

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Untersuchungen zum Einfluss von Grassilagen
mit niedrigen Reineiweißgehalten auf den Eiweißstoffwechsel
im Pansensaft *in-vitro***

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Nina Gresner
Celle

Hannover 2011

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. H. Bollwein
Klinik für Rinder
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Bollwein

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Kamphues

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2011

Gefördert durch die Niedersächsische Tierseuchenkasse

Most large animals, in fact,
are not the single individuals they seem to be.
They are walking menageries, whole communities of different species which,
in their various ways, are committed by evolution, for better or for worse,
in sickness and in health, to live together.
(David Attenborough, 1990)

Für meine Eltern und Lutz

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|-----|
| | Abkürzungsverzeichnis | vii |
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Schrifttum | 2 |
| 2.1 | Protein- und Stickstoffmetabolismus im Pansen | 2 |
| 2.1.1 | Ruminaler Proteinmetabolismus..... | 2 |
| 2.1.1.1 | Übersicht zum ruminalen mikrobiellen Proteinmetabolismus | 2 |
| 2.1.1.2 | Am ruminalen Proteinmetabolismus beteiligte Enzyme | 4 |
| 2.1.1.3 | Proteolytische Aktivität und Aktivitätsmuster von Proteasen im Pansensaft | 4 |
| 2.1.1.4 | Proteolyse im Pansen durch pflanzliche Proteasen | 5 |
| 2.1.1.5 | Einflussfaktoren auf die ruminale Abbaubarkeit von Proteinen..... | 6 |
| 2.1.1.5.1 | Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe..... | 6 |
| 2.1.1.5.1.1 | Tannine | 6 |
| 2.1.1.5.1.1.1 | Vorkommen von Tanninen und ihre chemische Struktur..... | 6 |
| 2.1.1.5.1.1.2 | Proteinpräzipitation durch Tannine | 8 |
| 2.1.1.5.1.1.3 | Ruminaler Abbau von Tanninen..... | 8 |
| 2.1.1.5.1.1.4 | Beeinflussung der ruminalen Verdauung durch Tannine | 9 |
| 2.1.1.5.1.1.5 | Einfluss von Tanninen auf die mikrobielle Proteolyse im Pansen | 11 |
| 2.1.1.5.1.1.6 | Einfluss von Tanninen auf das Wachstum ruminaler proteolytischer Bakterien..... | 11 |
| 2.1.1.5.1.1.7 | Einfluss pflanzlicher Tannine auf die mikrobielle Populationszusammensetzung im Pansen..... | 12 |
| 2.1.1.5.1.2 | Ätherische Öle | 12 |
| 2.1.1.5.1.3 | Saponine | 15 |
| 2.1.1.5.2 | Amylase und Zellulase | 16 |
| 2.1.1.5.3 | Weitere, den ruminalen Proteinabbau beeinflussende Faktoren..... | 16 |
| 2.1.2 | Ruminaler Peptidmetabolismus | 18 |
| 2.1.2.1 | Peptidkonzentration im Pansensaft..... | 18 |
| 2.1.2.2 | Peptidaufnahme durch Pansenbakterien | 19 |
| 2.1.2.3 | Mikrobieller Peptidabbau im Pansen..... | 19 |
| 2.1.2.4 | Mikrobieller Tri- und Dipeptidabbau im Pansen..... | 20 |
| 2.1.2.5 | Beeinflussung der ruminalen Peptidabbaubarkeit | 21 |
| 2.1.2.6 | Artifizielle Beeinflussung der ruminalen Peptidabbaubarkeit..... | 22 |
| 2.1.2.6.1 | Unterbindung der Peptidhydrolyse durch Modifizierung des N-Terminus | 22 |
| 2.1.2.6.2 | Unterbindung des Peptidabbaus mittels Peptidaseinhibitoren..... | 23 |
| 2.1.2.7 | Einfluss der Peptidkonzentration auf das Wachstum von Pansenbakterien | 24 |
| 2.1.3 | Ruminaler Aminosäurenmetabolismus..... | 25 |
| 2.1.3.1 | Aminosäurenkonzentration im Pansensaft | 25 |
| 2.1.3.2 | Aminosäureaufnahme durch Pansenbakterien..... | 25 |
| 2.1.3.2.1 | Aminosäureaufnahme durch Diffusion..... | 25 |
| 2.1.3.2.2 | Natriumabhängige Aminosäuretransportsysteme..... | 25 |
| 2.1.3.3 | Aminosäuresynthese durch ruminale Mikroorganismen | 27 |
| 2.1.3.4 | Aminosäurenabbau durch ruminale Mikroorganismen | 29 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 2.1.3.5 | Auswirkungen der An- und Abwesenheit freier Aminosäuren auf das Wachstum von Pansenbakterien | 31 |
| 2.1.3.6 | Hemmung des Wachstums von Pansenbakterien durch freie Aminosäuren | 32 |
| 2.1.3.7 | Einfluss der Peptid- und Aminosäurenkonzentrationen auf die Neusynthese von Aminosäuren und weiteren Stickstoffverbindungen durch Pansenbakterien | 33 |
| 2.1.3.8 | Ruminaler Lysin- und Methioninmetabolismus | 34 |
| 2.1.3.8.1 | Ruminaler Lysinmetabolismus | 34 |
| 2.1.3.8.2 | Ruminaler Methioninmetabolismus | 34 |
| 2.1.3.9 | Wirkungen nicht-proteinogener Aminosäuren im Pansen: Diaminobutylsäure und 2-Amino-4-N-Azetylaminobutylsäure | 36 |
| 2.1.3.10 | Aminosäurenprofil des pansenbeständigen Proteins | 36 |
| 2.1.3.11 | Aminosäurenprofile einzelner mikrobieller Fraktionen im Pansen..... | 39 |
| 2.1.3.11.1 | Beeinflussung der Aminosäurenprofile ruminaler Mikroorganismen..... | 41 |
| 2.1.4 | Ammoniak im Pansen..... | 43 |
| 2.1.4.1 | Ammoniakkonzentration im Pansensaft..... | 43 |
| 2.1.4.2 | Ammoniakaufnahme durch Pansenbakterien | 43 |
| 2.1.4.3 | Ammoniakassimilation durch Pansenbakterien..... | 44 |
| 2.1.4.4 | Ammoniaknutzung durch ruminale Mikroorganismen | 44 |
| 2.1.5 | Harnstoff, Nitrat, Nitrit, biogene Amine und Nukleobasen im Pansen | 46 |
| 2.1.6 | Abbau und Überdauern einzelner Stickstofffraktionen aus Grassilagen im Pansen..... | 46 |
| 2.1.7 | Kinetik einzelner Stickstofffraktionen im Pansen | 47 |
| 2.1.8 | Mikroorganismen im ruminalen Stickstoffstoffwechsel | 50 |
| 2.1.8.1 | Einzelne Bakterien im ruminalen Stickstoffstoffwechsel..... | 50 |
| 2.1.8.1.1 | <i>Prevotella</i> ssp. | 50 |
| 2.1.8.1.2 | <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> | 52 |
| 2.1.8.1.3 | <i>Clostridium proteoclasticum/Butyrivibrio proteoclasticus</i> | 52 |
| 2.1.8.1.4 | <i>Megasphaera elsdenii</i> | 53 |
| 2.1.8.1.5 | <i>Streptococcus bovis</i> | 53 |
| 2.1.8.1.6 | <i>Ruminobacter amylophilus</i> | 54 |
| 2.1.8.1.7 | <i>Selenomonas ruminantium</i> | 54 |
| 2.1.8.1.8 | <i>Lactobacillus</i> ssp. | 54 |
| 2.1.8.1.9 | <i>Eubacterium</i> | 54 |
| 2.1.8.1.10 | <i>Allisonella histaminiformans</i> | 54 |
| 2.1.8.1.11 | Hyperammoniumproduzierende Bakterien..... | 55 |
| 2.1.8.1.11.1 | Metabolische Eigenschaften der hyperammoniumproduzierenden Bakterien . | 57 |
| 2.1.8.1.11.2 | <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | 58 |
| 2.1.8.1.11.3 | <i>Clostridium sticklandii</i> | 58 |
| 2.1.8.1.11.4 | <i>Clostridium aminophilum</i> | 59 |
| 2.1.8.1.11.5 | <i>Eubacterium pyruvativorans</i> | 59 |
| 2.1.8.2 | Zusammensetzung der bakteriellen Population im Pansen | 60 |
| 2.1.8.2.1 | Methoden zur Untersuchung der bakteriellen Populationszusammensetzung . | 60 |
| 2.1.8.2.2 | Zusammensetzung der proteolytischen bakteriellen Population im Pansen..... | 61 |
| 2.1.8.2.3 | Veränderungen der bakteriellen Populationszusammensetzung im Pansen..... | 62 |
| 2.1.8.3 | Ruminale Protozoen und Pansenpilze | 64 |
| 2.1.9 | Abhängigkeit des ruminalen Stickstoff- vom Kohlenhydratstoffwechsel..... | 64 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.1.9.1 | Zeitliche Synchronisierung von Stickstoff- und Kohlenhydratstoffwechsel im Pansen..... | 65 |
| 2.2 | Reineiweiß | 69 |
| 2.2.1 | Reineiweißgehalte in Grassilagen..... | 70 |
| 3 | Eigene Untersuchungen | 71 |
| 3.1 | Versuchsziel..... | 71 |
| 3.2 | Material und Methoden..... | 71 |
| 3.2.1 | Das Langzeitinkubationssystem RUSITEC..... | 71 |
| 3.2.1.1 | Aufbau und Funktionsweise des RUSITEC-Systems | 71 |
| 3.2.1.2 | Inbetriebnahme des RUSITEC-Systems..... | 71 |
| 3.2.1.3 | Dauerbetrieb des RUSITEC-Systems..... | 73 |
| 3.2.1.4 | Zusammensetzung des verwendeten Puffers | 74 |
| 3.2.2 | Spendertier | 75 |
| 3.2.2.1 | Haltung und Fütterung des Spendertiers..... | 75 |
| 3.2.2.2 | Pansensaftentnahme und -entnahmeort | 75 |
| 3.2.3 | Futterkomponenten | 75 |
| 3.2.3.1 | Herkunft und Beschaffenheit des Heus | 75 |
| 3.2.3.2 | Herkunft und Beschaffenheit des Kraftfutters | 75 |
| 3.2.3.3 | Herkunft und Beschaffenheit der eingesetzten Grassilagen | 76 |
| 3.2.4 | Versuchsdurchführung..... | 78 |
| 3.2.5 | Analytik | 81 |
| 3.2.5.1 | Bestimmung der Ammoniakkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 82 |
| 3.2.5.2 | Bestimmung des Gehalts an bakteriellem Protein in der Fermenterflüssigkeit | 82 |
| 3.2.5.3 | Bestimmung der Konzentrationen von freien Aminosäuren und biogenen Aminen in der Fermenterflüssigkeit | 84 |
| 3.3 | Peptidmessung im Pansensaft mittels LC-MS/MS-Technik | 86 |
| 3.3.1.1 | In der Literatur beschriebene etablierte Methoden zur Messung von Peptiden im Pansensaft | 86 |
| 3.3.1.2 | Nutzung der ESI-MS(/MS)-Technik zur Messung von Peptiden in komplexen Matrices..... | 87 |
| 3.3.2 | Technische Grundlagen der ESI-MS/MS-Analytik..... | 88 |
| 3.3.3 | Eigene LC-MS/MS Messungen in Pansensaftproben..... | 90 |
| 3.3.3.1 | Versuchsablauf | 90 |
| 3.3.3.2 | LC-MS-Chromatogramme der Pansensaftproben | 93 |
| 3.3.3.2.1 | LC-MS-Chromatogramme bei einer Flussrate von 0,2 mL/min | 93 |
| 3.3.3.2.2 | LC-MS-Chromatogramme bei einer Flussrate von 0,3 mL/min | 95 |
| 3.3.3.3 | MS/MS-Spektrogramme der Pansensaftproben | 95 |
| 3.3.3.3.1 | Vorgehen bei der Auswertung der MS/MS-Spektrogramme | 96 |
| 3.3.3.3.2 | Auswertung des MS/MS-Spektrogramms des Ions mit $m/z = 249$ | 99 |
| 3.3.3.3.3 | Auswertung der MS/MS-Spektrogramme der Ionen mit $m/z = 295, 313, 339, 348, 353, 390, 499, 699$ und 715 | 101 |
| 3.3.3.3.4 | Auswertung der MS/MS-Spektrogramme der Ionen mit $m/z = 430, 514, 367$ und 901 | 101 |
| 3.3.3.4 | Abschließende Wertung..... | 103 |
| 3.3.3.4.1 | LC-MS-Untersuchungen der Pansensaftproben | 103 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.3.3.4.2 | LC-MS/MS-Untersuchungen der Pansensaftproben | 104 |
| 3.3.3.4.3 | Zusammenfassung | 104 |
| 3.4 | Datenerfassung und statistische Auswertung | 105 |
| 4 | Ergebnisse | 106 |
| 4.1 | Ammoniakkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 107 |
| 4.2 | Gehalt bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit | 109 |
| 4.3 | Aminosäurekonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit..... | 111 |
| 4.3.1 | Summe der gemessenen freien Aminosäuren in der Fermenterflüssigkeit | 112 |
| 4.3.2 | Aspartatkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 114 |
| 4.3.3 | Glutamatkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 116 |
| 4.3.4 | Serinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit..... | 118 |
| 4.3.5 | Histidinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 120 |
| 4.3.6 | Glycinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 122 |
| 4.3.7 | Threoninkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 124 |
| 4.3.8 | Alaninkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 126 |
| 4.3.9 | Argininkonzentration in der Fermenterflüssigkeit..... | 128 |
| 4.3.10 | Tyrosinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit..... | 130 |
| 4.3.11 | Valinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 132 |
| 4.3.12 | Methioninkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 134 |
| 4.3.13 | Tryptophankonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 136 |
| 4.3.14 | Phenylalaninkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 138 |
| 4.3.15 | Isoleucinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 140 |
| 4.3.16 | Leucinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit..... | 142 |
| 4.4 | Konzentrationen biogener Amine in der Fermenterflüssigkeit | 144 |
| 4.4.1 | Serotoninkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 144 |
| 4.4.2 | Tyraminkonzentration in der Fermenterflüssigkeit | 146 |
| 4.5 | Freie Aminosäuren-Pools in der Fermenterflüssigkeit und statistische Analyse der Ergebnisse..... | 147 |
| 4.5.1 | Freie Aminosäuren-Pools in der Fermenterflüssigkeit während der Kontrollphasen..... | 148 |
| 4.5.2 | Freie Aminosäuren-Pools in der Fermenterflüssigkeit während der Versuchsphasen | 150 |
| 4.5.2.1 | Freie Aminosäuren-Pools während der Versuchsphasen unter Zulagen der Kontrollgrassilage 01 | 150 |
| 4.5.2.2 | Freie Aminosäuren-Pools während der Versuchsphasen unter Zulagen der Schadgrassilagen | 150 |
| 4.5.3 | Freie Aminosäuren-Pools in der Fermenterflüssigkeit während der Auslaufphasen..... | 154 |
| 4.5.3.1 | Freie Aminosäuren-Pools während der Auslaufphasen nach Zulagen der Kontrollgrassilage 01 | 154 |
| 4.5.3.2 | Freie Aminosäuren-Pools während der Auslaufphasen nach Zulagen der Schadgrassilagen..... | 154 |
| 4.6 | Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 157 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 5 | Diskussion | 159 |
| 5.1 | Intention der Arbeit..... | 159 |
| 5.2 | Kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus | 159 |
| 5.2.1 | Das RUSITEC-System und Inokulum..... | 159 |
| 5.2.2 | Eingesetzte Grassilagen | 160 |
| 5.2.2.1 | Reineiweißgehalte der eingesetzten Grassilagen..... | 160 |
| 5.2.2.2 | Gehalte freier Aminosäuren in den eingesetzten Grassilagen | 162 |
| 5.2.2.3 | Aminosäurengesamt- und Ammoniakgehalte in den eingesetzten Grassilagen | 163 |
| 5.2.2.4 | Anteile freier Aminosäuren an den Aminosäurengesamtgehalten in den eingesetzten Grassilagen..... | 165 |
| 5.2.2.5 | Prozentuale Anteile einzelner Stickstoffverbindungsfraktionen in den eingesetzten Grassilagen..... | 166 |
| 5.3 | Kritik der erfassten Parameter zur Kontrolle des ruminalen Proteinstoffwechsels | 167 |
| 5.3.1 | Ammoniakkonzentration und Gehalt an bakteriellem Protein | 167 |
| 5.3.2 | Konzentrationen freier Aminosäuren und biogener Amine..... | 167 |
| 5.3.3 | Ergebnisdarstellung der Konzentrationsbestimmungen der freien Aminosäuren..... | 169 |
| 5.4 | Statistik | 169 |
| 5.5 | Auswirkungen der Schadgrassilagen auf den ruminalen Proteinstoffwechsel..... | 170 |
| 5.5.1 | Auswirkungen auf die Ammoniakkonzentration im Pansensaft | 170 |
| 5.5.2 | Auswirkungen auf den Gehalt an bakteriellem Protein im Pansensaft..... | 172 |
| 5.5.3 | Auswirkungen auf die Stickstoffnutzungseffizienz der flüssigkeitsassoziierten Bakterien..... | 177 |
| 5.5.4 | Auswirkungen auf die Konzentrationen freier Aminosäuren und die Zusammensetzung des Pools der freien Aminosäuren im Pansensaft..... | 179 |
| 5.6 | Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch Schadgrassilagen der Gruppen 1, 2 und 3 sowie die Schadgrassilagen 04 und 09 | 184 |
| 5.6.1 | Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilagen 07 und 10 (Gruppe 1)..... | 184 |
| 5.6.2 | Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilagen 02 und 11 (Gruppe 2)..... | 185 |
| 5.6.3 | Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilagen 05, 08, 12 und 13 (Gruppe 3)..... | 186 |
| 5.6.4 | Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilage 04..... | 188 |
| 5.6.5 | Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilage 09..... | 189 |
| 5.7 | Ergänzende Kontrollgrassilagen (isogenic counterparts) | 190 |
| 5.8 | Abschließende Wertung..... | 191 |
| 6 | Zusammenfassung | 194 |
| 7 | Summary | 196 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 8 | Schrifttumsverzeichnis | 198 |
| 9 | Anhang | 247 |
| 9.1 | Probenentnahmeplan im Rahmen des gesamten Projekts | 247 |
| 9.2 | Aminosäuren- und Ammoniakgehalte, Gehalte freier Aminosäuren und Anteile der freien Aminosäuren an den Gesamtaminosäuregehalten in den eingesetzten Grassilagen | 248 |
| 9.3 | Eichkurve der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) | 254 |
| 9.4 | Verwendete HPLC-Gradienten für die Aminosäuremessungen in der Fermenterflüssigkeit | 255 |
| 9.5 | Beispielchromatogramme des Aminosäurenstandards und der analysierten Fermenterflüssigkeitsproben | 255 |
| 9.6 | Zusammensetzung des Aminosäurenstandardgemisches zur täglichen Überprüfung der Analysengeräte | 259 |
| 9.7 | Ergebnisse der Versuche | 260 |
| 9.8 | Informationen zu den Grassilagen der Vergleichsstudien aus Kapitel 5.2 | 295 |
| 9.9 | Aminosäurenkonzentrationen in Pansensaft in der Literatur | 295 |
| 9.10 | Konzentrationen freier Aminosäuren und biogener Amine in den Pansensaftinokulaten des Spendertiers | 297 |
| 9.11 | Ermittlung der Stickstoffnutzungseffizienz der flüssigkeitsassoziierten Bakterien | 297 |
| 9.12 | Flüssigkeitsverdrängung durch die eingesetzten Grassilagen | 299 |
| 9.13 | Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilagen 07, 08, 10, 11, 12 und 13 (Flussdiagramme) | 300 |
| 9.14 | Ergänzende Kontrollgrassilagen: Auswirkungen von Zulagen der Kontrollgrassilagen auf die Parameter Ammoniakkonzentration, Gehalt bakteriellen Proteins und Konzentrationen an freien Aminosäuren und biogenen Aminen in der Fermenterflüssigkeit | 303 |
| 9.15 | Täglicher Stickstoffinput in den RUSITEC und Stickstoffwieder- findung im Kompartiment 1 (Pansensaft bzw. Fermenterflüssigkeit) | 310 |

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|------------------|---|-----------|---|
| Abb. | Abbildung | Gew.-% | Gewichtsprozent |
| ADF | saure Detergens-Faser | ggf. | gegebenenfalls |
| ADP | Adenosindiphosphat | GLDH | Glutamatdehydrogenase |
| Ala | Alanin | Gln | Glutamin |
| Arg | Arginin | Glu | Glutam/ Glutaminsäure |
| ARISA | automated ribosomal intergenic spacer analysis | Gly | Glycin |
| AS | Aminosäure | HAP | hyperammoniumproduzierende Bakterien |
| Asn | Asparagin | His | Histidin |
| Asp | Aspartat/Asparaginsäure | HMB | 2-Hydroxy-4-methylthio-butylsäure |
| ATP | Adenosintriphosphat | HT | hydrolysierbare Tannine |
| <i>B.</i> | <i>Butyrivibrio</i> | iHMB | Isopropylester von 2-Hydroxy-4-methylthiobutylsäure (HMB) |
| BRENDA | BRAunschweig ENzyme DAtabase | HPLC | high performance liquid chromatography |
| bzw. | beziehungsweise | Ile | Isoleucin |
| <i>C.</i> | <i>Clostridium</i> | inkl. | inklusive |
| °C | Grad Celsius | IUBMB | International Union of Biochemistry and Molecular Biology |
| ca. | circa | K | Kontrollgrassilage |
| CID | collision induced fragmentation | k | kilo |
| CNCPS | Cornell Net Carbohydrate and Protein Evaluation System | k.A. | keine Angabe |
| Cys | Cystein | Kap. | Kapitel |
| Da | Dalton | KF | Kontrollfermenter |
| DABA | Diaminobutylsäure | KT | kondensierte Tannine |
| DAP | Diaminopimelat | L | Liter |
| DESI | desorption electrospray ionization | <i>L.</i> | <i>Lachnospira</i> |
| DGGE | denaturing gradient gel electrophoresis | LC | liquid chromatography |
| d.h. | das heißt | Leu | Leucin |
| DPP | Dipeptidylaminopeptidase | LHCP II | Protein der Lichtsammelfalle im Photosystem II (light harvesting chlorophyll binding protein) |
| ESI | Elektrosprayionisierung | LSU | große Untereinheit von Rubisco (large subunit) |
| etc. | et cetera | Lys | Lysin |
| <i>Eu.</i> | <i>Eubacterium</i> | m | milli |
| exkl. | exklusive | μ | micro |
| <i>F.</i> | <i>Fibrobacter</i> | M | Molekulargewicht [g/mol] |
| Fa. | Firma | <i>M.</i> | <i>Megasphaera</i> |
| FAB | flüssigkeitsassoziierte Bakterien | Met | Methionin |
| FAB ₁ | flüssigkeitsassoziierte Bakterien im ruminalen Kompartiment 1 | min | Minute |
| fAS | freie Aminosäuren | MJ | Megajoule |
| Ferm. | Fermenter | μm | Micrometer |
| FIFS | flüchtige Fettsäuren | MS | Massenspektrometrie |
| FM | Futtermittel | m/z | Masse- zu Ladungsverhältnis von Molekülonen |
| g | Gramm | | |
| GB | Großbritannien | | |

| | | | |
|-------------------|--|-----------|---|
| nm | Nanometer | RUSITEC | RUmen SIMulation TECnique |
| MNA | 4-Methoxy- β -naphthylamid | S | Schadgrassilage |
| mol | Mol | Σ | Summe |
| N | Stickstoff | s | Standardabweichung |
| n | Anzahl | s. | siehe |
| NAD(P)H | Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat) | S. | <i>Selenomonas</i> |
| NAN | Nicht-Ammoniak-N | Sc. | <i>Streptococcus</i> |
| N-DABA | N-Azetyldiaminobutylsäure | Ser | Serin |
| NDF | neutrale Detergens-Faser | Seroton | Serotonin |
| NEL | Nettoenergie-Laktation | SSU | kleine Untereinheit von Rubisco (small subunit) |
| NfE | N-freie Extraktstoffe | Tab. | Tabelle |
| NPN | nicht-Protein-N | TCA | Trichloressigsäure |
| NRE-N | nicht-Reineiweiß-N | Thr | Threonin |
| n.s. | nicht signifikant | TMR | Totale-Misch-Ration |
| OPA | σ -Phthaldialdehyd | Trp | Tryptophan |
| p | Signifikanz der Differenz | TS | Trockensubstanz |
| p_{Konz} | p bezogen auf Konzentration | Tyr | Tyrosin |
| $p\%$ | p bezogen auf Anteil [%] | Tyram | Tyramin |
| <i>P.</i> | <i>Prevotella</i> | u. | und |
| PAB | partikelassoziierte Bakterien | u.a. | unter anderem |
| PAS | Pansensaft | Überst. | Überstand |
| PB | Pansenbakterien | uS | ursprüngliche Substanz |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion | Val | Valin |
| Phe | Phenylalanin | VDLUFA | Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten |
| PI | Panseninhalt | Verb. | Verbindung |
| P_i | anorganisches Phosphat | VF | Versuchsfermenter |
| PI_f | fester Panseninhalt | VK | Variationskoeffizient |
| PM | Pansenmikroorganismen | vs. | versus |
| PP | Pansenprotozoen | \bar{x} | arithmetischer Mittelwert |
| ppm | parts per million | xg | mal Erdbeschleunigung |
| Pro | Prolin | * | schwach signifikant ($p < 0,05$) |
| <i>Psc.</i> | <i>Peptostreptococcus</i> | ** | signifikant ($p < 0,01$) |
| r | Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson | *** | hoch signifikant ($p < 0,001$) |
| <i>Rb.</i> | <i>Ruminobacter</i> | % | Prozent |
| <i>Rc.</i> | <i>Ruminococcus</i> | >/< | größer/kleiner als |
| RE | Reineiweiß | + | positiver Effekt |
| Ref. | Referenz | - | kein Effekt/keine Änderung |
| RIS/LP | ribosomal intergenic spacer analysis/length polymorphism | ↑ | geringgradige Zunahme |
| Rp | Rohprotein | ↑↑ | mittelgradige Zunahme |
| RSA | Rinderserumalbumin | ↑↑↑ | hochgradige Zunahme |
| Rubisco | Ribulosebisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase | ↑↑↑↑ | höchstgradige Zunahme |
| RUP | pansenbeständiges Protein (ruminally undegradable protein) | ↓ | geringgradige Abnahme |
| | | ↓↓ | mittelgradige Abnahme |
| | | ↓↓↓ | hochgradige Abnahme |

1 Einleitung

In den letzten zwei Jahrzehnten hat in norddeutschen, grassilagebasiert gefütterten Milchviehbeständen die Inzidenz von Erkrankungen, die nach EICKEN (2005 a) unter dem Namen „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ zusammengefasst werden, stark zugenommen. In betroffenen Betrieben treten infolge einer Beeinträchtigung des intermediären Stoffwechsels vermehrt Nachgeburtsverhaltung, Sterilität, erhöhte Milchzellzahl, Lahmheiten, Stoffwechselerkrankungen, Verdauungsstörungen, Labmagenverlagerung und Festliegen bis hin zu plötzlichen Todesfällen auf. Darüber hinaus bedingen Immun- und Leistungsdepression hohe finanzielle Einbußen (EICKEN 2005 a).

Es wird ein ätiologischer Zusammenhang mit der Eiweißqualität der Grassilagen vermutet (EICKEN 2005 a, b), da die Grassilagen in betroffenen Betrieben überwiegend niedrige prozentuale Reineiweißanteile am Rohprotein aufwiesen. Des Weiteren führten ein Absetzen bzw. Verschneiden der Grassilagen sowie Zulagen von Futtermitteln mit hohen Reineiweißanteilen am Rohprotein zur klinischen Erholung (EICKEN 2005 b).

Die Proteinversorgung eines Rindes wird neben pansenstabilem Protein vor allem durch das im Pansen synthetisierte mikrobielle Protein sichergestellt (BEEVER 1993). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des *in-vitro*-Systems RUSITEC untersucht werden, ob Zulagen von Grassilagen, die niedrige Reineiweißanteile am Rohprotein aufweisen und bzw. oder im Verdacht stehen, auf den Herkunftsbetrieben zur Entstehung des oben beschriebenen Krankheitsbildes beigetragen haben, zu Veränderungen im ruminalen Proteinstoffwechsel im Pansensaft führen. Die Ammoniakkonzentrationen wurden gemessen um zu überprüfen, ob es zu einem vermehrten Abbau von Aminosäuren kommt. Die Bestimmung der Gehalte bakteriellen Proteins im Pansensaft sollte wiederum bei der Beantwortung der Frage helfen, ob die Synthese bakterieller N-Verbindungen der flüssigkeitsassoziierten Pansenbakterien eingeschränkt wird. Des Weiteren wurden die Konzentrationen freier Aminosäuren in der RUSITEC-Fermenterflüssigkeit bestimmt, um ggf. Rückschlüsse auf eine Verschiebung im Konzentrationsmuster der freien Aminosäuren im Pansensaft ziehen zu können.

Um in Zukunft auch die Peptidfraktion als Parameter des ruminalen Proteinstoffwechsels erfassen zu können, wurden ferner erste LC-MS/MS-Analysen durchgeführt. Diese sollten zeigen, ob ein schnelles „Screening“ nativer Pansensaftproben auf ihren Gehalt an Peptiden möglich ist.

2 Schrifttum

Das Schrifttum der vorliegenden Arbeit befasst sich mit dem Protein- und Stickstoffstoffwechsel im Pansen. Die letzten im Pansenlabor der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover erstellten thematisch ähnlichen Übersichten wurden bereits vor einigen Jahren verfasst. HÖLTERSHINKEN (1990) erarbeitete eine Übersicht zum ruminalen Proteinstoffwechsel, BRÖCKER (1996) beschäftigte sich speziell mit dem Metabolismus von Aminosäuren und biogenen Aminen im Pansen. An dieser Stelle sollen verstärkt neue und bisher unberücksichtigte Aspekte des ruminalen Proteinstoffwechsels aufgegriffen werden.

2.1 Protein- und Stickstoffmetabolismus im Pansen

2.1.1 Ruminaler Proteinmetabolismus

Der Wiederkäuer bezieht Aminosäuren (AS) und Proteine für seinen eigenen Stoffwechsel über das im Pansen synthetisierte mikrobielle Protein (BEEVER 1993; WALLACE et al. 1994; BRODERICK 1995; WALLACE et al. 1997 a; NOLAN u. DOBOS 2005), Futterprotein, das dort nicht abgebaut wurde (BRODERICK et al. 1991; BEEVER 1993; WALLACE et al. 1994; BRODERICK 1995; NOLAN u. DOBOS 2005), und endogene Proteinsekretion (u.a. abgeschilferte Zellen; RICHARDSON u. HATFIELD 1978; WALLACE et al. 1997 a; NOLAN u. DOBOS 2005). Da die Bereitstellung in erster Linie über mikrobielles Protein (MUSCATO et al. 1983; WALLACE 1992 c; BEEVER 1993; NOLAN 1993; FIRKINS 1996; WALLACE et al. 1997 a; BRODERICK et al. 2006) und in erst in zweiter Linie durch nicht abgebautes Futterprotein erfolgt (MUSCATO et al. 1983; SHABI et al. 2000), ist der mikrobielle Eiweißstoffwechsel im Pansen von besonderer Bedeutung für den Wiederkäuer.

2.1.1.1 Übersicht zum ruminalen mikrobiellen Proteinmetabolismus

Pansenbakterien bauen Proteine zunächst extrazellulär zu Peptiden und AS ab (Proteolyse). Sowohl AS als auch Peptide werden von ihnen aufgenommen und die Peptide intrazellulär in AS zerlegt (Peptidolyse; TAMMINGA 1979; HOOVER u. STOKES 1991). Diese dienen dann der bakteriellen Proteinsynthese oder der Energiegewinnung (TAMMINGA 1979; NOCEK u. RUSSELL 1988) unter Bildung und Exkretion von flüchtigen Fettsäuren, Kohlenstoffdioxid und Ammoniak (Desaminierung). Über den Bedarf hinaus aufgenommener AS-N kann von Pansenbakterien nur nach Abbau zu Ammoniak abgegeben werden (TAMMINGA 1979).

Protozoen wiederum sind maßgeblich am Turnover des bakteriellen Proteins beteiligt (WALLACE et al. 1997 a), da sie neben unlöslichen Futterproteinen (JOUANY 1996) bzw. größeren Proteinpartikeln (WALLACE et al. 1997 a) vor allem bakterielles Protein nutzen (Aufnahme ganzer Bakterien; BONHOMME 1990; THEODOROU u. FRANCE 1993). Nur einige Protozoen sind darüber hinaus in der Lage, freie AS aufzunehmen (BONHOMME 1990). Die Proteolyse bei Protozoen findet intrazellulär statt (TAMMINGA 1979), die Prote-

asen gelangen nicht in das umgebende Medium (entodinomorphe Spezies; JOUANY 1996). Dabei frei gesetzte AS nutzen Protozoen direkt zur Proteinsynthese, nicht benötigte AS werden meistens ausgeschieden, und nicht wie von Bakterien im Pansen desaminiert (BONHOMME 1990). Ausnahmen gibt es bei Ciliaten, die einige AS desaminieren und Ammoniak freisetzen können (BRODERICK et al. 1991; WALLACE et al. 1997 a).

Sowohl Ammoniak (TAMMINGA et al. 1979; WALLACE et al. 1997 a), i-Butter-, i-Valerian- und Valeriansäure (RUSSELL et al. 1991; CARRO u. MILLER 1999; RUSSI et al. 2002) als Endprodukte als auch α -Ketosäuren als Zwischenprodukte im AS-Abbau werden neben freien AS im Pansensaft wieder von Mikroorganismen aufgenommen und zur mikrobiellen Proteinsynthese genutzt (TAMMINGA 1979). Ammoniak ist somit sowohl Hauptendprodukt des Proteinkatabolismus als auch wichtigstes Substrat der mikrobiellen Proteinsynthese. Endogener Harnstoff, der mit dem Speichel und über die Pansenwand in den Pansen gelangt, ist nur von Bedeutung, wenn wenig Protein gefüttert wird (WALLACE et al. 1997 a). Substrate der Protozoen sind vermutlich vorwiegend AS aus Bakterien und nicht nutritive AS (BRODERICK et al. 1991).

Ammoniak, das nicht mikrobiell fixiert wird, kann durch die Pansenwand aufgenommen (LENG u. NOLAN 1984; NOLAN 1993) und in der Leber zu Harnstoff umgesetzt werden. Dieser gelangt mit dem Speichel zurück in den Pansen oder muss renal ausgeschieden werden (s.o.; NOCEK u. RUSSELL 1988; ERASMUS 1991; MARINI et al. 2006).

Abbildung 2.1 gibt einen Überblick über den ruminalen mikrobiellen Proteinmetabolismus.

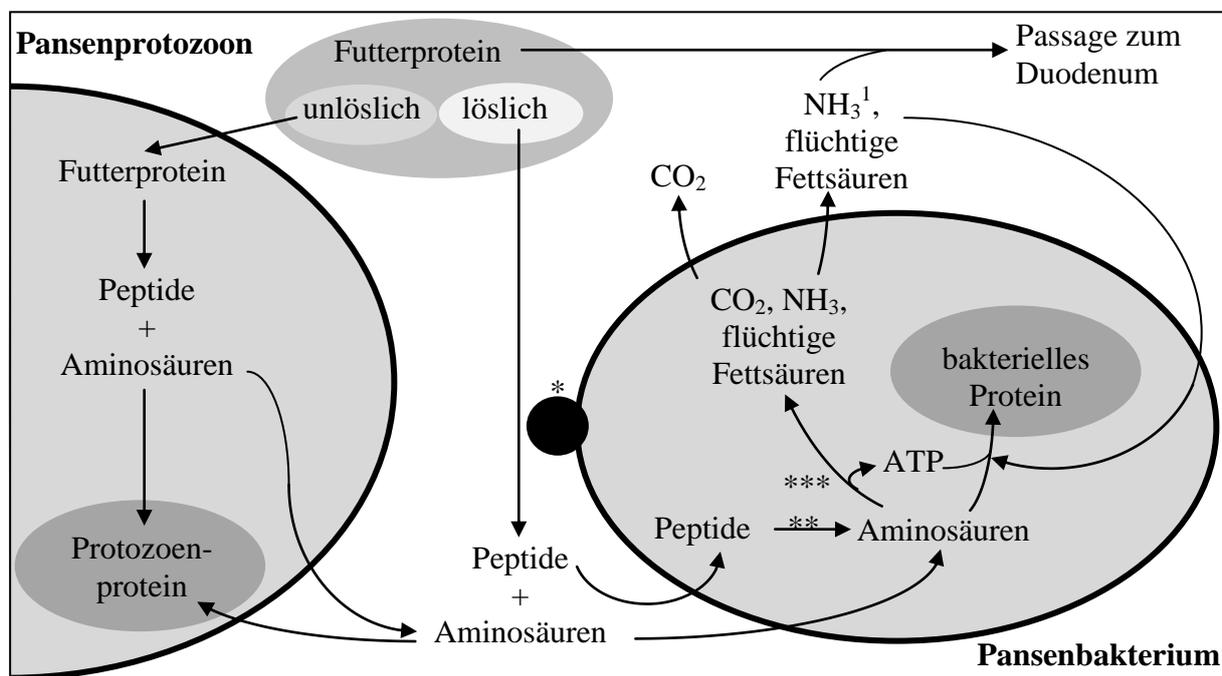


Abb. 2.1: Der ruminale mikrobielle Proteinmetabolismus (nach TAMMINGA 1979, BONHOMME 1990, BRODERICK et al. 1991, HOOVER u. STOKES 1991, RUSSEL et al. 1991, NOLAN 1993, WALLACE 1994, JOUANY 1996, BACH et al. 2005 und NOLAN u. DOBOS 2005). Nicht berücksichtigt sind die Aufnahme bakteriellen Proteins durch Protozoen und der Beitrag endogener N-Verbindungen (inkl. Harnstoff) zur mikrobiellen Proteinsynthese.

¹ teilweise auch direkter Eintrag mit dem Futter (Peptide, AS, NH_3)

* extrazelluläre Protease; ** Peptidase; *** Desaminase

Uneinigkeit herrscht darüber, welcher Schritt im Proteinabbau geschwindigkeitsbestimmend ist. Geringere Produktion bakterieller N-Verbindungen mit Proteinen gegenüber Peptiden bzw. Aminosäuren als N-Quelle (GRISWOLD et al. 1996) und niedrige ruminale Konzentrationen freier AS und Peptide (GRISWOLD u. MACKIE 1997) machen die Proteolyse zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. CARDOZO et al. (2004) und BACH et al. (2005) führen die von ihnen beobachtete Akkumulation freier AS nach der Fütterung schließlich auf begrenzte mikrobielle AS-Aufnahmekapazität zurück. Bei Fütterung grassilagebasierter Rationen scheint wiederum die Peptidolyse der limitierende Schritt zu sein (CHOI 2002). Es kann gefolgert werden, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt vermutlich nicht bei allen Fütterungsregimen und Versuchsbedingungen gleich ist und maßgeblich von der Art der verfütterten Proteine, der Beschaffenheit der Ration (BRODERICK et al. 1991) und der mikrobiellen Population beeinflusst wird.

2.1.1.2 Am ruminalem Proteinmetabolismus beteiligte Enzyme

Um den Ablauf der oben genannten Reaktionen zu gewährleisten, ist eine Vielzahl von Enzymen notwendig (s. HÖLTERSHINKEN 1990). Die proteolytischen, peptidolytischen und ureolytischen Enzyme ruminaler Mikroorganismen wurden in einer Übersicht von HÖLTERSHINKEN (1990) zusammengetragen und einzelnen Mikroorganismen zugeordnet. Von besonderer Bedeutung sind neben mikrobiellen auch pflanzliche Proteasen, die in frischem Grünfutter noch aktiv sind und zur Proteolyse im Pansen beitragen (THEODOROU et al. 1996; ZHU et al. 1999; KINGSTON-SMITH u. THEODOROU 2000; WALLACE et al. 2001; BEHA et al. 2002; KINGSTON-SMITH et al. 2002, 2003, 2005; PACHECO et al. 2007). Mit der Bedeutung der pflanzlichen Proteasen im Pansen beschäftigt sich Kapitel 2.1.1.4.

2.1.1.3 Proteolytische Aktivität und Aktivitätsmuster von Proteasen im Pansensaft

Proteinabbauprodukte zeigen postprandial variable Konzentrationen im Pansensaft (CHEN et al. 1987 a; WILLIAMS u. COCKBURN 1991), während die ruminale proteolytische Aktivität keine zeitlichen Schwankungen aufweist (WALLACE et al. 2000). Ihre absolute Höhe zu einem bestimmten Zeitpunkt wird weder *in-vivo* durch den Fütterungszeitpunkt (WALLACE et al. 2000) noch *in-vitro* (LEGLEITER et al. 2005) durch Natur und Konzentration eines Proteinsupplements beeinflusst. Proteinabbauprodukte akkumulieren folglich nicht auf Grund gesteigener proteolytischer Aktivität, sondern in Anhängigkeit vom Angebot an Proteinen (WALLACE et al. 2000).

Zudem besitzt jedes Tier ein individuelles, zeitlich stabiles Proteinaseaktivitätsmuster. Variationen zwischen einzelnen Tieren werden durch Konzentratfütterung erhöht. Da in den Proteinaseaktivitätsmustern keine bestimmten Proteinase dominieren, und einzelne Enzyme nur teilweise bei mehreren Tieren zu finden sind, müssen einige mikrobielle Spezies zwar regelmäßig proteolytisch aktiv sein, die Proteolyse zu dominieren scheint aber keine (FALCONER u. WALLACE 1998). Individuell unterschiedlich hohe proteolytische Aktivitäten zu gleichen Zeitpunkten führen WALLACE et al. (2000) daher auf verschiedene mikrobielle Populationen bei einzelnen Tieren zurück.

2.1.1.4 Proteolyse im Pansen durch pflanzliche Proteasen

Während früher unterstellt wurde, dass der ruminale Proteinabbau ein ausschließlich bzw. überwiegend durch Mikroorganismen vermittelter Prozess sei (NUGENT u. MANGAN 1981; WALLACE et al. 1999), geht man heute zunehmend davon aus, dass nach Aufnahme frischen Grünfutters auch pflanzliche Proteasen am ruminalem Proteinabbau beteiligt sind (THEODOROU et al. 1996; ZHU et al. 1999; KINGSTON-SMITH u. THEODOROU 2000; WALLACE et al. 2001; BEHA et al. 2002; KINGSTON-SMITH et al. 2002, 2003, 2005; PACHECO et al. 2007). Nach KINGSTON-SMITH und THEODOROU (2000) soll besonders in den ersten zwei Stunden nach der Futteraufnahme verstärkt durch pflanzliche Proteasen selbst vermittelte Proteolyse auftreten, bevor nach etwa drei Stunden zellulolytische Mikroorganismen bzw. mechanische Einwirkungen (Kauen, Futtermittelbearbeitung) die Zellwände zerstört haben und kleine Peptide und AS austreten (s. Abb. 2.2).

Bei keimfreier Inkubation von Weidelgras (*Lolium perenne*) unter pansenähnlichen Bedingungen stellte sich heraus, dass die große Untereinheit (LSU) des Pflanzenproteins Rubisco im Weidelgras vollständig durch pflanzeneigene Proteasen abbaubar ist (ZHU et al. 1999; BEHA et al. 2002; LÖSCHE et al. 2007). Der Abbau findet in den Chloroplasten statt (BEHA et al. 2002) und führt zur Akkumulation kleiner Polypeptide mit einem Molekulargewicht unter 20 kDa (ZHU et al. 1999; LÖSCHE et al. 2007). Sind ruminale Mikroorganismen anwesend, findet keine Peptidakkumulation statt (ZHU et al. 1999). Die LSU verschiedener Kleearten (*Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*) wird weder von pflanzlichen noch von mikrobiellen Enzymen vollständig abgebaut, in Hornklee (*Lotus corniculatus*) ist die LSU selbst nach 24 Stunden noch nachweisbar (ZHU et al. 1999). Ursachen sind womöglich Enzyminhibition oder Bindung von Rubisco durch Tannine (s. Kap. 2.1.1.5.1.1).

Im Gegensatz zur LSU weisen die kleine Untereinheit (SSU) von Rubisco und das Protein LHCP II, ein chlorophyllbindendes Protein der Lichtsammelfalle des Photosystems II (light harvesting chlorophyll binding protein), eine größere Resistenz gegen proteolytische Enzyme auf (ZHU et al. 1999; BEHA et al. 2002).

Der bei keimfreier Inkubation abnehmende Protein- und AS-Gehalt im Pflanzenmaterial wird unter pansenähnlichen Bedingungen von steigenden Protein- und AS-Gehalten im Inkubationsmedium begleitet (BEHA et al. 2002), wohingegen bei niedrigerer Temperatur (25 °C) deutlich weniger Protein abgebaut wird (BEHA et al. 2002; KINGSTON-SMITH et al. 2003). Weiterhin scheint der pflanzenvermittelte Proteinabbau unter pansenähnlichen Bedingungen auf der Stufe der AS zu enden (BEHA et al. 2002), was die deutlich geringe Ammoniakproduktion unter Ausschluss ruminaler, mikrobieller Enzyme im Pansen bestätigt (KINGSTON-SMITH et al. 2005). Dies stützt die Annahme, dass Proteolyse durch pflanzeneigene Proteasen im Pansen vor allem in frühen Proteolysestadien von Bedeutung ist (s.o., Akkumulation von Polypeptiden; ZHU et al. 1999).

Mittlerweile konnte eindeutig nachgewiesen werden (KINGSTON-SMITH et al. 2005), dass auch *in-vivo* im Pansen eine durch pflanzliche Proteasen vermittelte Proteolyse stattfindet. Während Rubisco größtenteils abgebaut wird, widerstehen das membranassoziierte LHCP II und die pflanzlichen Proteasen selbst der Proteolyse. Pflanzliche Proteasen werden außerdem in die Pansenflüssigkeit frei gesetzt und können dort möglicherweise aktiv bleiben und eventuell sogar akkumulieren.

Abbildung 2.2 zeigt den Beitrag der pflanzlichen Proteolyse zum ruminalem Proteinabbau.

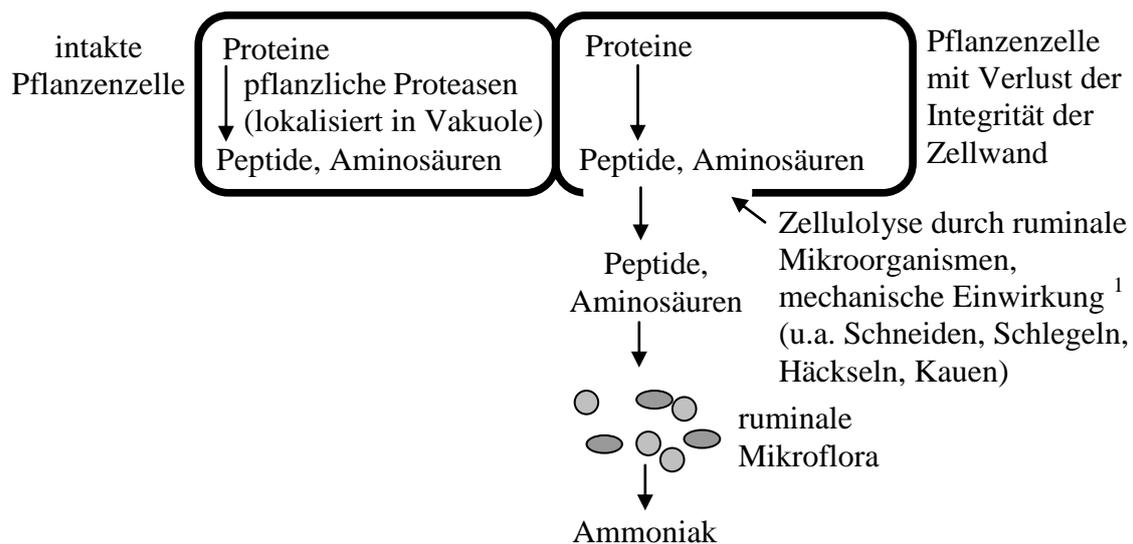


Abb. 2.2: *Erweitertes Modell nach KINGSTON-SMITH und THEODOROU (2000) zum Beitrag der pflanzlichen Proteolyse im ruminalen Proteinabbau*
¹ laut persönlicher Mitteilung von Herrn Prof. Dr. J. Kamphues, Hannover am 23.03.2011

2.1.1.5 Einflussfaktoren auf die ruminale Abbaubarkeit von Proteinen

2.1.1.5.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Einige sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe greifen in den ruminalen Proteinstoffwechsel ein (BARRY u. MANLEY 1986; BAE et al. 1993; JONES et al. 1994; WALLACE et al. 1994; TANNER et al. 1996; HRISTOV et al. 1999; MOLAN et al. 2001; McINTOSH et al. 2003; CARDOZO et al. 2004, 2005, 2006; BUSQUET et al. 2005, 2006; PATRA u. SAXENA 2009). Nach CALSAMIGLIA et al. (2007) werden Tannine, ätherische Öle und Saponine unterschieden.

2.1.1.5.1.1 Tannine

2.1.1.5.1.1.1 Vorkommen von Tanninen und ihre chemische Struktur

Tannine werden in allen Feldfrüchten gefunden, in hohen Konzentrationen treten sie vor allem in Leguminosen wie Esparsetten und Hornklee auf (BEEVER 1993), während Gräser nur geringe Konzentrationen enthalten (McLEOD 1974). Weitere tanninhaltige Pflanzenspezies können Tabelle 2.1 entnommen werden.

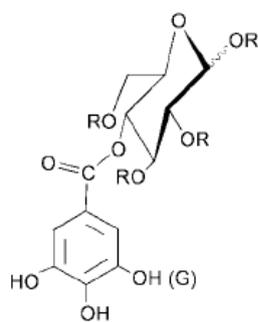
In der Stoffgruppe der Tannine wird hauptsächlich zwischen hydrolysierbaren und kondensierten Tanninen unterschieden (SWAIN 1979; BHAT et al. 1998; PATRA u. SAXENA 2009). Hydrolysierbare Tannine (HT)¹ haben Molekulargewichte von 1000 bis 1500 Da und bestehen aus Glukose oder anderen Polyolen, die mit Gallussäure verestert sind (SWAIN

¹ Im Gegensatz zu kondensierten Tanninen stehen zur Wirkung hydrolysierbarer Tannine auf den ruminalen Stoffwechsel weitaus weniger Informationen zur Verfügung (HRISTOV et al. 2003). Die folgenden Kapitel

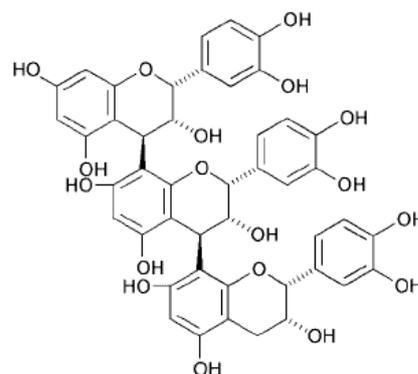
1979). Kondensierte Tannine (KT) sind Oligomere aus kondensierten Flavan-3-ol- oder Flavan-3,4-dioleinheiten (SWAIN 1979) und besitzen keinen Kohlenhydratkern (McLEOD 1974). Am häufigsten kommen Tetra-, Penta- und Hexamere vor, zum Teil werden aber auch Decamere gefunden (HEDQVIST et al. 2000). Monomere sind Catechin, Epicatechin, Gallo catechin (FOO et al. 1996; HEDQVIST et al. 2000) und Epigallocatechin (FOO et al. 1997; HEDQVIST et al. 2000). Homopolymere aus (Epi-)Catechin sind selten, solche aus (Epi-)Gallocatechin konnten bislang nicht nachgewiesen werden. Die meisten Oligopolymere enthalten aber mindestens ein bis zwei (Epi-)Gallocatechinmonomere (HEDQVIST et al. 2000). Die Molekulargewichte einzelner KT sind sehr heterogen und zeigen zwischen einzelnen Pflanzenspezies, aber auch innerhalb einer Spezies (FOO et al. 1982) große Unterschiede, wie Tabelle 2.1 zeigt. Abbildung 2.3 gibt exemplarisch den chemischen Aufbau eines HT- und eines KT-Moleküls wieder.

Tab. 2.1: Molekulargewichte [Da] kondensierter Tannine und ihr Vorkommen in verschiedenen Pflanzen

| Autor, Jahr | Molekulargewicht [Da] | Spezies |
|------------------------|-----------------------|---|
| FOO et al. 1982 | 2000 bis 4000 | <i>Coronilla varia</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lotus pedunculatus</i> , <i>Onobrychis viciifolia</i> |
| FOO et al. 1996 | 1800 bis 2100 | <i>Lotus corniculatus</i> |
| HEDQVIST et al. 2000 | 1177 bis 3067 | <i>Lotus corniculatus</i> |
| McALLISTER et al. 2005 | 3036 bis 7143 | <i>Coronilla varia</i> , <i>Hedysarum alpinum</i> , <i>Lespedeza cuneata</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lotus pedunculatus</i> , <i>Lotus uliginosus</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Onobrychis viciifolia</i> |



(a)



(b)

Abb. 2.3: Chemischer Aufbau eines hydrolysierbaren (Gallotannin; a) und eines kondensierten (Proanthocyanidin C₁; b) Tanninmoleküls (aus KHANBABAEE u. VAN REE 2001)

2.1.1.5.1.1.2 Proteinpräzipitation durch Tannine

Kondensierte Tannine binden mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen (McALLISTER et al. 2005) und über hydrophobe Bindungskräfte (SMITH et al. 2005) an Proteine (McALLISTER et al. 2005). Die Proteinpräzipitationskapazität variiert zwischen KT verschiedener Herkunft (McNABB et al. 1998; HEDQVIST et al. 2000; McALLISTER et al. 2005). Beeinflussende Faktoren sind die Anzahl möglicher Wasserstoffbrückenbindungen, die wiederum von Anzahl und Typ der Monomere und dem pH-Wert bestimmt wird, sowie die Struktur der zu präzipitierenden Proteine (McALLISTER et al. 2005). Neben dem pH-Wert soll außerdem die Anwesenheit anorganischer Ionen unabdingbar für die Formung unlöslicher Komplexe aus Proteinen mit KT, aber auch mit HT sein (PEREZ-MALDONADO et al. 1995).

Rubisco wird bei niedrigen pH-Werten kaum, bei pH 7 bis 8 hingegen fast vollständig, meist jedoch reversibel, präzipitiert (McNABB et al. 1998). Unterschiedliche Präzipitationskapazitäten von KT aus verschiedenen Pflanzen (MOLAN et al. 2001) wurden für Rubisco nicht in allen Studien dokumentiert (TANNER et al. 1996; McNABB et al. 1998). Zur Präzipitation von Rubisco werden aber deutlich geringere KT-Mengen benötigt als bei der von bovinem Serumalbumin (McNABB et al. 1998; McALLISTER et al. 2005), welches möglicherweise lösliche Komplexe mit KT bildet (McALLISTER et al. 2005). Obwohl bei höherem Molekulargewicht (AERTS et al. 1999; SMITH et al. 2005) und größerer Moleküloberfläche mehr stabile Bindungen zwischen den phenolischen Einheiten der Tannine und hydrophoben Proteinabschnitten möglich sind (SMITH et al. 2005), besteht zwischen Proteinpräzipitationskapazitäten und KT-Molekulargewichten keine positive Korrelation (McALLISTER et al. 2005). Dementsprechend wurde beobachtet (BARRY u. MANLEY 1984), dass KT mit niedrigem Molekulargewicht mehr Protein, und folglich auch mikrobielle Enzyme, präzipitieren. Bei höhermolekularen KT soll es nicht zur Inaktivierung von Enzymen kommen (BARRY u. MANLEY 1984). McALLISTER et al. (2005) halten es so für möglich, dass bestimmte KT Proteine schützen, gleichzeitig aber den Zelluloseabbau nicht beeinträchtigen.

Neben KT können auch HT Proteine komplexieren, wobei Tanninsäure als Vertreter der HT meistens weniger Protein bindet als KT (*Desmodium* und *Lotus*-Spezies; PEREZ-MALDONADO et al. 1995).

Von der Proteinpräzipitation ist zu unterscheiden, in wie weit ein KT auch die Hydrolyse des KT-Proteinkomplexes unterbindet und das Protein im Komplex vor dem Zugriff durch Proteasen schützt. Beispielsweise inhibieren KT-Extrakte aus *Lotus pedunculatus* und *Lotus corniculatus* die Hydrolyse durch Trypsin und Chymotrypsin nur bei niedrigen pH-Werten (McNABB et al. 1998) und somit ggf. auch die Hydrolyse durch ruminale, mikrobielle Proteasen, nicht aber durch wirtseigene Enzyme. Wie die Präzipitationskapazität von Rubisco ist der den Proteinabbau hemmende Effekt bei KT aus unterschiedlichen Pflanzen verschieden stark ausgeprägt (AERTS et al. 1999). McNABB et al. (1993) bestätigen neben reduzierter ruminale Proteolyse die Abnahme des Abbaus schwefelhaltiger AS, was *in-vivo* zu erhöhter Methioninabsorption führte. Die Gabe von Polyethylenglycol kann die Hemmung des Proteinabbaus durch KT aufheben (McNABB et al. 1993; AERTS et al. 1999).

2.1.1.5.1.1.3 Ruminale Abbau von Tanninen

Aus dem Pansen von Ziegen, die tanninreiche Futtermittel aufnahmen, konnten

tanninabbauende Bakterien isoliert werden (BROOKER et al. 1994; SKENE u. BROOKER 1995). So ist neben *Streptococcus gallolyticus*² (BROOKER et al. 1994) auch ein *Selenomonas ruminantium* ssp. *ruminantium*-Stamm (SKENE u. BROOKER 1995) in der Lage, sowohl HT als auch KT zu spalten. NELSON et al. (1995) berichten zudem von einer weiteren gramlabilen Kokkenspezies (keine Artangabe) im Pansen von Ziegen, die HT spaltet. Im Pansensaft von Rindern findet ein Abbau oligomerer Tannine hingegen nicht statt (MAKKAR et al. 1995) und auch nach achttägiger Inkubation kommt es *in-vitro* (RUSITEC) nicht zur Induktion KT-abbauender Enzyme (MAKKAR u. BECKER 1995). Tanninsäure hingegen wird *in-vitro* auch im bovinen Pansensaft zu Gallussäure, Pyrogallol und Resorcinol abgebaut (SINGH et al. 2001). Die nichtenzymatische Spaltung beider Tannintypen sei unter sauren Bedingungen im Pansen zumindest denkbar (McSWEENEY et al. 1999). BHAT et al. (1998) fassen den bakteriellen Abbau beider Tannintypen im Pansen wie folgt zusammen (s. Abb. 2.4):

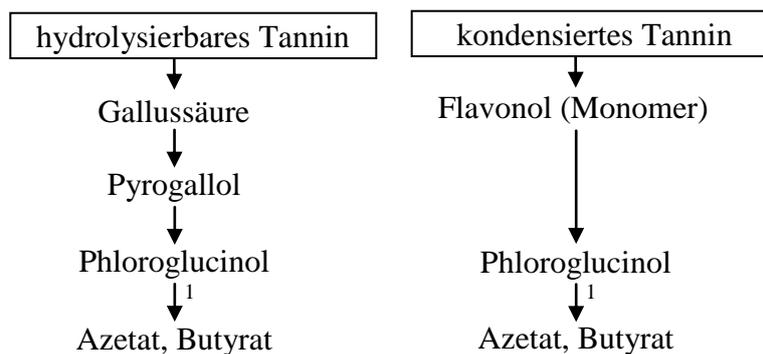


Abb. 2.4: Ruminaler Abbau hydrolysierbarer und kondensierter Tannine (stark vereinfacht nach BHAT et al. 1998). Zu beachten ist, dass im Pansensaft von Rindern kein Abbau oligomerer Tannine stattfindet (MAKKAR et al. 1995).

¹ mehrere Abbauewege bekannt

2.1.1.5.1.1.4 Beeinflussung der ruminalen Verdauung durch Tannine

Tannine reduzieren die Proteinverfügbarkeit in Pflanzen (ROBBINS et al. 1987 a) und dienen der Fraßhemmung, wie SWAIN (1979) die Ergebnisse früherer Arbeiten zusammenfasst. Sie sollen so der wichtigste Faktor zum Schutz der Pflanze gegen grasende Herbivoren sein. Äsende Spezies wie Maultierhirsche (ROBBINS et al. 1987 b) und Rehe (AUSTIN et al. 1989), aber auch einige Nager und Hasenartige (MOLE et al. 1990) können hingegen tanninbindende Speichelproteine bilden und so die chemische Abwehr der Pflanze außer Kraft setzen (AUSTIN et al. 1989). Bei Rindern wurden zwar ähnliche Proteine gefunden, die Bindung an Tannine ist aber *in-vivo* vernachlässigbar gering (MOLE et al. 1990) bzw. es werden bei domestizierten Schafen und Rindern keine (AUSTIN et al. 1989) oder nur thermisch instabile (JONES u. MANGAN 1977) bzw. lösliche (PEREZ-MALDONADO et al. 1995) Komplexe mit Tanninen gebildet. Die Manipulation der ruminalen Verdauung mittels Tanninen erscheint somit möglich (HANLEY et al. 1992; BARRY u. McNABB 1999). Im amerikanischen CNCPS (Cornell Net Carbohydrate and Protein System) werden an

² Bei *Sc. gallolyticus* und *Sc. caprinus* (BROOKER et al. 1994) handelt es sich um die gleiche Spezies, bei der Bezeichnung soll *Sc. gallolyticus* der Vorzug gegeben werden (SLY et al. 1997).

Tannine gebundene N-Verbindungen zur C-Fraktion gezählt (s. Kap. 2.2) und gelten somit als unverdaulich (VAN SOEST 1994; CHALUPA u. SNIFFEN 1996; LICITRA et al. 1996; SÜDEKUM et al. 2005). Komplexe aus KT und Rubisco sind aber *in-vitro* nur zwischen pH-Werten von 3,5 bis 7 stabil, d.h. im Pansen sind Tannine fest, im Labmagen und im vorderen Duodenum lediglich locker an Proteine gebunden (JONES u. MANGAN 1977; BRODERICK et al. 1991). Es wird daher angenommen, dass unlösliche (gebundene) KT den Abbau von Pflanzenprotein im Pansen reduzieren (McNABB et al. 1996) und so den Fluss höhermolekularer N-Verbindungen bzw. die AS-Versorgung im Duodenum erhöhen (BARRY u. MANLEY 1984, 1986).

Dementsprechend dokumentierten PEREZ-MALDONADO und NORTON (1996), dass während der ruminalen Verdauung die Konzentration an freien KT abnimmt, die der proteingebundenen aber steigt. Weitere Untersuchungen ergaben keine Hinweise darauf, dass diese Protein-KT-Komplexe im unteren Verdauungstrakt nicht abgebaut werden (PEREZ-MALDONADO u. NORTON 1996). TANNER et al. (1994) nehmen sogar an, dass die Aufnahme KT-haltigen Grünfutters durch Reduktion des ruminalen Blattproteinabbaus ernährungsphysiologisch von Vorteil ist. Hiergegen spricht, dass bei KT-Aufnahme aus *Lotus pedunculatus* zwar mehr Rubisco erst im Dünndarm abgebaut wird, gleichzeitig aber auch die duodenale AS-Verdaulichkeit sinkt (McNABB et al. 1996).

Freie KT können außerdem mit mikrobiellen Enzymen reagieren (McLEOD 1974; AERTS et al. 1999), sie hemmen und, wie Abbildung 2.5 zeigt, neben der mikrobiellen Proteolyse (JONES et al. 1994) auch den Kohlenhydratabbau (BARRY u. MANLEY 1984, 1986; BAE et al. 1993; HRISTOV et al. 2003) durch ruminale Mikroorganismen senken. Während Letzteres unter Umständen zu Energieeinbußen führt (BARRY u. MANLEY 1984), steigt die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese unter KT-Zulage an (MAKKAR et al. 1995). Ursache ist möglicherweise der ebenfalls verminderte Abbau der schnell fermentierbaren Kohlenhydrate (BARRY u. MANLEY 1984; s. Kap. 2.1.9, Abhängigkeit des ruminalen N-vom Kohlenhydratstoffwechsel).

BHAT et al. (1998) fassen zusammen, dass KT in kleinen Mengen Proteine vor überstürztem ruminalen Abbau schützen, in großen Mengen aber möglicherweise die Grünfutterqualität beeinträchtigen, bzw. die Nährstoffverdaulichkeit herabsetzen (BENCHAAAR et al. 2008 b). HT hingegen sind toxisch für Wiederkäuer und können in hohen Konzentrationen zum Stillstand der Pansenmotorik führen (ZHU u. FLIPPICH 1995), ein Einsatz zur Modifikation des ruminalen Proteinabbaus erscheint daher nicht sinnvoll.

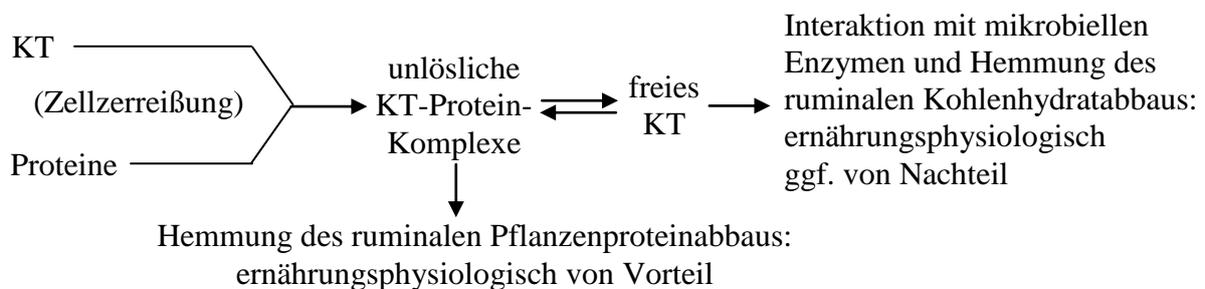


Abb. 2.5: Möglicher Reaktionsmechanismus der kondensierten Tannine im Pansen (BARRY u. MANLEY 1984, 1986, modifiziert nach BARRY u. McNABB 1999)

2.1.1.5.1.1.5 Einfluss von Tanninen auf die mikrobielle Proteolyse im Pansen

Während McSWEENEY et al. (1999) aus Ziegen den Bakterienstamm LP 1284 (s. Kap. 2.1.8.1.11) isolieren konnten, der auch in Gegenwart von Tanninen noch proteolytisch tätig ist, hemmen KT die zellassozierte und extrazelluläre Proteaseaktivität von *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 und *Streptococcus bovis* 45S1. Ursachen sollen gestörter Proteasetransport aus der Zelle (infolge Zellwandschädigung; s. Kap. 2.1.1.5.1.1.6) und Bindung der KT an zellwandständige Proteasen sein. Bei *Prevotella bryantii* B₁₄³ hingegen nimmt die totale Proteaseaktivität zu und die zellwandgebundene Aktivität wird nicht beeinflusst (JONES et al. 1994). Sowohl KT (MAKKAR u. BECKER 1995; BENCHAAAR et al. 2008 b) als auch HT (Tanninsäure; HRISTOV et al. 2003) reduzieren *in-vitro* die Ammoniakkonzentration im Inkubationsmedium. Hierfür ursächlich sollen indirekt die Abnahme der Protozoenpopulation oder die direkte Inhibition von Enzymen sein (MAKKAR u. BECKER 1995).

2.1.1.5.1.1.6 Einfluss von Tanninen auf das Wachstum ruminaler proteolytischer Bakterien

Neben der indirekten Beeinflussung der Pansenbakterien durch Einschränkung der Proteinverfügbarkeit (BARRY u. MANLEY 1986), können KT nach Zellwandpenetration durch selektive Hemmung der Zellwandsynthese bei einigen Spezies direkt in die Zellteilung eingreifen (JONES et al. 1994) und das bakterielle Wachstum beeinflussen.

Neben *B. fibrisolvens* und *P. bryantii* B₁₄ (JONES et al. 1994; MOLAN et al. 2001) wird auch das Wachstum von *Sc. bovis* (JONES et al. 1994; MOLAN et al. 2001; O'DONOVAN u. BROOKER 2001), *Eubacterium* sp. und *B. proteoclasticus* durch KT gehemmt (MOLAN et al. 2001). Am empfindlichsten reagieren *B. proteoclasticus*, gefolgt von *B. fibrisolvens*, *Sc. bovis* und *Eubacterium* sp. (MOLAN et al. 2007), während *P. bryantii* B₁₄ kaum gehemmt wird (JONES et al. 1994) und auch bei hohen Tanninkonzentrationen (600 µg/mL) noch wachsen kann (MOLAN et al. 2007).

Es wird vermutet, dass die Zellwand der grampositiven (JONES et al. 1994) Bakterien der Hauptangriffspunkt der KT ist (MOLAN et al. 2007). Bei *Sc. bovis* werden so die Bildung langer Bakterienketten (JONES et al. 1994; O'DONOVAN u. BROOKER 2001⁴; MOLAN et al. 2007) und die fehlerhafte Separierung der Tochterzellen nach der Teilung beobachtet (JONES et al. 1994; MOLAN et al. 2007⁵). JONES et al. (1994) und O'DONOVAN und BROOKER (2001)⁴ berichten außerdem von der Bildung multipler Teilungsebenen bei *Sc. bovis* und daraus resultierender Polymorphie. Ferner treten Verklumpung und Lyse der *Sc. bovis*-Zellen auf (O'DONOVAN u. BROOKER 2001)⁴. *B. fibrisolvens* reagiert mit verlängerten Zellen auf die Anwesenheit von Tanninen (JONES et al. 1994).

Tannintolerant scheinen einige *Selenomonas*-Spezies aus ostafrikanischen Wiederkäuern zu sein, die außerdem zur Gallussäure- bzw. Tanninsäurehydrolyse befähigt sind (ODENYO u. OSUJI 1998).

³ Systematische Neuordnung der *Prevotella*-Spezies nach AVGUŠTIN et al. (1997) ergab folgende Zugehörigkeiten einzelner Isolate:

| | |
|---|--|
| Stamm 23 ^T : <i>P. ruminicola</i> | Stamm GA 33 ^T : <i>P. brevis</i> |
| Stamm B ₁₄ ^T : <i>P. bryantii</i> | Stamm M384 ^T : <i>P. albensis</i> |

Im Folgenden wird diese Systematik übernommen und der Übersichtlichkeit halber auch auf ältere Studien übertragen, sofern dies möglich ist. Artname und Stammbezeichnung werden angegeben.

⁴ Ggf. gelten die Versuchsergebnisse zur Morphologie nur für Tanninsäure (aus Literatur nicht ersichtlich).

⁵ Beobachtung nur für *Sc. bovis* explizit erwähnt.

2.1.1.5.1.1.7 Einfluss pflanzlicher Tannine auf die mikrobielle Populationszusammensetzung im Pansen

Während Tannine die ruminale Bakteriengesamtpopulation verringern, vergrößern sich die Anteile von *Ruminococcus albus* und *Rc. flavefaciens* sowie *Fibrobacter succinogenes* unter ihrer Zulage (KRAUSE et al. 2004). KRAUSE et al. (2004) vermuten daher, dass diese selbst tanninsensitiven Spezies geringere Empfindlichkeit aufweisen als andere Pansenbakterien. Auch SMITH et al. (2005) nehmen an, dass Bakterien in tanninreichen Systemen nicht per se resistent, sondern durch die tanninbedingte Nährstofflimitierung nur weniger eingeschränkt sind als andere. Die tanninbedingte Hemmung soll folglich durch Bildung resistenter Enzyme mit weniger Tanninbindungsstellen oder Enzymüberproduktion kompensierbar sein. McSWEENEY et al. (2001) beobachteten hingegen abnehmende *F. succinogenes*- und *Ruminococcus* sp.-Anteile. Sie vermuten, dass freie, flüssigkeitsassoziierte Bakterien (FAB) weniger tanninempfindlich als partikelassoziierte Bakterien (PAB) sind.

In proteolytischen Populationen kommt es bei KT-Zulage neben einer Populationsverkleinerung zu Verschiebungen zu Gunsten von *Eubacterium*-Spezies. Tabelle 2.2 zeigt die Anteile einzelner proteolytischer Spezies an einer solchen Population.

Tab. 2.2: Prozentuale Anteile einiger proteolytischer Bakterien im Pansen vor und nach Erhöhung des KT-Gehalts in einer Ration (in-vivo) nach MIN et al. (2002)

| Spezies | Vor Erhöhung des KT-Anteils [%] | Nach Erhöhung des KT-Anteils [%] |
|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <i>Eubacterium</i> sp. | 74,4 | 81,8 |
| <i>B. proteoclasticus</i> | 23,4 | 17,9 |
| <i>Sc. bovis</i> | 1,2 | 0,2 |
| <i>B. fibrisolvens</i> | 0,1 | 0,1 |

Aus Ziegen, die tanninreiche Futtermittel aufnahmen, konnte das tanninresistente Bakterium *Sc. gallolyticus* isoliert werden (s. Kap. 2.1.1.5.1.1.3; BROOKER et al. 1994). Auch bei anderen kleinen und Wildwiederkäuern sind tannintolerante Bakterien, die Verwandtschaft (16S rRNA Sequenzanalysen) mit *Sc. gallolyticus* sowie *Eubacterium cellulosolvens* und *Escherichia coli* zeigen, weit verbreitet. Ein Nachweis bei Kühen mit niedrigen Tanningehalten in der Ration gelang bisher nicht (NELSON et al. 1998) und auch tanninresistente Protozoen und Pansenpilze konnten nicht nachgewiesen werden (BHAT et al. 1998).

ODENYO et al. (1997) fanden ferner, dass durch *Acacia angustissima*-Fütterung die Ciliatenzahl im Pansen abnimmt, während die der Pansenpilze zunimmt. Sie vermuten aber, dass Saponine und nicht KT hierfür verantwortlich sind. Neben KT (MAKKAR u. BECKER 1995) reduziert auch Tanninsäure (HRISTOV et al. 2003) die Protozoenpopulation (MAKKAR u. BECKER 1995) sowie die relative Aufnahme bakteriellen Proteins durch Protozoen. Die relative Proteinaufnahme der Bakterien bleibt *in-vitro* unbeeinflusst (HRISTOV et al. 2003).

2.1.1.5.1.2 Ätherische Öle

Als ätherische Öle werden leicht flüchtige oder in organischen Lösungsmitteln lösliche Pflanzenextrakte bezeichnet, die Pflanzen vor Infektionen oder Insekten schützen. Meistens

handelt es sich um zyklische Kohlenwasserstoffe und deren Alkohole, Aldehyde und Ester (WALLACE et al. 2002; WALLACE 2004; PATRAS u. SAXENA 2009).

Tabelle 2.3 gibt eine Übersicht über die aktiven Komponenten ätherischer Öle ausgewählter Pflanzen.

Tab. 2.3: Aktive Komponenten ätherischer Öle ausgewählter Pflanzen
(nach CALSAMIGLIA et al. 2007)

| Ätherisches Öl aus: | Trivialname | Aktive Komponente(n) |
|----------------------------|--------------------|-------------------------|
| <i>Allium sativum</i> | Knoblauch | Allicin, Diallylsulfite |
| <i>Anethum graveolens</i> | Dill | Limonene, Carvon |
| <i>Capsicum annuum</i> | Spanischer Pfeffer | Capsaicin |
| <i>Cinnamomum cassia</i> | Kassia | Zimtaldehyd |
| <i>Origanum vulgare</i> | Oregano | Carvacrol, Thymol |
| <i>Pimpinella anisum</i> | Anis | Anethol |
| <i>Syzygium aromaticum</i> | Nelke | Eugenol |
| <i>Thymus vulgaris</i> | Thymian | Thymol, Carvacrol |

Viele Pflanzenextrakte, die ätherische Öle enthalten, bzw. die aktiven Komponenten dieser Öle hemmen die ruminale Desaminierung, wie Tabelle 2.4 zusammenfasst. Ausnahmen wurden nur in wenigen Studien beobachtet [gesteigerte Desaminierung durch Anisextrakt (CARDOZO et al. 2004), keine Auswirkungen durch Anisextrakt, Anethol (BUSQUET et al. 2006), Eugenol (CASTILLEJOS et al. 2006) und Zimtaldehyd (BUSQUET et al. 2005)]. Effekte auf die ruminale Ammoniakkonzentration sind bei einzelnen Substanzen heterogen und sowohl dosis- als auch pH- (Anisextrakt, Anethol, Eugenol; CARDOZO et al. 2005; CALSAMIGLIA et al. 2007) und versuchssystemabhängig (FRASER et al. 2007).

Auf proteo- bzw. peptidolytischer Ebene greifen vermutlich nur wenige ätherische Öle an. Eugenol und Thymol (CASTILLEJOS et al. 2006) wie auch Knoblauch- und Zimtextrakt (CARDOZO et al. 2004, 2005) stimulieren die Proteolyse oder hemmen peptidolytische Vorgänge. Zimtaldehyd selbst, als Bestandteil des Zimtextraktes, wirkt weder auf Proteo- noch auf Peptidolyse und auch bei Knoblauchextrakt wurden in der Studie BUSQUET et al. (2005) keine Auswirkungen beobachtet.

Tab. 2.4: Hemmung der Desaminierung im Pansen durch ätherische Öle

| Extrakt/Stoff | <i>in-vivo/in-vitro</i> | Autor, Jahr |
|----------------------------|-------------------------|---|
| Anisextrakt | <i>in-vivo/in-vitro</i> | CARDOZO et al. 2005, 2006 |
| Anethol | <i>in-vitro</i> | CARDOZO et al. 2005 |
| Spanischer Pfeffer-Extrakt | <i>in-vitro</i> | CARDOZO et al. 2005 |
| Öl aus Spanischem Pfeffer | <i>in-vitro</i> | BUSQUET et al. 2006 |
| Eugenol | <i>in-vitro</i> | CARDOZO et al. 2005; BUSQUET et al. 2006 |
| Guajakol | <i>in-vitro</i> | CASTILLEJOS al. 2006 |

Tab. 2.4: Fortsetzung

| Extrakt/Stoff | <i>in-vivo/in-vitro</i> | Autor, Jahr |
|--|------------------------------|---|
| Knoblauchextrakt | <i>in-vitro</i> | CARDOZO et al. 2004, 2005; BUSQUET et al. 2005 |
| Limonene | <i>in-vitro</i> | CASTILLEJOS et al. 2006 |
| Oreganoextrakt | <i>in-vitro</i> | CARDOZO et al. 2005 |
| Oreganoöl | <i>in-vitro</i> | BUSQUET et al. 2006 |
| Carvacrol | <i>in-vitro</i> | BUSQUET et al. 2006 |
| Thymol | <i>in-vitro</i> | CASTILLEJOS et al. 2006 |
| Zimtextrakt | <i>in-vitro</i> | CARDOZO et al. 2004, 2005 |
| Zimtöl (dosisabhängig) | <i>in-vitro</i> | BUSQUET et al. 2006 |
| Zimtaldehyd | <i>in-vitro</i> ¹ | FRASER et al. 2007 |
| Zimtaldehyd und Eugenol | <i>in-vivo</i> | CARDOZO et al. 2005; BUSQUET et al. 2006 |
| Thymol, Eugenol, Vanillin und Limonene | <i>in-vivo</i> | McINTOSH et al. 2003 |
| Thymol, Guajakol und Limonene ² | <i>in-vivo/in-vitro</i> | NEWBOLD et al. 1999, 2004 |

¹ RUSITEC; ² Hauptkomponenten einer kommerziellen Mischung ätherischer Öle

Ergebnisse weiterer Studien deuten darauf hin, dass vor allem die Desaminaseaktivität monensinsensitiver Spezies (s. Kap. 2.1.8.1.11; HAP-Bakterien) gehemmt wird, während andere (u.a. *Clostridium aminophilum*, *Sc. bovis*, *Megasphaera elsdenii*) nur wenig beeinträchtigt werden bzw. sich adaptieren können (McINTOSH et al. 2003). CARDOZO et al. (2004) bestätigen die Adaptation ruminaler Mikroorganismen *in-vitro* sowie fehlende Auswirkungen auf Fermentation und N-Stoffwechsel nach einigen Tagen bei Gabe niedriger Dosen (0,22 mg/L Pansenflüssigkeit; CARDOZO et al. 2004). Höhere Dosen (30 bzw. 300 mg/L Kulturflüssigkeit) von Zimtaldehyd und Knoblauchöl können hingegen Adaptationsprozesse verhindern (BUSQUET et al. 2005). Speziell *P. bryantii* kann sich aber auch an hohe Thymol-, Eugenol-, Vanillin- und Limonenkonzentrationen adaptieren (127,5 ppm; McINTOSH et al. 2003).

Zu bedenken ist, dass reduzierte Konzentrationen von Ammoniak (CARDOZO et al. 2005) und verzweigtkettigen Fettsäuren auch über erhöhte Peptid- und AS-Nutzung der Pansenbakterien erklärbar sind, und nicht unbedingt Ausdruck gehemmter Desaminierung sein müssen. Protozoen werden durch ätherische Öle im Gegensatz zu KT und Saponinen (s. Kap. 2.1.1.5.1.1 und 2.1.1.5.1.3) in den meisten Fällen nicht negativ beeinflusst (McINTOSH et al. 2003; NEWBOLD et al. 2004; BENCHAAAR et al. 2006, 2007, 2008 b; CARDOZO et al. 2006; PATRA et al. 2006).

Die Wirkung ätherischer Öle soll entweder in der Beeinflussung der Substratbesiedlung über eine Wirkung auf *Ruminobacter amylophilus* (WALLACE et al. 2002) oder durch mehr oder weniger selektive Hemmung gramnegativer und grampositiver (CALSAMIGLIA et al. 2007) bzw. ammoniakhyperproduzierender Spezies begründet sein (WALLACE et al. 2002) und so

indirekt zur Senkung der Desaminaseaktivität führen (CALSAMIGLIA et al. 2007). Nach BENCHAAR et al. (2008 a) sind die antibakteriellen Eigenschaften ätherischer Öle mit ihrer Lipophilie und der resultierenden Affinität zu bakteriellen Zellmembranen assoziiert. Einige mögliche Reaktionsmechanismen sind nachfolgend aufgeführt:

- Wirksame Bestandteile haben Zugang zum Periplasma und anderen Zellkompartimenten (Zimtaldehyd) bzw. können die äußere Zellmembran und die Zytoplasmamembran zerstören (Carvacrol, Thymol) und membranassoziiertes Material bzw. ATP aus den Zellen freisetzen (HELANDER et al. 1998).
- Carvacrol erhöht die Permeabilität von Zellmembranen, wodurch es zum Eintritt von Protonen und Austritt von Kaliumionen kommt (ULTEE et al. 1999). Die phenolische Hydroxylgruppe soll hierbei als transmembranaler Carrier für Protonen beteiligt sein. Durch den folgenden pH-Gradientenabfall an der Zellmembran wird kein ATP mehr gebildet und es kommt zum Zelltod (ULTEE et al. 2002).
- Substanzen aus ätherischen Knoblauchölen reagieren mit Sulfhydrylgruppen (ROSS et al. 2001) und hemmen so möglicherweise mikrobielle Enzyme.

Ätherische Öle sollen die ruminale Fermentation zugunsten höherer Produktivität beeinflussen (WALLACE 2004). Bis jetzt sind aber nur vergleichsweise wenige ätherische Öle und einige ihrer Komponenten (BENCHAAR et al. 2008 a) untersucht worden. Darüber hinaus entstanden viele *in-vitro*-Studien mit relativ hohen Dosierungen (CASTILLEJOS et al. 2007; BENCHAAR et al. 2008 a), so dass besonders nach dem Verbot antibiotischer Leistungsförderer (NEWBOLD et al. 2006) verstärkter Bedarf nach *in-vivo*-Langzeitstudien besteht (CASTILLEJOS et al. 2007; BENCHAAR et al. 2008 a).

2.1.1.5.1.3 Saponine

Saponine sind hochmolekulare Glykoside aus Triterpenen, Steroiden oder Steroidalkaloiden (WALLACE et al. 2002).

In-vitro hemmen Saponine aus verschiedenen Pflanzen das Wachstum bestimmter bakterieller und auch proteolytischer Spezies im Pansen. Die Ergebnisse der einzelnen Studien sind zwar nicht eindeutig, jedoch scheinen *B. fibrisolvens* (WALLACE et al. 1994), *Rb. amylophilus* (WANG et al. 2000) und *Sc. bovis* eine höhere Sensitivität aufzuweisen als *S. ruminantium* (WALLACE et al. 1994; WANG et al. 2000) oder auch *P. bryantii* B₁₄, welches sein Wachstum unter Zulage von Saponinen aus *Yucca*-Extrakt sogar steigert (WALLACE et al. 1994). Möglicherweise kann es sich durch Zellwandverdickung (WANG et al. 2000) vor Saponinen schützen. Stärker als Bakterien, deren Anzahl in bestimmten Fällen -wie bereits erwähnt- unter Saponinzulage sogar zunehmen kann (NEWBOLD et al. 1997; HESS et al. 2004), werden sowohl *in-vitro* (MAKKAR et al. 1998; HESS et al. 2003; HRISTOV et al. 2003; GOEL et al. 2008) als auch *in-vivo* (NEWBOLD et al. 1997; HRISTOV et al. 1999; HESS et al. 2004; GOEL et al. 2008) Protozoen durch Saponine aus unterschiedlichsten Pflanzen gehemmt. Unklar ist, ob alle Spezies gleichermaßen von der Hemmung betroffen sind (PATRA u. SAXENA 2009).

Die Pflanze *Yucca schidigera* besitzt bei hohen Ammoniakkonzentrationen außerdem die Fähigkeit, mit einer „Glykokomponente“ (WALLACE et al. 1994), die nicht identisch mit den Saponinen ist (HEADON 1992), Ammoniak reversibel zu binden (HEADON 1992; WALLACE et al. 1994), während bei niedrigen Konzentrationen Ammoniak freigesetzt werden kann (HEADON 1992). Letzteres erklärt fehlende Ammoniakkonzentrations-

änderungen bei *in-vivo*-Studien mit niedrigen *Yucca*-Extraktkonzentrationen (WU et al. 1994). Senkungen der Ammoniakkonzentration in *in-vitro*-Studien (WALLACE et al. 1994; WANG et al. 1998) sollen hingegen auf eine sofort reduzierte Proteolyse (WALLACE et al. 1994), gesenkte Desaminaseaktivität und später auf antiprotozoale Effekte durch Saponine zurückzuführen sein (bakterielles Protein wird nicht von Protozoen genutzt; WALLACE et al. 1994; HRISTOV et al. 1999). HRISTOV et al. (1999) gehen im Gegensatz zu WALLACE et al. (1994) davon aus, dass die proteolytische Aktivität und mikrobielle Proteinsynthese unbeeinflusst bleiben und die sinkenden Ammoniakkonzentrationen in ihrer *in-vivo*-Studie neben einer Desaminaseaktivitätssenkung tatsächlich auch auf Ammoniakbindung zurückgeführt werden können. In weiteren Studien wurde sogar eine erhöhte Proteolyseaktivität beobachtet (WANG et al. 1998; CARDOZO et al. 2004), während die Desaminase- und Dipeptidaseaktivitäten unbeeinflusst blieben und lediglich gesenkte Peptidaseaktivität und erniedrigte Protozoenzahl zu kurzzeitig gesenkten Ammoniakkonzentrationen führten (WANG et al. 1998).

2.1.1.5.2 Amylase und Zellulase

Pflanzliche Zellwandproteine können erst nach Depolymerisierung der Zellwandpolysaccharide abgebaut werden, da proteolytische Enzyme sonst keinen Zugang zu ihrem Substrat haben (DEBROAS u. BLANCHART 1993). Der Proteinabbau durch ruminale Proteasen wird dementsprechend *in-vitro* durch Zellulasegabe nach längerer Inkubationszeit (16 Stunden) stark gesteigert (KOHN u. ALLEN 1995). Übereinstimmend bauen Cokulturen aus proteolytischen *Prevotella*-Spezies (keine genaue Speziesangabe) und zellulolytischen *Rc. albus in-vitro* Luzernezellwandprotein (Zellwandpräparation; sechstägige Inkubation) am effektivsten ab (DEBROAS u. BLANCHART 1993).

Stärke hemmt Proteasen von *Streptomyces griseus* und *Bacillus subtilis* (ASSOUMANI et al. 1992) sowie Bromelain (Protease aus der Ananaspflanze; TOMÁNKOVÁ u. KOPEČNÝ 1995). Durch Zusatz von α -Amylase (ASSOUMANI et al. 1992; TOMÁNKOVÁ u. KOPEČNÝ 1995) und β -Glucanase (ASSOUMANI et al. 1992) kann die sterische Hemmung der Proteasen durch Stärke- und Zellulosemoleküle vermieden werden (TOMÁNKOVÁ u. KOPEČNÝ 1995).

2.1.1.5.3 Weitere, den ruminalen Proteinabbau beeinflussende Faktoren

Tabelle 2.5 zeigt eine Auswahl von Einflussfaktoren auf den ruminalen Proteinabbau. Weitere Faktoren (Proteinstruktur, Löslichkeit, Fütterungsniveau, Rationszusammensetzung etc.) können der Arbeit von HÖLTERSINKEN (1990) entnommen werden.

Tab. 2.5: Effekte auf den ruminalen Proteinabbau durch Endprodukthemmung, Enzymzulage, Futtermittelbearbeitung, nichtionische Tenside, den pH-Wert sowie die Rationsgestaltung, Proteinquelle und unterschiedliche Protein-supplementierungsfrequenz

| Faktor | Effekt(e) | Autor, Jahr |
|---|--|--------------------------------------|
| Endprodukt-hemmung | <ul style="list-style-type: none"> • <i>In-vitro</i> reduzieren freie AS konzentrationsabhängig die Proteolyse um 6,5 bis 98,7 %, flüchtige Fettsäurenkonzentrationen über 133 mmol/L erhöhen die proteolytische Aktivität ($p < 0,05$) | VERESEGYHÁZY et al. 1993 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Ammoniak (> 5 mmol/L), AS und Peptide hemmen als Endproduktinhibitoren die Proteolyse (<i>in-vitro</i>) | BRODERICK et al. 2004 |
| Enzymzulage (überwiegend proteolytisch) | <ul style="list-style-type: none"> • Rp (Rohprotein)-Abbau wird trotz vier- bis neunfach gesteigerter proteolytischer Aktivität nur um durchschnittlich 6,7 % gesteigert (<i>in-vitro</i>) • Zunahme der Ammoniakkonzentration (<i>in-vitro</i>) | COLOMBATTO et al. 2003 |
| Futtermittelbearbeitung | <ul style="list-style-type: none"> • Membranständige Chloroplastenproteine werden in Luzernesilage gegenüber frischer oder angewelkter Luzerne schneller abgebaut, während lösliche Chloroplasten- und cytoplasmatische Proteine gleiche Abbauraten zeigen (<i>in-vitro</i>) | MAKONI et al. 1994 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Hitzebehandlung reduziert ruminalen Proteinabbau (Bildung von Maillardprodukten; s. Kap. 2.2), bereits Sontrocknung von Gras bei der Heuproduktion reduziert die ruminale Proteinabbaubarkeit | BRODERICK et al. 1991; NOLAN 1993 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Kombinierte Hitze- und Phosphor- oder Bernsteinsäurebehandlung vergrößert den nicht ruminal abbaubaren Proteinanteil in Sonnenblumenmehl um das 3,5-fache | GONZÁLEZ et al. 2009 |
| Nichtionische Tenside | <ul style="list-style-type: none"> • <i>In-vitro</i> Erhöhung der Proteaseaktivität einer gemischten bovinen Pansenbakterienpopulation, da in hydrophoben Enzymregionen gelegene SH-Gruppen der Cysteinproteasen substratzugänglicher gemacht werden | KAMANDE et al. 2000 |
| pH-Wert und Rationsgestaltung | <ul style="list-style-type: none"> • Die mikrobielle Population bei einem bestimmten pH-Wert bestimmt die proteolytische Aktivität: bei niedrigen Werten nehmen zellulolytische Bakterien ab. Mit ihrem Rückgang sinken der Faserabbau und die Möglichkeit an fasergebundenes Protein zu gelangen | BACH et al. 2005 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Andererseits werden unter sauren Bedingungen mehr amylolytische Bakterien gefunden, die höhere proteolytische Aktivität zeigen und unter Umständen höhere Proteolyseraten bewirken können | COLOMBATTO et al. 2003 |

Tab. 2.5: Fortsetzung

| Faktor | Effekt(e) | Autor, Jahr |
|----------------------------------|--|-------------------------|
| Proteinquelle | • Ähnliche Proteine aus verschiedenen Pflanzen werden im Pansen unterschiedlich schnell, aber ähnlich abgebaut | AUFRÈRE et al. 1994 |
| | • Mikrobieller Abbau der löslichen Rp-Fraktion ist futtermittelabhängig (<i>in-vitro</i>) | RUIZ MORENO et al. 2007 |
| Proteinsupplementierungsfrequenz | <ul style="list-style-type: none"> • Tägliche Supplementierung fördert <i>in-vivo</i> Bakterien, die schnell Peptide und AS umsetzen • Bei seltener Supplementierung (zweimal/Woche) dominieren <i>in-vivo</i> Bakterien, die diese Substrate langsam abbauen und es kommt zu größeren Peptid- und AS-Konzentrationsschwankungen nach der Fütterung (s. Kap. 2.1.2.1. und 2.1.3.1) | FARMER et al. 2004 |

2.1.2 Ruminaler Peptidmetabolismus

2.1.2.1 Peptidkonzentration im Pansensaft

Einen Überblick über gemessene Peptid-N-Konzentrationen im Pansensaft bzw. omasaler Digesta des Rindes gibt Tabelle 2.6.

Tab. 2.6: *Peptid-N-Konzentrationen in Pansensaft (CHEN et al. 1987 a; WILLIAMS u. COCKBURN 1991; VOLDEN et al. 2002) bzw. omasaler Digesta (CHOI 2002) von Rindern*

| Peptid-N [mg/L] | Nutritive N-Quelle | Autor, Jahr |
|------------------|--|---------------------------|
| 54 bis 225 | Fischmehl, Sojabohnenmehl | CHEN et al. 1987 a |
| 21 bis 169 | u.a. Kasein, Fischmehl, Sojabohnen- und Maisglutenmehl | WILLIAMS u. COCKBURN 1991 |
| 0,3 bis 2,8 | Harnstoff | |
| 56,0 bis 81,0 | Grassilage und Proteinsupplemente | CHOI 2002 |
| 170 (Mittelwert) | Gras, Grassilage | VOLDEN et al. 2002 |

CHOI (2002) und VOLDEN et al. (2002) maßen ca. eine Stunde nach der Fütterung höchste Peptidkonzentrationen, während CHEN et al. (1987 a) und FARMER et al. (2004)⁶ höchste Konzentrationen erst zwei Stunden nach der Fütterung dokumentierten. Bereits nach drei bis fünf (BRODERICK u. WALLACE 1988; WILLIAMS u. COCKBURN 1991; VOLDEN et al. 2002) bzw. vier bis sechs Stunden (CHOI 2002) fällt die Konzentration auf Ausgangswerte

⁶ Peptidkonzentrationen bis ca. 1,75 mmol/L, ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren ist auf Grund der gewählten Einheit [mmol/L] ohne Kenntnis des Peptid-N-Gehalts nicht möglich.

ab. Mit steigendem Rp-Gehalt erhöht sich die Peptidkonzentration (CHEN et al. 1987 a). Wird Harnstoff als N-Quelle gegeben, sind die Konzentrationen hingegen sehr niedrig (BRODERICK u. WALLACE 1988; WILLIAMS u. COCKBURN 1991).

2.1.2.2 Peptidaufnahme durch Pansenbakterien

In dieser Arbeit sind Ergänzungen und neuere Erkenntnisse bezüglich der bakteriellen Peptidaufnahme enthalten. Grundlegende Informationen sind bei HÖLTERSINKEN (1990) zu finden.

Bei Pansenbakterien ist die Peptidaufnahme, wie die Aufnahme vieler AS, nicht ATP-abhängig, sondern wahrscheinlich an den Mineralstoffkationentransport gekoppelt (WALLACE et al. 1990 a). Vermutlich benötigt dieser Mechanismus, bezogen auf einzelne AS, weniger Energie als der Transport freier AS (RUSSELL et al. 1991).

Die Fähigkeit zur Peptidaufnahme ist bei einzelnen Pansenbakterienspezies unterschiedlich ausgeprägt. Die Spezies *Sc. bovis* und *P. bryantii* B₁₄ zeigen hohe, *F. succinogenes*, *S. ruminantium* und *Anaerovibrio lipolytica* niedrigere Peptidaufnahmeraten. Eine Präferenz zur Aufnahme von Peptiden gegenüber AS wurde bei *P. bryantii* B₁₄ nachgewiesen (LING u. ARMSTEAD 1995).

ARMSTEAD und LING (1993) berichten, dass Peptide mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 2000 Da am schnellsten aufgenommen werden, gefolgt von Peptiden unter 200, Peptiden zwischen 500 und 1000 und schließlich Peptiden zwischen 200 und 500 Da Molekulargewicht. Insgesamt sind die Aufnahmeraten aber ähnlich. Für Alaninpeptide scheint diese Reihenfolge nicht zu gelten, hier wird Ala₃ (268 Da) schneller als Ala₄ und Ala₅ (356 bzw. 445 Da) aufgenommen, Ala₂ (178 Da) zeigt unerwartet die langsamste Aufnahmerate (BRODERICK et al. 1988). Ursache des unterschiedlich schnellen Peptidtransports sind möglicherweise separate Transportsysteme für verschieden lange Peptide, wie sie bei *Prevotella*-Spezies bereits nachgewiesen wurden (WALLACE et al. 1995).

Zu beachten ist aber, dass Peptidasen häufig zellassoziiert sind, und es daher nicht immer ohne Weiteres möglich ist, Peptidtransport und extrazelluläre Peptidaseaktivität mit anschließendem AS-Transport voneinander zu unterscheiden (RUSSELL et al. 1991).

Hydrophile Peptide mit hohen Aspartat-, Glutamat-, Arginin- und Lysinanteilen (CHEN et al. 1987 c) werden bevorzugt durch Pansenbakterien aufgenommen. Es wird vermutet, dass der Transport hydrophober Peptide in die mikrobiellen Zellen erschwert ist (CHEN et al. 1987 a, c) und daher Peptide mit hohen Tyrosin-, Valin-, Tryptophan-, Phenylalanin-, Leucin- und Prolinanteilen im Pansensaft akkumulieren (CHEN et al. 1987 c). Dementsprechend werden die Dipeptide Ala₂, Gly₂, GlyAla und ValAla ähnlich schnell von einer gemischten Pansenbakterienpopulation aufgenommen während das prolinhaltige GlyPro niedrigere Aufnahmeraten zeigt (BRODERICK et al. 1988).

2.1.2.3 Mikrobieller Peptidabbau im Pansen

Für den ruminalen Abbau längerer Peptide (Alanin- und Glycinpeptide mit einer Länge von bis zu fünf AS) sind vor allem Bakterien verantwortlich. Protozoen (Ciliaten) zeigen höhere Dipeptidaseaktivität (WALLACE et al. 1990 b).

Der beherrschende Mechanismus der Peptidhydrolyse ist die Spaltung durch Dipeptidylaminopeptidasen (DPP; WALLACE et al. 1990 b; DEPARDON et al. 1996; WALLACE 1997; WALLACE et al. 1999; WANG et al. 2004), deren Aktivität sofort nach Peptidzulage

ansteigt (DEPARDON et al. 1996). Beteiligt sind vor allem am N-Terminus angreifende DPP (WALLACE u. McKAIN 1989 a, b; WALLACE et al. 1990 c; WALLACE et al. 1993 a; WALKER et al. 2003), bei denen es sich wahrscheinlich überwiegend um DPP vom Typ I (synthetisches Substrat: GlyArg-MNA) handelt (WALLACE u. McKAIN 1989 a).

Die wichtigsten Spezies, die DPP-Aktivität vom Typ I besitzen, sind die *Prevotella*-Stämme *P. albensis* M384 (McKAIN et al. 1992; WALLACE et al. 1997 b), *P. bryantii* B₁₄ (McKAIN et al. 1992), *P. ruminicola* 23 (DEPARDON et al. 1998) und *P. brevis* GA 33 (McKAIN et al. 1992). Des Weiteren verfügen auch *Sc. bovis*, *Rb. amylophilus*, *Rc. albus* und *flavefaciens*, sowie *Veillonella parvula* über DPP-Aktivität (WALLACE et al. 1997 b). In neueren Studien wurden bei *P. albensis* M384 außerdem DPP vom Typ IV (synthetisches Substrat: GlyPro-MNA) und weitere DPP identifiziert (s. Kap. 2.1.8.1.1; WALLACE u. McKAIN 1991; WALLACE et al. 1997 b). Die DPP vom Typ IV ist vermutlich mit der Zellmembran assoziiert, wiegt ca. 240 kDa und besteht aus drei Untereinheiten (WALKER et al. 2003).

P. ruminicola 23 weist neben DPP Typ I-Aktivität Alaninaminopetidaseaktivität auf (DEPARDON et al. 1996); *Sc. bovis* und in geringerem Umfang auch *Rb. amylophilus* zeigen außerdem Leucinaminopeptidaseaktivität und können einzelne AS von Peptiden abspalten (WALLACE et al. 1990 c; WALLACE u. McKAIN 1991). Die ruminale Leucinamino- bzw. Exopeptidaseaktivität steigt im Gegensatz zur DPP-Aktivität erst drei Stunden nach Peptidzulagen an (DEPARDON et al. 1996). Obwohl zwar auch einige Carboxypeptidasen im Pansen aktiv sind (WALLACE et al. 1993 a), wird die Peptidhydrolyserate aber vor allem durch die Struktur des N-Terminus bestimmt (WALLACE et al. 1990 c).

Da die Peptidaseaktivität im Pansensaft der von *Prevotella* entspricht (DPP Typ I-Aktivität), spielen andere Spezies *in-vivo* vermutlich nur eine untergeordnete Rolle beim Peptidabbau (WALLACE u. McKAIN 1991). Es wird vermutet, dass Populationsverschiebungen zu Gunsten von *Sc. bovis* auch die Hauptpeptidaseaktivität von DPP zu Leucinaminopeptidasen verlagern (WALLACE 1996).

Die peptidolytische Aktivität ist größtenteils zellassoziiert (BRODERICK et al. 1988; WALLACE et al. 1990 b), lediglich die dipeptidolytische Aktivität ist etwa zur Hälfte in der Pansenflüssigkeit lokalisiert (BRODERICK et al. 1988). Da es bei Bakterien nicht zu intrazellulärer Peptidakkumulation kommt, ist es aber auch möglich, dass Substrate erst in die Zelle transportiert, dort gespalten und wieder aus der Zelle geschleust werden (WALLACE et al. 1990 b).

2.1.2.4 Mikrobieller Tri- und Dipeptidabbau im Pansen

Endprodukte des Peptidabbaus durch DPP sind Di- und Tripeptide, die einem weiteren Abbau zu AS durch Di- und Tripeptidasen unterliegen. Abbildung 2.6 zeigt schematisch diese zweistufige Gliederung des ruminalen Peptidabbaus, die bei *Prevotella* besonders ausgeprägt ist (WALLACE et al. 1997 b).

In den Dipeptidabbau sind vor allem Ciliaten involviert (WALLACE et al. 1990 b, WALLACE 1996), aber auch *M. elsdenii* (WALLACE u. McKAIN 1991) und *P. albensis* M384 sowie *P. bryantii* B₁₄ zeigen hohe bzw. höhere Dipeptidaseaktivität als originärer Pansensaft. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass diese Spezies auch beim Tri- und Dipeptidabbau von besonderer Bedeutung sind (WALLACE et al. 1993 a).

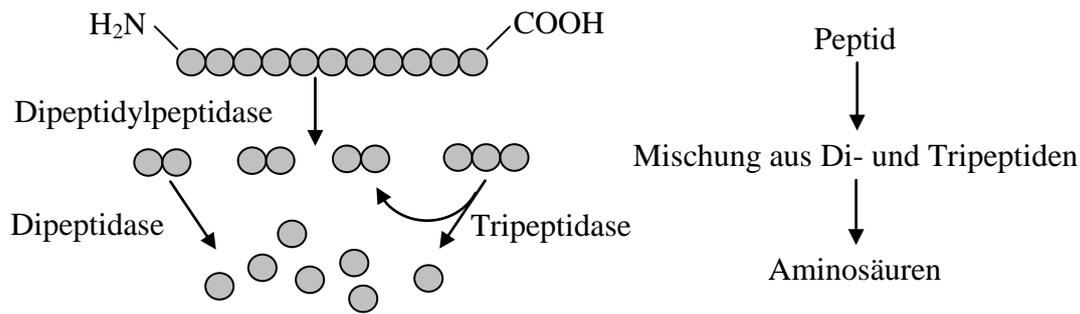


Abb. 2.6: *Biphasischer Peptidabbau durch ruminale Bakterien und speziell durch Prevotella ssp. (modifiziert nach WALLACE 1996, 1997)*
 ○ monomere Aminosäure

Wie die Tripeptidasen sind die Dipeptidasen von *Prevotella*-Spezies intrazellulär lokalisiert, so dass die Dipeptidtransportrate in die Zelle die Substratverfügbarkeit bestimmt. Spaltstelle der Tripeptidasen ist die N-terminale Peptidbindung (WALLACE et al. 1995). Die Dipeptidasen der Bakterien *P. albensis* M384, *F. succinogenes*, *Lachnospira multipara* und *M. elsdenii* sowie vermutlich auch die der Protozoen sind Metallodipeptidasen (WALLACE et al. 1996), wobei das Co-Enzym der Metallodipeptidase von *P. albensis* M384 Mn^{2+} ist (WALLACE unveröffentlicht in WALLACE u. McKAIN 1996).

2.1.2.5 Beeinflussung der ruminalen Peptidabbaubarkeit

Die Abbaubarkeit einzelner Peptide wird vor allem von ihrem Molekulargewicht und ihrer Komposition aus monomeren AS beeinflusst:

- Peptide mit **Molekulargewichten** zwischen 2000 und 4000 Da werden durch eine gemischte ruminale Bakterienpopulation schneller abgebaut als solche zwischen 500 und 2000 Da (DEPARDON et al. 1996). In *P. ruminicola*-Kulturen hingegen akkumulieren Peptide mit Molekulargewichten zwischen 2000 und 3000 Da, während die von noch größeren Peptiden (3000 bis 5000 Da) rasch abnimmt und die von Peptiden unter 2000 Da annähernd gleich bleibt (DEPARDON et al. 1998). Ursächlich für gleichbleibende Konzentrationen der kleineren Peptide (< 2000 Da; DEPARDON et al. 1998) bzw. die Akkumulation von Peptiden unter 500 Da (DEPARDON et al. 1996) ist möglicherweise, dass Pansenbakterien Peptide mit Molekulargewichten bis 751 (*Sc. bovis*; WESTLAKE u. MACKIE 1990) bzw. 2000 Da (*P. ruminicola* 23; PITTMAN et al. 1967) direkt aufnehmen können. Ihre Akkumulation kann folglich durch schnelle Peptidolyse und damit verbundene Überlastung der Transportsysteme erklärt werden (DEPARDON et al. 1996).
- **Hydrophile Peptide** unterliegen schnellerem ruminalen Abbau als hydrophobe, doch in beiden Gruppen wurden resistente Moleküle entdeckt, die höhere Serin-, Valin-, Lysin- und niedrigere Histidin-, Threonin- und Phenylalaninanteile aufweisen als die ursprünglichen Peptide (DEPARDON et al. 1996). Möglicherweise kann so das AS-Profil der N-Verbindungen im Duodenum durch Bindung hydrophiler AS an hydrophobe Peptide beeinflusst werden (RUSSEL et al. 1991).

- **Tripeptide mit Gly₂-Rest** am N-Terminus (WALLACE et al. 1993 a), **prolinhaltige** und **saure (Tri-) Peptide** werden langsamer als andere Tripeptide abgebaut (WALLACE u. McKAIN 1989 b; WALLACE et al. 1993 a).
- **Prolinhaltige Dipeptide** (LeuPro, LysPro, ProLeu, ProLys, ValPro, MetPro, GlyPro, ProMet, ProGly, ProAla und ProVal, aufsteigend nach Abbaubarkeit geordnet) werden besonders langsam (BRODERICK et al. 1988; YANG u. RUSSELL 1992; WALLACE et al. 1993 a), bzw. langsamer als Dipeptide abgebaut, die aus zwei gleichen AS (außer Prolin) bestehen (Gly₂, Ala₂, Val₂, Met₂, Leu₂ und Lys₂; YANG u. RUSSELL 1992). DEPARDON et al. (1998) konnten zwar weder Prolinanreicherung noch Zunahme hydrophober Peptide in Peptidrückständen beobachten, waren aber auch nicht in der Lage, alle Peptide messtechnisch zu erfassen. Möglich ist auch, dass bei Peptiden mit mehr als zwei AS Länge kein hemmender Effekt durch Prolin auftritt (DEPARDON et al. 1998).
- **Saure, aspartat-** (WALLACE et al. 1993 a) und **glutamathaltige** (DEPARDON et al. 1998) **(Di-) Peptide** unterliegen einem langsamerem Abbau als neutrale und basische Dipeptide (WALLACE et al. 1993 a).

2.1.2.6 Artifizielle Beeinflussung der ruminalen Peptidabbaubarkeit

WALLACE (1997) fasst zusammen, dass die meisten Peptide im Pansen bis zu Ammoniak abgebaut werden können und die Fähigkeit der Pansenmikroorganismen, dieses zu nutzen, bei schnellem Peptidabbau zeitweilig überstiegen wird. Besonders bei Energielimitierung kommt es zur Akkumulation von AS aus dem Peptidabbau und in der Folge zu massiver Ammoniakproduktion (WALLACE 1996). Somit würde nach WALLACE (1997) ein verlangsamter Peptidabbau zu höherer Effizienz bei der AS-N-Aufnahme durch Mikroorganismen führen. Zur Rationalisierung des Peptidmetabolismus bieten sich folgende drei Möglichkeiten:

- (1) Suppression peptidolytischer Bakterien (WALLACE et al. 1990 c) bzw. numerische Reduktion von *Prevotella* sp. (WALLACE 1997). Da *Prevotella* (keine genaue Stammdefinition möglich) das häufigste Pansenbakterium ist und viele Stoffwechselfunktionen erfüllt, wäre dies nach BRODERICK et al. (1991) möglicherweise kontraproduktiv.
- (2) Verhinderung der Dipeptidaufnahme durch Bakterien (WALLACE 1997).
- (3) Unterbindung der Hydrolyse durch Peptidasen (WALLACE et al. 1990 c) und DPP (WALLACE 1997) mittels Enzymhemmung oder Substratmodifikationen (BRODERICK et al. 1991). Dieser Ansatz ist bisher am besten untersucht worden (s. Kap. 2.1.2.6.1 und 2.1.2.6.2).

2.1.2.6.1 Unterbindung der Peptidhydrolyse durch Modifizierung des N-Terminus

Durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid kann der N-Terminus von Peptiden in Trypticase (WALLACE 1992 a, b) sowie Lactalbuminhydrolysat geblockt und die Hydrolyse durch Aminopeptidasen verringert bzw. bei reinen, acetylierten Peptiden (ValGlySerGlu, PheGlyGly, LeuGlyGly, Ala₃, Ala₂) verhindert werden (WALLACE 1992 a). Bernsteinsäureanhydrid und Maleinsäureanhydrid können gleichermaßen zur Blockierung des N-Terminus eingesetzt werden und verhindern *in-vitro* den Abbau zu Ammoniak ebenfalls fast vollständig (WALLACE et al. 1993 b). Auch *in-vivo* entsteht bei Fütterung acetylierter Sojabohnenpeptide weniger Ammoniak im Pansen als bei unbehandeltem Sojabohnenmehl (CAO et al. 2007).

Im Gegensatz zu Peptiden können Proteine durch Acetylierung nicht geschützt und auch der Abbau großer Peptide (u.a. Bradykinin) nur verlangsamt werden, da lange AS-Ketten viele Angriffspunkte für Endoproteinasen bieten (WALLACE 1992 a). In weiteren Versuchen konnte aber nicht bestätigt werden, dass Peptide mit höherem Molekulargewicht tatsächlich weniger gut geschützt werden (WALLACE 1992 b).

Eine Adaptation der ruminalen Mikroorganismenpopulation findet auch nach 21-tägiger Fütterung acetylierter Peptide nicht statt (WITT et al. 1998; WALLACE et al. 1999). Anstatt, wie zunächst befürchtet (WALLACE 1992 a), die Prävalenz von Spezies mit Carboxypeptidaseaktivität zu erhöhen, verließen sich die Mikroorganismen auf das Vorhandensein freier N-Termini (WALLACE 1997).

Fraglich war zunächst auch, ob acetylierte oder anderweitig modifizierte Peptide durch das Wirtstier nutzbar sind (WALLACE et al. 1993 b). WALLACE et al. (1999) gehen trotz möglicher Deacetylierung im Labmagen (CAO et al. 2007) und hoher intestinaler Verdaulichkeit acetylierter Peptide (WALLACE et al. 1998; CAO et al. 2007) davon aus, dass der nutritive Wert durch Acetylierung gemindert wird.

2.1.2.6.2 Unterbindung des Peptidabbaus mittels Peptidaseinhibitoren

Die Tabellen 2.7 und 2.8 geben einen Überblick über verschiedene Dipeptidaseinhibitoren und die von ihnen gehemmte DPP-Aktivität (s. Tab. 2.7) bzw. ihre Wirkmechanismen (s. Tab. 2.8).

Tab. 2.7: Dipeptidaseinhibitoren und jeweils gehemmte Peptidaseaktivität im Pansensaft von Schafen

| Dipeptidaseinhibitor | Gehemmte Peptidaseaktivität | Autor, Jahr |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| GlyPhe-Diazomethylketon | DPP Typ I, Leucinaminopeptidase | WANG et al. 2004 |
| Ala ₂ -Chloromethylketon | DPP Typ I und II | WANG et al. 2004 |
| Benserazid | DPP Typ II, Leucinaminopeptidase | WANG et al. 2004 |
| Diprotin A | DPP Typ IV | WANG et al. 2004 |
| 1,10-Phenanthrolin | DPP (keine Typangabe) | WALLACE et al. 1996 |

Von einer DPP-Hemmung durch GlyPhe-Diazo- und Ala₂-Chloromethylketon sowie Benserazid und Diprotin A sind sowohl *P. ruminicola* 23, *P. albensis* M384, *P. bryantii* B₁₄ und *P. brevis* GA 33 als auch gemischte Pansenmikroorganismenpopulationen betroffen, während für GlyPhe-Diazomethylketon und Benserazid auch eine Hemmung der Leucinaminopeptidaseaktivität in *Sc. bovis* verzeichnet wurde (WANG et al. 2004).

1,10-Phenanthrolin hemmt neben der DPP von *P. albensis* M384 (WALLACE et al. 1995) auch die DPP-Aktivität von *F. succinogenes*, *L. multipara* und *M. elsdenii* (WALLACE et al. 1996). Außer Benserazid sollen die von WANG et al. (2004) untersuchten Stoffe keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum und die Bakterienaufnahme durch Protozoen haben.

Tab. 2.8: Dipeptidaseinhibitoren bei *P. albensis* M384 (nach WALLACE u. McKAIN 1996; innerhalb einzelner Gruppen absteigend nach Effektivität geordnet)

| Dipeptidaseinhibitoren | Vermutete Wirkmechanismen |
|--|---|
| Metallionen: Hg ²⁺ > Cr ²⁺ > Cu ²⁺ > Pb ²⁺ > Cd ²⁺ > Sn ²⁺ > Fe ²⁺ > Ti ²⁺ | <ul style="list-style-type: none"> • Verdrängung des Metallionen-Co-Faktors • Interaktion mit Sulfhydrylgruppen |
| Chelatoren: TPEN > EDTA > TMP > 1,10-Phenanthrolin > EGTA | <ul style="list-style-type: none"> • Reaktion mit Metallionen-Co-Faktor |
| EDTA = Ethylendiamintetraacetat | |
| EGTA = Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure | |
| TMP = 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthrolin | |
| TPEN = N,N,N',N'-Tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin | |

Die Dipeptidasehemmung durch 1,10-Phenanthrolin ist durch Manganionen aufhebbar (WALLACE u. McKAIN 1996). ZHANG et al. (2007) bestätigten die Wirksamkeit eines Dipeptidaseinhibitors (in der Literatur nicht näher bezeichnet) bei der Reduktion der Ammoniakfreisetzung und Erhöhung der Peptidkonzentration im Pansen saft *in-vivo*.

2.1.2.7 Einfluss der Peptidkonzentration auf das Wachstum von Pansenbakterien

Peptide steigern *in-vitro* das Wachstum zellulolytischer (CRUZ SOTO et al. 1994⁷; ATASOGLU et al. 2001) und nicht-zellulolytischer (CRUZ SOTO et al. 1994⁸; ATASOGLU et al. 1998) Pansenbakterienpopulationen sowie das von Gesamtpopulationen ruminaler Mikroorganismen (WALLACE 1997; ATASOGLU et al. 1998). Flüssigkeitsassoziierte Bakterien (FAB) verstärken ihr Wachstum sowohl bei Peptid- als auch Proteinzulagen (CARRO u. MILLER 1999). Besonders stark wird das Wachstum von *Sc. bovis*, *Butyrivibrio* und *Prevotella* durch Peptide aber auch AS gefördert, wenn gleichzeitig Ammoniak verfügbar ist (NILI u. BOOKER 1995). Eine weitere Voraussetzung für die peptidbedingte Wachstumsförderung ist außerdem eine ausreichende Energieverfügbarkeit (WALLACE 1996, 1997).

P. bryantii B₁₄ (CRUZ SOTO et al. 1994; ATASOGLU et al. 1998), *M. elsdenii* und *S. ruminantium* bevorzugen Peptide gegenüber AS und zeigen auf einem Medium mit Peptiden effizienteres Wachstum (CRUZ SOTO et al. 1994). Zellulolyten können Peptide und AS nach CRUZ SOTO et al. (1994) gleich gut nutzen. Mittlerweile wurde aber nachgewiesen, dass zellulolytische Bakterien⁷ bei Peptid-N-Zulagen weniger Peptid-N in mikrobielles N einbauen als AS-N bei AS-Zulagen (ATASOGLU et al. 2001).

In-vivo soll eine Peptidkonzentration von 1,8 mmol/L die Syntheseeffizienz mikrobieller N-Verbindungen (g bakterielles N/kg fermentierter Urschubstanz) maximieren (FU et al. 2001).

⁷ im Versuch *Rc. albus*, *Rc. flavefaciens* und *F. succinogenes*

⁸ im Versuch *M. elsdenii*, *P. bryantii* B₁₄ und *S. ruminantium*

2.1.3 Ruminaler Aminosäurenmetabolismus

2.1.3.1 Aminosäurenkonzentration im Pansensaft

Die ruminale Konzentration freier AS ist niedriger als die Peptidkonzentration und erreicht eine Stunde nach der Fütterung Werte von 1,2 bis 15 mg AS-N/L (WILLIAMS u. COCKBURN 1991), entsprechend 120 bis 882⁹ bzw. 705 bis 1194 µmol AS/L (VELLE et al. 1997¹⁰). Die größten Anstiege zeigen Alanin (WRIGHT u. HUNGATE 1967 a; VELLE et al. 1997) und Prolin (VELLE et al. 1997). FARMER et al. (2004) beobachteten die höchste Konzentration erst zwei Stunden nach der Fütterung eines sojabohnenmehlbasierten Protein-supplements (420 g Rp/kg TS; Heu ad libitum), während bei Grassilage- bzw. Heufütterung schon nach 45 Minuten bis einer Stunde Maximalkonzentrationen erreicht werden (VOLDEN et al. 2002). Nach drei (VOLDEN et al. 2002) bzw. zwei Stunden gleichen sich diese wieder dem Ausgangswert an. Lediglich bei Alanin wird der Ausgangswert später erreicht. Nüchterne Tiere zeigen Gesamtkonzentrationen freier AS um 200⁹ (VELLE et al. 1997) bzw. 130 µmol AS/L¹⁰ (24 Stunden nach der Fütterung; BRITO et al. 2006).

2.1.3.2 Aminosäureaufnahme durch Pansenbakterien

Aminosäuren werden meistens schneller (ARMSTEAD u. LING 1993; LING u. ARMSTEAD 1995) und von anderen Bakterien aufgenommen als Peptide. So bevorzugt *S. ruminantium* im Gegensatz zu *P. bryantii* B₁₄ die Aufnahme von AS gegenüber der von Peptiden (s. Kap. 2.1.2.2). Mit zunehmender Expositionsdauer verringern sich aber sowohl bei *S. ruminantium* als auch *Sc. bovis* die AS-Aufnahmeraten und zeigen die Entstehung eines Gleichgewichts zwischen Aufnahme, Metabolisierung und Exkretion an. Demgegenüber weisen *F. succinogenes*, *Anaerovibrio lipolytica* und *P. bryantii* B₁₄ zwar konstante, aber geringere Aufnahmeraten auf (LING u. ARMSTEAD 1995).

2.1.3.2.1 Aminosäureaufnahme durch Diffusion

Sc. bovis besitzt neben einem aktiven Glutamintransportsystem die Möglichkeit, Glutamin bei hohen Milieukonzentrationen durch passive Diffusion zu inkorporieren (CHEN u. RUSSELL 1989 c). Auch die zu den HAP-Bakterien (hyperammoniumproduzierende Bakterien) zählenden ruminalen Spezies *C. sticklandii* und *C. aminophilum* (s. Kap. 2.1.8.1.11.3 und 2.1.8.1.11.4) können sowohl Glutamin als auch Glutamat (*C. aminophilum*; CHEN u. RUSSELL 1990) sowie Arginin (*C. sticklandii*; sogenanntes low-affinity system; VAN KESSEL u. RUSSELL 1992) durch Diffusion aufnehmen.

2.1.3.2.2 Natriumabhängige Aminosäuretransportsysteme

Viele bakterielle AS-Transportsysteme sind natriumabhängig. Der *S. ruminantium*-Stamm H18 besitzt natriumabhängige Aspartat-, Glutamin/Asparagin-, Lysin-, Phenylalanin/Tyrosin-, Valin/Leucin/Isoleucin- und Serintransportsysteme (STROBEL u. RUSSELL 1991). *C. aminophilum* verfügt, wie in Abbildung 2.7 dargestellt, über separate Transportsysteme für

⁹ unter der Annahme, dass jede einzelne AS nur ein N-Atom enthält

¹⁰ Cys und Phe (VELLE et al. 1997) bzw. Asn, Gln und Trp (BRITO et al. 2006) nicht inbegriffen

Glutamin und Glutamat, die von einem Natriumgradienten, nicht aber durch ein Membranpotenzial angetrieben werden können. Auch Histidin und Serin nimmt es mit Hilfe von natriumabhängigen Transportsystemen auf (CHEN u. RUSSELL 1990). *Peptostreptococcus anaerobius* besitzt neben einem hochaffinen natriumabhängigen Glutaminaufnahmesystem ein niederaffines System, dessen Transportrate von der extrazellulären Glutaminkonzentration bestimmt wird (BECK u. RUSSELL 1994). Außerdem transportiert es Leucin im Antiport mit Natrium. Bei diesem Transportmechanismus handelt es sich vermutlich um einen gemeinsamen Aufnahmemechanismus der verzweigt-kettigen AS Leucin, Valin und Isoleucin, der durch einen chemischen Natriumgradienten oder ein Membranpotenzial in Anwesenheit von Natriumionen angetrieben wird (CHEN u. RUSSELL 1989 b). Im Gegensatz dazu nimmt *Sc. bovis* Glutamin mit Hilfe phosphatgebundener Energie auf (CHEN u. RUSSELL 1989 c) und auch der Leucintransport ist nicht natriumabhängig (RUSSELL et al. 1988 b). Der Serintransport kann bei *Sc. bovis* JB1 sowohl durch ein Natriumkonzentrationsgefälle als auch ein Membranpotenzial bewirkt werden. Zu Threonin- und Alaninaufnahme wird gleichfalls Natrium benötigt (RUSSELL et al. 1988 b).

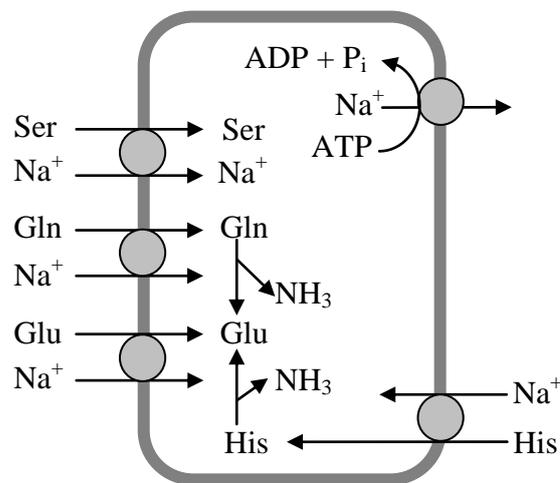


Abb. 2.7: Vermutliche AS-Aufnahmemechanismen von *C. aminophilum* (vereinfacht nach CHEN u. RUSSELL 1990)

Bei *C. sticklandii* wird Arginin in niedrigen Konzentrationen mit Hilfe eines speziellen natriumabhängigen Carriers aufgenommen. Nach intrazellulärer Umsetzung zu Ornithin entsteht ein Ornithingradient, der über Schaffung eines Natriumgradienten wiederum die Argininaufnahme antreibt (sogenanntes high-affinity system; s. Abb. 2.8). Da auch Lysin mit niedriger Affinität transportiert wird, kann Selbiges den Arginintransport schwach hemmen. Mit sinkendem pH-Wert nimmt die Transportleistung des Carriers ab. (VAN KESSEL u. RUSSELL 1992).

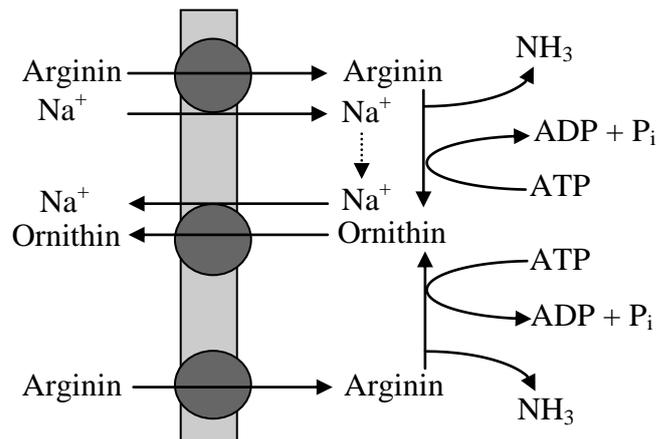


Abb. 2.8: Arginintransport durch *C. sticklandii* (VAN KESSEL u. RUSSELL 1992)

2.1.3.3 Aminosäuresynthese durch ruminale Mikroorganismen

Das Schrifttum bei HÖLTERSINKEN (1990) beschäftigt sich ausführlich mit der Synthese einzelner AS im Pansen. Abbildung 2.9 gibt einen Überblick über bekannte Synthesewege bei bestimmten Spezies und Pansenmikroorganismengruppen. Die zur Erstellung genutzten Studien sind überwiegend älteren Datums, neuere Studien gibt es kaum. Die Codierung der Stoffwechselwege kann folgender Auflistung entnommen werden:

- Gemischte bovine (ALLISON u. BRYANT 1963; WRIGHT u. HUNGATE 1967 b) Pansenbakterien und bovine (SAUER et al. 1975), ovine (ALLISON 1965) bzw. caprine (AMIN u. ONODERA 1997 b; MOHAMMED et al. 1999 a, b; WADUD et al. 2001 b) Pansenmikroorganismen
- *M. elsdenii* (SOMMERVILLE u. PEEL 1967; SOMMERVILLE 1968; ALLISON u. PEEL 1971)
- *P. ruminicola* (ALLISON et al. 1966, 1984; ALLISON u. PEEL 1971); Valinsynthese bei *P. ruminicola* 23 und *P. brevis* GA 33 (ALLISON u. PEEL 1971)
- *M. elsdenii*, *Methanobacterium ruminantium*, *P. ruminicola* ssp. *brevis* und *P. ruminicola* ssp. *ruminicola* (ROBINSON u. ALLISON 1969)
- *Rc. flavefaciens* (ALLISON et al. 1962), *M. elsdenii*, nicht bei *B. fibrisolvans*, *Eu. ruminantium*, *S. ruminantium* und *L. multipara* (ALLISON et al. 1966)
- *S. ruminantium* Stamm D (SMITH et al. 1980)
- *Succinivibrio fibrisolvans* (PATTERSON u. HESPELL 1985)
- *Sc. bovis* (BASSO et al. 1993)
- *F. succinogenes*, *Rc. flavefaciens* (ALLISON 1965)
- *Rc. flavefaciens* (ALLISON et al. 1962; ALLISON u. BRYANT 1963)

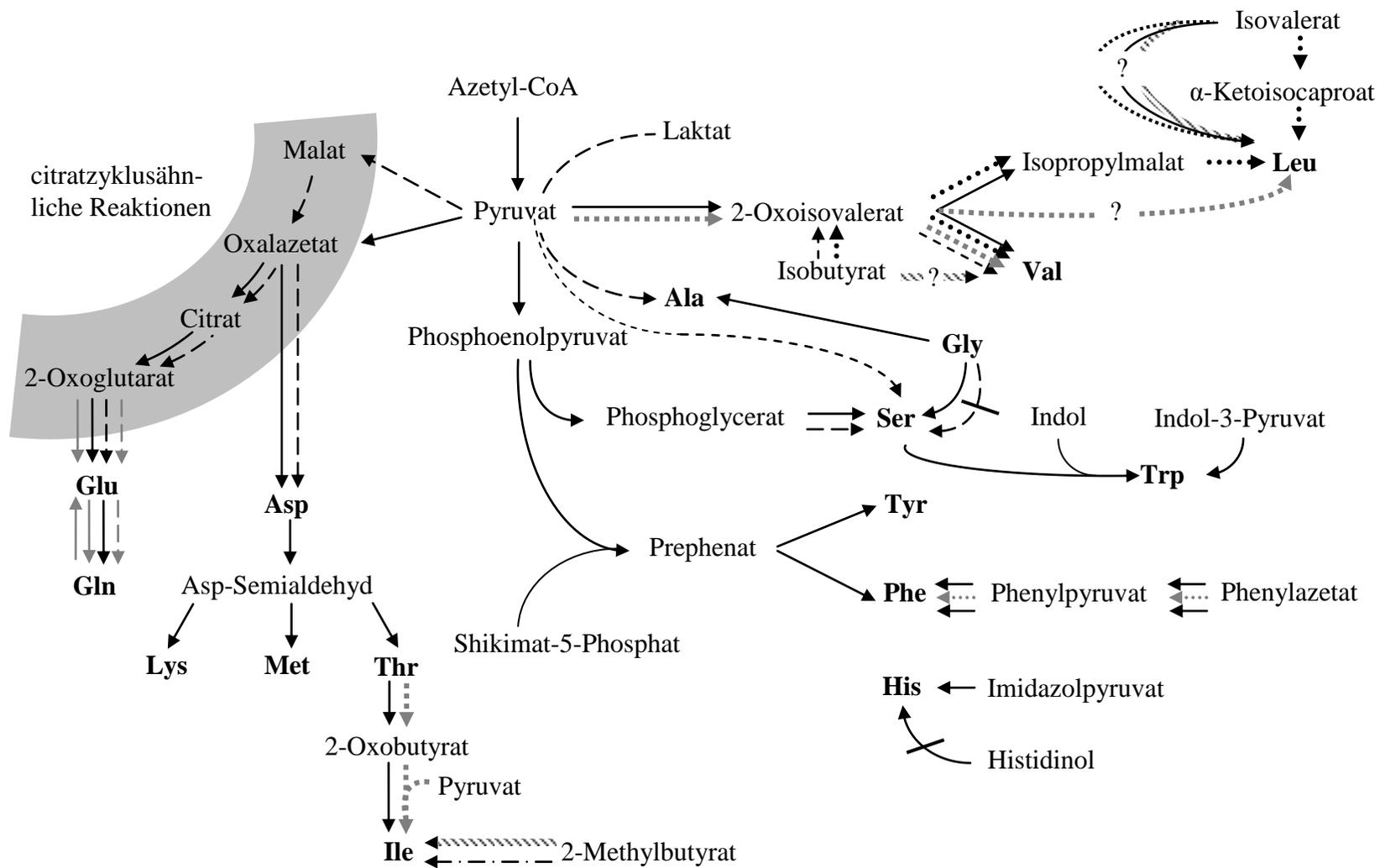


Abb. 2.9: AS-Synthese ruminaler Mikroorganismen (Legende s. Seite 27). Fragezeichen kennzeichnen mögliche, aber unbekannte Zwischenprodukte.

2.1.3.4 Aminosäurenabbau durch ruminale Mikroorganismen

Tabelle 2.9 fasst AS-Abbauprodukte im Pansen zusammen. Endprodukte im AS-Katabolismus der HAP-Bakterien können Tabelle 2.19 entnommen werden.

Tab. 2.9: AS-Abbauprodukte ruminaler Mikroorganismen. Fettdruck kennzeichnet die jeweiligen Hauptabbauprodukte.

| AS | Mikroorganismus | Abbauprodukte | | | | | | | | | | Ref. | | |
|-----|-------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|------|----------|-----------|----------|---------|-----------|-----------|------|---|----------|
| | | NH ₃ | CO ₂ | H ₂ | FIFS | Azetat | Propionat | Butyrat | Valerat | i-Butyrat | i-Valerat | | Caproat | Sonstige |
| Asp | PB, bovin | x | x | | x | x | x | x | | | | | Butyrat: über Succinat | 1 |
| | PB, ovin | | | | | | x | | | | | | | 2 |
| Glu | PM, ovin | | x | | x | | | | | | | | | 3 |
| | PB, bovin | x | x | | x | x | x | x | | | | | | 1 |
| | <i>M. elsdenii</i> | | | | | | | | x | | | | Über Succinat | 4 |
| Ser | PB, bovin | x | x | | x | x | x | x | | | | | | 1 |
| | <i>M. elsdenii</i> | x | x | x | x | x | | x | | | | | α -Oxobutyrat, Pyruvat | 5 |
| His | <i>Allisonella histaminiformans</i> | | | | | | | | | | | | Histamin | 6 |
| | PM, caprin | | | | | | | | | | | | Histamin, Imidazol-laktat und -azetat, 4-Imidazolacrylat | 7 |
| | <i>M. elsdenii</i> | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | α -Oxobutyrat, Pyruvat | 5 |
| Arg | PB, bovin | x | x | | x | x | x | x | | | | | | 1 |
| | PB, bovin | | | | | | | | | | | | Ornithin, weiter zu α -Aminobutyrat und Putrescin | 8 |
| Val | PM, bovin | x | x | | x | | | | | x | | | Über Ketoisovalerat | 9 |
| Leu | PM, ovin | | x | | | (x) | | (x) | | | x | | | 3 |
| | <i>Prevotella</i> ssp. | | | | | | | | | | x | | | 10 |
| Trp | PB, bovin | | | | | | | | | | | | Indol, Skatol | 8 |
| | PB, PP, caprin | | | | | | | | | | | | p-Cresol, Indol, Skatol | 11 |
| Phe | PB, PP, caprin | | | | | | | | | | | | Benzoessäure, Phenylpropionat, -laktat (PB) und -azetat, ggf. Tyrosin | 12 |
| Cys | <i>M. elsdenii</i> | x | x | x | | x | x | x | x | | | | | 5 |
| Lys | PB, bovin | | | | | | | | | | | | α -Aminovalerat, Cadaverin | 8 |
| | <i>S. ruminantium</i> | | | | | | | | | | | | Cadaverin, Putrescin | 13 |

Tab. 2.9: Fortsetzung

| AS | Mikroorganismus | Abbauprodukte | | | | | | | | | | Sonstige | Ref. | |
|-------------------|---|-----------------|-----------------|----------------|------|--------|-----------|---------|---------|-----------|-----------|----------|---|---------|
| | | NH ₃ | CO ₂ | H ₂ | FIFS | Azetat | Propionat | Butyrat | Valerat | i-Butyrat | i-Valerat | | | Caproat |
| | <i>P. ruminicola</i> 23 | | | | | x | x | | | x | | | 2- und 3-Methylbutyrat, Phenylazetat | 14 |
| Trypticase | <i>M. elsdenii</i> | | | | | | | x | x | x | | x | 2- und 3-Methylbutyrat | 14 |
| | <i>Sc. bovis</i> , <i>S. ruminantium</i> , <i>Rb. amylophilus</i> , <i>B. fibrisolvans</i> | | | | | | | | | | | | Keine verzweigt-kettigen FIFS | 14 |
| | <i>Eu. pyruvativorans</i> | | | | | | | | | x | | x | | 15 |
| | PB, ovin | | | | | | | | | | | | Putrescin, Cadaverin, keine anderen biogenen Amine | 8 |
| Kasein-hydrolysat | PB, ovin | x | x | | | | | | | | | | (Un)-verzweigte C ₂ -bis C ₅ -Fettsäuren, kein H ₂ | 16 |

FIFS flüchtige Fettsäuren; PB Pansenbakterien; PM Pansenmikroorganismen;

PP Pansenprotozoen; Ref. Referenz

Referenzen: 1 = SIROTNAK et al. 1953; 2 = LEWIS 1955; 3 = OTAGAKI et al. 1955;

4 = SOMMERVILLE u. PEEL 1967; 5 = LEWIS u. ELSDEN 1955;

6 = GARNER et al. 2002, 2004; 7 = WADUD et al. 2001 a, b;

8 = LEWIS u. EMERY 1962; 9 = DEHORITY et al. 1958; 10 = BLADEN et al. 1961 b;

11 = MOHAMMED et al. 1999 a, b; 12 = AMIN u. ONODERA 1997 a;

13 = TAKATSUKA et al. 1999; 14 = ALLISON 1978; 15 = WALLACE et al. 2003;

16 = EL-SHAZLY 1952

Die Abbauraten freien Serins, Asparagins, Glutamats und Glutamins sind deutlich höher als die von Prolin, Glycin, Methionin und Histidin (VELLE et al. 1997). Genaue Informationen können Abbildung 2.10 entnommen werden. COTTLE und VELLE (1988) bestätigen, dass Methionin, aber auch Threonin langsamer als Lysin abgebaut werden.

Neben Methionin (COTTLE u. VELLE 1988; VELLE et al. 1997), das vermutlich durch Schwefelfreisetzung und der daraus resultierenden Desaminaseaktivitätshemmung seinen eigenen Abbau effektiv hemmt (VELLE et al. 1997), scheint auch Phenylalanin zu den durch Pansenbakterien eher schwer abbaubaren AS zu gehören. Selbiges reichert sich neben Leucin und Tyrosin in Pansenbakterien an, sobald AS oder Peptide supplementiert werden (ARMSTEAD u. LING 1993). Bei Lysin, Methionin und Threonin (VOLDEN et al. 1998) bzw. allen kanonischen AS¹¹ (Phe und Cys nicht erfasst; VELLE et al. 1997) sinkt der Abbau

¹¹ Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, His, Gly, Thr, Ala, Arg, Tyr, Val, Met, Trp, Phe, Ile, Leu, Lys, Pro, Cys

mit steigenden intraruminalen Dosen (VELLE et al. 1997; VOLDEN et al. 1998). Zu beachten ist, dass Austauschprozesse über die Pansenwand, die Hydrolyse mikrobiellen Proteins und die AS-Neusynthese in den entsprechenden Studien nicht berücksichtigt wurden (VELLE et al. 1997).

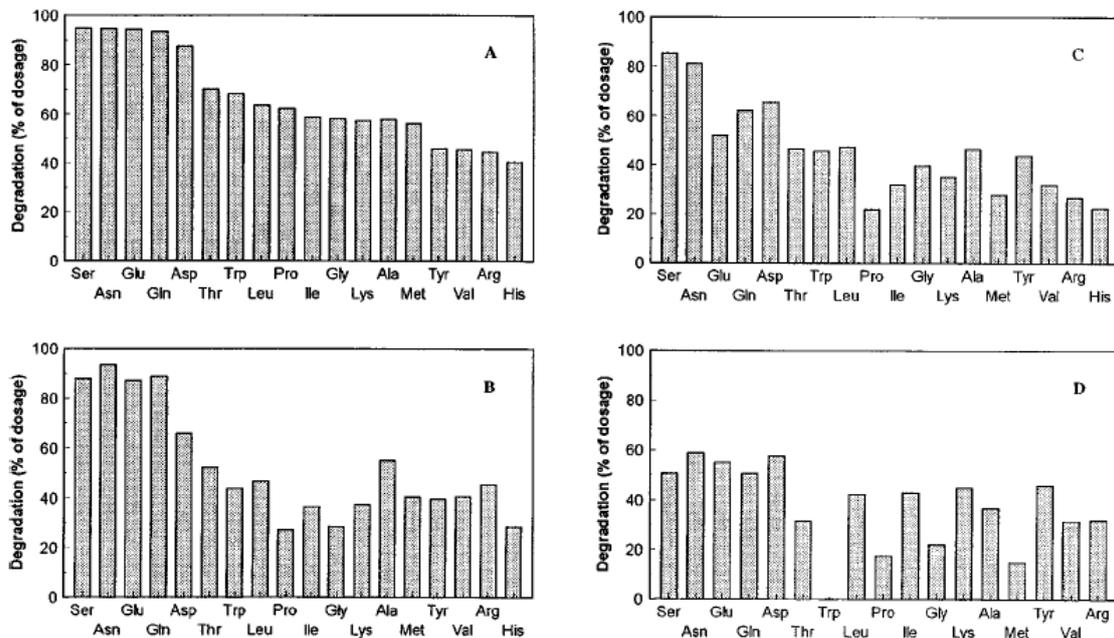


Abb. 2.10: Scheinbarer AS-Abbau in der ersten Stunde nach intraruminaler Infusion von jeweils 75 (A), 150 (B), 300 (C) bzw. 600 (D) mmol einzelner freier AS (aus VELLE et al. 1997)

2.1.3.5 Auswirkungen der An- und Abwesenheit freier Aminosäuren auf das Wachstum von Pansenbakterien

Die Zulage von AS kann das Wachstum von Pansenmikroorganismen steigern (FUJIMAKI et al. 1992; ATASOGLU et al. 1998, 1999, 2001; CARRO u. MILLER 1999; KAJIKAWA et al. 2002). Positiv beeinflusst werden *in-vitro* sowohl gemischte (ATASOGLU et al. 1999), nicht-zellulolytische (ATASOGLU et al. 1998) als auch zellulolytische (ATASOGLU et al. 2001) Pansenbakterienpopulationen. Voraussetzung für einen stimulatorischen Effekt bei zellulolytischen Bakterien ist aber die Energieverfügbarkeit (s. auch Kap. 2.1.9; CRUZ SOTO et al. 1994).

Ein bestimmter *Butyrivibrio*-Stamm (E14) und *P. brevis* GA 33 zeigen erst dann Wachstum, wenn neben Ammoniak auch freie oder peptidgebundene AS anwesend sind (NILI u. BROOKER 1995). Abgesehen von Ammoniak sind so lediglich Glutamin und Glutaminsäure als einzelne zugelegte freie AS in der Lage, die Wachstumsrate und die Effizienz¹² einer gemischten Pansenbakterienpopulation um mehr als 10 % zu erhöhen. Umgekehrt nimmt bei Fehlen von Leucin, Tryptophan, Tyrosin und Glutamat der stimulatorische Effekt eines

¹² Effizienz: g Bakterien/g Zucker

Gemisches¹³ aus AS stärker, bei Fehlen von Valin, Methionin und Phenylalanin weniger deutlich ab. Leucin, Tyrosin, Tryptophan und Glutamat werden folglich als essentiell für die Verbesserung des Wachstums eingestuft, Methionin, Phenylalanin und Valin gelten nach KAJIKAWA et al. (2002) als subessentiell. Für das Wachstum von *F. succinogenes* hingegen ist vermutlich auf Grund eingeschränkter Befähigung zur Synthese Phenylalanin unabdingbar (ATASOGLU et al. 2001), während *Psc. anaerobius* (s. Kap. 2.1.8.1.11.2) neben Phenylalanin auch Leucin und Tyrosin für sein Wachstum benötigt (CHEN u. RUSSELL 1988). Auch Methionin ist vermutlich wachstumslimitierend, da bei seinem Fehlen die mikrobielle Proteinsynthese abnimmt, wenngleich nicht so stark wie beim Fehlen verzweigtkettiger AS. Die Wachstumsdepressionen in gemischten caprinen ruminalen Mikroorganismenpopulation bei Entfernung von Lysin oder Histidin sind weitaus geringer (-12,6 bzw. -4,32 %; WANG et al. 2008).

Dass auch nach Gabe der essentiellen und subessentiellen AS nach KAJIKAWA et al. (2002) im Vergleich mit dem AS-Gemisch¹³ nur 21 % der Wachstumsrate bzw. 25 % der möglichen Effizienz erreicht werden, unterstreicht die Bedeutung der übrigen proteinogenen AS. Besonders durch zusätzliche Serin-, Glycin- und Cysteingaben können Wachstumsrate und Effizienz deutlich erhöht werden (KAJIKAWA et al. 2002).

2.1.3.6 Hemmung des Wachstums von Pansenbakterien durch freie Aminosäuren

Bereits in der Mitte des letzten Jahrhunderts wurde beobachtet, dass Threonin, Isoleucin und Leucin sowie Phenylalanin, wenn es in Gegenwart von Tyrosin zugelegt wurde, das Wachstum von *Sc. bovis* hemmten (WASHBURN u. NIVEN 1948). Eine neue Studie (KAJIKAWA et al. 2002) bestätigt die hemmende Wirkung auf Wachstumsrate und -effizienz in einer gemischten Pansenbakterienpopulation durch geringe (1,0 bzw. 2,5 mg N/L) Threonin-, Phenylalanin- und Isoleucin- und höhere (10 mg N/L) Leucin- und Cysteindosen. Auch Valin und Lysin sollen in der Lage sein, das mikrobielle Wachstum gemischter Populationen zu verlangsamen (KAJIKAWA et al. 2002).

Die hemmende Wirkung des verzweigtkettigen Isoleucins und des aromatischen Phenylalanins sind durch andere verzweigtkettige (Valin, Leucin) bzw. aromatische (Tyrosin, Tryptophan) AS aufhebbar, weswegen angenommen wird, dass bei Zulage bestimmter freier AS gemeinsame Enzyme im frühen Syntheseweg gehemmt werden (Feedbackhemmung; KAJIKAWA et al. 2002, 2005). Durch Supplementierung, ggf. auch verzweigtkettiger Fettsäuren, wird der hemmende Effekt umgangen, obwohl die Feedbackhemmung selbst weiterhin besteht. Der negative Effekt von Threonin ist nicht durch eine Feedbackhemmung begründet und lässt sich durch Lysin und Methionin nicht mindern (obwohl diese den gleichen Syntheseweg nutzen), wohl aber durch Supplementierung mit Glutaminsäure (-96 %), Serin (-87 %), Valin (-76 %), Alanin (-71 %) und Glutamin (-50 %). Denkbar ist, dass AS-Transportvorgänge in die mikrobiellen Zellen oder andere extrazelluläre Prozesse (nicht genauer bezeichnet) durch Anwesenheit freier AS behindert werden (KAJIKAWA et al. 2005). *In-vivo* übersteigt der Peptidtransport vermutlich quantitativ den der AS (WALLACE et al. 1997 a), so dass Wachstumshemmungen auch durch intrazelluläre AS-Freisetzung bedingt sein könnten (KAJIKAWA et al. 2005).

Interessanterweise sind die AS, welche die durch Threonin, Phenylalanin und Isoleucin

¹³ im Gemisch enthaltene 20 α -AS: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val

induzierte Hemmung aufheben können, weitgehend identisch mit den essentiellen AS für das bakterielle Wachstum (Leu, Tyr, Trp, Glu; KAJIKAWA et al. 2002). Es ist vorstellbar, dass sie den hemmenden Effekt von Isoleucin, Phenylalanin und Threonin maskieren. Während Threonin und Isoleucin gemeinsam mit ihren Antagonisten aus einem AS-Gemisch entfernt werden können, ohne dass negative Effekte auf das bakterielle Wachstum auftreten, ist dies bei Phenylalanin nicht möglich. Die Präsenz aromatischer AS muss daher essentiell für die Wachstumsstimulation der Pansenbakterienpopulation sein (s.o.; KAJIKAWA et al. 2005).

2.1.3.7 Einfluss der Peptid- und Aminosäurekonzentrationen auf die Neusynthese von Aminosäuren und weiteren Stickstoffverbindungen durch Pansenbakterien

Das Ausmaß der Neubildung proteinogener N-Verbindungen hängt in einer gemischten ruminalen Mikroorganismenpopulation von der Qualität aller verfügbaren N-Verbindungen ab (ATASOGLU et al. 1999; WALLACE et al. 1999). Peptide (Kaseinhydrolysat) und AS (Mischung aus saurem Kaseinhydrolysat, Cystein und Tryptophan) reduzieren die Neusyntheserate mikrobieller N-Verbindungen auf 37 bzw. 55 %. Eine Mischung aus Prolin, Glycin, Valin und Threonin ist weniger effektiv, so dass die Neusyntheserate der mikrobiellen N-Verbindungen immerhin 86 % beträgt (ATASOGLU et al. 1999). Mit steigenden Peptid- und AS-Angeboten sinkt die Neusynthese aller proteinogenen N-Verbindungen sowohl bei zellulolytischen (ATASOGLU et al. 2001) als auch nicht zellulolytischen Bakterien ab (ATASOGLU et al. 1998), wobei die AS-Synthese am stärksten betroffen ist (ATASOGLU et al. 2001). Speziell die Prolinsynthese wird vom Angebot des Mediums gesteuert und es kommt erst dann zur Neusynthese, wenn kein freies Prolin mehr verfügbar ist (ONODERA et al. 1997). Neben nicht zellulolytischen Pansenbakterien (*P. bryantii* B₁₄, *S. ruminantium*, *Sc. bovis* ES1; ATASOGLU et al. 1998) und gemischten Populationen (ATASOGLU et al. 1999) nehmen sogar *Ruminococcus*-Spezies, die sonst eher zur Neusynthese derartiger Verbindungen neigen, Prolin bevorzugt aus der Umgebung auf (ATASOGLU et al. 2001).

Von gemischten Pansenbakterienpopulationen werden auch Glycin, Valin, Leucin und Threonin, sofern möglich, aus dem Medium aufgenommen, während Glutamat und Alanin, gefolgt von Aspartat, eher synthetisiert werden. Ob präformierte AS frei oder in Peptiden gebunden vorliegen, ist nicht ausschlaggebend (ATASOGLU et al. 1999). Auch bei nicht zellulolytischen Pansenbakterien werden die Glutamat- und Aspartatsynthese weniger stark beeinflusst (ATASOGLU et al. 1998). Ursache für die bleibende Neusynthese soll die grundlegende Bedeutung dieser AS bei frühen Reaktionen der Ammoniakassimilation sein (ATASOGLU et al. 1999; s. Kap. 2.1.4.3).

In zellulolytischen Populationen hingegen werden durch Peptid- oder AS-Supplementierung die Aspartat- und Glutamatsynthese zusammen mit der von Alanin, Glycin, Serin, Threonin und Tyrosin stärker gesenkt als die von Valin, Leucin, Isoleucin und Prolin (ATASOGLU et al. 2001). Womöglich ist hierfür der spezielle Bedarf an verzweigt-kettigen Fettsäuren bzw. AS bei zellulolytischen Bakterien verantwortlich (ALLISON et al. 1962).

In gemischten Populationen sinkt durch Gabe einer Mischung aus Prolin, Glycin, Valin und Threonin die Synthese aller AS (s.o.) bis auf Lysin, besonders stark aber die von Leucin und Isoleucin (ATASOGLU et al. 1999).

In welchem Umfang neu synthetisierte AS wiederum in bakterielles Protein eingebaut werden, hängt möglicherweise vom Syntheseweg ab. Es konnte nachgewiesen werden, dass aus Indol-3-Pyruvat synthetisiertes Tryptophan (s. Abb. 2.9) zu einem geringeren Teil direkt in bakterielles Protein eingebaut wird (MOHAMMED et al. 1999 a), als aus Serin und Indol

synthetisiertes (MOHAMMED et al. 1999 b). Protozoen bauen das von ihnen gebildete Tryptophan nicht in ihr Protein ein (MOHAMMED et al. 1999 a, b).

2.1.3.8 Ruminaler Lysin- und Methioninmetabolismus

2.1.3.8.1 Ruminaler Lysinmetabolismus

Der wichtigste Aufnahmeweg für Lysin durch ruminale Bakterien ist ein vereinfachter Diffusionsmechanismus. Außerdem kann es zumindest bei *C. sticklandii* über einen speziellen Carrier mit niedriger Lysinaffinität aufgenommen werden (VAN KESSEL u. RUSSELL 1992).

Lysin wird von Bakterien (EL-WAZIRY u. ONODERA 1996; ONODERA et al. 1997) und Protozoen (ONODERA u. KANDATSU 1974; ONODERA et al. 1974, 1997; ONODERA 1990; EL-WAZIRY u. ONODERA 1996) aus Diaminopimelat (DAP) synthetisiert. Protozoen nutzen vor allem DAP, das im Peptidoglycan der bakteriellen Zellwände gebunden ist (ONODERA et al. 1974). Zur Lysinsynthese wird das DAP-Stereoisomer meso-DAP benötigt¹⁴ (ASADA et al. 1981), das sowohl von ruminale Bakterien als auch Ciliaten aus LL- und DD-DAP gebildet werden kann. Obwohl die Epimerisierung aller drei DAP-Stereoisomere in gemischten Pansenbakterienpopulationen möglich ist (EL-WAZIRY u. ONODERA 1996), wird DD-DAP in geringerem Umfang genutzt. Pansenbakterien aus dem Pansen von Ziegen und Schafen enthalten sogar nur meso- und LL-DAP, *Anaerovibrio lipolytica* 5S, *P. bryantii* B₁₄ und *Sc. bovis* JB1 nur meso-DAP (ONODERA et al. 1997).

Die Lysinproduktion von Bakterien, Protozoen und ihrem Gemisch wird durch Vitamin B₆ und Salinomycin, vor allem aber durch die kombinierte Gabe beider Substanzen erhöht (ONODERA et al. 1997). Alanin, Serin und Cystein hemmen die Lysinsynthese der Protozoen aus DAP stark, Glycin hingegen nur schwach (ONODERA 1990).

In *S. ruminantium* werden sowohl L-Lysin, L-Ornithin als auch L-2,4-Diaminobutylsäuredihydrochlorid von einer 88 kDa schweren Lysindecaboxylase abgebaut. Sie besteht aus zwei identischen Monomeren zu je 42 (TAKATSUKA et al. 1999) bzw. 43 kDa (TAKATSUKA et al. 2000) und baut weder D-Lysin noch DL-1,6-Diaminopimelinsäure, L-Arginin, L-Glutamin und L-Histidin ab (TAKATSUKA et al. 1999). Beim Eintritt in die stationäre Phase wird das Enzym von ATP-abhängigen Proteasen zerstört (YAMAGUCHI et al. 2002). Während TAKATSUKA et al. (1999) vermuten, dass Cadaverin als Antienzym der Lysindecaboxylase wirkt, konnte nachgewiesen werden, dass ihr Abbau durch ein 22 kDa schweres, vermutlich durch Putrescin und Spermidin induziertes Protein katalysiert wird (YAMAGUCHI et al. 2002).

Auf Grund höher Lysinanteile im Protozoen- gegenüber dem Bakterienprotein (s. Kap. 2.1.3.11), wird vermutet, dass das Lysinangebot das Protozoenwachstum limitiert WANG et al. (2008).

2.1.3.8.2 Ruminaler Methioninmetabolismus

Methioningaben können den mikrobiellen Abbau von Methionin selbst, aber auch von Cystein, Tyrosin und Isoleucin reduzieren (BACH u. STERN 1999) bzw. die ruminale Konzentrationen von Isoleucin, Glutamin, Glutamat, Glycin, Tyrosin, Valin, Aspartat, Asparagin,

¹⁴ im Versuch *Bacillus sphaericus*

Arginin, Histidin, Prolin und Leucin in aufsteigender Reihenfolge durch Abbauminderung steigern. Ursächlich sollen die Inhibition von Desaminasen infolge Schwefelfreisetzung und eine generelle Depression des ruminalen Metabolismus durch Methionin sein (VELLE et al. 1997). Letzteres erklärt möglicherweise, dass höhere Methioninzulagen die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese nicht verbessern können (BACH u. STERN 1999).

Die gesunkene Isovaleratkonzentration in der Studie CHUNG et al. (2006) unter Methionin-supplementierung scheint die Desaminaseinhibition zu bestätigen, dagegen sprechen aber gleichzeitig gestiegene Ammoniakkonzentrationen.

Die langsam, aber leicht zur Verfügung stehende Methioninquelle 2-Hydroxy-4-methylthio-butylsäure (HMB) soll im Pansen helfen, Oxalazetat für die Synthese anderer AS oder für die Energiegewinnung einzusparen (NOFTSGER et al. 2003). Trotzdem wirken sich neben Methionin HMB und dessen Isopropylester iHMB nicht auf N-Flüsse¹⁵ zum Blättermagen, bakterielle N-Gehalte, ruminale AS-Konzentrationen (NOFTSGER et al. 2005) und Protozoenzahlen (NOFTSGER et al. 2005; KARNATI et al. 2007) aus. Außerdem wird bei HMB-Supplementierung weniger N in Form von Ammoniak zur Synthese mikrobieller N-Verbindungen genutzt. Die Konzentrationen verzweigtkettiger Fettsäuren steigen möglicherweise infolge des substratsparenden Effekts von HMB an, obwohl die Populationsgröße der i-Säuren nutzenden Bakterien *F. succinogenes*, *Rc. flavofaciens* und *Rc. albus* sich nicht verändert (NOFTSGER et al. 2003). VÁZQUEZ-AÑÓN et al. (2001) dokumentieren gegenüber Ansätzen ohne Methioninzulage bei HBM aber zumindest *in-vitro* gesunkene Ammoniakkonzentrationen und in moderaten Dosen auch eine höhere mikrobielle Proteinsynthese-effizienz.

Da die Beeinflussung des ruminalen Proteinstoffwechsels eher gering zu sein scheint (NOFTSGER et al. 2005; KARNATI et al. 2007) und teilweise sogar negative Effekte erkennbar sind (weniger Ammoniak wird genutzt; NOFTSGER et al. 2003), ist der positive Effekt von HMB auf die Milchleistung möglicherweise durch dessen gegenüber Methionin höheres Vermögen, unverändert aus dem Pansen entweichen zu können, bedingt. Tabelle 2.10 zeigt, in welchen Anteilen HMB und Methionin aus dem Pansen bzw. entsprechenden *in-vitro*-Versuchssystemen entweichen können.

Tab. 2.10: HMB- und Methioninsupplemente und ihr Entweichen aus dem Pansen bzw. dem Versuchssystem

| Met-Supplement | Bedingung | Passageanteil [%] | Autor, Jahr |
|----------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| HMB | <i>In-vivo</i> , Rind | 50 ¹ | KOENIG et al. 1999 |
| HMB | <i>In-vitro</i> , Rind | 22 bis 43 ² | VÁZQUEZ-AÑÓN et al. 2001 |
| HMB | <i>In-vivo</i> , Rind | 39,5 ¹ | KOENIG et al. 2002 |
| HMB | <i>In-vivo</i> , Rind | 5,3 ³ | NOFTSGER et al. 2005 |
| Methionin | <i>In-vivo</i> , Rind | 22,1 ⁴ | VOLDEN et al. 1998 |
| Methionin | <i>In-vitro</i> , Rind | 10 bis 23,9 ⁵ | BACH u. STERN 1999 |

¹ von gesamter Dosis

² von gesamter Dosis bei unterschiedlichen Flüssigkeitsverdünnungsraten (0,15 bzw. 0,125/Stunde) und Partikelretentionszeiten (16,7 bzw. 25 Stunden)

³ Passagerate kleiner Partikel 0,071/Stunde, Flüssigkeitspassagerate 0,167/Stunde

⁴ Mittelwert bei verschiedenen Dosierungen und Fütterungsniveaus nach acht Stunden

⁵ Rechenwert, Partikelpassagerate 0,055/Stunde, Flüssigkeitspassagerate 0,10/Stunde

¹⁵ Gesamt-N, Ammoniak-N, andere N-Verbindungen als Ammoniak, nicht-bakterieller N, bakterieller N

2.1.3.9 Wirkungen nicht-proteinogener Aminosäuren im Pansen: Diaminobutylsäure und 2-Amino-4-N-Azetylaminobutylsäure

Heu aus *Lathyrus sylvestris* (Wilde Platterbse) enthält 2,4-Diaminobutylsäure (DABA), welche die hepatische Harnstoffsynthese hemmt. Schafe, die mit diesem Heu gefüttert werden, zeigen ohne vorherige Adaptation neurologische Symptome. Werden die Tiere hingegen an das Heu gewöhnt, adaptiert sich die ruminale Mikroflora und die Toxizität von DABA nimmt ab (RASMUSSEN et al. 1993).

Die Samen (EVANS et al. 1985) und Blätter (REED et al. 2001) von *Acacia angustissima* (Prärie- oder Weißballakazie) enthalten neben DABA vor allem 2-Amino-4-N-Azetylaminobutylsäure (N-DABA). Ihr Verzehr ruft bei nicht adaptierten Schafen neben neurologischen Symptomen Todesfälle hervor. Pathologisch-anatomische Untersuchungen zeigen, dass auch das Herz-Kreislaufsystem betroffen ist. Auf ruminaler Ebene nimmt die Protozoenzahl mit *Acacia angustissima*-Zulage ab und entsprechende Extrakte hemmen *in-vitro* das Wachstum zellulolytischer Bakterien (*Rc. albus*, *Rc. flavefaciens*) sowie das von *Prevotella* sp. (Stamm D31D) und *Sc. bovis*, während *S. ruminantium* nicht beeinflusst wird (ODENYO et al. 1997). Toxische Effekte auf Zellulolyten wurden auch durch Oxalyldiaminopropionsäure, einer ebenfalls nicht proteinogenen AS, beobachtet (PENG et al. 2005).

Die erwähnte Adaptation der Mikroflora (RASMUSSEN et al. 1993; ODENYO et al. 1997) setzt wiederum voraus, dass Mikroorganismen, die zur DABA- bzw. N-DABA-Metabolisierung befähigt sind, im Pansen existieren und sich vermehren können. Mittlerweile konnten sowohl aus dem Pansen eines adaptierten Schafs in Äthiopien (ROBERTSON McKIE et al. 2004) als auch eines australischen Merinoschafs (McSWEENEY et al. 2005) Bakterien isoliert werden, die zum DABA-Abbau befähigt sind. N-DABA wiederum wird von einzelnen toleranten Isolaten (v.a. bei afrikanischen Wildwiederkäuern; ROBERTSON McKIE et al. 2004) bzw. von Reinkulturen N-DABA-abbauender Spezies (McSWEENEY et al. 2005) nicht abgebaut, wohl aber von Mischkulturen dieser Spezies. DABA als mögliches Zwischenprodukt akkumuliert *in-vitro* während des N-DABA-Abbaus nicht, wenn Kohlenhydrate anwesend sind (McSWEENEY et al. 2005).

PENG et al. (2007) konnten aus dem Pansen von Schafen ein stäbchenförmiges Bakterium isolieren, das DABA aus *Acacia angustissima* sogar als N-Quelle nutzen kann, wenn gleichzeitig Glukose als Energiequelle verfügbar ist. Die DABA-Abbaurrate ist sehr variabel (3,2 bis 83,5 %) und von Inkubationsdauer, DABA-Konzentration und Glukoseverfügbarkeit abhängig.

Eine Adaptation der Mikroflora zu Gunsten des Wirtstieres scheint somit möglich und wird durch den Umstand gestützt, dass Panseninhalt von bereits adaptierten Schafen native Schafe vor Intoxikation schützt (RASMUSSEN et al. 1993; ODENYO et al. 1997).

2.1.3.10 Aminosäurenprofil des pansenbeständigen Proteins

Das im Pansen synthetisierte mikrobielle Protein ist von hohem biologischem Wert (NOLAN 1993; WALLACE 1994) für das Tier, da es unter anderem mehr Methionin und Lysin als viele Futterproteine enthält (WALLACE 1994). Trotzdem sind die Anstrengungen, die Proteinversorgung des Tieres über größere pansenbeständige Proteinanteile (RUP-Anteile) zu verbessern, weitaus größer als die, die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese zu erhöhen (BEEVER 1993). Mittels RUP sollen nach ERASMUS (1991) möglicherweise auch AS bereitgestellt werden können, die das mikrobielle Protein nicht in ausreichender Menge enthält.

Unter anderem in Grassilagen unterscheiden sich die Abbauraten der einzelnen AS und somit das originäre AS-Profil des Futterproteins von dem des RUP (VON KEYSERLINGK et al. 1998). Tabelle 2.11 zeigt die ruminalen Abbaubarkeiten einzelner AS in Gras- und Maissilagen sowie gemischten Rationen und Gras selbst. Die Ergebnisse einzelner Studien sind heterogen und teilweise gegensätzlich. Während beispielsweise Methionin in den Studien von VARVIKKO (1986) und BACH und STERN (1999) zu den am besten abbaubaren AS zählt, stellten VON KEYSERLINGK et al. (1998) und TAGHIZADEH et al. (2005) speziell für Methionin nur geringe bzw. mittlere Abbauraten fest. Dies steht mit der Beobachtung in Einklang, dass auch in weiteren Futtermitteln (s. Tab. 2.12) die Methioninkonzentration im RUP von der Natur des Futtermittels abhängig war (ERASMUS et al. 1994 a).

Tab. 2.11: Abbau einzelner AS in unterschiedlichen Futtermitteln [%] nach zwölfstündiger ruminaler bzw. in-vitro-Inkubation (Ausnahme BACH u. STERN 1999, hier ist der Probenentnahmezeitpunkt unbekannt)

| Autor, Jahr | VARVIKKO 1986 | VON KEYSERLINGK et al. 1998 | TAGHIZADEH et al. 2005 | BACH u. STERN 1999 |
|------------------|------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Technik | <i>in-vivo</i> | <i>in-vivo</i> | <i>in-vivo</i> | <i>in-vitro</i> |
| Futtermittel | Gras | Grassilage | Maissilage | Gemischte Ration ¹ |
| Asp ² | 77,1 | 55,8 | 38 | 42,4 |
| Glu ² | 75,9 | 54,7 | 33 | 48,9 |
| Ser | 77,3 | 48,6 | 25 | 44,6 |
| His | 90,0 | 47,1 | 29 | 50,2 |
| Gly | 80,3 | 53,4 | 28 | 41,3 |
| Thr | 75,9 | 54,1 | 24 | 37,9 |
| Ala | 84,3 | 60,1 | 39 | 41,2 |
| Arg | 86,4 | 46,1 | 6 | 51,4 |
| Tyr | 77,7 | 54,1 | 40 | 21,2 |
| Met | 78,2 | 34,8 | 25 | 83,4 |
| Val | 73,1 | 61,1 | 27 | 41,5 |
| Phe | 79,1 | 52,8 | 12 | 43,2 |
| Ile | 74,4 | 59,9 | 8,5 | 37,9 |
| Leu | 76,0 | 57,4 | 23 | 46,2 |
| Lys | 80,6 | 56,5 | 13 | 53,4 |
| Pro | | | | 55,8 |
| Cys | | | | 34,2 |

¹ Mittelwerte von vier gemischten Rationen bestehend aus Maissilage, Luzerneheu und Konzentratkomponenten (die Einzelwerte bei allen vier Rationen unterscheiden sich nur vereinzelt mit $p < 0,05$)

² in der Studie VON KEYSERLINGK et al. (1998) jeweils auch Asn bzw. Gln enthalten

Da die Gehalte der verzweigt-kettigen AS Valin, Isoleucin und Leucin bei *in-situ*-Inkubation von Grassilage besonders in den ersten zwölf Stunden abnehmen, wird davon ausgegangen, dass der lösliche Proteinanteil in Grassilagen hohe Gehalte dieser AS aufweist (VON KEYSERLINGK et al. 1998).

Zahlreiche Versuche mit weiteren Futtermitteln (VARVIKKO 1986; ERASMUS et al. 1994 a; COZZI et al. 1995; O'MARA et al. 1997; HARSTAD u. PRESTLØKKEN 2001; TAGHIZADEH et al. 2005) zeigen ebenfalls heterogene AS-Abbauraten, während MAIGA et al. (1996) sowie PIEPENBRINK und SCHINGOETHE (1998) keine Unterschiede zwischen originären AS-Profilen und denen des RUP unterschiedlicher Futtermittel nachweisen konnten. Tabelle 2.12 zeigt eine Übersicht der eingesetzten Futtermittel in den erwähnten Studien.

Tab. 2.12: Übersicht über Futtermittel zur Bestimmung des RUP-Aminosäurenprofils

| Autor, Jahr | Futtermittel |
|---------------------------------|---|
| VARVIKKO 1986 | Gerste, Gerstenstroh, Rapssaat, Deutsches Weidelgras (<i>Lolium perenne</i>) |
| ERASMUS et al. 1994 a | Luzerneheu, Bogen-Liebesgras-Heu, Mais und Hirse sowie Fisch-, Tier-, Blut-, Maiskleber-, Sonnenblumen-, Erdnuss-, Baumwoll- und Sojabohnenmehl |
| COZZI et al. 1995 | Maisgluten-, Sojabohnen-, Herings- und Fleischmehl |
| MAIGA et al. 1996 | Blut- und Fleisch-, Maiskleber- und Sojabohnenmehl |
| O'MARA et al. 1997 | Deutsches Weidelgras (<i>Lolium perenne</i>), Fisch-, Sojabohnen-, Rapssaat- und Baumwollsaatmehl sowie Maiskleber |
| PIEPENBRINK u. SCHINGOETHE 1998 | Blut-, Maisgluten-, Canola- und Fischmehl |
| VOLDEN et al. 1998 | TMR aus Grassilage und Konzentrat |
| VON KEYSERLINGK et al. 1998 | Grassilage |
| BACH u. STERN 1999 | Gemischte Ration: Maissilage, Luzerneheu und Konzentratkomponenten |
| HARSTAD u. PRESTLØKKEN 2001 | Maiskleber-, Raps- und Fischmehl |
| TAGHIZADAË et al. 2005 | Fleisch-, Fisch-, Baumwollsaat- und Sojabohnenmehl, Mais, Gerste, Gerstenheu, Maissilage, Luzerneheu, Weizenkleie |

Im Gegensatz zu VON KEYSERLINGK et al. (1998) stiegen in mehreren Studien (VARVIKKO 1986; ERASMUS et al. 1994 a; O'MARA 1997; HARSTAD u. PRESTLØKKEN 2001) die Gesamtanteile von Isoleucin und Leucin und bei VARVIKKO (1986) auch der von Valin in den Rückständen an, weswegen diese Autoren eine gewisse Resistenz gegen mikrobiellen Abbau vermuteten.

Während Lysin (ERASMUS et al. 1994 a; COZZI et al. 1995; O'MARA et al. 1997), Glutamat (O'MARA et al. 1997) und Arginin (COZZI et al. 1995; O'MARA et al. 1997) auch in anderen Futtermitteln gut abbaubar zu sein scheinen, nehmen Methionin- bzw. Phenylalanin-gehalte in den Futterrückständen einiger Futtermittel eher zu (ERASMUS et al. 1994 a;

COZZI et al. 1995; O'MARA et al. 1997; HARSTAD u. PRESTLØKKEN 2001). HARSTAD und PRESTLØKKEN (2001) ermittelten außerdem bei mehreren Futtermitteln geringe ruminale Abbauraten (entsprechend höheren Gehalten im RUP) für Tyrosin und höhere (entsprechend niedrigeren Gehalten im RUP) für Glycin und Cystein.

Dass das AS-Profil des RUP, unabhängig vom ruminalem mikrobiellen Abbau, maßgeblich vom Futtermittel abhängt zeigt auch, dass Fleischmehl-RUP mit gestiegenen Threonin-, Methionin-, Valin-, Phenylalanin-, Leucin- Isoleucin- und Lysingehalten deutliche Unterschiede zu den RUP-AS-Profilen anderer Proteinsupplemente aufweist. Die angereicherten AS sind bei Fleischmehl möglicherweise Bestandteile schwer abbaubarer Polypeptide (COZZI et al. 1995). Zusammen mit den Ergebnissen der Studien VARVIKKO (1986), ERASMUS et al. (1994 a), O'MARA et al. (1997), VON KEYSERLINGK et al. (1998), BACH und STERN (1999), HARSTAD und PRESTLØKKEN (2001) sowie TAGHIZADAE et al. (2005) kann so belegt werden, dass die Abbauraten einzelner AS ebenfalls vom Futtermittel abhängen und diese Unterschiede in den AS-Profilen des RUP bedingen. Sowohl erhöhte Wasserlöslichkeit der Proteine (COZZI et al. 1995) als auch gute Abbaubarkeit eines Futtermittels tragen zu Änderungen in den AS-Profilen bei (O'MARA et al. 1997).

Lediglich bei Sopralin (formaldehydbehandeltes Sojabohnenmehl) tritt infolge gleichmäßigen Schutzes aller AS keine Änderung des AS-Profiles durch ruminale Inkubation auf (CROOKER et al. 1986; O'MARA et al. 1997). Hitzebehandlung kann Änderungen im AS-Profil des Sojabohnenmehls hingegen nicht verhindern (CROOKER et al. 1986).

2.1.3.11 Aminosäurenprofile einzelner mikrobieller Fraktionen im Pansen

CLARK et al. (1992) berechneten aus der Versuchsergebnissen von 17 weiteren Autoren die durchschnittlichen AS-Gehalte im Protein von Pansenbakterien (s. Tab. 2.13). Die Glutamat- und Aspartatanteile sind am höchsten, Methionin und Histidin sind in wesentlich geringeren Mengen enthalten. Ähnliche Ergebnisse erzielten SHABI et al. (2000) für eine Population aus FAB und PAB, lediglich der Histidingehalt lag tiefer (\bar{x} 0,52 g/100 g AS), der Phenylalanningehalt hingegen höher (\bar{x} 7,66 g/100 g AS). Auch ERASMUS et al. (1994 b) bestätigen mit Ausnahme höherer Serinanteile (\bar{x} 6,62 g/100 g AS) die Ergebnisse der Berechnungen von CLARK et al. (1992).

Tab. 2.13: Durchschnittliche AS-Gehalte der Pansenbakterien (CLARK et al. 1992; Angaben in g/100 g AS)

| AS | Asp | Glu | Ser | His | Gly | Thr | Ala | Arg | Tyr | Val | Met | Phe | Ile | Leu | Lys | Pro |
|--------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gehalt | 12,2 | 13,1 | 4,6 | 2,0 | 5,8 | 5,8 | 7,5 | 5,1 | 4,9 | 6,2 | 2,6 | 5,1 | 5,7 | 8,1 | 7,9 | 3,7 |

Zu beachten ist, dass sowohl Unterschiede zwischen den AS-Profilen von Pansenbakterien und -protozoen (CHAMBERLAIN et al. 1986; MARTIN et al. 1996; SHABI et al. 2000; KORHONEN et al. 2002), als auch innerhalb der bakteriellen Fraktionen (PAB vs. FAB) bestehen (MARTIN et al. 1996; RODRÍGUEZ et al. 2000; KORHONEN et al. 2002).

PAB weisen niedrigere Alanin- und höhere Leucin- sowie teilweise auch Phenylalaninanteile am bakteriellen Protein auf als FAB (MARTIN et al. 1996; RODRÍGUEZ et al. 2000; KORHONEN et al. 2002; BOGUHN et al. 2006 b). Unterschiede zwischen FAB und PAB

sind vermutlich durch unterschiedliche Spezies bedingt, ein niedrigerer Alaninanteil bei PAB deutet möglicherweise auf größere Populationsanteile grampositiver Spezies hin (RODRÍGUEZ et al. 2000).

Protein aus Protozoen enthält höhere Lysin- und Glutamat-, dafür aber niedrigere Glycin-, Alanin- und Valinanteile als bakterielles Protein (CHAMBERLAIN et al. 1986; MARTIN et al. 1996; SHABI et al. 2000; KORHONEN et al. 2002).

Eine detaillierte Übersicht über die Ergebnisse einzelner Studien gibt Tabelle 2.14, Abbildung 2.11 zeigt die AS-Profile von PAB, FAB und Protozoen im Pansensaft von Rindern.

Tab. 2.14: Vergleich der AS-Anteile am mikrobiellen Protein zwischen PAB und FAB sowie zwischen ruminalen Bakterien und Protozoen (PP)

| AS | Vergleich PAB ↔ FAB | | | | | | | | Vergleich Bakterien ↔ Protozoen (PP) | | | | | | | |
|-----|---------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------------------|---|---|----------------|------------------|---|---|----------------|
| | Höher in PAB | | | | Niedriger in PAB | | | | Höher in PP | | | | Niedriger in PP | | | |
| | Referenzen: | | | | | | | | Referenzen: | | | | | | | |
| | 2 | 3 ¹ | 5 ² | 6 ¹ | 2 | 3 ¹ | 5 ² | 6 ¹ | 1 ^{1,3} | 2 | 4 | 5 ² | 1 ^{1,3} | 2 | 4 | 5 ² |
| Asp | | | | | x | | | x | | x | x | x | | | | |
| Glu | | | | x | | | x | | x | x | x | x | | | | |
| Ser | | | x | x | | | | | | | | | | x | | x |
| His | x | | | | | | | | | | x | | | | | x |
| Gly | | | | | x | | x | | | | | | x | x | x | x |
| Thr | | | | x | x | | x | | | | | | | x | x | x |
| Ala | | | | | x | x | x | x | | | | | x | x | x | x |
| Arg | x | | x | | | | | | | | | | | x | | |
| Tyr | | | | | | | | | x | x | | | | | | |
| Val | | | | | | x | x | | | | | | x | x | x | x |
| Met | x | | | | | x | | x | | | | | | | | x |
| Phe | x | x | x | | | | | | x | x | | | | | | |
| Ile | | x | | | | | | | | x | x | x | | | | |
| Leu | x | x | x | x | | | | | | | | x | | | | |
| Lys | | x | x | | | | | | x | x | x | x | | | | |
| Pro | | | x | x | | | | | | | | | | x | | x |
| Cys | x | | | x | | | | | | x | | x | | | | |

Referenzen: 1 = CHAMBERLAIN et al. 1986; 2 = MARTIN et al. 1996; 3 = RODRÍGUEZ et al. 2000; 4 = SHABI et al. 2000; 5 = KORHONEN et al. 2002; 6 = BOGUHN et al. 2006 b

¹ Mikroorganismen aus dem Pansensaft von Schafen

² Asp beinhaltet Asp und Asn; Glu beinhaltet Glu und Gln

³ Ergebnisse zwei verschiedener Rationen zusammengefasst

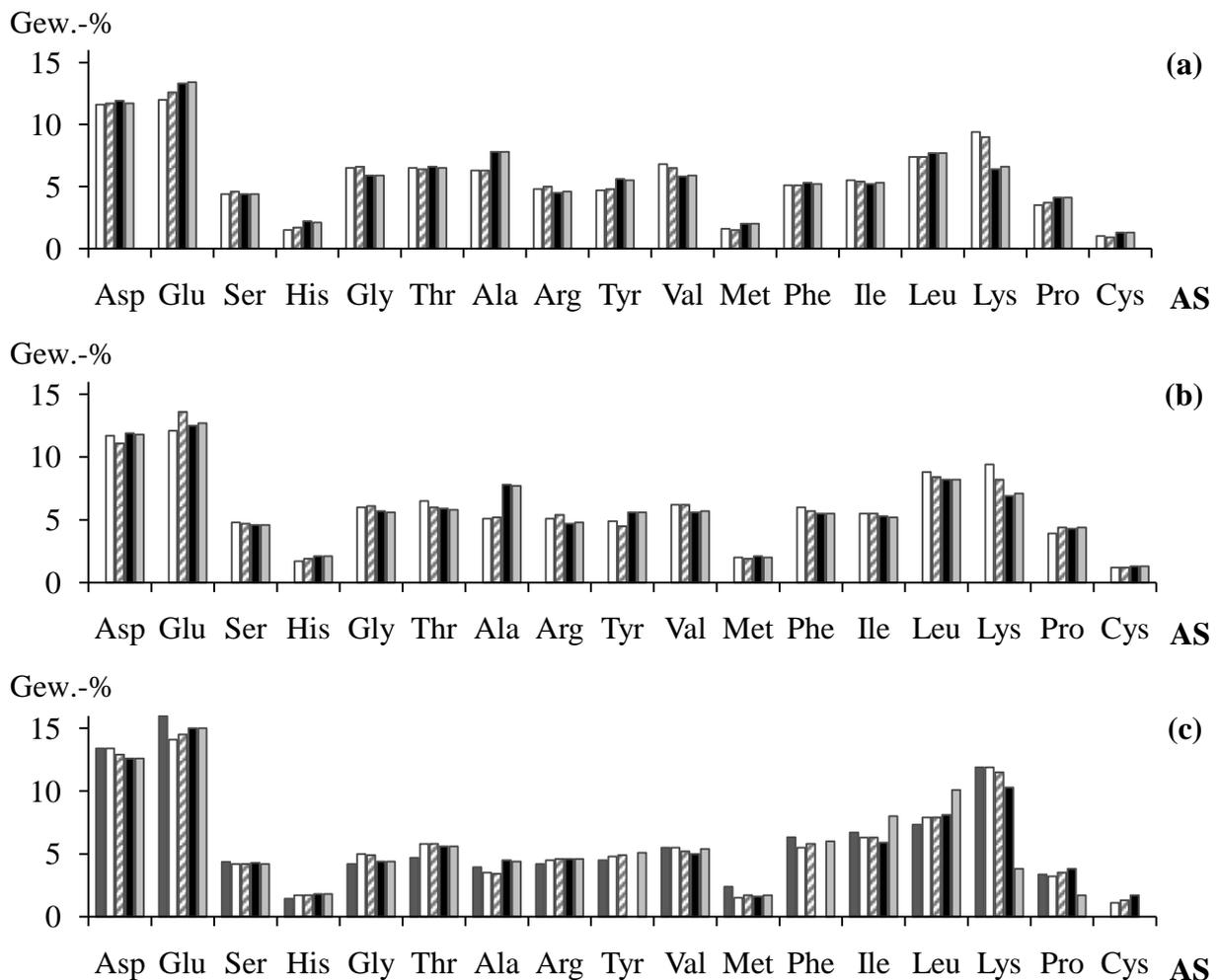


Abb. 2.11: AS-Profil von FAB (a) und PAB (b) sowie Protozoen (c) im bovinen Pansen-saft. Die Daten stammen aus folgenden Studien:

- SHABI et al. 2000 (nur Protozoen)
- /▨ MARTIN et al. 1996 (Heu-/Heu- und Gerstefütterung)
- /□ KORHONEN et al. 2002 (Fütterung von Grassilage, supplementiert mit Gerste und Raps/Mittelwert verschiedener Fütterungsregime, u.a. auch nicht-supplementierte Grassilagefütterung einbezogen)

2.1.3.11.1 Beeinflussung der Aminosäurenprofile ruminaler Mikroorganismen

Mit zunehmender Dauer nach der Fütterung nehmen Arginin- und Glutamatanteile am bakteriellen Protein bei den PAB ab, während der Glycinanteil zunimmt. Die Anteile der anderen AS werden, wie aus Abbildung 2.12 ersichtlich, kaum beeinflusst. Die AS-Profile der einzelnen mikrobiellen Fraktionen sind daher nicht Ausdruck metabolischer Aktivität, sondern vielmehr Charakteristika der jeweiligen Population (MARTIN et al. 1996). Wird die Futtermittelaufnahme bei Schafen erhöht, so steigen Arginin- und Methioninanteile im bakteriellen Protein, während Alanin- und Glycingehalte absinken (RODRÍGUEZ et al. 2000).

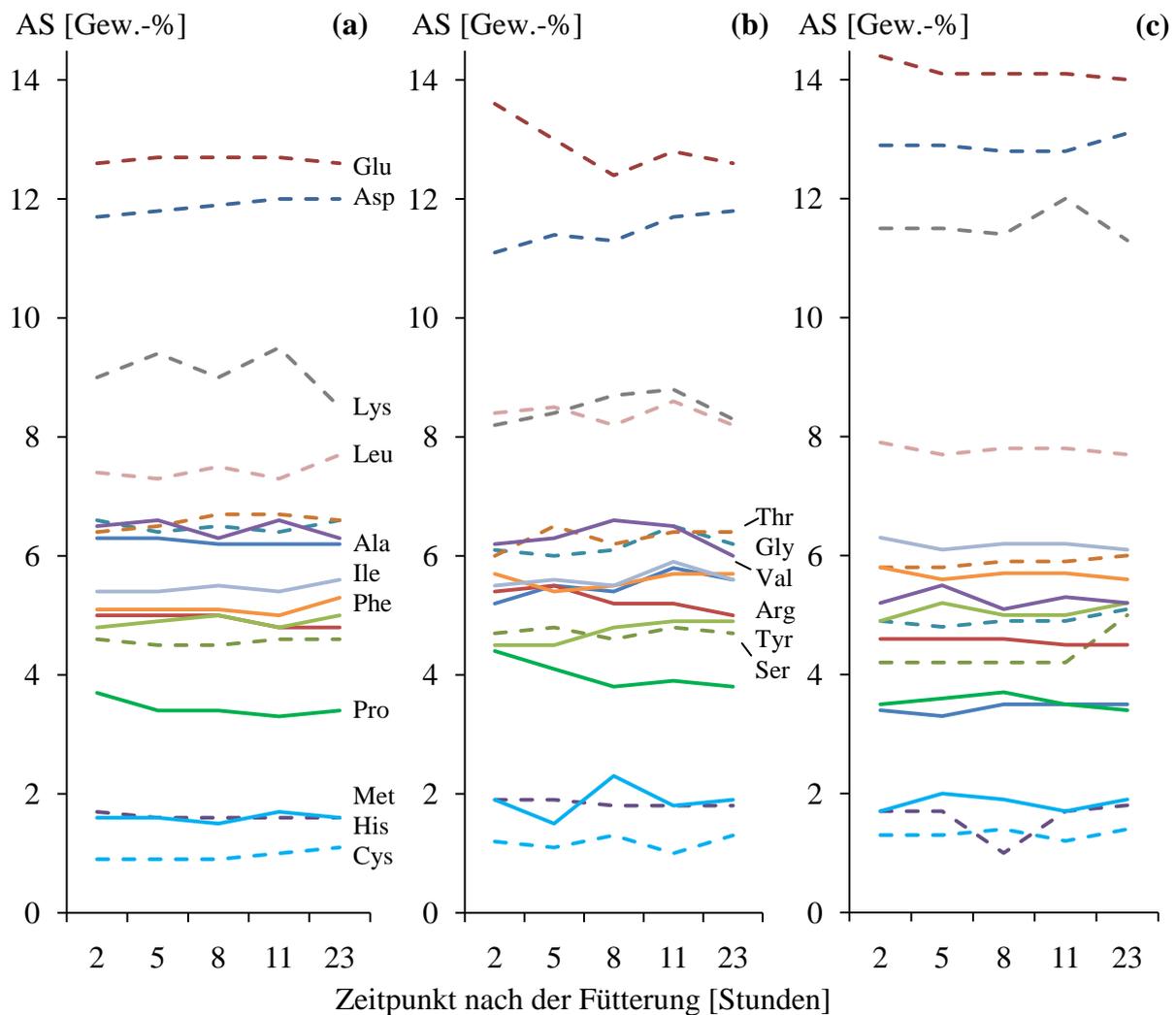


Abb. 2.12: AS-Gehalte (Gew.-% des Gesamt-AS-Gehalts) in FAB (a), PAB (b) und flüssigkeitsassoziierten Protozoen (c) im Pansen in Abhängigkeit vom Fütterungszeitpunkt (Fütterung bei 0 Stunden). Die Daten entstammen der Studie MARTIN et al. (1996).

Ob das AS-Profil einzelner mikrobieller Fraktionen durch die Rationsgestaltung beeinflusst wird, ist umstritten. Nach CHAMBERLAIN et al. (1986), MARTIN et al. (1996), BACH und STERN (1999) sowie KORHONEN et al. (2002) ist dies nicht der Fall, während HUSSEIN et al. (1995) dieses nur für Grundfuttermittel und SHABI et al. (2000; mit Ausnahme niedriger Methioninanteile bei Fütterung geringer pansenabbaubarer Proteinanteile) nur für das bakterielle AS-Profil bestätigen.

Glutamat-, Leucin- und Threoninanteile am Protozoenprotein sollen hingegen von den Gehalten pansenabbaubarer organischer Masse und/oder pansenabbaubaren Proteins beeinflusst werden ($p < 0,05$). Ursache ist vermutlich, dass Protozoen neben bakteriellem Protein auch Futterproteine aufnehmen (SHABI et al. 2000). Unterschiedliche Proteinsupplemente (Blut-, Maisgluten- und Sonnenblumenmehl) beeinflussen zwar auch die AS-Profile des bakteriellen Proteins, die Änderungen sind aber gering ($p > 0,05$) und zeigen keine Korrela-

tion zu den AS-Profilen des RUP (ERASMUS et al. 1994 b). Ob Beziehungen zum Profil des pansenabbaubaren Proteins bestehen, ist nicht beschrieben. Fettsupplementierung mit Rapssaat führt zum Absinken der Phenylalanin-, Isoleucin-, Leucin- und Lysinanteile im bakteriellen Protein ($p < 0,05$; HUSSEIN et al. 1995), die Änderungen sind aber ebenfalls gering ($< 10\%$). Umfangreiche Versuche mit TMR unterschiedlichster Zusammensetzungen (BOGUHN et al. 2006 a) zeigen, dass auch die AS-Profile der Pansenbakterien vor allem durch die Natur der enthaltenen Rationsbestandteile beeinflusst werden. Ursache sind im Einklang mit MARTIN et al. (1996) vermutlich Verschiebungen in der bakteriellen Population. Korrelationen der Anteile einzelner AS mit bestimmten Nährstoffen in einer Ration bestehen nur in wenigen Fällen (BOGUHN et al. 2006 b).

Zusammengefasst bedeutet dies, dass Modifikationen der mikrobiellen AS-Profile vermutlich über Beeinflussungen der mikrobiellen Populationszusammensetzung möglich sind. Die Änderungen sind aber eher gering und eine Vorhersage der Richtung ist bisher nicht ohne Weiteres möglich.

2.1.4 Ammoniak im Pansen

2.1.4.1 Ammoniakkonzentration im Pansensaft

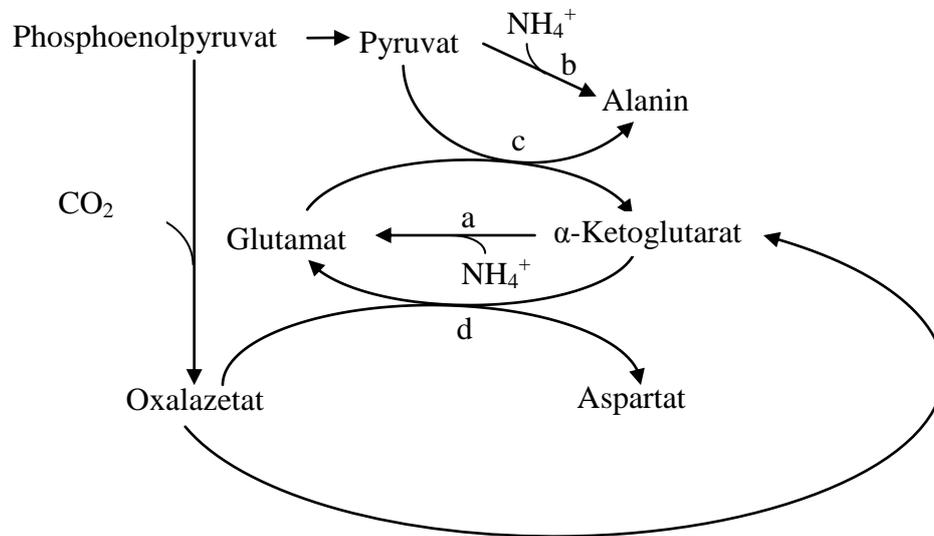
Die Ammoniakkonzentration im Pansensaft ist umso höher, je besser löslich und abbaubar die Nahrungsproteine sind (WILLIAMS u. COCKBURN 1991) und verhält sich umgekehrt proportional zur Kohlenhydratfermentationsrate (RUSSELL et al. 1991). Dementsprechend ist sie niedriger, wenn genügend Energiequellen verfügbar sind (ROOKE et al. 1987). Werden täglich Proteinsupplemente gefüttert, steigt sie zwar deutlich, aber nur kurzzeitig an und fällt rasch auf den Ausgangswert zurück, wohingegen seltene Zulage (zweimal/Woche) zu langsameren und höheren Anstiegen der Ammoniakkonzentration führt und es Tage dauern kann, bis die Ausgangskonzentration wieder erreicht ist (FARMER et al. 2004). Bei Gras- und Grassilagefütterung erreicht die Ammoniakkonzentration 75 Minuten nach der Fütterung ein Maximum von bis zu 10 mmol/L und kehrt nach drei Stunden mit 3,53 mmol/L fast zum Ausgangswert zurück (VOLDEN et al. 2002). In früheren Studien lag die mittlere Ammoniakkonzentration bei Grassilagefütterung mit 3,64 mmol/L ähnlich hoch (ROOKE et al. 1987).

2.1.4.2 Ammoniakaufnahme durch Pansenbakterien

Ammoniak kann von Bakterien durch passive Diffusion (als lipophiles NH_3) aufgenommen werden. Unter Ammoniaklimitierung ist aber die Existenz von Ammoniaktransportsystemen ausgesprochen wichtig (KLEINER 1985). Die intrazelluläre Ammoniakkonzentration einer Pansenbakterienpopulation kann so ca. zwei-, bei niedrigen Milieukonzentrationen sogar bis zu 15 mal höher als die extrazelluläre sein und zeigt an, dass aktive Transportmechanismen (RUSSELL u. STROBEL 1987) und/oder N-Recyclingsysteme in den Bakterien selbst (DUNCAN et al. 1992) vorhanden sein müssen. Da stets geringe Ammoniakmengen im Medium verbleiben (0,71 mmol/L), ist davon auszugehen, dass die Transportsysteme Ammoniak aus der Umgebung nicht zu 100 % in die Zelle transportieren können (RUSSELL u. STROBEL 1987).

2.1.4.3 Ammoniakassimilation durch Pansenbakterien

Glutamat und Glutamin werden zur Ammoniakassimilation und zur Transaminierung im Rahmen der Biosynthese anderer AS benötigt (WALLACE 1994) und nehmen eine zentrale Rolle im bakteriellen AS-Stoffwechsel ein (WATSON 1976; MATHERON et al. 1999). Abbildung 2.13 zeigt dies für *F. succinogenes*.



a Glutamatdehydrogenase; b Alanindehydrogenase;
c Glutamat-Pyruvattransaminase; d Glutamat-Oxalazetattransaminase

Abb. 2.13: Zentrale Rolle von Glutamat bei der Ammoniakassimilation und AS-Synthese in *F. succinogenes* (vereinfacht nach MATHERON et al. 1999)

Im Gegensatz zu *P. brevis* GA 33 (NILI u. BROOKER 1995) besitzen *Rc. flavefaciens* (DUNCAN et al. 1992) und *F. succinogenes* (MATHERON et al. 1999) zur Ammoniafixation eine Glutamatdehydrogenase (GLDH), die bei niedrigeren Ammoniakkonzentrationen höhere Aktivität aufweist (nur *Rc. flavefaciens*) und α -Ketoglutarat als Substrat und NADH (nur *F. succinogenes*) und NADPH als Energiequelle(n) nutzen kann. Bei *Rc. flavefaciens* scheinen 78 % der GLDH-Aktivität, die durch das aus sechs Untereinheiten zu je 48 kDa aufgebaute Enzym vermittelt wird, an die Membran gebunden zu sein (DUNCAN et al. 1992). *F. succinogenes* verfügt neben GDLH-, auch über Alanindehydrogenase- und Aspartase- bzw. Ammoniaklyase¹⁶, nicht aber über Glutaminsynthetaseaktivität (s. Abb. 2.13; MATHERON et al. 1999).

2.1.4.4 Ammoniaknutzung durch ruminale Mikroorganismen

Ammoniak ist unabdingbar für das mikrobielle Wachstum und die mikrobielle Proteinsynthese vieler Pansenbakterien (BRYANT u. ROBINSON 1962). Die Angaben über seine optimale Konzentration variieren und liegen zwischen 1,0 und 16,4 mmol/L Pansensaft

¹⁶ katalysierte Reaktion: $\text{Fumarat} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{L-Asp} + \text{H}^+$

wie HÖLTERSHINKEN (1990) zusammenfasst. Andererseits kann Ammoniak das Wachstum bestimmter Bakterienspezies (u.a. anaerobe Laktobazillen) behindern (BRYANT u. ROBINSON 1962), während gemischte ruminale Bakterienpopulationen ihr Wachstum bei Ammoniaklimitierung reduzieren (RUSSELL u. STROBEL 1987). Nach RUSSELL et al. (1992) sollen zellulolytische Bakterien mit langsamem Wachstum und geringem Erhaltungsenergiebedarf Ammoniak als Haupt-N-Quelle nutzen können, während amylytische Bakterien mit schnellem Wachstum und hohem Erhaltungsbedarf neben Ammoniak auch Peptide und AS aufnehmen, um Energie für Neusynthesen zu sparen. Bestimmte *Butyrivibrio*-, *Selenomonas*-, *Prevotella*- und *Streptococcus*-Spezies können hingegen sogar mit Ammoniak als einziger N-Quelle wachsen (NILI u. BROOKER 1995). Bei den meisten Rationen ist Ammoniak folglich nicht der wachstumslimitierende Faktor (WALLACE 1994). Tabelle 2.15 zeigt, dass der Ammoniakanteil, der tatsächlich für das mikrobielle Wachstum genutzt wird und dann als mikrobieller N in den Mikroorganismen nachweisbar ist, ebenso unterschiedlich ist wie die benötigten bzw. tolerierten Ammoniakkonzentrationen. Er soll vom Verhältnis zwischen N in Form von Ammoniak und insgesamt verfügbarem N abhängen (ATASOGLU et al. 1999).

Tab. 2. 15: Aus Ammoniak entstammender N-Anteil am mikrobiellen N ruminaler Mikroorganismen

| Autor, Jahr | Mikrobielles N aus Ammoniak [%] | Bedingungen |
|------------------------------|---|--|
| FIRKINS et al. 1987 | PAB: 69 bis 71 FAB: 70 bis 75 Protozoen: 47 bis 54 | <i>In-vivo</i> |
| HRISTOV u. BRODERICK 1996 | Bakterien: 46 bis 82 Protozoen: 28 bis 62 | <i>In-vivo</i> |
| ATASOGLU et al. 1998 | <i>P. bryantii</i> B ₁ 4: 14 bis 86 <i>S. ruminantium</i> HD4: 23 bis 89 <i>Sc. bovis</i> ES1: 16 bis 64 | <i>In-vitro</i> Peptide aus Trypticase oder AS verfügbar |
| ATASOGLU et al. 1999 | Bakterien: 37 bis 100 | <i>In-vitro</i> ; variierende Peptid- und AS- und NH ₃ -Konzentrationen |
| CARRO u. MILLER 1999 | Bakterien: 55 bis 67 PAB: 48 bis 55 FAB: 65 bis 82 | <i>In-vitro</i> (RUSITEC); verschiedene N-Quellen: Ammoniak, AS, Peptide, Proteine |
| KOENIG et al. 2000 | Bakterien: 63 bis 80 | <i>In-vivo</i> ; [(de)faunierte Schafe] |
| ATASOGLU et al. 2001 | <i>F. succinogenes</i> BL2: 42 bis 91 <i>Rc. flavefaciens</i> 17: 44 bis 80 <i>Rc. albus</i> SY3: 25 bis 63 | <i>In-vitro</i> ; variierende Peptid- und AS-Konzentrationen; Zellulose als Kohlenstoff-/Energiequelle |
| RUSSI et al. 2002 | Bakterien: 44 bis 45 PAB: 44 bis 46 FAB: 49 bis 69 | <i>In-vitro</i> (RUSITEC); verschiedene N-Quellen (Ammoniak, Peptide) |

Auffälligerweise inkorporieren Bakterien mit 14 bis 100 % Ammoniak-N-Anteil am mikrobiellen N mehr Ammoniak-N als Protozoen (28 bis 62 %). Ursächlich ist wahrscheinlich die Art der Nährstoffaufnahme, da Protozoen eher große Partikel und weniger lösliche niedermolekulare Verbindungen aufnehmen (JOUANY 1996; s. Kap. 2.1.1.1). Die Ammoniakaufnahme von FAB hängt von der Natur der verfügbaren N-Verbindungen ab, während PAB immer ähnliche Ammoniakanteile zur Synthese zelleigener Verbindungen nutzen. Vermutlich werden lösliche Proteine, Peptide und AS so schnell von FAB aufgenommen, dass PAB keinen Zugang zu ihnen haben, oder letztere sind bereits ihren Bedürfnissen entsprechend durch faserassoziertes Protein versorgt (CARRO u. MILLER 1999; RUSSI et al. 2002).

2.1.5 Harnstoff, Nitrat, Nitrit, biogene Amine und Nukleobasen im Pansen

HÖLTERSHINKEN (1990) beschäftigt sich im Schrifttum mit der Bedeutung von Harnstoff, Nitrat und Nitrit im Pansen, während sich eine neue Studie¹⁷ im Pansenlabor der Klinik für Rinder und GAST (2010) mit biogenen Aminen bzw. den ebenfalls N-haltigen Nukleobasen befassen.

2.1.6 Abbau und Überdauern einzelner Stickstofffraktionen aus Grassilagen im Pansen

Proteine in Grassilagen und Gras¹⁸ werden häufig schlecht von Pansenmikroorganismen genutzt (BEEVER 1993), wobei der Anteil pansenstabilen Proteins in frischem Gras und Heu höher als in Grassilage ist (PETIT u. TREMBLAY 1992). VOLDEN et al. (2002) zeigten, dass sich in Gras und Grassilagen die Konzentrationen einzelner Nicht-Ammoniak-N (NAN)-Fraktion unterscheiden (s. Tab. 2.16) und bestätigen ihre unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit, dem ruminalen Abbau zu entkommen.

Tab. 2.16: NAN-Fraktionen [%] in Grassilageextrakten (gewonnen durch Auspressen nach mechanischer Zerkleinerung und Lagerung bei 39 °C für eine Stunde) und Gras (VOLDEN et al. 2002)

| NAN-Fraktion | Grassilageextrakt [%] | Gras [%] |
|---|-----------------------|----------|
| Lösliches Protein und langkettige Peptide | 30 | 67 |
| Kurzkettige Peptide | 52 | 20 |
| Freie Aminosäuren | 18 | 13 |

Bei Grassilage war die N-Abbaurate aus fAS (freien Aminosäuren) am höchsten, gefolgt von N aus langkettigen Peptiden und Proteinen. Kurzkettige Peptide hingegen wurden am langsamsten abgebaut (VOLDEN et al. 2002), was möglicherweise durch Akkumulation infolge limitierter extrazellulärer Peptidaseaktivität und/oder begrenzter transmembranaler Transport-

¹⁷ laut persönlicher Mitteilung von Frau S. Theermann, Hannover am 25.05.2009

¹⁸ Proteine in Grünfuttern sind zu 75 % schnell abbaubare Fraktion 1- (ca. 50 % Rubisco; NOLAN u. DOBOS 2005) und zu 25 % langsam abbaubare Fraktion 2-Blattproteine. Membranproteine, Enzyme und Proteine aus Chloroplasten, Mitochondrien und dem Zellkern sind nur in geringen Mengen vorhanden (NOLAN 1993).

kapazität in mikrobielle Zellen (s. Kap. 2.1.2.2) zu erklären ist (CHEN et al. 1987 a). CHEN et al. (1987 a) folgern und VOLDEN et al. (2002) bestätigen für Gras und Grassilage, dass freie kurzkettige Peptide zu größeren Anteilen als andere N-Fractionen aus dem Pansen entweichen können (VOLDEN et al. 2002). CHOI (2002) identifizierte Peptide dementsprechend bei Grassilagefütterung als quantitativ wichtigste Fraktion löslicher N-Verbindungen in omasaler Ingesta. Mehr als die Hälfte des löslichen N liegen hier in Form von Peptiden vor (79,5 und 59,8 mg Peptid-N vs. 30,5 und 23,1 mg löslicher Protein-N/L omasaler Ingesta). Freie AS entweichen entsprechend ihrer hohen Abbaurate zu geringen Anteilen (VOLDEN et al. 2002) und sind mit 15,8 bzw. 22,3 mg N/L omasaler Ingesta eine relativ kleine N-Fraktion (CHOI 2002).

Lösliche nutritive NAN-Verbindungen in Grassilagen entkommen mit ca. 5 bis 8 % nur zu relativ kleinen Anteilen dem ruminalen Abbau. Die größte lösliche NAN-Verbindungsfraktion ist dementsprechend mikrobiellen Ursprungs (ca. 61 bis 71 %; CHOI 2002). Der Gesamt-N-Anteil, der sich dem ruminalen Abbau entziehen kann, wird positiv durch steigende Trockenmassegehalte und einen späteren Schnitzeitpunkt im Jahr beeinflusst. Je höher hingegen der Rp-Anteil, desto weniger N-Verbindungen können dem Abbau entgehen (TAMMINGA et al. 1991). Auch aus frischem Gras, das mehr makromolekulare N-Verbindungen als Grassilage enthält (s. Tab. 2.16), wird weniger N (24 %) zu Ammoniak umgesetzt als bei Grassilagen (76 %, VOLDEN et al. 2002).

2.1.7 Kinetik einzelner Stickstofffraktionen im Pansen

Futterproteine, endogene Proteine (aus Speichel und Epithelzellen) und Proteine aus lytischen Mikroorganismen bilden den potentiell abbaubaren ruminalen NAN-Pool, dessen Turnoverrate kleiner als 24 Stunden ist. Bei Schafen hat dieser eine Größe von 30 g, bei Rindern von 200 g N. Der Ammoniakpool ist sehr viel kleiner (0,6 bis 1,2 g N bei Schafen) und wird in weniger als zwei Stunden komplett ersetzt. Stickstoff aus dem Ammoniakpool wird an Ort und Stelle verstoffwechselt oder gelangt über den ruminohepatischen Kreislauf zurück in den Pansen (NOLAN 1993).

Abbildung 2.14 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Studie (SIDONS et al. 1985) an Schafen (Fütterung von Grassilage bzw. getrocknetem Gras), bei der tägliche N-Flüsse im Pansen bestimmt wurden. Besonders auffällig ist die hohe Ammoniakresorption über die Pansenwand bei Fütterung der Grassilage. Dementsprechend bestätigen AHVENJARVI et al. (2007) dass Ammoniak-N, der mit Grassilage in den Pansen gelangt, zu 32 % absorbiert wird, 11 % entweichen mit der flüssigen Phase und weitere 14 bzw. 36 % können in bakteriellen N-Verbindungen der FAB bzw. PAB detektiert werden. Von löslichen NAN-Verbindungen aus Grassilagen werden immerhin noch 17 % als Ammoniak absorbiert und weitere 11 % entweichen als Ammoniak (AHVENJARVI et al. 2007).

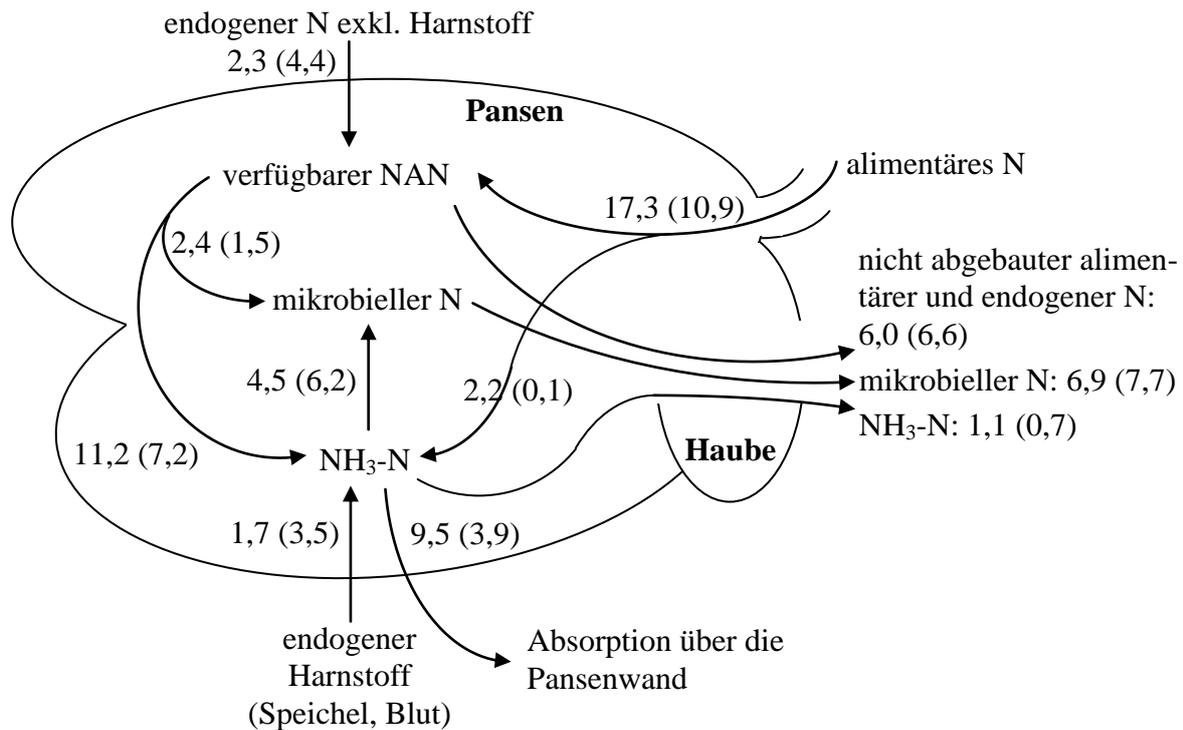


Abb. 2.14: N-Fluss [g/Tag] im Pansen eines Schafes bei Grassilagefütterung. Die Werte in Klammern beziehen sich auf Fütterung trockenem Grases. (nach SIDDONS et al. 1985)

Kürzlich wurde das in Abbildung 2.15 abgebildete komplexe Modell entwickelt, mit dem einzelne N-Fraktionsanteile, die aus dem Pansen in den Blättermagen gelangen, mit Hilfe von Gleichgewichtskonstanten für Abbau- und Transportraten rechnerisch ermittelt werden können (VOLDEN et al. 2002). Das Modell berücksichtigt bis auf die Anheftung von Bakterien an Proteine (und umgekehrt) die von UDÉN (2000) vorgeschlagenen Schritte im Proteinabbau (extrazellulärer Proteinabbau, aktiver Transport von AS und Oligopeptiden, intrazellulärer Abbau dieser Verbindungen zu Ammoniak bzw. AS, mikrobielle Proteinsynthese und Austauschvorgänge mit dem umliegenden Medium). Aus Abbildung 2.15 ist ersichtlich, dass die Konzentrationen und Anteile einzelner Fraktionen jeweils von der Konzentration bzw. der Abbaugeschwindigkeit und Passagerate der anderen Fraktionen abhängen (K_1 ist abhängig von K_p , K_2 ist wiederum abhängig von K_p und K_1 usw.)

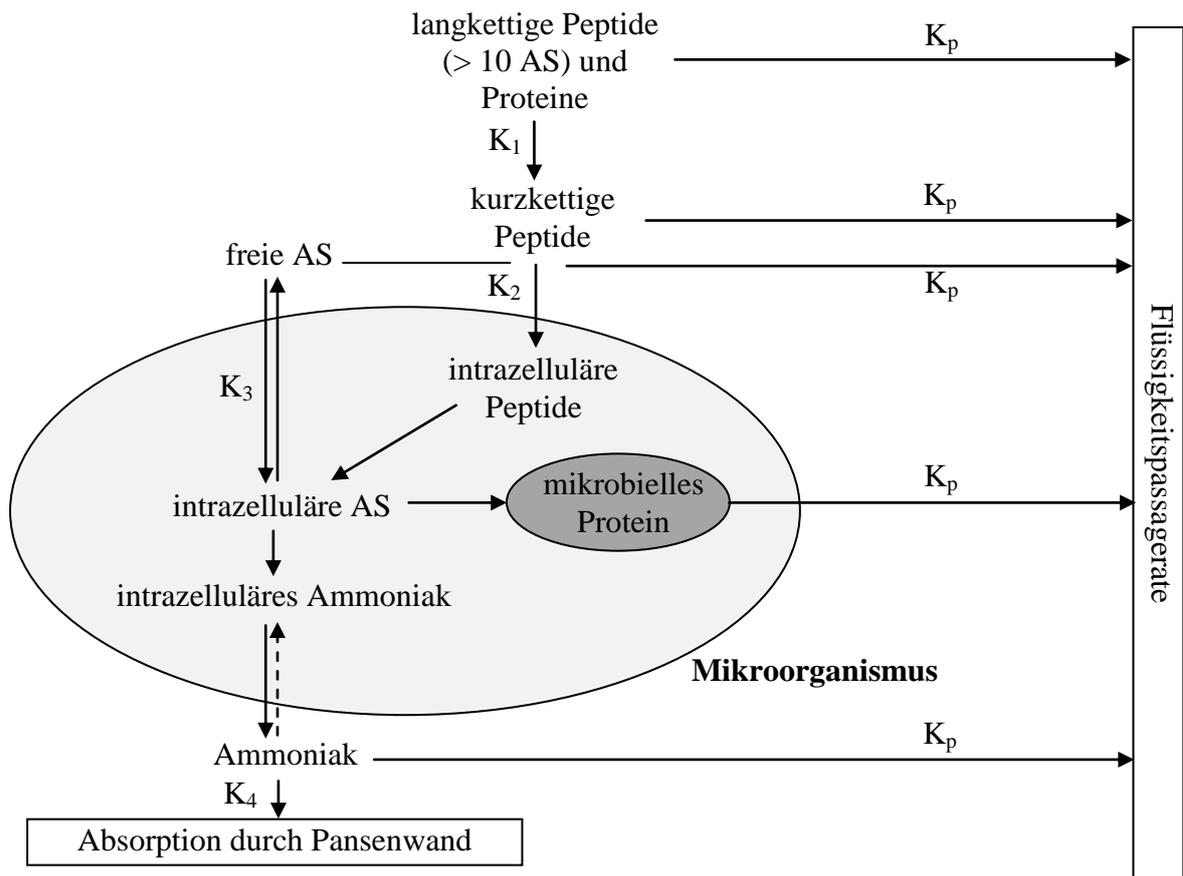


Abb. 2.15: Kinetik einzelner N-Fractionen im Pansen nach VOLDEN et al. (2002), ergänzt nach SCHOLZ¹⁹ (gestrichelter Pfeil)
 K = Gleichgewichtskonstante

¹⁹ laut persönlicher Mitteilung von Herrn Prof. Dr. H. Scholz, Hannover am 21.10.2008

2.1.8 Mikroorganismen im ruminalen Stickstoffstoffwechsel

Tabelle 2.17 gibt eine Übersicht über Bakterien des ruminalen Protein-, Peptid- und AS-Metabolismus, sowie auf welcher Stufe des Proteinabbaus diese tätig sind. Ureolytische Spezies und proteinabbauende Protozoen können bei HÖLTERSHINKEN (1990), proteolytische Pilze bei WULFF (2001) entnommen werden.

Tab. 2.17: Im ruminalen Protein-, Peptid- und AS-Abbau tätige Pansenbakterien nach WALLACE et al. (1997 a), ergänzt nach GARNER et al. (2002)

| Abbauschritt | Beteiligte Pansenbakterien |
|---|---|
| Proteine → Oligopeptide (Proteolyse) | <i>B. fibrisolvans</i> , <i>C. ssp.</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Fusobacterium ssp.</i> , <i>L. multipara</i> , <i>Prevotella</i> ¹ , <i>Rb. amylophilus</i> , <i>S. ruminantium</i> , <i>Sc. bovis</i> |
| Oligopeptide → Dipeptide (Peptidolyse) | <i>Sc. bovis</i> , <i>Rb. amylophilus</i> , <i>Prevotella</i> ¹ |
| Dipeptide → AS | <i>F. succinogenes</i> , <i>M. elsdenii</i> , <i>Prevotella</i> ¹ , <i>L. multipara</i> , <i>S. ruminantium</i> |
| AS → Ammoniak (Desaminierung) | <i>C. aminophilum</i> , <i>C. sticklandii</i> , <i>Eubacterium pyruvativorans</i> , <i>Psc. anaerobius</i> , <i>B. fibrisolvans</i> , <i>Prevotella</i> ¹ , <i>M. elsdenii</i> , <i>S. ruminantium</i> |
| Sonstige | <i>Allisonella histaminiformans</i> (Histidinabbau; GARNER et al. 2002) |

¹ keine Stammdefinition möglich (s. Fußnote ², Seite 11), in der Literatur als *P. ruminicola* angegeben

2.1.8.1 Einzelne Bakterien im ruminalen Stickstoffstoffwechsel

Bei HÖLTERSHINKEN (1990) sind grundlegende Informationen über ruminale proteolytische Bakterien und ihre proteolytischen Enzyme nachzulesen.

2.1.8.1.1 *Prevotella ssp.*

Ursprünglich wurden *Prevotella*-Spezies dem Genus *Bacteroides* zugeordnet (STEWART et al. 1997), doch erst kürzlich erfolgte auf Grund großer genetischer Variationen eine Neugruppierung der einzelnen Spezies (s. Fußnote ², Seite 11; AVGUŠTIN et al. 1997).

Prevotella sp. besitzt hohe, bei *P. ruminicola* 23 und *P. bryantii* B₁₄ zu 70 % zellgebundene (COTTA u. HESPELL 1986) Exopeptidaseaktivität (ABOU AKKADA u. BLACKBURN 1963), die durch ein dipeptidabspaltendes Enzym vermittelt wird (*P. bryantii* B₁₄; GRISWOLD u. MACKIE 1997). Bei *P. ruminicola* 23 konnte außerdem Endopeptidaseaktivität detektiert werden (DEPARDON et al. 1998). Noch vor *B. fibrisolvans* sind *Prevotella*-Spezies so die wichtigsten Bakterien im ruminalen Proteinabbau (VAN GYLSWYK 1990), vor allem aber im Peptidkatabolismus (WALLACE et al. 1990 c; WALLACE u.

McKAIN 1991; McKAIN et al. 1992, im Versuch *P. bryantii* B₁₄, *P. albensis* M384 und *P. brevis* GA 33;). Vermutlich hat *P. bryantii* B₁₄ auf den Peptidabbau sogar größeren Einfluss als auf die Proteolyse (GRISWOLD u. MACKIE 1997) und *P. ruminicola*-Reinkulturen zeigen bereits die gleiche Peptidaseaktivität wie originärer Pansensaft (WALLACE u. McKAIN 1991).

Aus dem Pansensaft von Schafen konnten McKAIN et al. (1992) zwölf Isolate mit DPP Typ I-Aktivität isolieren, bei denen es sich um *Prevotella*-Spezies handelte. Alle diese Isolate gehörten den drei Hauptstämmen B₁₄ (*P. bryantii*), M384 (*P. albensis*) und GA 33 (*P. brevis*) an und waren in der Lage, GlyArg-MNA (DPP Typ I-Substrat) und Ala₅ zu hydrolysieren. Neben GlyArg-MNA können *Prevotella*-Spezies eine Reihe weiterer synthetischer DPP-Substrate spalten (LysAla-MNA – Typ II; ArgArg-MNA – Typ III; GlyPro-MNA – Typ IV), GlyArg-MNA (DPP Typ I) wird jedoch in größtem Umfang hydrolysiert (WALLACE u. McKAIN 1991). *P. albensis* M384 besitzt neben DPP der Typen I und IV weitere DDP, die sich nicht eindeutig in die Enzymnomenklatur nach IUBMB (WALLACE et al. 1997 b) bzw. BRENDA (CHANG et al. 2009) einordnen lassen. Eins dieser Enzyme zeigt Affinität zu alaninhaltigen Peptiden, das andere hydrolysiert LysAla-4-MNA (WALLACE et al. 1997 b). MADEIRA et al. (1997) vermuten jedoch, dass die Substrate GlyArg-MNA (Typ I) und ArgArg-MNA (Typ III) vom gleichen Enzym gespalten werden, da *P. bryantii* B₁₄-Mutanten die Fähigkeit zur Spaltung beider Substrate in Experimenten simultan verloren hatten. Sie schlagen daher vor, das entsprechende Enzym als GlyArg-MNase anzusprechen und nicht mehr zwischen DPP der Typen I und III zu unterscheiden (MADEIRA et al. 1997).

BLADEN et al. (1961 a) berichteten, dass *Prevotella*-Spezies die aktivsten und ggf. wichtigsten Ammoniakproduzenten im Pansen seien. Es ist fraglich, ob diese Vermutung im Hinblick auf neue Erkenntnisse (Existenz der HAP-Bakterien, s. Kap. 2.1.8.1.11; dominierende Rolle von *Prevotella* sp. im ruminalen Peptidabbau) weiterhin tragbar ist. In gemischten Kulturen mit *Psc. anaerobius* und *C. aminophilum* (HAP-Spezies; s. Kap. 2.1.8.1.11.2 und 2.1.8.1.11.4) nimmt die Ammoniakproduktion aber um 25 % ab, wenn Stämme ohne GlyArg-MNase- (MADEIRA et al. 1997) bzw. DPP-Aktivität vom Typ 1 (WALLACE u. McKAIN 1991) eingesetzt werden. Die Rolle von *Prevotella* in der ruminalen Ammoniakproduktion sollte daher nicht unterschätzt werden (MADEIRA et al. 1997).

Obwohl Peptide gegenüber AS bevorzugte N-Quelle für *Prevotella*-Spezies sind (ATASOGLU et al. 1998) und *P. bryantii* B₁₄ sogar große Peptide favorisiert (GRISWOLD u. MACKIE 1997), besitzt Letzteres NADPH- und NADH-gekoppelte GLDH-Aktivität, die von einem Polypeptid mit einer Länge von 444 AS und einem Molekulargewicht von 48,5 kDa ausgeht (WEN u. MORRISON 1996). Während *P. ruminicola* 23 und *P. bryantii* B₁₄ nur ein Enzym besitzen, wiesen WEN und MORRISON (1997) bei *P. brevis* GA 33 zwei unterschiedliche Proteine nach. Bei allen Stämmen ist die Enzymaktivität nach ammoniaklimitiertem Wachstum am höchsten und nimmt ab, wenn Peptide als einzige N-Quelle verfügbar sind (WEN u. MORRISON 1997). Trotzdem kann *P. brevis* GA 33 im Gegensatz zu anderen Stämmen nicht auf Medien mit Ammoniak allein wachsen, wenn nicht einzelne freie AS (außer Methionin und Cystein) zugelegt werden (NILI u. BROOKER 1995). Entgegen WEN und MORRISON (1997) konnten NILI und BROOKER (1995) bei *P. bryantii* B₁₄ keine GLDH-Aktivität detektieren, so dass sie vermuten, dass Glutamat durch Transaminierung zwischen α -Ketoglutarat und anderen AS synthetisiert wird. Nicht auszuschließen ist aber, dass der verwendete Laborstamm einen anderen Phänotyp aufwies als der Originalstamm.

2.1.8.1.2 *Butyrivibrio fibrisolvens*

Butyrivibrio und *Butyrivibrio*-ähnliche Stämme sind wahrscheinlich sowohl an der primären Hydrolyse von Futterproteinen als auch am weiteren Abbau zu kleineren Peptiden und AS beteiligt (ATTWOOD u. REILLY 1996). Besonders große Bedeutung scheint dieser Spezies bei Weidehaltung zuzukommen (ATTWOOD u. REILLY 1995). Die proteolytische Aktivität ist größtenteils extrazellulär lokalisiert [70 bis 80 % (JONES et al. 1994) bzw. 95 bis 97 %] und durch Serinproteasen vermittelt (COTTA u. HESPELL 1986). Der in Neuseeland isolierte Stamm *Butyrivibrio* C211 weist hingegen zellgebundene Cystein- und Metalloproteinaseaktivität auf (ATTWOOD u. REILLY 1996). Einige *Butyrivibrio*-Stämme zeigen ähnlich hohe proteolytische Aktivität wie *Rb. amylophilus* und *Prevotella*-Spezies (COTTA u. HESPELL 1986). Abbauendprodukte sind Peptide, AS (ABOU AKKADA u. BLACKBURN 1963) und Ammoniak (BLADEN et al. 1961 a).

Obwohl *B. fibrisolvens* SH13 Ala₅ zu Ala₂ und Ala₃ abbauen kann, besitzt es vermutlich weder DPP- noch Endoproteinaseaktivität (keine Hydrolysehemmung durch den Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid). Acetylierung des N-Terminus, aber auch Blockung des C-Terminus führen hingegen zur Hydrolysereduktion. Welche enzymatischen Mechanismen genau für die proteo- und peptidolytische Aktivität von *B. fibrisolvens* verantwortlich sind, ist daher nach WALLACE und McKAIN (1991) unklar.

B. fibrisolvens E14 kann im Gegensatz zu anderen Stämmen nicht mit Ammoniak als einziger N-Quelle wachsen, speziell Methionin ist für sein Wachstum notwendig. Ursächlich ist vermutlich ein Defekt bei der Metabolisierung von Cystein zu Methionin. Beide AS werden wie Lysin direkt in das bakterielle Protein eingebaut (NILI u. BROOKER 1995).

2.1.8.1.3 *Clostridium proteoclasticum/Butyrivibrio proteoclasticus*

Zunächst wurde dieses Bakterium²⁰ mit sehr hoher proteolytischer Aktivität als ein *Butyrivibrio*-ähnlicher Organismus (ATTWOOD u. REILLY 1995, 1996) - als Stamm B316^T - angesprochen. Bestimmung der Guanin- und Cytosingehalte der DNA und phylogenetische Untersuchungen der 16S rRNA (ATTWOOD et al. 1996) ergaben zunächst seine Zugehörigkeit als *C. proteoclasticum* zum Genus *Clostridium* und enge Verwandtschaft mit *C. aminophilum*, einem Vertreter der HAP-Bakterien (s. Kap. 2.1.8.1.11.4). Morphologische Merkmale und metabolische Eigenschaften (Abwesenheit von Sporen bzw. Metabolisierung von Linolsäure; WALLACE et al. 2006) und kürzliche (MOON et al. 2008) Neubestimmung der Guanin- und Cytosingehalte der DNA sowie umfassendere phylogenetische Untersuchungen der 16S rRNA zeigen hingegen die Zugehörigkeit zum Genus *Butyrivibrio*. Es besteht enge Verwandtschaft mit *B. hungatei*, einem nicht proteolytischen ruminalen Bakterium (KOPEČNÝ et al. 2003). Folglich schlugen MOON et al. (2008) die Reklassifizierung des Organismus als *B. proteoclasticus* comb. nov. vor.

B. proteoclasticus kann Kohlenhydrate nutzen, ist bei der primären Hydrolyse von Futterproteinen (ATTWOOD et al. 1996; REILLY u. ATTWOOD 1998) und eventuell beim Peptidabbau zu AS von Bedeutung (ATTWOOD et al. 1996). Es bildet vor allem zellgebundene (ATTWOOD u. REILLY 1996) Proteinasen vom Serintyp (ATTWOOD u. REILLY 1996; ATTWOOD et al. 1996) und einige Cystein- und Metalloproteasen mit deren Hilfe es Kasein und Rubisco hydrolysieren kann. Bildung von Ammoniak ist nicht möglich, Wachs-

²⁰ aus einer neuseeländischen Kuh (Weidehaltung) isoliert

tum erfolgt nur in anaerobem Milieu bei 39 °C (25 bis 45 °C; ATTWOOD et al. 1996). REILLY und ATTWOOD (1998) fanden bei PCR-Untersuchungen, dass die Konzentration von *B. proteoclasticus* im Pansensaft relativ konstant bleibt [$2,01 \cdot 10^6$ bis $3,12 \cdot 10^7$ /mL, entsprechend 0,3 % bei einer Gesamtpopulation von 10^{10} Zellen/mL (PAILLARD et al. 2007)] und nicht vom N-Gehalt der Fütterung beeinflusst wird. In einer neueren PCR-Studie (PAILLARD et al. 2007) wird die Konzentration mit einem Anteil von 2,2 bis 9,4 % an der bakteriellen Gesamtpopulation weit höher geschätzt. Nach PAILLARD et al. (2007) wird sie auch nicht durch den Konzentratanteil einer Ration beeinflusst und hängt im Wesentlichen vom Tier selbst ab. Unterschiede zur Studie REILLY und ATTWOOD (1998) seien durch den Einsatz unterschiedlicher Grundfuttermittel zu erklären (Grassilage vs. frisches Weidelgras), da frisches Grünfutter möglicherweise ungesättigte, für diesen Organismus toxische Fettsäuren enthalte (WALLACE et al. 2006).

2.1.8.1.4 *Megasphaera elsdenii*

Im Gegensatz zu *Prevotella* sp., *S. ruminantium* und *Butyrivibrio* benötigt *M. elsdenii* (früher *Psc. elsdenii*; ROGOSA 1971; STEWARD et al. 1997) keine Kohlenhydratquelle für Wachstum und Ammoniakproduktion (BLADEN et al. 1961 a). *M. elsdenii* besitzt hohe Dipeptidaseaktivität (WALLACE u. McKAIN 1991) und kann möglicherweise die Dipeptidaseaktivität der Protozoen in defaunierten Tieren ersetzen (WALLACE et al. 1987) bzw. wird unterdrückt, wenn Ciliaten anwesend sind (WALLACE u. McKAIN 1991).

Fermentationsendprodukte sind verzweigte und unverzweigte C4- bis C6-Fettsäuren, wobei Isovalerat und n-Butyrat am häufigsten gebildet werden (OUWERKERK et al. 2002). *M. elsdenii* wächst auf Medien mit AS besser als mit Peptiden, kann aber nur bestimmte AS (nicht definiert) nutzen und nicht mit verzweigt-kettigen AS als alleiniger Energiequelle wachsen (RYCHLIK et al. 2002 c). Threonin, Serin und Cystein sind hingegen als Energiequelle während des Wachstums nutzbar (LEWIS u. ELSDEN 1955). Nach ALLISON (1978) ist *M. elsdenii* die Hauptquelle verzweigt-kettiger Fettsäuren im Pansen. Einige Stämme setzen diese und Ammoniak sogar fast genauso schnell frei wie obligat AS-fermentierende HAP-Bakterien (s. Kap. 2.1.8.1.11) und sind wie *C. aminophilum* resistent gegen Bacteriocine aus *B. fibrisolvens* (s. Kap. 2.1.8.1.11.4; RYCHLIK u. RUSSELL 2002 b).

M. elsdenii ist im Pansen von Rindern nicht immer nachweisbar, nach Inokulation scheint sich aber eine Population etablieren zu können (OUWERKERK et al. 2002). Milchkühe mit größeren *M. elsdenii*-Populationen weisen zudem eine geringere Milchfettproduktion auf, für die pH-Wertdifferenzen im Pansensaft bzw. unterschiedlich schnell abbaubare Stärkeanteile in der Ration nicht ursächlich sein sollen (PALMONARI et al. 2010; WEIMER et al. 2010).

2.1.8.1.5 *Streptococcus bovis*

Sc. bovis verfügt über zellgebundene (RUSSEL u. ROBINSON 1984; ATTWOOD u. REILLY 1996) Aminopeptidase- (RUSSEL u. ROBINSON 1984) bzw. Leucin-Arylamidaseaktivität (WALLACE u. McKAIN 1991; ATTWOOD u. REILLY 1996). Nachgewiesen wurden sowohl Serin- (WESTLAKE u. MACKIE 1990; ATTWOOD u. REILLY 1996) als auch Cysteinproteasen (ATTWOOD u. REILLY 1996).

Sc. bovis bevorzugt Peptide (ATTWOOD u. REILLY 1996; ATASOGLU et al. 1998) und AS (ATASOGLU et al. 1998) als N-Quelle und ist nach extrazellulärer Peptidhydrolyse sowohl zur Aufnahme von Peptiden bis zu einem Molekulargewicht von 751 Da, als auch freien AS

(Glutamat, Alanin, Phenylalanin) befähigt. Arginin wird weniger gut aufgenommen als Glutamat, Alanin und Phenylalanin (WESTLAKE u. MACKIE 1990).

2.1.8.1.6 *Ruminobacter amylophilus*

Diese Bakterienspezies weist hohe Endopeptidaseaktivität auf (ABOU AKKADA u. BLACKBURN 1963), die zu 40 bis 45 % zellgebunden ist (JONES et al. 1994) und vermutlich der Freilegung weiterer Substanzen dient (COTTA u. HESPELL 1986). Proteolytische Endprodukte sind Peptide und AS, während Ammoniak die bevorzugte N-Quelle dieses Organismus ist (ABOU AKKADA u. BLACKBURN 1963).

2.1.8.1.7 *Selenomonas ruminantium*

Peptide, AS (ABOU AKKADA u. BLACKBURN 1963) und Ammoniak (BLADEN et al. 1961 a) sind proteolytische Endprodukte von *S. ruminantium*, während Ammoniak gleichzeitig als wichtigste N-Quelle betrachtet wurde (ABOU AKKADA u. BLACKBURN 1963). Neuere Studien zeigen aber, dass *S. ruminantium* bevorzugt AS (LING u. ARMSTEAD 1995; ATASOGLU et al. 1998) bzw. Peptide (ATASOGLU et al. 1998) aufnimmt.

2.1.7.1.8 *Lactobacillus* ssp.

McKAIN et al. (1992) fanden im Pansensaft von Schafen zwölf *Prevotella*-Spezies mit Dipeptidylaminopeptidaseaktivität (s. Kap. 2.1.8.1.1) und zwei weitere Isolate, die GlyArg-MNA hydrolysierten und bei denen es sich um *Lactobacillus* ssp. handelte. Aus Ala₅ entstand jedoch Ala₄ und Leu-MNA wurde in ungewöhnlich hohem Umfang gespalten, so dass die Hydrolyse von GlyArg-MNA in diesem Fall wahrscheinlich auf die hohe Aktivität des Enzyms Leucin-Arylamidase zurück zu führen war (McKAIN et al. 1992).

2.1.8.1.9 *Eubacterium*

Die Gattung *Eubacterium* weist überwiegend zellassozierte Serin- und Metalloproteinaseaktivität auf (ATTWOOD u. REILLY 1996). Proteolytische Endprodukte sind Peptide (ABOU AKKADA u. BLACKBURN 1963).

2.1.8.1.10 *Allisonella histaminiformans*

Allisonella histaminiformans ist ein gramnegatives, ovoides, nicht-sporenbildendes Bakterium, das in Paaren oder Ketten aus bis zu acht Zellen vorliegt. Es kann nur anaerob wachsen und ist monensinresistent. Es kann aus dem Pansen von Rindern mit Getreide- (GARNER et al. 2002) bzw. Luzernesilage- (GARNER et al. 2004), nicht aber mit Heufütterung isoliert werden (GARNER et al. 2002, 2004). Je größer der Luzernesilageanteil, desto höher ist die Keimzahl des Bakteriums und desto mehr Histidin wird zu Histamin umgesetzt (GARNER et al. 2004).

Als einzige Energiequelle nutzt *Allisonella histaminiformans* Histidin, welches zu 95 % zu Histamin decarboxyliert wird (GARNER et al. 2002, 2004). Neben Histamin entstehen außerdem kleine Ammoniakmengen und es kann Kohlenhydrate und organische Säuren nutzen. Lediglich Lysin wird neben Histidin verstoffwechselt, reicht aber für das bakterielle

Wachstum allein nicht aus. Wachstum ist nur in Medien mit Hefeextrakt, Butyrat und Histidin möglich (GARNER et al. 2002).

2.1.8.1.11 Hyperammoniumproduzierende Bakterien

Ruminale Bakterien wie *Prevotella* sp., *S. ruminantium* und *Butyrivibrio* produzieren relativ viel Ammoniak. *Prevotella*-Spezies sollten lange Zeit sogar die wichtigsten Ammoniakproduzenten bei adulten Rindern sein (BLADEN et al. 1961 a). Abweichend davon konnten RUSSELL et al. (1988 a) *Clostridien*- und *Peptostreptococcus*-Spezies mit sehr hoher spezifischer Aktivität zur Ammoniakproduktion isolieren (s. Tab. 2.18). WALLACE (1996) fasst dementsprechend zusammen, dass Ammoniak einerseits von Bakterien mit niedriger Desaminaseaktivität [*B. fibrisolvens*, *M. elsdenii*, *Prevotella* (keine aktuelle Stammdefinition möglich), *S. ruminantium*, *Sc. bovis*; 10 bis 20 nmol Ammoniak/mg Protein/Minute], die aber in großen Zahlen im Pansen vorkommen, und andererseits von kleinen Populationen mit sehr hoher Aktivität gebildet wird.

Im Verlauf wurden die von RUSSELL et al. (1988 a) isolierten Spezies genauer untersucht und weitere isoliert, die ebenfalls nur in geringer Zahl im Pansen vorkommen, aber eine hohe Ammoniakproduktion (> 300 nmol/mg Protein/Minute; ATTWOOD et al. 1998) aufweisen. In neueren Studien werden diese Spezies als hyperammoniumproduzierende, als sogenannte HAP-Bakterien bezeichnet (ATTWOOD et al. 1998; McSWEENEY et al. 1999; ESCHENLAUER et al. 2002; WALLACE et al. 2003).

Angaben bezüglich der anteiligen Populationsgröße reichen von 1 % *in-vivo* (YANG u. RUSSELL 1993 b) und *in-vitro* (KRAUSE u. RUSSELL 1996 a) bis hin zu 5 % der Gesamtpopulation bei hoher Trypticaseverfügbarkeit *in-vitro* (KRAUSE u. RUSSELL 1996 a). *In-vivo* ist die HAP-Bakterienpopulation bei Rindern, die mit Heu gefüttert werden viermal größer als bei solchen, die überwiegend Getreide erhalten (RYCHLIK u. RUSSELL 2000). Bei neuseeländischen Wiederkäuern sollen HAP-Spezies, teilweise entgegen der obigen Definition, 1,3 % (Reh), 5,2 % (Milchrind) und sogar 11,6 % (Schaf) der Pansenbakterienpopulation stellen (ATTWOOD et al. 1998).

Fraglich ist hingegen, ob HAP-Bakterien zu den „echten“ Pansenbakterien zu zählen sind, da diesbezüglich nicht alle Kriterien von allen Spezies erfüllt werden (s. Zusammenstellung bei MAURUSCHAT 1996). Sie kommen teilweise in sehr kleiner Zahl vor und viele bisher isolierte Spezies scheinen großen Variationen zu unterliegen. Zum anderen ist fraglich, ob ihr Metabolismus mit den übrigen ruminalen Stoffwechselreaktionen in Einklang zu bringen ist.

Eine Übersicht über isolierte HAP-Spezies und ihre wichtigsten metabolischen Eigenschaften gibt Tabelle 2.18.

Tab. 2.18: Übersicht über ruminale HAP-Bakterien-Isolate

| Autor, Jahr | Isolierte Spezies | Funktionelle Eigenschaften |
|----------------------------|--|--|
| RUSSELL et al. 1988 a | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Peptostreptococcus</i> sp. / Stamm C, Populationsgröße: 10^8 Zellen/mL Pansensaft • Später als <i>Psc. anaerobius</i> identifiziert (PASTER et al. 1993) • <i>Clostridium</i> sp. / Stamm R, Populationsgröße: $< 10^3$ Zellen/mL Pansensaft | <ul style="list-style-type: none"> • Wachstum nicht ohne AS-Quelle • Nur <i>Clostridium</i> sp. kann Kohlenhydrate als Energiequelle nutzen, Gelatine verflüssigen und Kasein verdauen; keine Ureolyse • Beim AS-Abbau entsteht auch Hydrogensulfid • Monensinsensitiv |
| CHEN u. RUSSELL 1989 a | <ul style="list-style-type: none"> • Stamm SR, später als <i>C. sticklandii</i> identifiziert (PASTER et al. 1993) Populationsgröße: $< 10^9$ Zellen/mL Pansensaft <i>in-vivo</i> • Stamm F, später als <i>C. aminophilum</i> angesprochen (PASTER et al. 1993) Populationsgröße: $< 10^9$ Zellen/mL Pansensaft <i>in-vivo</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Schnelles Wachstum auf kurzkettigen Peptiden und AS, schnelle Glu-, Ser-, Thr-, Arg- und Lys-Desaminierung • Schnelles Wachstum auf AS • Schnelle Desaminierung von Glu, Gln, Ser und His • Monensinsensitiv |
| ATTWOOD et al. 1998 | 14 Isolate ¹ , genetische Verwandtschaft/Zugehörigkeit zu: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Psc. anaerobius</i>, <i>Psc. asaccharolyticus</i> • <i>Bacteroidaceae</i> (u.a. <i>Fusobacterium necrophorum</i>) • <i>Eubacterium</i> sp. | <ul style="list-style-type: none"> • Nur zwei der Isolate grampositiv • Keine Nutzung von Kasein und Gelatine, keine Ureaseaktivität; AS als Energie- und C-Quelle ausreichend • Monensinsensitiv |
| McSWEENEY et al. 1999 | <ul style="list-style-type: none"> • Isolat Lp 1284² (enge Verwandtschaft mit <i>C. botulinum</i> NCTC 7273) | <ul style="list-style-type: none"> • Proteolytische Aktivität in Gegenwart von Tanninen |
| ESCHENLAUER et al. 2002 | 19 Isolate ³ : genet. Verwandtschaft einzelner Isolate mit: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Clostridium</i> sp. (4) • <i>Eubacterium</i> sp. (1) • (<i>Atopobium minutum</i>) • <i>Desulfomonas piger</i> (1) • <i>Acidaminococcus fermentans</i> (2) | <ul style="list-style-type: none"> • Wachstum auf Trypticase • Exopeptidaseaktivität, DPP I-Aktivität nur bei den <i>Atopobium minutum</i>-ähnlichen Isolaten • Einige Isolate können Kohlenhydrate nutzen • Anaerob, monensinsensitiv |
| WALLACE et al. 2003 | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Eubacterium pyruvativorans</i> sp. nov.⁴ | <ul style="list-style-type: none"> • Nicht proteolytisch, asaccharolytisch, monensinsensitiv |

Isoliert aus: ¹ Kühen, Schafen, Rehen (Weiden, Neuseeland); ² Ziegen (tanninreiche Diät); ³ Schafen (Heu- und Konzentratfütterung); ⁴ Schafen (GB)

2.1.8.1.11.1 Metabolische Eigenschaften der hyperammoniumproduzierenden Bakterien

Aus Tabelle 2.18 ist ersichtlich, dass fast alle bisher isolierten HAP-Spezies monensinsensitiv sind und schnell auf Medien mit AS und/oder Peptiden wachsen. Die meisten sind grampositiv (s. Kap. 2.1.8.1.11.2 bis 2.1.8.1.11.5), können keine Kohlenhydrate nutzen bzw. benötigen diese nicht für ihr Wachstum, und sind weder proteo- noch peptidolytisch. Ausnahmen sind unter anderem das Isolat 1284, das hohe proteolytische Aktivität zeigt (McSWEENEY et al. 1999), und das *Atopobium minutum*-ähnliche Isolat mit DPP Typ I-Aktivität, welches möglicherweise trotz Wachstum auf Medien mit Trypticase nach Angaben der Autoren nicht zu den HAP-Bakterien zu zählen ist (ESCHENLAUER et al. 2002).

Psc. anaerobius (CHEN u. RUSSELL 1988), *C. sticklandii* und *C. aminophilum* (CHEN u. RUSSELL 1989 a) setzen AS neben Ammoniak zu verzweigten und unverzweigten flüchtigen Fettsäuren um. Die Endprodukte des proteolytischen Isolats LP 1284 aus Kasein und Rubisco sind ebenfalls Isobutyrat und -valerat (McSWEENEY et al. 1999). Tabelle 2.19 zeigt die Fermentationsendprodukte einiger AS von *Peptostreptococcus* sp., *C. sticklandii* und *C. aminophilum*.

Tab. 2.19: Fermentationsendprodukte von Glu, Gln, Ser, His, Thr, Arg, Phe, Leu und Lys bei *Peptostreptococcus* sp., *C. sticklandii* und *C. aminophilum* (CHEN u. RUSSELL 1988; CHEN u. RUSSELL 1989 a)

| Aminosäure | Fermentationsendprodukte |
|------------|---|
| Glu | Azetat, Butyrat, Ammoniak |
| Gln | Pyroglutamat, Azetat, Butyrat, Ammoniak, CO ₂ |
| Ser | Azetat, Butyrat, Malat, Laktat, Ammoniak, CO ₂ |
| His | Azetat, Butyrat, Laktat, Ammoniak, CO ₂ |
| Thr | Glycin, Ketobutytrat, Azetat, Propionat, Butyrat, Laktat, Ammoniak, CO ₂ |
| Arg | Citrullin, Ornithin, Azetat, Ammoniak, CO ₂ |
| Phe | Phenylpropionat, Phenyllaktat, Phenylazetat, Ammoniak, CO ₂ |
| Leu | Isovalerat, Isocaproat, Ammoniak, H ₂ |
| Lys | Azetat, Butyrat, Propionat, Laktat, Ammoniak |

Da die meisten HAP-Bakterien nicht proteolytisch sind (s.o., CHEN u. RUSSEL 1988, 1989 a), können sie aus Proteinen bzw. Peptiden kein Ammoniak bilden, wenn nicht auch proteolytische bzw. peptidolytische Bakterien wie *Sc. bovis* oder *P. bryantii* B₁₄, nicht aber *S. ruminantium*, anwesend sind. Nur in Cokulturen steigen daher die Konzentrationen von Ammoniak und flüchtigen Fettsäuren an (CHEN u. RUSSELL 1988, 1989 a). Durch Monensingabe wird die Ammoniakproduktion *in-vitro* (CHEN u. RUSSELL 1991) und *in-vivo* reduziert (YANG u. RUSSELL 1993 a, b; KRAUSE u. RUSSELL 1996 a), während die Proteolyse zumindest *in-vitro* unbeeinflusst bleibt (CHEN u. RUSSELL 1991). Nach KRAUSE und RUSSELL (1996 a) geht die reduzierte Ammoniakbildung mit einem Rückgang der *C. sticklandii*- und *Psc. anaerobius*-Populationen bzw. dem Rückgang der Bakterien einher, die AS fermentieren und Proteinhydrolysat als Energiequelle nutzen können (YANG u. RUSSELL 1993 a). Mit den Nachweisen, dass gemischte ruminale Bakterien

HAP-Bakterien und eine durch *B. fibrisolvans* gebildete bacteriocinähnliche Substanz *C. sticklandii*, *C. aminophilum* und *Psc. anaerobius* hemmen, während die meisten gramnegativen, kohlenhydratfermentierenden Bakterien nicht beeinträchtigt werden, konnten RYCHLIK und RUSSELL (2002 a) belegen, dass es *in-vivo* tatsächlich natürliche Mechanismen zur Regulation der Populationsgröße gibt (RYCHLIK u. RUSSELL 2000). Erst kürzlich (LIMA et al. 2009²¹) konnte mit Bovicin HC5 aus *Sc. bovis* HC5 ein weiteres Bacteriocin nachgewiesen werden, dass die Zellmembran penetriert und die Ammoniakproduktion durch HAP-Bakterien hemmen soll.

Nicht vergessen werden darf, dass die Ammoniakproduktion stark von der Fütterung beeinflusst werden kann und nicht unbedingt Ausdruck der Aktivität von HAP-Bakterien sein muss (WALLACE et al. 1996). Eine durch Ionophore bedingte Peptidakkumulation kann auch durch Schädigung der Membran von *Prevotella*-Spezies erklärt werden, in deren Folge keine großen Peptide mehr metabolisiert werden können (NEWBOLD et al. 1992).

2.1.8.1.11.2 *Peptostreptococcus anaerobius*

Psc. anaerobius wurde erstmalig als Stamm C von RUSSELL et al. (1988 a) isoliert und später durch PASTER et al. (1993) als *Psc. anaerobius* identifiziert. Es handelt sich um ein grampositives, monensinsensitives, anaerobes Bakterium, das keine Sporen bilden und Kohlenhydrate nicht als Energiequelle nutzen kann. Es ist weder proteolytisch noch ureolytisch (RUSSELL et al. 1988 a) und kann keine Oligopeptide hydrolysieren (WALLACE et al. 1990 c). Während Ammoniakproduktion aus Glutamat und Glycin nicht möglich ist (RUSSELL et al. 1988 a), werden Glutamin, Serin, Threonin, Phenylalanin und besonders Leucin schnell desaminiert (CHEN u. RUSSELL 1988). *Psc. anaerobius* kann nicht ohne AS-Quelle wachsen (RUSSELL et al. 1988 a), möglich ist Wachstum auf Medien mit Trypticase und Kasaminosäuren wobei Tyrosin, Phenylalanin und Leucin für das Wachstum essentiell sind (CHEN u. RUSSELL 1988). Für Valin, Isoleucin und Leucin besitzt *Psc. anaerobius* ein gemeinsames, natriumabhängiges Transportsystem (s. Kap. 2.1.3.2.2; CHEN u. RUSSELL 1989 b).

Psc. anaerobius stellt ca. 1 % der gesamten ruminalen Bakterienpopulation (KRAUSE u. RUSSELL 1996 a) bzw. kommt in einer Konzentration von 10^8 Zellen/mL Pansensaft vor (RUSSELL et al. 1988 a).

2.1.8.1.11.3 *Clostridium sticklandii*

Ursprünglich wurde *C. sticklandii* als Stamm SR isoliert (CHEN u. RUSSELL 1989 a) und später durch PASTER et al. (1993) der Art *C. sticklandii* zugeordnet. Die kleinen gramlabilen Stäbchen bilden keine Sporen (CHEN u. RUSSELL 1989 a) und stellen wie *C. aminophilum* und *Psc. anaerobius* ca. 1 % der gesamten ruminalen Bakterienpopulation (KRAUSE u. RUSSELL 1996 a) bzw. kommen *in-vivo* in Konzentrationen von 10^9 Zellen/mL Pansensaft vor (CHEN u. RUSSELL 1989 a). Sie sind nicht proteolytisch, können aber im Gegensatz zu *C. aminophilum* auf Medien mit kurzkettigen Peptiden besser wachsen als mit AS. Wachstum auf Medien mit langkettigen Peptiden ist nicht möglich. Glutamat, Serin, Threonin, Arginin und Lysin werden schnell desaminiert (CHEN u. RUSSELL 1989 a). *C. sticklandii* besitzt

²¹ In diesem Versuch wurde die Wirkung von Bovicin HC5 auf bakterielle Kulturen getestet, in denen HAP-Bakterien zwar angereichert, aber nicht nachgewiesen wurden.

einen aktiven Arginintransportmechanismus (VAN KESSEL u. RUSSELL 1992; s. Kap. 2.1.3.2.2) für den neben dem „AS-Verlust“ durch Desaminierung viel Energie aufgewendet werden muss (WALLACE 1994).

Die bacteriocinähnliche Substanz von *B. fibrisolvens* JL5 setzt die Lebensfähigkeit von *C. sticklandii* durch Senkung der intrazellulären Kalium- und ATP-Konzentration sowie durch Erniedrigung des Membranpotenzials herab (RYCHLIK u. RUSSELL 2002 a).

2.1.8.1.11.4 *Clostridium aminophilum*

Zunächst wurde dieses Bakterium als „Stamm F“ isoliert (CHEN u. RUSSELL 1989 a) und später von PASTER et al. (1993) als *C. aminophilum* beschrieben. Es handelt sich um grampositive, pleomorphe (CHEN u. RUSSELL 1989 a), ca. 1,5 µm lange, obligat anaerobe, gelegentlich sporenbildende Bakterien (PASTER et al. 1993). *C. aminophilum* ist asaccharolytisch (PASTER et al. 1993) und zeigt schnelles Wachstum auf Medien mit AS (CHEN u. RUSSELL 1989 a). Es desaminiert Glutamat, Glutamin, Serin und Histidin (s. Tab. 2.19; CHEN u. RUSSELL 1989 a) und nutzt diese AS als Kohlenstoffquelle (PASTER et al. 1993). Glutamin, Glutamat und Histidin können im Gegensatz zu Serin als alleinige Energiequelle dienen (CHEN u. RUSSELL 1990). Für die genannten AS besitzt *C. aminophilum* natriumabhängige Transportsysteme (CHEN u. RUSSELL 1990; s. Kap. 2.1.3.2.2). Einige Stämme sind auch in der Lage, Pyroglutamat zu desaminieren (PASTER et al. 1993).

C. aminophilum stellt ca. 1 % der gesamten ruminalen Bakterienpopulation (KRAUSE u. RUSSELL 1996 a) bzw. kommt *in-vivo* in Konzentrationen von 10^9 Zellen/mL Pansensaft vor (CHEN u. RUSSELL 1989 a). In Reinkulturen toleriert es höhere Monensinkonzentrationen (1,5 µmol/L) als *C. sticklandii* und *Psc. anaerobius*. *In-vivo* kann es aber nicht durch Monensin eliminiert werden und soll für die Verschwendung von 9 % des Futterproteins verantwortlich sein (KRAUSE u. RUSSELL 1996 a). Die von *B. fibrisolvens* JL5 gebildete bacteriocinähnliche Substanz hemmt *C. aminophilum* ebenfalls weniger stark als *C. sticklandii*, da Ersteres vermutlich durch strukturelle Zellwandveränderungen die Bindung dieser Substanz verhindern kann. Kreuzresistenzen mit Monensin scheinen nicht zu bestehen (RYCHLIK u. RUSSELL 2002 b). Bovicin HC5 (s. Kap. 2.1.8.1.11.1) hingegen hemmt sowohl Wachstum als auch Ammoniakproduktion von *C. aminophilum* durch Änderung der Zellwandpermeabilität. Besonders nach pH-Wertabsenkung kommt es zum Austreten von Kalium, eine geringgradige Adaptation ist aber möglich (MANTOVANI u. RUSSELL 2002).

2.1.8.1.11.5 *Eubacterium pyruvativorans*

Eu. pyruvativorans wurde aus dem Pansen von Schafen isoliert. Es ist ein grampositives, anaerobes, leicht gebogenes, 0,3 bis 0,5 x 1,0 bis 1,5 µm großes kokkoides Stäbchen, das in der Lage ist, AS aus Trypticase ebenso schnell zu Ammoniak umzusetzen, wie *Psc. anaerobius*, *C. sticklandii* und *C. aminophilum*. Es ist monensinsensitiv, asaccharolytisch, ureasenegativ und nicht proteolytisch. Hauptendprodukt seines Stoffwechsels ist Caproat, Valerat wird in kleineren Mengen gebildet (WALLACE et al. 2003). *Eu. pyruvativorans* kann AS als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (WALLACE et al. 2003), aber nicht wachsen, wenn die AS einzeln gegeben werden oder nur in Form freier AS zur Verfügung stehen (WALLACE et al. 2004). Alanin, gefolgt von Leucin, Serin und Prolin, wird während des Wachstums am meisten genutzt, wobei Alanin und Aspartat schon vor der Aufnahme modifiziert werden. Lysin, Histidin und Tyrosin werden am langsamsten aufgenommen. Maxi-

males Wachstum wird bei Gabe von Kaseinhydrolysat, AS und Ammoniak erreicht, was nach WALLACE et al. (2004) zeigt, dass *Eu. pyruvativorans* einen höheren Peptid- als AS-Bedarf hat. Möglicherweise sind fehlende AS-Transportsysteme die Ursache (WALLACE et al. 2004).

Durch sein schnelles Wachstum auf Medien mit Pyruvat unterscheidet sich *Eu. pyruvativorans* von anderen HAP-Bakterien (WALLACE et al. 2003). Da Pyruvat nicht in hohen Konzentrationen im Pansen vorkommt (WALLACE 1978), vermuten WALLACE et al. (2004) dass dieser Organismus eine Nische besetzt, in der er AS und weitere Komponenten zu Pyruvat umsetzen kann, um dieses dann unter ATP-Gewinn zu Azetat zu oxidieren. Ob tatsächlich AS die Hauptenergiequelle für dieses Bakterium darstellen, bleibt zunächst unklar (WALLACE et al. 2004).

2.1.8.2 Zusammensetzung der bakteriellen Population im Pansen

Die Bakterienzahl im Pansen beläuft sich auf 10^9 bis 10^{10} Bakterien/g Panseninhalt (WALLACE 1992 c) bzw. /mL Pansensaft (THEODOROU u. FRANCE 1993) und liegt damit sehr viel höher als die der Protozoen (10^3 bis 10^6 /g Panseninhalt; WALLACE 1992 c). Das häufige Vorkommen einiger Bakterien soll auf höhere Wachstumsraten dieser Spezies zurückzuführen sein (WOLIN et al. 1997). Moderne DNA- und RNA-Untersuchungen zeigen außerdem, dass die Speziesvielfalt der Pansenbakterien deutlich größer ist, als bisher angenommen wurde (KRAUSE u. RUSSELL 1996 b).

2.1.8.2.1 Methoden zur Untersuchung der bakteriellen Populationszusammensetzung

Lange Zeit wurden kulturelle Methoden (VAN GYLSWYK et al. 1990; ATTWOOD u. REILLY 1995) genutzt, um Zusammensetzungen von Pansenbakterienpopulationen quantitativ und qualitativ zu erfassen. In Kulturen fehlt jedoch räuberische Protozoenaktivität, die interspezifische Konkurrenz ist geringer, in der Regel gibt es keine Passage aus dem System (KOIKE et al. 2003) und die Populationsgröße einfach zu kultivierender Stämme wird möglicherweise überschätzt (WEIMER et al. 1999). Seit den 90er Jahren sind PCR-Techniken bei der Untersuchung ruminaler Bakterienspezies (REILLY u. ATTWOOD 1998; TAJIMA et al. 1999, 2000, 2001; REILLY et al. 2002; NOFTSGER et al. 2003; EINSPANIER et al. 2004; WIEDEMANN et al. 2007; GOEL et al. 2008) weit verbreitet.

Gebräuchlich sind außerdem hybridisierungs- (MAY et al. 1993; MICHALET-DOREAU et al. 2001) und elektrophoresebasierte (KOCHERGINSKAYA et al. 2001; LARUE et al. 2005; KARNATI et al. 2007) Verfahren sowie RIS/RIS-LP (ribosomal intergenic spacer analysis-length polymorphism; NOFTSGER et al. 2003; LARUE et al. 2005; KARNATI et al. 2007) und ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis; SUNDSET et al. 2009; WELKIE et al. 2010). Letzteres Verfahren erlaubt zwar Aussagen über Speziesunterschiede und Populationsgrößen, kann einzelne Spezies aber nicht identifizieren (SUNDSET et al. 2009; WELKIE et al. 2010). Ein Nachteil von RNA-Messungen ist außerdem, dass weder Vitalität, metabolische Aktivität, Ribosomenzahl noch die Wachstumsphase erfasst werden können (hybridbasierte Messungen; MAY et al. 1993). Bei RIS-Analysen überlagern außerdem Banden von häufigen Spezies möglicherweise die seltenerer Bakterien (NOFTSGER et al. 2003).

Auffällig ist, dass der wichtigste Zelluloseabbauer *F. succinogenes* verfahrensunabhängig nicht oder nur schlecht detektiert werden kann (VAN GYLSWYK 1990; TAJIMA et al. 1999;

LARUE et al. 2005; KARNATI et al. 2007). KARNATI et al. (2007) führen dies bei DGGE- (denaturing gradient gel electrophoresis) und RIS-LP-Analysen auf schwierigere Amplifikation gegenüber anderen Spezies zurück, während STEVENSON und WEIMER (2007) annehmen, dass andere, unbekannte zellulolytische Bakterien oder Pilze exakte Ergebnisse verhindern. Auch MAY et al. (1993) konnten im Mittel nur ca. 5 % der detektierten 16S rRNA *F. succinogenes* zuordnen.

Bei Studien, die keinen festen Panseninhalt (MAY et al. 1993; KARNATI et al. 2007) analysierten, muss außerdem davon ausgegangen werden, dass *F. succinogenes* an Futterpartikeln verblieb, die Probenentnahme- und -aufbereitung also wahrscheinlich entscheidend für die Nachweisbarkeit waren.

2.1.8.2.2 Zusammensetzung der proteolytischen bakteriellen Population im Pansen

Bei Fütterung von Grassilage, Grasheu und Kraftfutter stellen *Prevotella*-Spezies mit 60,1 % vor *B. fibrisolvens* (14,4 %) und *Eu. ruminantium* (5,0 %) die größten Anteile der gesamten bovinen ruminalen Bakterienpopulation. Es folgen *Fusobacterium* sp. (3,2 %) und *Bacteroides*-ähnliche Spezies (1,8 %). *Clostridium* sp., *M. elsdenii* und *L. multipara* sind mit Anteilen unter 1 % an der gesamten bakteriellen Population vertreten (VAN GYLSWYK 1990). Die Speziesvielfalt der proteolytischen Population in neuseeländischen Weiderindern wird jedoch weniger von *Prevotella* (2 % der isolierten proteolytischen Stämme), als durch *Sc. bovis* (61 %) und *Eu. budayi* (23 %) sowie *B. fibrisolvens* (7 %) und *B. fibrisolvens*-ähnlichen Bakterien (7 %) dominiert. Die proteolytische Aktivität hingegen wird hauptsächlich (42 %) durch *B. fibrisolvens* und *B. fibrisolvens*-ähnliche Spezies und nur zu 23 % durch *Sc. bovis*, zu 16 % durch *Eubacterium* und immerhin zu 10 % durch *Prevotella* vermittelt (ATTWOOD u. REILLY 1995).

Ähnlich der Studie VAN GYLSWYK (1990) zeigten PCR-Untersuchungen von Panseninhalt (fest:flüssig 1:1; STEVENSON u. WEIMER 2007; WEIMER et al. 2008) aus Rindern mit luzerne- und maissilagebasierter Fütterung, dass 41,8 bis 60,0 % aller rRNA-Kopien *Prevotella*-Spezies zuzuordnen waren, allerdings entfielen nur geringe Anteile auf die bekannten Spezies *P. bryantii*, *P. ruminicola* und *P. brevis*, rRNA von *S. ruminantium* kam ebenfalls nur in sehr geringen Anteilen vor, wie Tabelle 2.20 zeigt.

Tab. 2.20: Populationsanteile [%] einzelner im Proteinstoffwechsel aktiver Bakterien bei kultureller bzw. PCR-basierter Bestimmung

| Autor, Jahr | VAN GYLSWYK 1990 | STEVENSON u. WEIMER 2007 | WEIMER et al. 2008 |
|------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Nachweis- technik: | Kulturell | PCR PAS : fester PI 1:1 | PCR PAS : fester PI 1:1 |
| Fütterung: | Grassilage | Mais-/luzernesilagebasiert | Mais-/luzernesilagebasiert |
| <i>Prevotella</i> | 60,1 | 42 bis 60 | 41,8 |
| <i>ruminicola</i> | | } 2 bis 4 | < 2,0 |
| <i>bryantii</i> | | | ~ 0,6 |
| <i>brevis</i> | | | ~ 0,1 |
| <i>B. fibrisolvens</i> | 14,4 | < 0,03 | bis 0,01 |
| <i>M. elsdenii</i> | < 1 | < 0,03 | 0 bis ~ 0,1 |
| <i>Sc. bovis</i> | | < 0,03 | < 0,002 |
| <i>S. ruminantium</i> | | 0,5 bis 1,0 | ~ 0,5 bis 0,75 |
| <i>L. multipara</i> | < 1 | | |

PAS Pansensaft; PI Panseninhalt

2.1.8.2.3 Veränderungen der bakteriellen Populationszusammensetzung im Pansen

Die Zusammensetzung der bakteriellen Population hängt von Rationsgestaltung (TAJIMA et al. 2001), Wirtstier (WEIMER et al. 1999; LARUE et al. 2005) und Probenentnahmezeitpunkt (NOFTSGER et al. 2003; WELKIE et al. 2010) ab.

Kleine Unterschiede im Rp-Gehalt der Ration (17,5 vs. 18,5 %) beeinflussen zellulolytische Spezies (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*), die mit 0,3 bis 3,9 % der gesamten bakteriellen RNA nur einen kleinen Anteil der Population auszumachen scheinen, nicht (WEIMER et al. 1999). Zulage von Proteinsupplementen wie Sojabohnenmehl und isoliertes Sojabohnenprotein kann aber das bakterielle Wachstum aber um das 1,5-fache steigern, wie quantitative 16S rRNA-Untersuchungen ergaben (MAY et al. 1993). MAY et al. (1993) vermuten, dass sich durch Protein- aber auch Ammoniaksupplementierung vor allem Proteolyten vermehren konnten und für den ebenfalls beobachteten gestiegenen Zellwandabbau im Pflanzenmaterial verantwortlich waren (Abbau von Zellwandprotein führte zu besserer Zugänglichkeit der Polysaccharidkomplexe).

Bei niedrigen N-Gehalten in der Ration und gleichzeitiger Kohlenhydratzulage (Dextrose: Maismehl 50:50) nimmt die *Sc. bovis*-Population in gemischtem Panseninhalt (fest/flüssig) ab, während die *B. fibrisolvens*-Population zunimmt. Ursache für den Rückgang der *Sc. bovis*-Population ist möglicherweise exzessive Energieverschwendung durch Energyspilling (s. Kap. 2.1.9). *P. bryantii*, das auch in dieser Studie mit 0,7 % nur einen kleinen Teil der *Prevotella*-Population stellte, ist bei niedrigen N-Gehalten und Kohlenhydratzulage in größeren Zahlen vorhanden (REILLY et al. 2002). CHEN et al. (2007) beobachteten hingegen, dass bei zusätzlicher Ammoniakzulage zu Reisstroh der Anteil von *B. fibrisolvens* im Besonderen, aber auch der anderer faserassoziierter, zellulolytischer Bakterien zunahm (*Rc. flavefaciens*,

F. succinogenes), während die Populationsgröße von *Rc. albus* sank. Kaseinzulage bewirkte bei allen Spezies einen noch größeren Anstieg.

Bei zunehmenden Getreide- und Konzentratanteilen zu Lasten des Heuanteils in einer Ration nehmen zellulolytische Ruminokokken (TAJIMA et al. 2000), fibrolytische Bakterien und das xylanolytische *Eu. ruminantium* im bovinen Pansensaft erwartungsgemäß anteilig ab (TAJIMA et al. 2001). Laktatbildende und laktatnutzende Spezies wie *S. ruminantium*, *M. elsdenii* und *B. fibrisolvans*, Letzteres in Übereinstimmung mit REILLY et al. (2002), nehmen hingegen zu (TAJIMA et al. 2000). Wie in der Studie von REILLY et al. (2002) erhöhte sich auch die *P. bryantii*-Population unter höherer Kohlenhydratzulage stark, weswegen TAJIMA et al. (2001) annehmen, dass dieses Bakterium möglicherweise auch amylolytisch tätig ist. Denkbar ist aber auch, dass höhere Rp-Gehalte nach dem Futterwechsel (Nährstoffzusammensetzung nicht angegeben) zu Zunahmen in *Prevotella*-Subpopulationen geführt haben. Die *P. ruminicola*-Population nahm hingegen zwar zunächst ab, *P. ruminicola* blieb aber trotzdem vorherrschende Spezies in der Bakterienpopulation (TAJIMA et al. 2001). Bei Erhöhung des Stärkeanteils einer Ration durch Mais zu Lasten des Heuanteils (möglicherweise mit Erniedrigung des Rp-Gehalts einhergehend; diesbezüglich keine Nährstoffangabe) verschiebt (LARUE et al. 2005), bzw. erhöht sich (ab 50 % Mais; KOCHERGINSKAYA et al. 2001) die Speziesvielfalt (s. Tab. 2.21) im Pansen. So können dann vermehrt mit *B. fibrisolvans* und *B. proteoclasticus* verwandte Spezies detektiert werden (LARUE et al. 2005).

Tab. 2.21: Bakterienspezies in festem und flüssigem Panseninhalt bei Heu- bzw. Heu- und Maisfütterung (RIS-Analysen; LARUE et al. 2005)

| Ration | Isolierte Spezies im Pansensaft | Isolierte Spezies im festen Panseninhalt |
|--------------------|---|---|
| Heu | <i>Prevotella</i> , Clostridien-ähnliche Spezies | Viele Bakterien mit niedrigen Guanin- und Cytosinanteilen an RNA/DNA: u.a. <i>L. multipara</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Prevotella</i> ; wenige Ruminokokken |
| Heu und Mais | <i>P. ruminicola</i> , <i>P. brevis</i> , viele Spezies, die mit <i>B. fibrisolvans</i> und <i>B. proteoclasticus</i> verwandt sind | <i>Selenomonas</i> - und <i>Butyrivibrio</i> -ähnliche Spezies, Ruminokokken |

RIS- und DGGE- (LARUE et al. 2005) bzw. ARISA-Analysen (WELKIE et al. 2010) zeigen außerdem Populationsunterschiede zwischen einzelnen Schafen bzw. Kühen auf. Des Weiteren variiert die bakterielle Population in Abhängigkeit vom Probenentnahmezeitpunkt (WELKIE et al. 2010) und zwischen Bakterien der flüssigen und festen Panseninhaltsphase (LARUE et al. 2005; WELKIE et al. 2010). Zeitliche und individuelle Variationen sind bei Bakterien in festem Panseninhalt aber weniger ausgeprägt als bei Bakterien der flüssigen Phase (WELKIE et al. 2010). Über 50 % Mais in einer Ration aus Heu und Mais führen neben vielfältigeren bakteriellen Populationen auch zu erhöhten Variationen zwischen Individuen (KOCHERGINSKAYA et al. 2001).

2.1.8.3 Ruminale Protozoen und Pansenpilze

Bei HÖHLING (2000) und WULFF (2001) ist nachzulesen, welche Bedeutung Protozoen bzw. Pilze im ruminalen Proteinstoffwechsel haben.

2.1.9 Abhängigkeit des ruminalen Stickstoff- vom Kohlenhydratstoffwechsel

Da für die mikrobielle Proteinsynthese viel Energie benötigt wird (4 Moleküle ATP zur Polymerisierung einer AS; NOCEK u. RUSSELL 1988; NOLAN 1993; VAN KESSEL u. RUSSELL 1996) und Bakterien vor allem Kohlenhydrate zur Energiegewinnung und deren Kohlenstoffskelette in Kombination mit Ammoniak zur Proteinsynthese nutzen (BACH et al. 2005), hängt die mikrobielle Proteinsynthese sowohl von der N- als auch Energieverfügbarkeit ab (ERASMUS 1991; CHIKUNYA et al. 1996; NOLAN u. DOBOS 2005). Das Kohlenhydratangebot (NOCEK u. RUSSELL 1988) bzw. die Kohlenhydratfermentationsrate (HOOVER u. STOKES 1991), welche die Energieverfügbarkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt maßgeblich bestimmt, begrenzen das mikrobielle Wachstum und somit die mikrobielle Proteinsynthese. Dementsprechend soll auf Grund von Energielimitierung bei gras-silagebasiert gefütterten Tieren die Bereitstellung bakteriellen Proteins gering sein (JAURENA et al. 2005). Wenn der pansenabbaubare Proteinanteil am Gesamtproteinanteil einer Ration hingegen 60 % übersteigt, ist selbst bei großen Mengen verfügbarer Kohlenhydrate mit hohen N-Verlusten zu rechnen (NOCEK u. RUSSELL 1988). Bei schnellerer bzw. höherer N- als Energiefreisetzung gelangt überschüssiges Ammoniak in den Blutkreislauf des Wirtstieres, wird in der Leber zu Harnstoff umgesetzt und anschließend entweder renal ausgeschieden (Verlust) oder in den Pansen rezykliert (HUBER u. HERRERA-SALDANA 1994). Abbildung 2.16 zeigt schematisch die gegenseitige Abhängigkeit des ruminalen Energie- und N-Stoffwechsels.

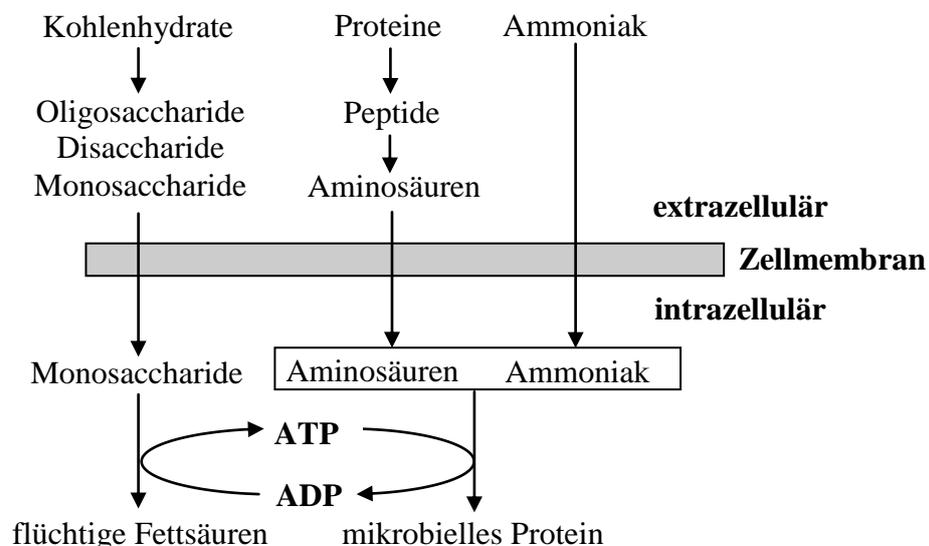


Abb. 2.16: Gegenseitige Abhängigkeit des ruminalen Energie- und N-Stoffwechsels (modifiziert nach NOCEK u. RUSSELL 1988 und RUSSELL et al. 1991). In der Abbildung nicht berücksichtigt ist die Peptidaufnahme durch ruminale Mikroorganismen.

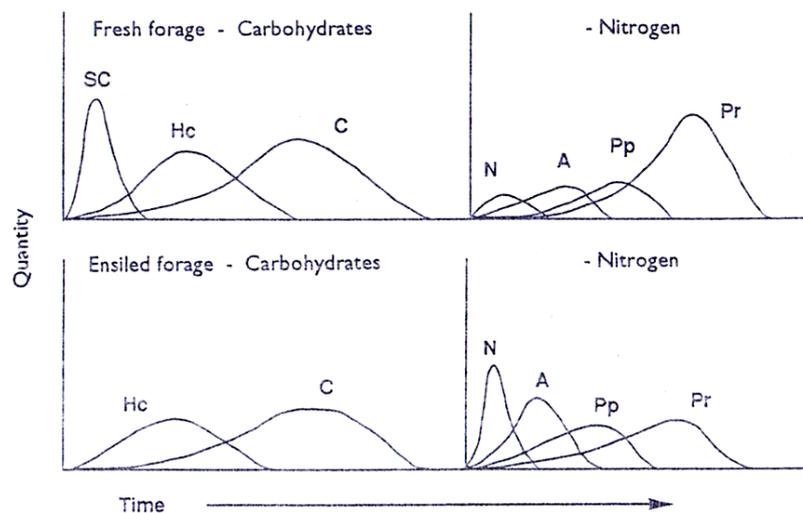
Auf Zellebene resultiert aus der gegenseitigen Abhängigkeit, dass energielimitierte Pansenbakterienmischkulturen (exkl. *Sc. bovis*) bei Ammoniaküberschuss zwar niedrige Erhaltungsenergie aufweisen, bei Peptid- und AS-Gabe aber nicht in der Lage sind, ihr Wachstum zu vergrößern. Umgekehrt erhöhen ammoniaklimitierte Kulturen mit Energieüberschuss ihr Wachstum erst, wenn Amino-N zur Verfügung gestellt wird, benötigen aber zehnfach höhere Erhaltungsenergie (VAN KESSEL u. RUSSELL 1996). Dieses Phänomen wird als „Energy-spilling“ bezeichnet und ist durch Wärmeproduktion infolge zyklischer Ionenströme durch die Zellmembran bedingt (NOCEK u. RUSSELL 1988). Bei *F. succinogenes* nimmt bei Ammoniakgabe die Glykogenspeicherung ab, während zunehmend Glukose metabolisiert wird, um mehr ATP zur Verfügung zu stellen. Gleichzeitig steigt, ggf. anstelle der Glykogensynthese, die Synthese von AS und Makromolekülen an (MATHERON et al. 1999).

Es ist davon auszugehen, dass die für das Tier empfohlene Protein- und Energieversorgung die mikrobiellen Bedürfnisse nicht optimal deckt (NOCEK u. RUSSELL 1988). Aus diesem Grund erscheint die Synchronisierung von N- und Energieverfügbarkeit zur Optimierung der mikrobiellen Proteinsynthese und Vermeidung von N-Verlusten sinnvoll.

2.1.9.1 Zeitliche Synchronisierung von Stickstoff- und Kohlenhydratstoffwechsel im Pansen

BEEVER (1993), HUBER und HERRERA-SALDANA (1994) sowie MAENG et al. (1997) fassen zusammen, dass die Nutzung von Kohlenhydraten und N-Verbindungen durch Pansenbakterien verbessert werden kann, wenn diese in der jeweils benötigten Menge zur gleichen Zeit verfügbar sind. In mehreren Studien wurden positive Effekte auf Milchleistung (HERRERA-SALDANA u. HUBER 1989) und mikrobielle Proteinausbeute im Duodenum (HERRERA-SALDANA et al. 1990; ALDRICH et al. 1993) bzw. mikrobielle N-Produktion (SINCLAIR et al. 1995) beobachtet (s. Tab. 2.22).

Es liegt die Annahme zu Grunde, dass die Nutzung von Energie oder N immer dann ineffizient wird, wenn das jeweils andere Substrat nicht angemessen verfügbar ist (NEWBOLD u. RUST 1992). Bei Synchronisierung von N- und Energiequelle werden benötigte Substrate wie ATP, Ammoniak und AS simultan freigesetzt und stehen den Mikroorganismen direkt zur Verfügung (NOLAN 1993; HUBER u. HERRERA-SALDANA 1994). Meistens kann nicht genügend Energie bereitgestellt werden, da der ruminale Proteinabbau schneller abläuft, so dass AS desaminiert und zur Energiegewinnung genutzt werden (BRODERICK et al. 1991). Am effizientesten nutzbare Kohlenhydratquellen für das mikrobielle Wachstum sind stärkereiche Futtermittel, da Zellulose zu langsam, Zucker hingegen zu schnell abgebaut wird (ERASMUS 1991) bzw. Futtermittel deren Abbaugeschwindigkeiten denen der Proteinsupplemente ähneln (MATRAS et al. 1991; CHIKUNYA et al. 1996; MIRON et al. 1996). Bei Fütterung ammoniierten Strohs kommt es daher infolge rascher Ammoniakfreisetzung und niedriger Energieverfügbarkeit wie erwartet zu ineffizienter mikrobieller Proteinsynthese (VAN SOEST 1994). Bei Grünfuttern führt Silierung zu veränderter Energie- und N-Freisetzung, eine synchrone Substratfreisetzung ist, wie Abbildung 2.17 zeigt, nicht möglich (BEEVER 1993). STOKES et al. (1991) fanden, dass die bakterielle Effizienz (g bakterielles N/kg verdauter Trockenmasse) am höchsten ist, wenn die Ration mindestens 37 % nicht strukturierte Kohlenhydrate enthält und das Verhältnis zu abbaubarem Protein < 3 ist.



SC = lösliche Kohlenhydrate (soluble carbohydrates);
 Hc = Hemizellulose (hemicellulose); C = Zellulose (cellulose);
 N = NAN; A = AS; Pp = Peptide; Pr = Proteine

Abb. 2.17: Freisetzung von Energie (bzw. Kohlenhydraten) und N-Verbindungen in frischem und siliertem Grünfutter (aus BEEVER 1993)

Die ruminale Ammoniakkonzentration steht in direktem Zusammenhang mit der Synchronisierung von N- und Energiefreisetzung. Ammoniak wird in Rationen, die höhere Anteile löslicher Kohlenhydrate oder fermentierbarer Fasern enthalten, am besten genutzt (BRODERICK 2006), wie *in-vivo*-Studien bereits gezeigt hatten (HRISTOV u. ROPP 2003; HRISTOV et al. 2005). Leicht fermentierbare Energie senkt entweder durch verminderte Produktion und/oder erhöhte Proteinsynthese die ruminale Ammoniakkonzentration (HRISTOV et al. 2005).

In-vivo kann N-Recycling über den ruminohepatischen Kreislauf niedrige ruminale Ammoniakkonzentrationen kompensieren (FIRKINS et al. 2007) und mangelhafte Synchronisierung ausgleichen (HENNING et al. 1993; HUBER u. HERRERA-SALDANA 1994; VALKENERS et al. 2004; BACH et al. 2005; ROTGER et al. 2006). Dies verhindert negative N-Bilanzen bei proteinreichen Rationen (MARINI et al. 2006) und erklärt, dass in vielen Studien keine positiven Effekte durch Synchronisierung auftraten. Es soll reichen, innerhalb von 48 (VALKENERS et al. 2004) bzw. 24 Stunden (HENNING et al. 1993) aufeinander abgestimmte N- und Energieanteile zu füttern. FIRKINS (1996) resümiert dementsprechend, dass Synchronisierung für optimale mikrobielle Proteinsynthese zwar notwendig sei, vorübergehend asynchrone Perioden aber toleriert würden. Neben N-Recycling im ruminohepatischen Kreislauf (s.o.) sollen die gegenseitige Bereitstellung benötigter Substrate zwischen verschiedenen Bakterienspezies (NOLAN 1993) und intrazellulärer Polysaccharidabbau vorübergehenden Protein- und/oder Energiemangel ausgleichen können, wie FIRKINS et al. (1996, 2006) zusammenfassen. Wenn Rationen mit wenig Rp verfüttert werden, d.h. pansenabbaubares Protein nicht kontinuierlich verfügbar ist, ist Synchronisierung aber dennoch sinnvoll (BRODERICK 2006).

Tabelle 2.22 gibt einen Überblick über die Ergebnisse einiger Studien zur Synchronisierung von Energie- und N-Verfügbarkeit. Beachtet werden sollte, dass Synchronisierung einerseits allein durch zeitliche Fütterungsänderungen, aber auch durch Einsatz unterschiedlicher Futter-

mittel erreicht werden kann. Letzteres birgt die Gefahr, dass neben der N- oder Energiefreisetzungsrates weitere Faktoren den gemessenen Parameter beeinflussen.

Besonders in *in-vivo*-Studien wurden positive Effekte durch synchronisierte Energie- und N-Gabe beobachtet. Jedoch halten NEWBOLD und RUST (1992) trotz schneller Erholung der bakteriellen Population *in-vitro* nach kurzzeitiger N-Unterversorgung Einschränkungen des mikrobiellen Wachstums und Energieverluste für das Wirtstier durch die erforderliche Harnstoffsynthese bei N-Überschuss für möglich. In Versuchen, bei denen keine positiven Synchronisierungseffekte auftraten, wurden möglicherweise Substanzen wie Peptide oder AS unzureichend supplementiert (MABJEESH et al. 1997) oder im Pflanzenmaterial verbliebene N-Verbindungen überdeckten negative Effekte bei nicht synchronisierter Fütterung (RUSSI et al. 2002).

Beachtet werden muss, dass Synchronisierung wahrscheinlich nicht für alle mikrobiellen Subpopulationen im Pansen gleichzeitig erreicht werden kann. Aus diesem Grund bleibt nach BACH et al. (2005) die mikrobielle Effizienz unabhängig von der Synchronisierung weitgehend stabil. Zu weiterer Stabilität und kontinuierlicher mikrobieller Proteinsynthese bei asynchroner Verfügbarkeit nutritiver N-Verbindungen trägt, wie bereits erwähnt, auch endogener, rezyklisierter N bei (HENNING et al. 1993; HUBER u. HERRERA-SALDANA 1994; VALKENERS et al. 2004; BACH et al. 2005; ROTGER et al. 2006). In den meisten Fütterungsregimen wird so, abhängig von Fütterungszeiten und Energie- und Proteinabbaubarkeit, wenigstens intermittierend eine gewisse Synchronisierung erreicht (HUBER u. HERRERA-SALDANA 1994).

Tab. 2.22: Auswirkungen der Synchronisierung von Energie- und N-Aufnahme bei Wiederkäuern. In den Versuchen wurden das zeitliche Muster der N- und Energiegabe bei identischer Ration (= Muster) oder die Rationsbestandteile (= Futtermittel; FM) verändert, um (a)synchrone N- und Energieverfügbarkeit zu simulieren.

| Autor, Jahr | <i>In-vivo/</i> <i>in-vitro</i> | Tierart/ System | (A-)Synchron durch: | Parameter | Effekt |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------|-------------------------|--|-------------------|
| HERRERA-SALDANA u. HUBER 1989 | <i>in-vivo</i> | Rind | FM | Milchleistung | + |
| HERRERA-SALDANA et al. 1990 | <i>in-vivo</i> | Rind | FM | Mikrobielle Proteinsynthese | + ¹ |
| MATRAS et al. 1991 | <i>in-vivo</i> | Lamm | FM | N-Nutzungseffizienz durch Lämmer | + |
| NEWBOLD u. RUST 1992 | <i>in-vitro</i> | Kulturen | Muster, FM ² | Bakterielle Populationsgröße | - |
| ALDRICH et al. 1993 | <i>in-vivo</i> | Rind | FM | Mikrobielle N-Passage (Duodenum)/ Milchleistung | + ¹ /- |
| HENNING et al. 1993 | <i>in-vivo</i> | Schaf | Muster | Mikrobielles Wachstum | - |
| KHORASANI et al. 1994 | <i>in-vivo</i> | Rind | FM | Milchleistung und -zusammensetzung | - |
| SINCLAIR et al. 1995 | <i>in-vivo</i> | Schaf | FM | Mikrobielle N-Produktion | + |
| ABDELGADIR et al. 1996 | <i>in-vivo</i> | Kalb | FM | Zunahmen, Futteraufnahme | - |
| MABJEESH et al. 1997 | <i>in-vivo</i> | Rind | FM | Mikrobielle Proteinsynthese | - |
| CASPAR et al. 1999 | <i>in-vivo</i> | Rind | FM | Milchleistung, Trockenmasseaufnahme | (+) |
| KIM et al. 1999 | <i>in-vivo</i> | Rind | Muster | Mikrobielle Proteinsynthese | - |
| RUSSI et al. 2002 | <i>in-vitro</i> | RUSITEC | Muster, FM | Fermentationseffizienz | - |
| CABRITA et al. 2003 | <i>in-vivo</i> | Rind | Muster | Milchleistung | + |
| RICHARDSON et al. 2003 | <i>in-vivo</i> | Lamm | FM | Zunahmen/Energieretention | -/+ |
| VALKENERS et al. 2004 | <i>in-vivo</i> | Rind | Muster | Mikrobielle Proteinsynthese, N-Retention | - |
| ROTGER et al. 2006 | <i>in-vivo</i> <i>in-vitro</i> | Rind | FM | Pansenfermentation, mikrobieller N-Fluss, scheinbare Verdaulichkeit, Futteraufnahme | - (+) |

¹ positiver Effekt bei Synchronisierung schnell abbaubarer N- und Energiequellen größer als bei langsam abbaubaren

² unterschiedliche Abbaubarkeit nur durch mechanische (unterschiedlicher Zerkleinerungsgrad)/chemische Behandlung

+ positiver Effekt; - kein Effekt

2.2 Reineiweiß

Als Reineiweiß wird in Deutschland eine chemisch vermutlich sehr heterogene Gruppe von Substanzen definiert, die entweder mit Kupfersulfat- oder Tanninlösung fällbar ist (Methoden nach BARNSTEIN 1900 bzw. MOTHESS 1926; s. Kap. 5.2.2.1). Im amerikanischen Raum wird im Rahmen des Cornell Net Carbohydrate and Protein Systems (CNCPS), welches das Verhalten einzelner N-Fractionen gegenüber chemischen Agentien nutzt (SNIFFEN et al. 1992; CHALUPA u. SNIFFEN 1996; LICITRA et al. 1996), Trichloressigsäure (TCA) als Fällungsmittel eingesetzt, um die Reineiweißfraktion (RE-Fraktion) quantitativ zu erfassen. Im Rp enthaltende N-Verbindungen werden in diesem System wie folgt unterschieden:

Die **A-Fraktion** beinhaltet niedermolekulare nicht-Protein-N-Verbindungen (NPN-Verbindungen) wie Harnstoff (SÜDEKUM et al. 2005), AS, Peptide (CHALUPA u. SNIFFEN 1996; SÜDEKUM et al. 2005), Ammoniak und Nitrat (CHALUPA u. SNIFFEN 1996) sowie Nukleinsäuren, Amide und Amine (NOLAN 1993). Diese können mit proteinspezifischen Reagenzien nicht gefällt, aber rechnerisch nach Fällung der B- und C-Fractionen (s.u.) erfasst werden (LICITRA et al. 1996). KRISHNAMOORTHY et al. (1982) und MARAIS und EVENWELL (1983) nutzten als Fällungsreagenz TCA, welche Peptide erst ab ca. zehn AS Länge fällt (VAN SOEST 1994; keine Angabe des Molekulargewichts), Peptide bis neun Aminosäuren daher in der A-Fraktion verbleiben. Da Peptide wegen ihrer metabolischen Eigenschaften eher den löslichen Proteinen zuzuordnen sind, schlagen LICITRA et al. (1996) die Fällung mit Wolframsäure vor, da diese bereits Peptide aus zwei bis drei AS präzipitiert (VAN SOEST 1994). Tatsächlich aber konnten GREENBERG und SHIPE (1979) bei TCA- bzw. Wolframsäurefällung keine unterschiedlich langen Peptide im Überstand nach erfolgter Präzipitation nachweisen. Verbindungen der A-Fraktion sind im Pansen schnell (CHALUPA u. SNIFFEN 1996; SÜDEKUM et al. 2005) und vollständig abbaubar (CHALUPA u. SNIFFEN 1996).

Als **B-Fraktion** wird das mit Wolframsäure (VAN SOEST 1994) bzw. TCA (KRISHNAMOORTHY 1982; VAN SOEST 1994) fällbare RE bezeichnet (s.o.). Die B-Fraktion ist, jeweils basierend auf ihrer Löslichkeit, weiterhin unterteilbar in die Fraktionen B₁, B₂ und B₃ (CHALUPA u. SNIFFEN 1996; LICITRA et al. 1996).

Die **B₁-Fraktion** umfasst das in Borat-Phosphat-Puffer lösliche RE bei einem physiologischen ruminalen pH-Wert (KRISHNAMOORTHY et al. 1982; CHALUPA u. SNIFFEN 1996; LICITRA et al. 1996). Proteine der B₁-Fraktion sind im Pansen ebenfalls schnell abbaubar (VAN SOEST 1994; SÜDEKUM et al. 2005) und nur kleine Anteile erreichen unverändert das Duodenum (CHALUPA u. SNIFFEN 1996). Nicht beachtet wird jedoch, dass bereits relativ geringe pH-Wertänderungen die Löslichkeit der N-Verbindungen stark beeinflussen können, was möglicherweise zu Genauigkeitseinbußen bei der Bestimmung der Proteinverfügbarkeit führt (DE JONGE et al. 2009).

In der **B₂-Fraktion** finden sich Proteine, die in neutralen Detergenzien (in der Literatur nicht näher bezeichnet) löslich sind. Ihre Abbaubarkeit durch Enzyme ist variabel (VAN SOEST 1994). Nach SÜDEKUM et al. (2005) ist die B₂-Fraktion zumindest potenziell vollständig ruminal abbaubar.

Die **B₃-Fraktion** enthält Proteine, die nur noch in sauren Detergenzien (in der Literatur nicht näher bezeichnet) löslich sind. Der enzymatische Abbau ist variabel bzw. nur noch langsam möglich (VAN SOEST 1994). Im Pansen sind diese zellwandgebundenen und hitzedenaturierten (keine Maillardprodukte; CHALUPA u. SNIFFEN 1996) Proteine auch nach

SÜDEKUM et al. (2005) nur langsam und nicht unbedingt vollständig abbaubar. In sauren Detergenzien unlöslicher N bildet die **C-Fraktion**, die durch Hitzeeinwirkung zerstörte Proteine (Maillardprodukte, durch Erhitzen oder Trocknen), sowie an Lignin (VAN SOEST 1994; CHALUPA u. SNIFFEN 1996) und Tannin gebundenen N beinhaltet (SÜDEKUM et al. 2005). N-Verbindungen der C-Fraktion werden als unverdaulich angesehen (VAN SOEST 1994; LICITRA et al. 1996) und sind weder im Pansen noch im Dünndarm abbaubar (CHALUPA u. SNIFFEN 1996; SÜDEKUM et al. 2005), was teilweise im Widerspruch zu PEREZ-MALDONADO und NORTON (1996) steht, die zumindest bei KT-Proteinkomplexen keine Einschränkung der duodenalen Verdauung beobachteten. Der Anteil der C-Fraktion am Gesamt-N-Gehalt liegt in weiß- und rotkleehaltigen Silagen mit 4,1 bis 5,9 % ungefähr doppelt so hoch wie in Grassilagen aus Welschem Weidelgras (2,8 %; SÜDEKUM et al. 2005).

2.2.1 Reineiweißgehalte in Grassilagen

Im Gegensatz zum Milchleistungsfutter fehlen meistens detaillierte Angaben zu den enthaltenen Nährstoffen in Grassilagen und nach COENEN (2004) erweist sich die Bewertung des Futterproteins in Grassilagen als besonders schwierig. Probleme bestehen in der Heterogenität des Siliergutes und darin, dass die Silage zwar über Monate eingesetzt wird, aber oft nur zu Fütterungsbeginn eine Nährstoffanalyse erfolgt, obwohl der RE-Anteil am Rp mit fortschreitender Lagerungsdauer sogar auf ein Drittel des ursprünglichen Wertes absinken kann (von 57,9 auf 16,8 %; EICKEN 2005 a).

Wird der prozentuale RE-Anteil am Rp als Bewertungsmaßstab in der Grassilagebeurteilung zu Grunde gelegt [RE-Analytik nach BARNSTEIN (1900), entsprechend den VDLUFA-Richtlinien, Methode 4.4.1; 2004], kommt EICKEN (2005 a) zu folgendem Ergebnis (s. Tab. 2.23):

Tab. 2.23: *Prozentualer RE-Anteil am Rp als Bewertungsmaßstab für die Grassilagequalität nach EICKEN (2005 a)*

| % RE am Rp | Grassilagequalität |
|-------------------|---------------------------|
| > 70 | Sehr gut |
| 60 bis 70 | Gut |
| 50 bis 60 | Mittel |
| < 50 | Beeinträchtigt |
| < 40 | Schlecht, bedenklich |

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Versuchsziel

Ziel der Untersuchungen war, die Auswirkungen von Grassilagen, die einen RE-Anteil am Rp unter 50 % aufwiesen und bzw. oder im Verdacht stehen, in Milchviehbeständen zur Entstehung des in Kapitel 1 beschriebenen Krankheitsbildes beigetragen zu haben, auf den ruminalen Proteinstoffwechsel im Pansensaft *in-vitro* mit Hilfe des Langzeitsimulationssystems RUSITEC zu erfassen. Von besonderem Interesse war die Frage, ob es zu erhöhtem Abbau von N-Verbindungen kommt und ob sich die Gabe der auffälligen Grassilagen auf die Gehalte bakteriellen Proteins im ruminalen Kompartiment 1 (Pansensaft) auswirkt. Des Weiteren wurden die Konzentrationen freier Aminosäuren erfasst. Um in Zukunft neben Ammoniak, den Gehalten bakteriellen Proteins und den freien Aminosäuren auch die N-haltige Peptidfraktion im Pansensaft quantitativ und qualitativ erfassen zu können, wurde mittels LC-MS-/MS-Analysen getestet, ob ein schnelles Screening von Pansensaftproben nach Peptiden möglich ist.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Das Langzeitinkubationssystem RUSITEC

3.2.1.1 Aufbau und Funktionsweise des RUSITEC-Systems

Zur Durchführung der *in-vitro*-Versuche wurde das von CZERKAWSKI und BRECKENBRIDGE (1977) entwickelte RUSITEC-System (Rumen Simulation TECHnique) genutzt. Das RUSITEC-System ist ein geschlossenes, semikontinuierliches Durchflusssystem (s. SCHIRMER 1990) mit sechs vollständig voneinander getrennten Fermentationseinheiten, das eine Versuchsdauer von mehreren Wochen erlaubt (CZERKAWSKI u. BRECKENBRIDGE 1977). Der apparative Aufbau des Systems kann den Dissertationen von BRÖCKER (1996) und MAURUSCHAT (1996) sowie den Abbildungen 3.1 und 3.2 entnommen werden. Abweichend von BRÖCKER (1996) und MAURUSCHAT (1996) war das Wasserbad auf 39 °C temperiert und die Öffnungen in den Fermenterdeckeln wurden nur zur Entnahme der Proben für die Peptidbestimmungen (Dreiwegehahn) genutzt. Die übrigen Proben wurden erst nach dem Öffnen der Fermenter entnommen. Die Pufferdurchflussrate betrug 280 µL/min (403 mL/24 Stunden), so dass jeder Fermentereinheit täglich 391 mL Puffer zugeführt wurden (Unterbrechung der Pufferzufuhr während des 45-minütigen Beladungsvorgangs).

3.2.1.2 Inbetriebnahme des RUSITEC-Systems

Vorbereitungen vor Inbetriebnahme des Systems (Zusammenbau, Überprüfung der Pufferzufuhr) sind nachzulesen bei MAURUSCHAT (1996). Abweichend von den dortigen Beschreibungen wurden keine pH-Elektroden in die Schraubdeckel eingebaut. Jeder Fermenter wurde mit 500 mL durch eine Doppellage Gaze geseihtem Pansensaft (zur

Entnahme s. Kap. 3.2.2.2), 200 mL vorgewärmtem Puffer (s. Tab. 3.2) und 100 mL ionenfreiem Wasser (Seradest®) sowie einem Nylonbeutel (17x8 cm, Maschenweite 1 mm; Eigenherstellung aus Nylon, Fa. LAT®, Garbsen, Deutschland) mit 80 g festem Panseninhalt beschickt. Außerdem wurde ein weiterer Nylonbeutel mit 12,0 g Heu und 3,4 g Kraftfutter in jeden Fermenterinnenbehälter verbracht.

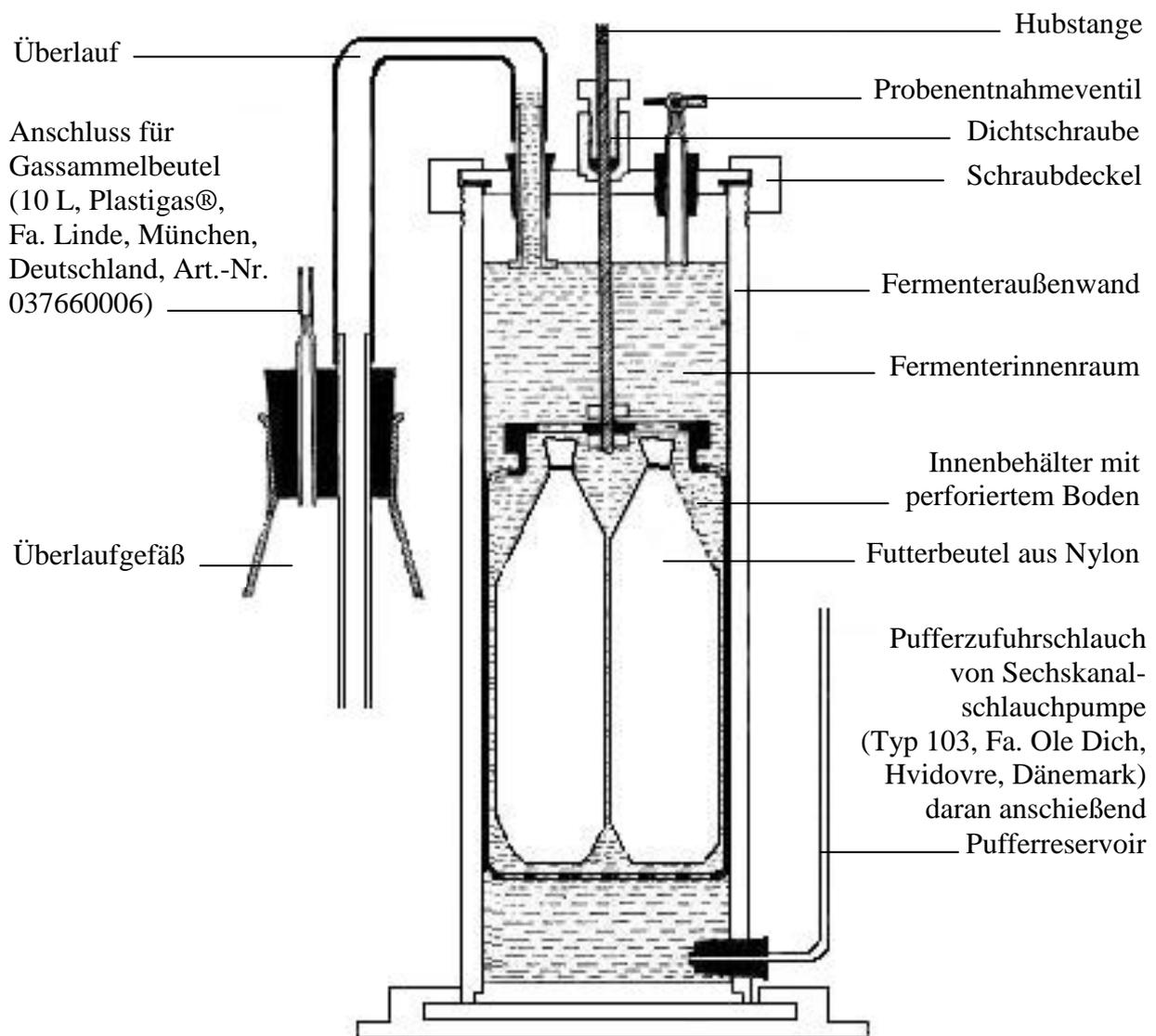


Abb. 3.1 Schematischer Aufbau einer Funktionseinheit des RUSITEC-Systems (CZERKAWSKI u. BRECKENRIDGE 1977). Nicht abgebildet sind das Pufferreservoir, der Gassammelbeutel zum Auffangen der Fermentationsgase und der Motor zum Heben und Senken der Hubstange.

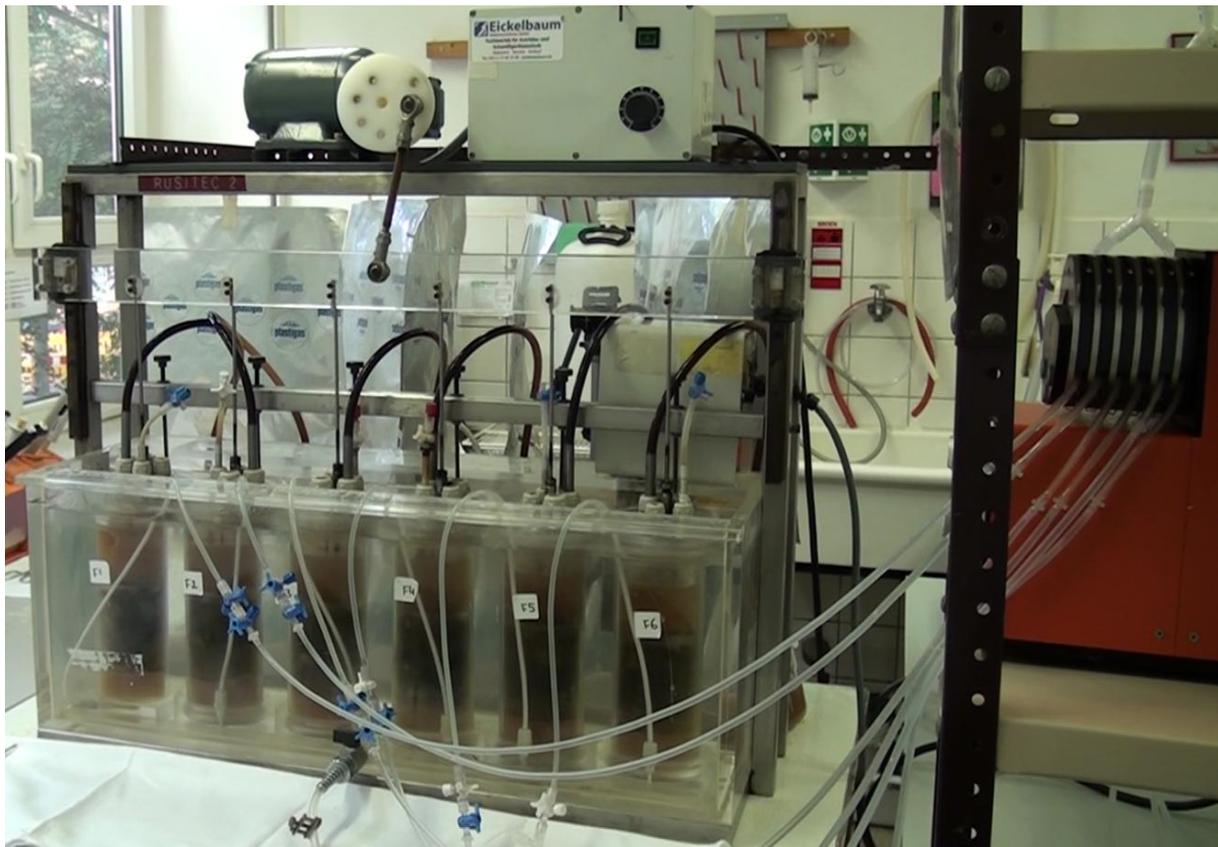


Abb. 3.2: RUSITEC-System im Pansenlabor der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Am rechten Bildrand sind die Sechskanal-schlauchpumpe (Typ 103, Fa. Ole Dich, Hvidovre, Dänemark) und am oberen Bildrand der Hubmotor zu sehen (Foto: L. Lumpp).

3.2.1.3 Dauerbetrieb des RUSITEC-Systems

Die täglichen Arbeiten am RUSITEC und die Probegewinnung und -aufbereitung im Rahmen dieser Arbeit sind Tabelle 3.1 zu entnehmen. Davon abweichend wurde an Tag 1 der Nylonbeutel mit festem Panseninhalt bereits nach 24 Stunden durch einen Beutel mit Heu und Kraftfutter ersetzt.

Überstands- und Gasvolumina, Gaszusammensetzungen, Konzentrationen und Produktionen von flüchtigen Fettsäuren und Nukleobasengehalte der flüssigkeitsassoziierten Bakterien wurden im Verlauf der Dissertation LUMPP²² bzw. bei GAST (2010) bestimmt (s. auch Übersicht in Tab. 9.1).

²² laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lumpp, Hannover am 01.04.2008

Tab. 3.1 Tägliche Arbeitsabläufe am RUSITEC

| Minute | Arbeitsschritt |
|----------|--|
| -40 | Vorbereitung: <ul style="list-style-type: none"> • Filtration der BRADFORD-Gebrauchslösung (s. Kap. 3.2.5.2) • Eichung der Ammoniakmesselektrode (s. Kap. 3.2.5.1) |
| -5 | Über Dreiwegehähne Entnahme von 5 mL Fermenterflüssigkeit aus jedem Fermenter und sofortige Kühlung auf -80 °C (spätere Peptidbestimmung ²³) |
| 0 | Beladungsvorgang: <ul style="list-style-type: none"> • Abschalten des Hubmotors, Unterbrechung der Pufferzufuhr, Abkopplung der Gassammelbeutel und Unterbrechung der Verbindung der Fermenter zu den Überlaufgefäßen • Entnahme des ersten Fermenters aus dem Wasserbad, Öffnen des Fermenters • Entnahme von 21 mL flüssigem Fermenterinhalt [zur Bestimmung des Proteingehalts und Messung der Konzentrationen von Ammoniak und freien AS (fAS)] • In 10 mL sofortige Ammoniakkonzentrationsbestimmung • Entnahme und Öffnen des Fermenterinnenbehälters und Austausch des seit 48 Stunden im Fermenter befindlichen Futterbeutels gegen einen neuen Futterbeutel • Spülen des entfernten Futterbeutels mit 50 mL vorgewärmtem Puffer, Ausdrücken der Restflüssigkeit und Rückführung der Rest- und Spülflüssigkeit in den Fermenter • Verbringen des Innenbehälters mit den Futterbeuteln in den Fermenter, Verschluss und Zurücksetzen des Fermenters ins Wasserbad • Verbinden des Fermenters mit dem Überlaufgefäß • Wiederholung mit den Fermentern 2 bis 6 • Verbinden der Fermenter mit dem Pufferreservoir • Fixieren der Hubstangen und Starten des Hubmotors |
| +45 | Begasung der Fermenter mit CO ₂ (Fa. Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland) für eine Minute über Dreiwegehähne, Dichtigkeitsprüfung der sechs einzelnen Fermentationseinheiten |
| +60 | Ende Beladungsvorgang: <ul style="list-style-type: none"> • Anschluss der Gassammelbeutel an die Überlaufgefäße |
| Bis +180 | Probenaufbereitung: <ul style="list-style-type: none"> • Zur Protein- und fAS-Bestimmung (s. Kap. 3.2.5.2 und 3.2.5.3) • Messung des Proteingehalts (s. Kap. 3.2.5.2), Konservierung der aufbereiteten fAS- und Peptidproben²³ bei -18 °C bis zur Messung |

3.2.1.4 Zusammensetzung des verwendeten Puffers

Zur Spülung der Futterbeutel und zur Simulation des Speichelflusses während der Versuche wurde Puffer nach McDOUGALL (1948) verwendet. Die Zusammensetzung ist Tabelle 3.2 zu entnehmen.

²³ Die Peptidgehalte in der RUSITEC-Fermenterflüssigkeit wurden durch WICHERN (noch unveröffentlicht) bestimmt (laut persönlicher Mitteilung von Frau A. Wichern, Hannover am 23.06.2009).

Tab. 3.2 Pufferzusammensetzung und -herstellung nach McDOUGALL (1948)

| Lösung | Zusammensetzung |
|--------|--|
| A | 49,0 g NaHCO ₃ (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 106329) 46,5 g Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 106579) Ad 4950 mL ionenfreies Wasser (Seradest®) |
| B | 47,0 g NaCl (Fa. Grüssing, Filsum, Deutschland, Art.-Nr. 12122) 57,0 g KCl (Fa. Grüssing, Filsum, Deutschland, Art.-Nr. 12008) 5,3 g CaCl ₂ *2 H ₂ O (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1023820) 12,8 g MgCl ₂ *6 H ₂ O (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 105833) Ad 1000 mL ionenfreies Wasser (Seradest®) |

Lösung B wird mit einer Tropfpipette unter ständigem Rühren zu Lösung A gegeben.

3.2.2 Spendertier

3.2.2.1 Haltung und Fütterung des Spendertiers

Die als Inokulum verwendeten Substrate Pansensaft und fester Panseninhalt stammten von einem weiblichen Deutsch-Schwarzbunten Rind mit permanenter Pansenfistel. Das Tier war zu Versuchsbeginn fünf Jahre alt (geboren 2003) und wog 650 kg. Es wurde in einer Box mit Stroheinstreu gehalten und am Tag der Entnahme der Inokulate drei Stunden vor der Substratentnahme mit 3 kg Heu und 800 g Kraftfutter gefüttert (zu Herkunft und Beschaffenheit der Futtermittel s. Kap. 3.2.3.1 und 3.2.3.2).

3.2.2.2 Pansensaftentnahme und -entnahmeort

Die Pansensaftentnahmetechnik kann HÖLTERSINKEN (1990) entnommen werden. Bis zum Einsatz im RUSITEC verblieben Pansensaft und fester Panseninhalt in Thermogefäßen.

3.2.3 Futterkomponenten

3.2.3.1 Herkunft und Beschaffenheit des Heus

Das Heu wurde bei Raumtemperatur gelagert und vor der Verwendung im RUSITEC auf eine Halmlänge von 2 cm zerkleinert. Die Ergebnisse der Futtermittelanalyse sind Tabelle 3.3 zu entnehmen.

3.2.3.2 Herkunft und Beschaffenheit des Kraftfutters

Tabelle 3.4 zeigt die Ergebnisse der Futtermittelanalyse des Kraftfutters.

Tab. 3.3: Nährstoffgehalte des eingesetzten Heus (Analyseergebnisse des Instituts für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

| Bezeichnung | Dimension | Gehalt |
|-------------|-----------|--------|
| Rohasche | g/kg TS | 48,9 |
| Rohprotein | g/kg TS | 113 |
| Reineiweiß | g/kg TS | 99,2 |
| Reineiweiß | % von Rp | 87,5 |
| Rohfaser | g/kg TS | 309 |
| TS | g/kg uS | 877 |

TS Trockensubstanz; uS ursprüngliche Substanz (Frischsubstanz)

Tab. 3.4: Nährstoffgehalte (Herstellerangaben) des eingesetzten Kraftfutters [Milchleistungsfutter II (Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe Dairystar 18/III G Pellets), BELA-Mühle GmbH, Vechta, Deutschland]

| Bezeichnung | Dimension | Gehalt |
|--|-----------|--------|
| Rohasche | % | 6,0 |
| Rohprotein | % | 18,0 |
| Rohfett | % | 3,5 |
| Rohfaser | % | 9,5 |
| Kalzium | % | 0,8 |
| Phosphor | % | 0,5 |
| Natrium | % | 0,25 |
| NEL | MJ/kg | 6,7 |
| Vitamin A | I.E. | 10000 |
| Vitamin D ₃ | I.E. | 1000 |
| Vitamin E | mg | 0,15 |
| Na-Selenit | mg | 0,4 |
| Cu(II)SO ₄ *5H ₂ O | mg | 25 |

NEL Nettoenergie-Laktation

3.2.3.3 Herkunft und Beschaffenheit der eingesetzten Grassilagen

Alle eingesetzten Grassilagen stammten aus norddeutschen Milchviehbetrieben und wurden vom Erwerb bis zur Verwendung im RUSITEC bei -18 °C gelagert. Verfütterung der Kontrollgrassilagen (K01, K14, K15, K16, K18, K20, K23) in den jeweiligen Herkunftsbetrieben hatte keine Krankheitsfälle (s. Kap. 1) hervorgerufen. Sie wiesen prozentuale RE-Anteile am Rp von mindestens 50 % auf (Ausnahme K14 mit 49,9 % RE vom Rp) und entsprachen diesbezüglich Grassilagen von mittlerer (50 bis 60 % RE vom Rp) bis guter (60 bis 70 % RE vom Rp) Qualität (EICKEN 2005 a; s. Kap. 2.2.1). Die Schadgrassilagen (S02, S04, S05, S07, S08, S09, S10, S11, S12, S13) enthielten dementsprechend niedrigere RE-Anteile am Rp (Ausnahmen S08 und S12 mit 59,7 bzw. 58,5 % RE vom Rp) und ihre Verfütterung hatte in den Milchviehhaltungen vermutlich zu Erkrankungen (s. Kap. 1) geführt.

Die Tabellen 3.5 und 3.6 zeigen die Nährstoffzusammensetzungen der Grassilagen, AS-Gesamt- und freie AS-Gehalte sind den Tabellen 9.2, 9.3, 9.4 und 9.5 zu entnehmen.

Tab. 3.5: Nährstoffgehalte und pH-Werte der verwendeten Kontrollgrassilagen (Analyseergebnisse des Instituts für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

| Bezeichnung | Dimension | Kontrollgrassilage | | | | | | |
|------------------|------------------------|--------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | K01 | K14 | K15 | K16 | K18 | K20 | K23 |
| TS | g/kg uS | 472 | 579 | 615 | 439 | 569 | 693 | 412 |
| Rohasche | g/kg TS | 109 | 89,1 | 97,6 | 107 | 106 | k.A. | k.A. |
| Rohprotein | g/kg TS | 165 | 164 | 203 | 198 | 164 | 150 | 155 |
| Reineiweiß | g/kg TS | 83,3 | 81,7 | 116 | 102 | 90,9 | 101 | 84,0 |
| Reineiweiß | % von Rp | 50,5 | 49,8 | 57,1 | 51,5 | 55,4 | 67,3 | 54,2 |
| Rohfett | g/kg TS | 34,1 | 32,8 | 35,3 | 42,1 | 20,1 | k.A. | k.A. |
| Rohfaser | g/kg TS | 250 | 275 | 246 | 262 | 150 | k.A. | k.A. |
| NfE ¹ | g/kg TS | 442 | 440 | 418 | 390 | 245 | k.A. | k.A. |
| NDF | g/kg TS | 494 | 563 | 527 | 554 | 303 | k.A. | k.A. |
| ADF | g/kg TS | 305 | 321 | 286 | 310 | 177 | k.A. | k.A. |
| NEL ¹ | MJ/kg TS | 6,22 | 6,18 | 6,42 | 6,23 | 6,14 | - | - |
| pH-Wert | -log [H ⁺] | 4,83 | 5,30 | 5,17 | 4,83 | 5,47 | 5,83 | 4,00 |

ADF saure Detergens-Faser; k.A. keine Angabe; NDF neutrale Detergens-Faser;

NfE N-freie Extraktstoffe

¹ Rechenwert; - Berechnung nicht möglich

Tab. 3.6: Nährstoffgehalte und pH-Werte der verwendeten Schadgrassilagen (Analyseergebnisse des Instituts für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

| Bezeichnung | Dimension | Schadgrassilage | | | | | | | | | |
|------------------|------------------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| TS | g/kg uS | 321 | 446 | 365 | 410 | 304 | 413 | 451 | 329 | 445 | 509 |
| Rohasche | g/kg TS | 110 | 85,0 | 126 | 103 | 105 | 119 | 85,4 | 98,2 | 96,4 | 99,6 |
| Rohprotein | g/kg TS | 174 | 180 | 231 | 178 | 221 | 156 | 180 | 188 | 207 | 277 |
| Reineiweiß | g/kg TS | 71,0 | 78,9 | 97,0 | 75,9 | 132 | 61,0 | 60,1 | 74,8 | 70,6 | 162 |
| Reineiweiß | % von Rp | 40,8 | 43,8 | 42,0 | 42,6 | 59,7 | 39,1 | 33,4 | 39,8 | 34,1 | 58,5 |
| Rohfett | g/kg TS | 34,3 | 41,0 | 41,7 | 31,5 | 45,1 | 29,1 | 32,6 | 37,7 | 39,1 | 37,9 |
| Rohfaser | g/kg TS | 280 | 278 | 205 | 273 | 227 | 327 | 290 | 258 | 254 | 218 |
| NfE ¹ | g/kg TS | 402 | 417 | 397 | 415 | 401 | 368 | 410 | 419 | 404 | 367 |
| NDF | g/kg TS | 520 | 496 | 433 | 520 | 395 | 610 | 543 | 523 | 481 | 491 |
| ADF | g/kg TS | 318 | 296 | 262 | 310 | 247 | 385 | 333 | 325 | 292 | 273 |
| NEL ¹ | MJ/kg TS | 6,02 | 6,23 | 6,58 | 6,13 | 6,55 | 5,58 | 6,14 | 6,30 | 6,38 | 6,78 |
| pH | -log [H ⁺] | 4,37 | 4,57 | k.A. | 4,90 | 3,98 | 5,35 | 5,25 | 4,16 | 4,53 | 4,94 |

Legende s. Tabelle 3.5

3.2.4 Versuchsdurchführung

Es wurden die Auswirkungen auf den ruminalen Proteinstoffwechsel von sieben Kontroll- und zehn Schadgrassilagen in insgesamt 17 Versuchsläufen von jeweils 28 Tagen Dauer untersucht (Ausnahmen Läufe 16 bis 18 mit jeweils 19 Tagen Dauer). Während der **Einlauf-** und **Kontrollphasen** (Tage 1 bis 6 bzw. 7 und 8) wurden täglich 12,0 g Heu und 3,4 g Kraftfutter in einem Nylonbeutel je Fermenter zugelegt. Das Verhältnis von Heu zu Kraftfutter entsprach dem, mit dem auch das Spendertier gefüttert wurde (s. Kap. 3.2.2.1). Die täglich eingesetzte Menge an TS (ca. 13,5 g²⁴) stimmte mit den Empfehlungen von CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE (1977) überein, die bei Einwaagen zwischen 12 und 18 g TS/Tag und RUSITEC-Fermenter höchste Methan-, flüchtige Fettsäuren- und mikrobielle RE-Produktionen bezogen auf TS dokumentierten.

An den Tagen 9 bis 18 (**Versuchsphase**) erfolgten die Grassilagezulagen. Es wurden jeweils 10,5 g TS je Futterbeutel eingewogen und wie in der Kontrollphase 3,4 g Kraftfutter hinzugefügt. K01 wurden in allen Läufen bis auf die Läufe 14 und 15 als Standardkontrollsilage in den Fermentern 1 und 2 (Kontrollfermenter KF_{1,2}) eingesetzt. In jeweils zwei der vier verbliebenen Fermenter wurde eine der Schadgrassilagen zugelegt (Versuchsfermenter VF_{3,4} bzw. VF_{5,6}). In den Läufen 14 und 15 wurden die übrigen Kontrollgrassilagen getestet. Der Einsatz der einzelnen Grassilagen in den Versuchsläufen ist Tabelle 3.7 zu entnehmen. In der anschließenden **Auslaufphase** (Tage 19 bis 28) entsprachen die Futterzulagen denen in Einlauf- und Kontrollphasen.

Durch den Probenentnahmezeitpunkt unmittelbar vor dem Futterbeutelwechsel konnte ein Zulageeffekt erst am nächsten Versuchstag gemessen werden. Dies hatte zur Folge, dass zwar an Tag 9 Grassilage in das RUSITEC-System eingebracht wurde, ein möglicher Effekt aber frühestens an Tag 10 zu erwarten war. Analog wurde an Tag 19 bereits ein Grassilagebeutel durch Heu ersetzt, eine eventuell beginnende Rückkehr zum Einlauf-/Kontrollstatus konnte aber frühestens an Tag 20 gemessen werden. Da jeder Futterbeutel 48 Stunden im RUSITEC-System verblieb, wurde erst an den Tagen 11 und 21 der volle Effekt durch den Futterwechsel sichtbar. Tabelle 3.8 stellt graphisch dar, wann sich welche Futterbeutel im RUSITEC-System befanden und ab wann ein Effekt durch die Futterwechsel messbar war.

Ab Tag 7 (Beginn der Kontrollphase) wurde bei den Messungen davon ausgegangen, dass das System sich mechanisch und biologisch eingelaufen hatte, und ein Gleichgewichtszustand erreicht worden war („steady state“, Überprüfung anhand der Parameter Gaszusammensetzung und -volumen, Überstandsvolumen, pH-Wert und Ammoniakkonzentration).

Die Messung der Parameter bakterielles Protein, fAS (freie AS) und biogene Amine sowie Ammoniak folgte entsprechend dem Schema im unteren Teil der Tabelle 3.8. Der Tabelle 9.1 im Anhang ist die Probenentnahme im Rahmen des gesamten Projekts zu entnehmen.

²⁴ TS-Gehalt des Kraftfutters nicht angegeben, daher mit 88 % angenommen (nach KAMPHUES et al. 2009)

Tab. 3.7: Einsatz der Grassilagen im RUSITEC während der Versuchsphasen (Tage 9 bis 18) der einzelnen Läufe. Wie in den Einlauf-, Kontroll- und Auslaufphasen wurden neben den Grassilagen täglich 3,4 g Kraftfutter zugelegt. Im rechten Teil der Tabelle sind die täglichen Einwaagen an TS, NEL, Rp, RE, AS, fAS und Ammoniak für die jeweilige Grassilage und an TS, NEL und Rp für die Kombination aus der jeweiligen Grassilage und dem Kraftfutter aufgeführt.

| Läufe | Fermenter | Täglich eingewogene Futtermittel | Nährstoffgehalte der täglichen Einwaagen | | | | | | |
|-------------------------|-------------------|----------------------------------|--|----------|--------|--------|--------|---------|---------------------|
| | | | TS [g] | NEL [kJ] | Rp [g] | RE [g] | AS [g] | fAS [g] | NH ₃ [g] |
| 2 bis 13 und 16, 17, 18 | KF _{1,2} | K01 | 10,5 | 65,3 | 1,73 | 0,87 | 0,99 | 0,34 | 0,04 |
| | | Kraftfutter ¹ + K01 | 13,5 | 88,1 | 2,34 | - | - | - | - |
| 2, 3, 4 | VF _{3,4} | S02 | 10,5 | 63,2 | 1,83 | 0,75 | 0,85 | 0,38 | - |
| | | Kraftfutter ¹ + S02 | 13,5 | 86,0 | 2,44 | - | - | - | - |
| 2, 3, 4 | VF _{5,6} | S04 | 10,5 | 65,4 | 1,89 | 0,83 | 1,08 | 0,40 | 0,04 |
| | | Kraftfutter ¹ + S04 | 13,5 | 88,2 | 2,50 | - | - | - | - |
| 5, 6, 7 | VF _{3,4} | S05 | 10,5 | 69,1 | 2,43 | 1,02 | 1,18 | 0,52 | - |
| | | Kraftfutter ¹ + S05 | 13,5 | 91,9 | 3,04 | - | - | - | - |
| 5, 6, 7 | VF _{5,6} | S07 | 10,5 | 64,4 | 1,87 | 0,80 | 0,89 | 0,35 | 0,05 |
| | | Kraftfutter + S07 | 13,5 | 87,1 | 2,48 | - | - | - | - |
| 8, 9, 10 | VF _{3,4} | S08 | 10,5 | 68,8 | 2,32 | 1,39 | 1,39 | 0,52 | 0,06 |
| | | Kraftfutter ¹ + S08 | 13,5 | 91,6 | 2,93 | - | - | - | - |
| 8, 9, 10 | VF _{5,6} | S09 | 10,5 | 58,6 | 1,64 | 0,64 | 0,58 | 0,18 | 0,09 |
| | | Kraftfutter ¹ + S09 | 13,5 | 81,4 | 2,25 | - | - | - | - |
| 11, 12, 13 | VF _{3,4} | S10 | 10,5 | 64,5 | 1,89 | 0,63 | 0,96 | 0,44 | 0,06 |
| | | Kraftfutter ¹ + S10 | 13,5 | 87,3 | 2,50 | - | - | - | - |
| 11, 12, 13 | VF _{5,6} | S11 | 10,5 | 66,2 | 1,97 | 0,79 | 1,09 | 0,41 | 0,01 |
| | | Kraftfutter ¹ + S11 | 13,5 | 88,9 | 2,59 | - | - | - | - |
| 14 | KF _{1,2} | K16 | 10,5 | 65,4 | 2,08 | 1,07 | 1,32 | 0,36 | 0,05 |
| | | Kraftfutter ¹ + K16 | 13,5 | 88,2 | 2,69 | - | - | - | - |
| 14 | KF _{3,4} | K15 | 10,5 | 67,4 | 2,13 | 1,22 | 1,24 | 0,29 | 0,04 |
| | | Kraftfutter ¹ + K15 | 13,5 | 90,2 | 2,74 | - | - | - | - |
| 14 | KF _{5,6} | K14 | 10,5 | 64,9 | 1,72 | 0,86 | 0,98 | 0,26 | 0,04 |
| | | Kraftfutter ¹ + K14 | 13,5 | 87,7 | 2,33 | - | - | - | - |
| 15 | KF _{1,2} | K18 | 10,5 | 64,5 | 1,72 | 0,95 | 1,01 | 0,27 | 0,03 |
| | | Kraftfutter ¹ + K18 | 13,5 | 87,3 | 2,33 | - | - | - | - |
| 15 | KF _{3,4} | K20 | 10,5 | - | 1,58 | 1,06 | 1,02 | 0,17 | 0,03 |
| | | Kraftfutter ¹ + K20 | 13,5 | - | 2,19 | - | - | - | - |
| 15 | KF _{5,6} | K23 | 10,5 | - | 1,63 | 0,88 | 1,01 | 0,30 | 0,03 |
| | | Kraftfutter ¹ + K23 | 13,5 | - | 2,24 | - | - | - | - |
| 16, 17, 18 | VF _{3,4} | S13 | 10,5 | 67,0 | 2,17 | 0,74 | 1,23 | 0,47 | 0,06 |
| | | Kraftfutter ¹ + S13 | 13,5 | 89,8 | 2,79 | - | - | - | - |
| 16, 17, 18 | VF _{5,6} | S12 | 10,5 | 71,2 | 2,91 | 1,70 | 1,63 | 0,37 | 0,07 |
| | | Kraftfutter ¹ + S12 | 13,5 | 94,0 | 3,52 | - | - | - | - |

¹ Täglich wurden neben der jeweiligen Grassilage durch 3,4 g Kraftfutter weitere 2,99 g TS (siehe auch Fußnote ²⁴ auf Seite 78), 22,8 kJ NEL und 0,61 g Rp in jeden Fermenter eingebracht

AS Aminosäuren; fAS freie AS; K Kontrollgrassilage; KF Kontrollfermenter; RE Reineiweiß; Rp Rohprotein; S Schadgrassilage; TS Trockensubstanz; VF Versuchsfermenter; - Berechnung nicht möglich (für das Kraftfutter keine Angaben zu RE-, (f)AS- und NH₃-Gehalten vorliegend, NEL-Berechnung für K20 und K23 nicht möglich)

Tab. 3.8: *Im RUSITEC-System befindliche Futterbeutel während der Versuchsphasen nach der täglichen Beladung und Zeitpunkt des möglichen Sichtbarwerdens eines Zulageeffekts (Zusammensetzung des Messergebnisses). Die Pfeile an den Versuchstagen 1 und 2 deuten exemplarisch an, dass an einem Versuchstag jeweils der Effekt der Zulagen gemessen wird, die sich vom Vortag bis zur neuen Beladung im RUSITEC befanden. Der untere Tabellenabschnitt zeigt den Probenentnahmeplan für folgende Parameter: Gehalt bakteriellen Proteins, fAS-, Ammoniak- und biogene Aminekonzentrationen.*

| | | Versuchsabschnitt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---------------|---------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--------------|----|----|----|----|----|---------|----|----|---|---|---|---|---|---|
| Futterbeutel im RUSITEC nach der täglichen Beladung | Beutel | B | Einlaufphase | | | | | | | | Kontrollphase | Versuchsphase | | | | | | | | | | Auslaufphase | | | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | GS | GS | GS | GS | GS | GS | GS | H | H | H | H | H | H | H | H |
| 2 | PI _f | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | GS | GS | GS | GS | GS | GS | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| Versuchstag | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | | | | | | |
| Messergebnis | | | P H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | GS | GS | GS | GS | GS | GS | H GS | H | H | H | H | H | H | H | H |
| Parameter: | Probenentnahmeplan | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bakt. Protein | | | | x | | | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | |
| Aminosäuren | | | | | | | | x | x | | | x | x | x | | | x | x | x | x | x | x | x | | | | | | | | | | x | x | x | |
| Ammoniak | | | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| Biogene Amine | | | | | | | | x | x | | | x | x | x | | | x | x | x | x | x | x | x | | | | | | | | | | | x | x | x |

B Beladung des RUSITEC-Systems an Tag 0; Bakt. bakterielles; H Zulage von Heu und Kraftfutter; GS Zulage von Grassilage (Kontroll- oder Schadgrassilage) und Kraftfutter; PI_f fester Panseninhalt des Spendertieres

3.2.5 Analytik

Während der 28 Tage eines Versuchslaufs wurden die in Tabelle 3.8 aufgeführten Parameter bestimmt. Die Tabellen 3.9 und 3.10 fassen die Messverfahren, ihre Analysenpräzision in Serie (VK: Variationskoeffizient der Analysenpräzision in Serie) und diesbezügliche Autoren zusammen.

Tab. 3.9: *Messverfahren der Parameter Ammoniakkonzentration und Gehalt bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit (s. MÜLLER-ÖZKAN 2002)*

| Parameter | Messverfahren | Dimension | Literatur | VK [%] |
|------------------------------|---------------|-----------|--|--------|
| Ammoniakkonzentration | Elektrode | mmol/L | s. ZIPORI 1989 DEHARENG u. GODEAU 1988 | 2,36 |
| Gehalt bakteriellen Proteins | Photometrisch | µg RSA/mL | BRADFORD 1976 s. BRÖCKER 1996 s. KRAKOW 1992 | 4,98 |

Tab. 3.10: *Untersuchte AS und biogene Amine und ihre Analysenpräzision in beiden verwendeten HPLC-Gradienten (Gradienten 01 und 05)¹.*

| AS und biogene Amine | VK [%] Gradient 01 | VK [%] Gradient 05 |
|----------------------|--------------------|--------------------|
| Aspartat | 4,41 | 4,33 |
| Glutamat | 7,61 | 4,52 |
| Serin | 14,8 | 14,1 |
| Histidin | 5,68 | 5,62 |
| Glycin | 10,2 | 14,8 |
| Threonin | 6,22 | 8,82 |
| Alanin | 4,95 | 6,06 |
| Arginin | 2,76 | 6,91 |
| Tyrosin | 3,03 | 6,91 |
| Valin | 4,14 | 3,88 |
| Methionin | 2,94 | 6,27 |
| Tryptophan | 2,20 | 9,55 |
| Phenylalanin | 4,44 | 12,2 |
| Isoleucin | 6,26 | 13,0 |
| Leucin | 7,53 | 15,6 |
| Serotonin | 20,1 | Nicht messbar |
| Tyramin | 12,6 | Nicht messbar |

¹ Die Messung erfolgte flüssigkeitschromatographisch (HPLC), die Gehalte werden in der Einheit µmol/L angegeben. Referenzliteratur: HÖLTERSINKEN u. SCHOLZ (1990), BRÖCKER 1996

3.2.5.1 Bestimmung der Ammoniakkonzentration in der Fermenterflüssigkeit

Um Ammoniumionen in der Fermenterflüssigkeit in elektrisch neutrale Ammoniakmoleküle zu überführen, wurden 10 mL Fermenterflüssigkeit mit 100 µL 10M NaOH (hergestellt aus NaOH der Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1064679010) versetzt. Anschließend konnte die Ammoniakkonzentration mit einer Ammoniakmesselektrode und einem Ammoniak-Analyzer (Typ 9512 bzw. 290A, beide Geräte Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, vormals Orion[®]) gemessen werden.

Die Elektrode war täglich mit zwei Ammoniumchloridlösungen der Konzentrationen 10^{-3} (Lösung 1) bzw. 10^{-2} mol/L (Lösung 2) zu eichen (Zweipunkteichung). Lösung 2 wurde durch zehnfache Verdünnung einer Stammlösung hergestellt, Lösung 3 wiederum durch zehnfache Verdünnung von Lösung 2. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 10^{-1} mol/L und wurde aus 2,67 g Ammoniumchlorid („Ammoniumchlorid zur Analyse“ der Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1145) und Aqua bidestillata ad 500 mL hergestellt. Näheres ist nachzulesen bei ZIPORI (1989).

3.2.5.2 Bestimmung des Gehalts an bakteriellem Protein in der Fermenterflüssigkeit

Die Bestimmung des Gehalts an bakteriellem Protein in der Fermenterflüssigkeit erfolgte photometrisch nach BRADFORD (1976). Wie Abbildung 3.3 zeigt, wurde die benötigte BRADFORD-Gebrauchslösung aus einer Stammlösung mit dem Nachweisreagenz Brilliant Blue G (Farbstoffgehalt ~ 60 %, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Art.-Nr. B-1131) und Ethanol (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 100983) und 85 %iger ortho-Phosphorsäure (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 100552) hergestellt. Zur Abtrennung ungelöster Farbstoffpartikel musste die Gebrauchslösung direkt vor der Benutzung zweifach filtriert werden (Filtrationsvorsatz der Fa. PTFE Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland, Art.-Nr. 9.604 235 und Cellulose-Acetat-Filter, Porengröße 0,45 µm und 0,2 µm, Fa. Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland, Art.-Nr. 11106-13-N und 11107-13-N).

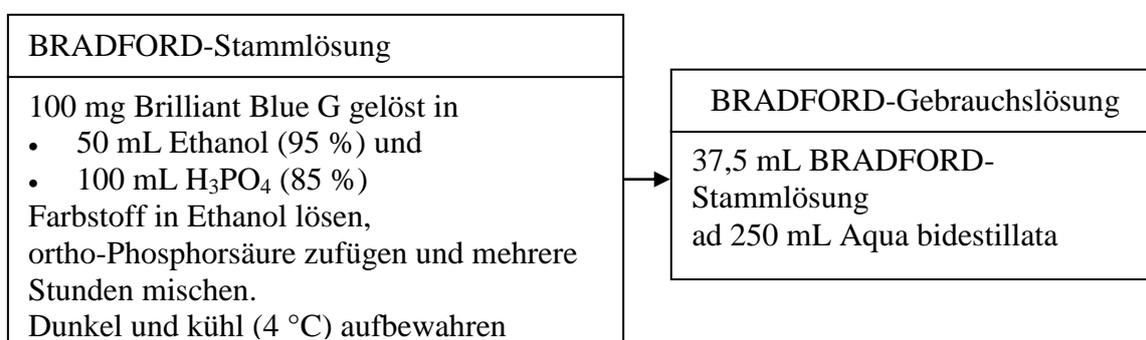
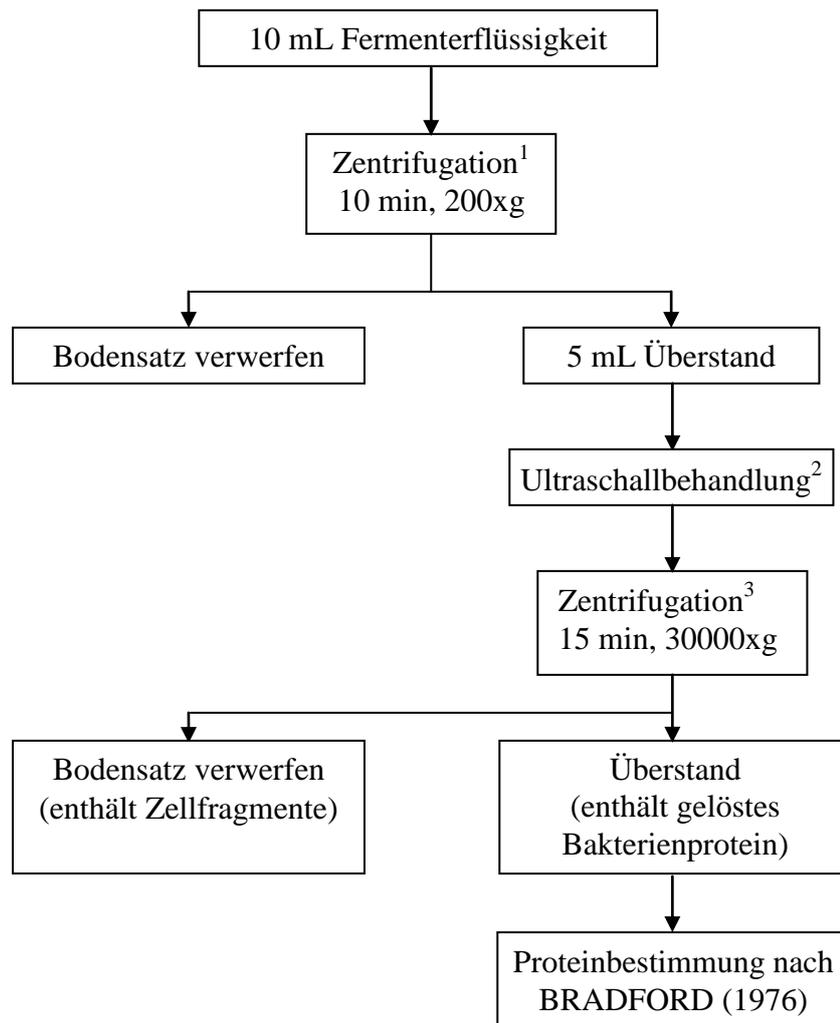


Abb. 3.3: *Zusammensetzung und Herstellung der BRADFORD-Stamm- und -gebrauchslösung*

Die Probenflüssigkeit aus den Fermentern wurde während der Beladung entnommen (s. Tab. 3.1) und entsprechend dem Schema in Abbildung 3.4 aufbereitet (modifiziertes Zentrifugationsverfahren nach SMITH u. McALLAN 1974).



¹ Tischzentrifuge UNIVERSAL (Fa. Hettich; Tuttlingen, Deutschland)

Einstellungen: 10 min, 200xg, Raumtemperatur

→ Abtrennung der Protozoen

² Sonoplus Hochleistungsdesintegrator Typ HD60 Typ-Nr. H0606 M 1049 und Sonotrode

Typ UW60 Nr. 1049 (Fa. Bandelin electronic, Berlin, Deutschland)

Einstellungen: 2 min, Frequenz 20 kHz, Geräteleistung 60 %

→ Aufschluss der bakteriellen Zellwände mittels Ultraschallwellen im Eisbad
(Unterbindung übermäßiger Erwärmung)

³ Kühlzentrifuge Typ ZK 401 mit Winkelkopfrotor A 2424

(Fa. Hermle, Gosheim, Deutschland)

Einstellungen: 15 min, 30.000xg, +4 °C

→ Abtrennung von bakteriellen Zellwand- und Zellorganellfragmenten

Abb. 3.4 Probenaufbereitung für die Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die zellfreien Überstände 1:3 mit Aqua bidestillata verdünnt, 100 µL jeder verdünnten Probenlösung in mit 1 mL BRADFORD-

Lösung gefüllte Halbmikroküvetten (10*4*45 mm, Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland, Art.-Nr. 67742) verbraucht und beide Flüssigkeiten sorgfältig mit einem Rührspatel (120 mm, Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland, Art.-Nr. 81970) vermischt. Für die Messung wurden für jede Probenlösung drei Halbmikroküvetten vorbereitet (Dreifachmessung).

Die Bestimmung der Probenextinktion erfolgte photometrisch nach zehnmütiger Reaktionszeit bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Hilfe des Photometers prietest ECO (Fa. QMLab, Steinfurt, Deutschland) gegen einen Blindwert (1 mL BRADFORD-Lösung + 100 µL Aqua bidestillata). Mit Hilfe der Eichkurve (s. Abb. 9.1) konnte der Proteingehalt in µg RSA (Rinderserumalbumin)/mL errechnet werden.

3.2.5.3 Bestimmung der Konzentrationen von freien Aminosäuren und biogenen Aminen in der Fermenterflüssigkeit

Die Bestimmung der Konzentrationen von freien AS (fAS) und biogenen Aminen in der Fermenterflüssigkeit erfolgte mit Hilfe eines aus folgenden Komponenten bestehenden HPLC-Gradientensystems (Gradienten s. Tab. 9.8 und 9.9):

| | |
|---|---|
| Autoinjektor: | Typ SIL-9A (Fa. Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland) |
| Pumpen: | Lauf 2 bis Lauf 9, Tag 21: Typ 2150 (Fa. Pharmacia LKB, Schweden) Lauf 9, Tag 26 bis Lauf 18, Tag 18: Typ LC 20AT (mit integrierter Kontrolleinheit und Niederdruckmischkammer, Fa. Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland) |
| Kontrolleinheit (Pumpen): | Typ 2152 LC Controller (Fa. Pharmacia LKB, Schweden), nur Lauf 2 bis Lauf 9, Tag 21 |
| Niederdruckmischkammer: | Typ 11300 Ultrograd (Fa. Pharmacia LKB, Schweden), nur Lauf 2 bis Lauf 9, Tag 21 |
| Vakuumdegaser | Typ S7505 (Fa. Sykam GmbH, Eresing, Deutschland) |
| Floureszenzdetektor: | Typ RF 10AXL (Fa. Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland) Ex Wellenlänge 330 nm; Em Wellenlänge 450 nm |
| Zwischendatenspeicher und HPLC-Steuergerät: | Typ CBM 10A (Fa. Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland) |
| Hauptsäulen: | 250*4,6 mm Reprosil OPA 2,5 µm (Fa. Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) |
| Vorsäulen: | 0*4,6 mm Reprosil OPA 5 µm, (Fa. Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) |
| Sättigungssäulen: | 40*4 mm (Fa. Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland, Art.-Nr. ss.r0404) |

Die verwendeten Eluenten A und B wurden aus einem Natriumphosphatpuffer (Zusammensetzung s. Tab. 3.11) und folgenden Lösungsmitteln hergestellt (s. Tab. 3.12):

Tab. 3.11: Zusammensetzung und Herstellung des HPLC-Natriumphosphatpuffers

| Menge/Volumen | Pufferkomponente |
|---|---|
| 3,4882 g | NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.06346) |
| 5,2687 g | Na ₂ HPO ₄ (Fa. Grüssing, Filsum, Deutschland, Art.-Nr. 12147) |
| Ad 5,00 L | Aqua bidestillata |
| Einstellen auf pH 7,2 mit 5M NaOH (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.09913) | |

Tab. 3.12: Zusammensetzung der HPLC-Eluenten A und B

| Eluent A | Eluent B | Lösungsmittel |
|----------|----------|---|
| 1 % | 4,5 % | Tetrahydrofuran (HiPerSolv CHROMANORM, Fa. VWR, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 28559.320) |
| 5 % | 14,5 % | Methanol (BAKER HPLC ANALYZED, Fa. J.T.Baker, Deventer, Niederlande, Art.-Nr. 8402) |
| - | 35,0 % | Acetonitril (HiPerSolv CHROMANORM, Fa. VWR, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 20060.320) |

Im ersten Aufbereitungsschritt wurden 100 µL 30 %ige Sulfosalicylsäure (hergestellt aus 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat der Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 800691) zur Enteiweißung zu 1 mL Fermenterflüssigkeit gegeben. Um eine vollständige Enteiweißung zu erreichen, wurden die Proben 45 Minuten bei 4 °C gelagert und anschließend für 15 Minuten bei 30000xg und 4 °C zentrifugiert (Kühlzentrifuge ZK 401 mit Winkelkopfrotor A 2424, Fa. Hermle, Gosheim, Deutschland). Die Überstände wurden in Reagiergefäße (2 mL, Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland, Art.-Nr. 72689) verbracht und bei -18 °C bis zur weiteren Aufbereitung und Messung gelagert.

Unmittelbar vor der flüssigkeitschromatographischen Analyse wurden 100 µL des Überstands mit 900 µL Kaliumboratpuffer (pH 11, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 109462) versetzt und in Rollrandflaschen (1,5 mL, Fa. LAT, München, Deutschland) überführt.

Der Autosampler vermischte die Probenlösung 1:1 (500 µL:500 µL) mit dem Derivatisierungsreagenz σ-Phthaldialdehyd (OPA, Phthaldialdehyde Reagent, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Art.-Nr. P0532) und injizierte 20 µL des Gemisches über eine Probenschleife in das HPLC-System.

Analysengeräte- und Integratorfunktion wurden durch doppelte Messung eines Standards (100 µL Standardgemisch + 900 µL Kaliumboratpuffer, s. Kap. 9.6) zu Beginn eines Messtags und zusätzlich nach jeder sechsten Probe überprüft (Beispielchromatogramme s. Abb. 9.2 und 9.3). Die Auswertung der Chromatogramme von Proben und Standards erfolgte manuell mit Hilfe des Computerprogramms Class-LC 10 (Fa. Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland). Nach täglicher Kalibrierung konnten Peakflächen und Stoffmengenkonzentrationen berechnet werden.

3.3 Peptidmessung im Pansensaft mittels LC-MS/MS-Technik

Massenspektrometer werden zur Massenbestimmung und Strukturaufklärung von Molekülen und Molekülbruchstücken genutzt (STOYE u. BÖCKER 2005; REHM u. LETZEL 2010). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob ein „Screening“ nativer Pansensaftproben nach Peptiden im Anschluss an flüssigkeitschromatographische Probentrennung mittels LC-ESI-MS ohne weitere vorausgehende aufwendige Probenaufbereitung möglich ist. Erste MS/MS-Analysen sollten Hinweise auf die Struktur detektierter Verbindungen liefern. Zur Probenanalytik stand ein Massenspektrometer (s. Kap. 3.3.3.1) zur Verfügung, dass die ionisierten, flüssigkeitschromatographisch getrennten Analyten durch sogenannte Elektrosprayionisierung (ESI) in die Gasphase überführte und mit Hilfe einer Ionenfalle massenspektrometrisch analysierte (LC-MS, zu technischen Grundlagen von ESI und Ionenfalle s. Kap. 3.3.2). Bei den MS/MS-Analysen wurden bestimmte, durch ESI in den Gaszustand überführte Ionen fragmentiert und die resultierenden Bruchstücke analysiert.

3.3.1.1 In der Literatur beschriebene etablierte Methoden zur Messung von Peptiden im Pansensaft

Peptide in Pansensaftproben wurden bisher überwiegend unter quantitativen, teilweise unter semiquantitativen Gesichtspunkten untersucht. Eine Übersicht über etablierte Methoden zur Peptidmessung in Pansensaftproben gibt Tabelle 3.13.

Tab. 3.13: Etablierte Methoden zur Peptidmessung in Pansensaft

| Methode | Autor, Jahr |
|---|---|
| Proteinpräzipitation, Ammoniakentfernung, Hydrolyse verbleibender Peptide zu AS, flüssigkeitschromatographische Bestimmung der Peptid-AS nach Reaktion mit Ninhydrin nach CHEN et al. (1987b) | CHEN et al. 1987 a ,b ,c; CHEN u. RUSSELL 1988, 1991; FU et al. 2001; Farmer et al. 2004; ZHANG et al. 2007 |
| Flourimetrisch (Reaktion der Peptide mit Fluorescamin) | BRODERICK u. WALLACE 1988; BRODERICK et al. 1988; WALLACE u. McKAIN 1989 b, 1990; RUSSI et al. 2002 |
| Ammoniak- und AS-Gehaltsbestimmung, Ultra-/Gel-filtration, Hydrolyse und N-Bestimmung mit Ninhydrin; Kalkulation des Peptidgehalts | WILLIAMS u. COCKBURN 1991 |
| Flüssigkeitschromatographisch (HPLC) | WALLACE u. McKAIN 1989 a, 1991; WALLACE et al. 1990 b, 1993 a, b; WALLACE 1992 a; WITT et al. 1998; McINTOSH et al. 2003 |
| Flüssigkeitschromatographisch (HPLC) nach saurer Hydrolyse und Ninhydrinreaktion | YANG u. RUSSELL 1992 |
| Größenausschlusschromatographisch | DEPARDON et al. 1996 |

Tab. 3.13: Fortsetzung

| Methoden | Autor, Jahr |
|---|---|
| Rechnerisch nach Präzipitation mit Wolframsäure und nachfolgender N-Bestimmung nach Kjeldahl; außerdem Unterscheidung kurz- und langkettiger Peptide durch Präzipitation mit Wolframsäure und TCA (s. Kap. 2.2) | CARDOZO et al. 2004 VOLDEN et al. 2002; CARDOZO et al. 2006 |

3.3.1.2 Nutzung der ESI-MS(/MS)-Technik zur Messung von Peptiden in komplexen Matrices

Mittlerweile wurden in komplexen Matrices unzählige Peptidanalysen mittels ESI-MS(/MS)-Technik durchgeführt, von denen einige in Tabelle 3.14 aufgelistet sind.

Tab. 3.14: Peptidanalytik mittels ESI-MS(/MS)-Technik

| Untersuchte Analyten | Autor, Jahr |
|--|---------------------------|
| Peptide und Proteine zwischen 1182 und 143.000 Da | LOO et al. 1990 |
| Glycopeptide (Mucine) | ALVING et al. 1998 |
| Endothelinpeptide aus humanen Endothelzellkulturen | OOSTERKAMP et al. 1998 |
| Peptide aus tryptischem Verdau murinen Parvalbumins | TROXLER et al. 1999 |
| Zyklische Heptapeptide | YUAN et al. 1999 |
| AS- und Peptidenantiomere | DESAI u. ARMSTRONG 2004 |
| (Mit Malondialdehyd derivatisierte) argininhaltige Peptide und tryptisch verdaute Proteine | FOETTINGER et al. 2006 |
| Glycopeptide aus tryptischem Verdau boviner Ribonuclease | HENNING et al. 2007 |
| L-Hydroxyprolinhaltige Oligopeptide | SUN et al. 2007 |
| Zyklische Depsipeptide der Schlundsackschnecke <i>Elysia grandifolia</i> | TILVI u. NAIK 2007 |
| Peptide tryptisch verdauter Proteine (Cytochrom C, Myoglobin) | PASILIS et al. 2008 |
| Peptide in Schlangengiften | SOUZA et al. 2008 |
| Peptide und ihre phosphorylierten sowie mono- und dimethylierten Analoge | GROPENGIESSER et al. 2009 |
| Zyklische Peptiddiastereomere | ZHENG et al. 2009 |
| Peptide im Speichel diabetischer Kinder | CABRAS et al. 2010 |
| Peptide aus Kartoffelproteinhydrolysat | CHENG et al. 2010 |

Pansensaftproben wurden bis jetzt nur vereinzelt mittels ESI-MS(MS)-Technik untersucht. Einen Überblick über Analyten und Methodik gibt Tabelle 3.15.

Tab. 3.15: *Massenspektrometrisch untersuchte Substanzen in Panseninhalt von Rindern und Schafen*

| Substanz | Methode | Autor, Jahr |
|----------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Grayanotoxin I, II und III | HPLC/ESI-MS/MS | HOLSTEGE et al. 2001 ¹ |
| Strophanthidin | HPLC/ESI-MS/MS | FILIGENZI et al. 2004 ¹ |
| Zellulosebindende Proteine | SDS-Page/LC/ESI-MS/MS | TOYODA et al. 2009 ² |

¹boviner; ²oviner Panseninhalt

3.3.2 Technische Grundlagen der ESI-MS/MS-Analytik

Elektrospray“ionisierung“ (ESI) ermöglicht die Überführung stark polarer bzw. bereits ionisierter, nicht flüchtiger Analyten aus der kondensierten in die gasförmige Phase (GASKELL 1997). Wie Abbildung 3.5 zeigt, werden die Ionen mit Hilfe eines Potenzial- (GASKELL 1997; REHM u. LETZEL 2010) und Druckgradienten (GASKELL 1997) zwischen Kapillare und Gegenelektrode in feinste Tröpfchen versprüht, die teilweise nur noch aus einem einzigen Ion bestehen (REHM u. LETZEL 2010).

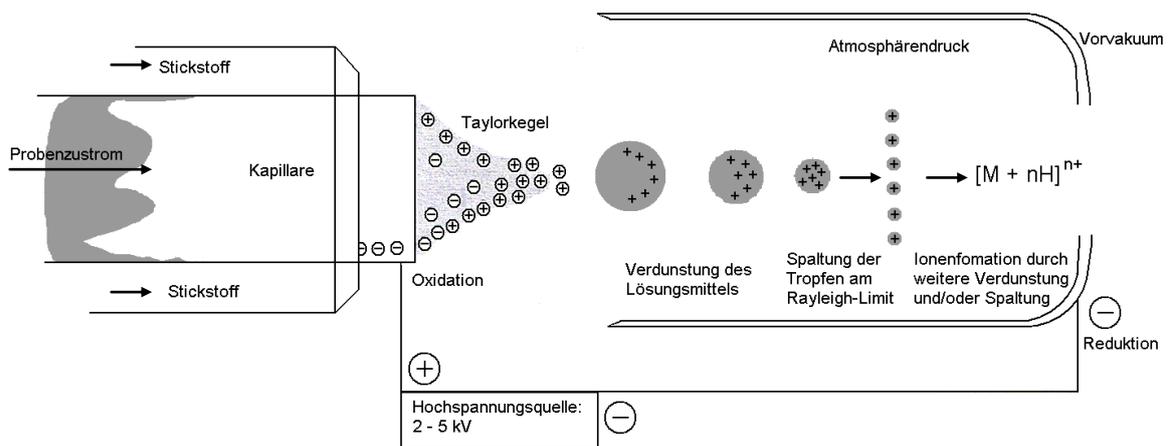


Abb. 3.5: „Ionenerzeugung“ in der Elektrospray-Quelle (aus REHM u. LETZEL 2010; ergänzt nach GASKELL 1997)

Nach GASKELL (1997) kann die Freisetzung von Ionen in einer ESI-Quelle in die drei Stadien Tropfenformation (I), Tropfenschrumpfung (II) und Formation gasförmiger Ionen (III) unterteilt werden. An der Kapillare bildet sich der sogenannte Taylorkegel, der sich entlang des elektrischen Feldes zu einem Filament verjüngt und bei positiver Ladung der Kapillare positiv geladene Tropfen produziert (Tropfenformation). Während sich die Tropfen entlang des Potenzial- und Druckgradienten bewegen, verdampft Lösungsmittel, die Tropfen verkleinern sich (Tropfenschrumpfung) und explodieren (Coulomb-Explosion), wenn ihre Ladungsdichte so hoch ist, dass die elektrostatische Abstoßung die Oberflächenspannung

übersteigt (sogenannte Rayleigh-Grenze; GASKELL 1997; REHM u. LETZEL 2010). Es entstehen dehydrierte, mehrfach geladene Protein- bzw. Peptidionen (REHM u. LETZEL 2010). Hinter die Ionenquelle ist ein Analysator geschaltet, der die Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis²⁵ trennt. Ionenfallen (s. Abb. 3.6) zwingen Ionen mit Hilfe elektrischer Felder auf Kreisbahnen. Durch Änderung der Spannungsamplitude werden Ionen selektiv aus der Ionenfalle entlassen und können dann von einem Photomultiplier detektiert werden. Da ESI als sanfte „Ionisierungsmethode“ gilt (SMITH et al. 1992; LOO 1997; REHM u. LETZEL 2010), ist ausgeschlossen, dass bereits auf dieser Stufe Molekülfragmente und nicht die Muttermolekülionen detektiert werden (LOO 1997). Andererseits werden, wie SMITH et al. (1992) und LOO (1997) zusammenfassen, auch Komplexe aus nicht kovalent gebundenen Peptiden mit Proteinen (SMITH et al. 1992; LOO 1997) und Metallionen (LOO 1997) detektiert.

Bei MS/MS-Untersuchungen wird ein bestimmtes Molekülion in der Ionenfalle isoliert, dort beschleunigt und durch Kollision mit Heliumatomen fragmentiert (CID, collision induced fragmentation). Die Molekülionenreste und seine Fragmente werden nacheinander aus der Ionenfalle entlassen und vom Detektor detektiert (REHM u. LETZEL 2010).

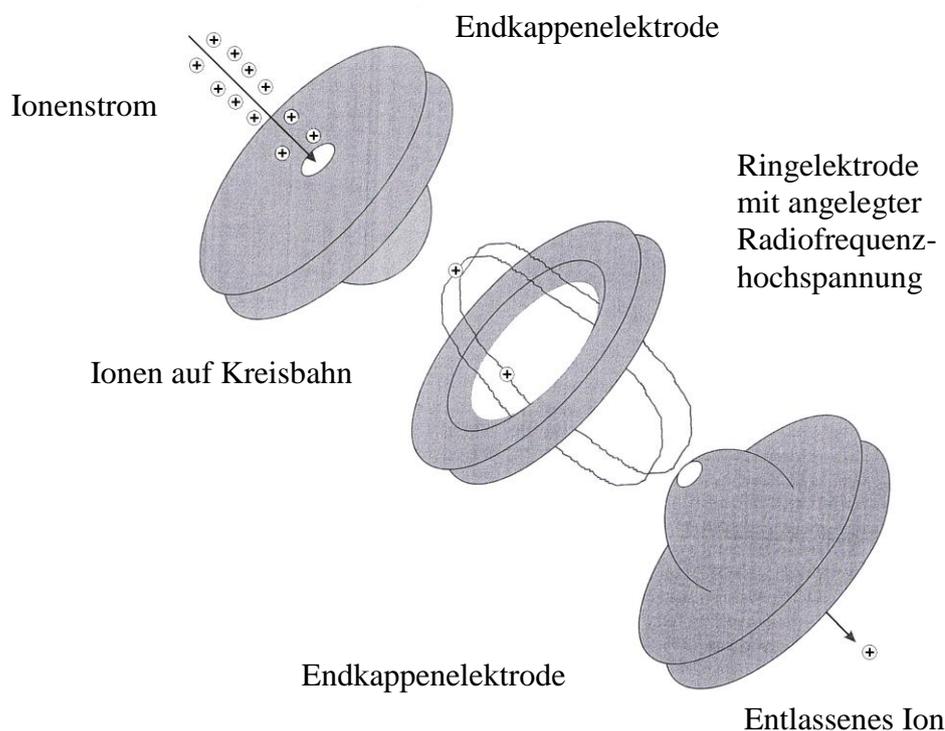


Abb. 3.6: Schematischer Aufbau einer Ionenfalle (aus REHM u. LETZEL 2010)

²⁵ Ein MS-Spektrogramm zeigt nicht die Molekulargewichte der Ionen, sondern das Verhältnis ihrer Masse m zu ihrer Ladung z .

3.3.3 Eigene LC-MS/MS Messungen in Pansensaftproben

3.3.3.1 Versuchsablauf

Für die Peptidmessung wurde frisch entnommener, durch eine Gaze zweifach geseihter Pansensaft zentrifugiert und mikrofiltriert, um Mikroorganismen und Futterpartikelreste zu entfernen und bis zur weiteren Analyse bei -18 °C in Reagiergefäßen (2 mL, Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland, Art.-Nr. 72689) gelagert. Spendertier war das bereits für die RUSITEC-Versuche genutzte Rind (s. Kap. 3.2.2.). Im Detail können die Probenaufbereitungsschritte Abbildung 3.7 entnommen werden.

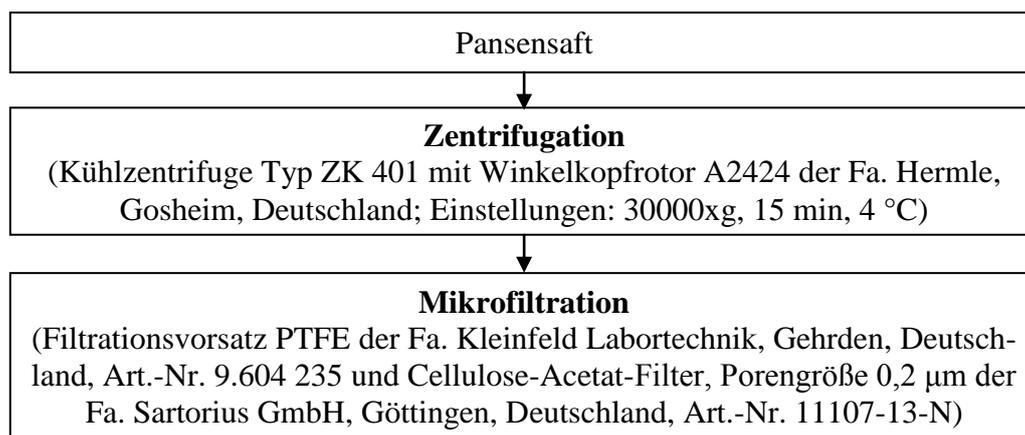


Abb. 3.7: Aufbereitung von Pansensaftproben zur LC/MS/MS-Messung

Für die LC-MS- bzw. LC-MS/MS-Analysen wurde der aufbereitete Pansensaft in Rollrandflaschen (12*32 mm, 300 µL, Fa. Techlab GmbH, Erkerode, Deutschland, Art.-Nr. 401127716) überführt und die Flaschen mit Snap on-Kappen (PE, Fa. Techlab GmbH, Erkerode, Deutschland, Art.-Nr. 2511C7011) verschlossen. Zunächst erfolgte die flüssigkeitschromatographische Auftrennung der Proben an einem LC-System, das aus folgenden Gerätekomponten bestand:

| | |
|-----------------------------------|---|
| Autoinjektor: | Typ Pro Star Modell 410 (Fa. Varian, Palo Alto, CA, USA) |
| Gradientenpumpensystem: | Zwei Typ Pro Star 210 Solvent Delivery-Module (Fa. Varian, Palo Alto, CA, USA) |
| Vorsäule (Schutz der Hauptsäule): | 4,00*3,00 mm, Security Guard Cartridge C12 (Fa. Phenomenex, Torrance, CA, USA, Art.-Nr. AJ-6074-S) |
| Hauptsäule: | 3,00*150 mm, Partikelgröße 4 µm, Jupiter Uno Proteo 90 Å (Fa. Phenomenex, Torrance, CA, USA, Art.-Nr. 00F-4396-Y0) |

Insgesamt wurden die Pansensaftproben mit fünf verschiedenen Gradienten (s. Tab. 3.16) und zwei unterschiedlichen Injektionsvolumina (10 und 30 µL) sowie im 40/60- und 60/60-Gradienten mit zwei verschiedenen Flussraten (0,2 und 0,3 mL/min) getrennt. Abbildung 3.8

zeigt exemplarisch den Verlauf des 40:60-Gradienten, bei dem nach 60 Minuten eine 40 %ige Konzentration des Eluenten B erreicht wird. In allen Gradienten wurde die Säule zwischen den Minuten 60 und 70 bei 95 %iger Konzentration des hydrophoben Eluenten B gespült und von verbliebenen hydrophoben Verbindungen gereinigt. Die Trennung des Probengemisches erfolgte bei 40 °C.

Tab. 3.16 LC-Gradienten in der LC-MS/MS-Anlage (links)

| Gradient | Konzentration des Eluenten B im Eluentengemisch nach 60 min [%] |
|----------|---|
| 20/60 | 20 |
| 40/60 | 40 |
| 60/60 | 60 |
| 80/60 | 80 |
| 95/60 | 95 |

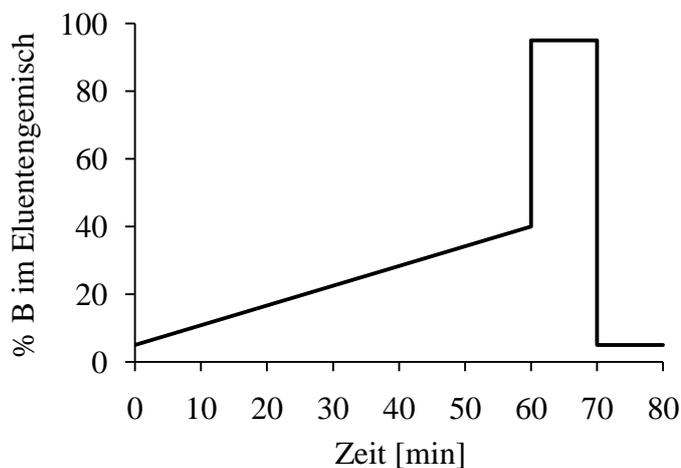


Abb. 3.8: Verlauf des 40/60-Gradienten in der LC-MS/MS-Anlage (rechts)

Folgende Lösungsmittel dienen der Herstellung der Eluenten A und B (s. Tab. 3.17). Der Ameisensäurezusatz ist zur Erzeugung positiv geladener Peptidionen für die ESI-Quelle (s. Kap. 3.3.2; GUZZETTA 2007; REHM u. LETZEL 2010) unabdingbar und soll außerdem die Peakschärfe erhöhen (GUZZETTA 2007).

Tab. 3.17: Zusammensetzung der Eluenten A und B

| Eluent A | Eluent B | Lösungsmittel |
|----------|----------|--|
| 99,9 % | - | Aqua bidestillata |
| - | 99,9 % | Acetonitril (Fa. CL-Chem-Lab, Zeldelgem, Belgien, Art.-Nr. CL00.0175.2500) |
| 0,1 % | 0,1 % | Ameisensäure (98 bis 100 %, pro analysi, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 926K12319964) |

Zur besseren Beurteilung der Trennleistung bei unterschiedlichen Gradienten und Injektionsvolumina wurde als Referenz ein Peptidstandard (Peptide Standard Mixture, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Art.-Nr. H2016) vermessen. Die Zusammensetzung des Peptidstandards und die Massen seiner Komponenten zeigt Tabelle 3.18.

Tab. 3.18: Zusammensetzung des Peptidstandards (HPLC Peptide Standard Mixture, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Art.-Nr. H2016)

| Substanz | Konzentration | Molekulargewicht |
|----------------|---------------|------------------|
| Gly-Tyr | 25 µg/mL | 238,2 |
| Val-Tyr-Val | 25 µg/mL | 379,5 |
| Met-Enkephalin | 25 µg/mL | 573,7 |
| Leu-Enkephalin | 25 µg/mL | 555,6 |
| Angiotensin II | 25 µg/mL | 1046,2 |

Ein Massenspektrometer Typ 500-MS der Firma Varian (Palo Alto, CA, USA) detektierte die chromatographisch getrennten Analyten. Durch „Screening“ der LC-MS-Chromatogramme wurden m/z-Verhältnisse ermittelt, die mit großer Intensität in einzelnen Peaks detektierbar waren. Traten sie nur an bestimmten Stellen in den Chromatogrammen auf und konnten dem m/z-Verhältnis eines ionisierten Peptids entsprechen, wurden sie mittels MS/MS-Technik genauer untersucht (s. Kap. 3.3.3.3). Abbildung 3.9 zeigt den vollständigen Versuchsablauf. Darstellung und Analyse der Chromato- und Spektrogramme erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms MS Workstation der Firma Varian (Palo Alto, CA, USA).

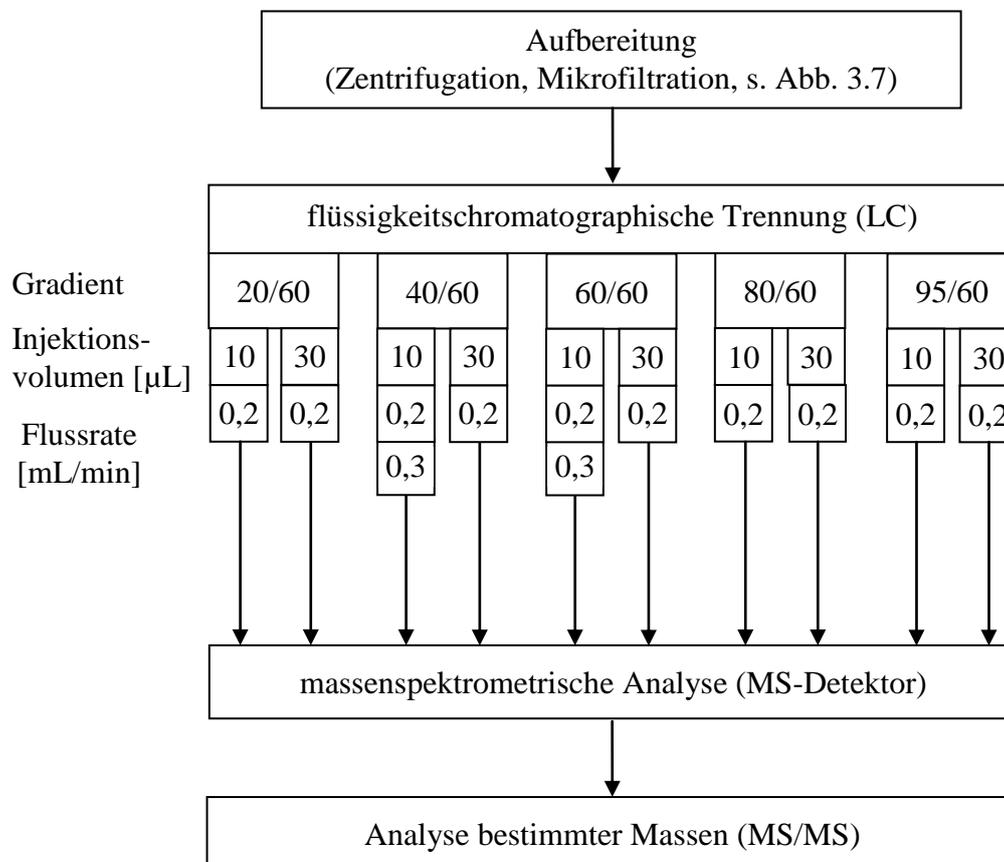


Abb. 3.9: Schematischer Analysenablauf nach der Probenaufbereitung

3.3.3.2 LC-MS-Chromatogramme der Pansensaftproben

3.3.3.2.1 LC-MS-Chromatogramme bei einer Flussrate von 0,2 mL/min

Aufbereitete Pansensaftproben und ein Peptidstandard (s. Tab. 3.18) wurden mit Hilfe von fünf verschiedenen LC-Gradienten bei zwei unterschiedlichen Injektionsvolumina getrennt (s. Tab. 3.16 und Abb. 3.9). Die Abbildungen 3.10 und 3.11 zeigen beispielhaft die LC-MS-Chromatogramme des Peptidstandards (s. Tab. 3.18) und der Pansensaftprobe im 60/60-Gradienten bei Nutzung eines Injektionsvolumens von 10 μ L.

Im **20/60-Gradienten** wurden die Standardpeptide fast über den gesamten Zeitraum, in dem die Konzentration des Eluenten B langsam zunahm, verteilt dargestellt (Minuten 4 bis 50). Die Auflösung der Peaks 3 und 4 (zur Nummerierung der Peaks s. Abb. 3.10) war jedoch nicht vollständig. In der Pansensaftprobe waren Peaks nur im kurzen Zeitraum zwischen den Minuten 52 und 60 detektierbar. Die Peaks waren relativ klein und die Auflösung mehrerer Peaks bei beiden Injektionsvolumina unvollständig.

Der **40/60-Gradient** stellte die Peptidstandardpeaks in einem kleineren Zeitfenster als der 20/60-Gradient dar (Minute 4 bis 27), die Peaks 3 und 4 waren jedoch fast vollständig getrennt. Peaks in der Probe konnten ab Minute 30 detektiert werden. Bis auf zwei Peaks bei Minute 34 und Minute 56 war die Auflösung unvollständig und es zeigten sich Überlagerungen mehrerer Substanzen (keine Basislinientrennung einzelner Peaks). Bei größerem Injektionsvolumen (30 μ L) hob sich die Basislinie an und Hintergrundeffekte verstärkten sich, so dass die Übersichtlichkeit eingeschränkt wurde.

Wurde nach 60 Minuten eine 60%ige Konzentration des Eluenten B erreicht (**60/60-Gradient**), stellten sich die Standardpeptide in einem Zeitfenster zwischen vier und 20 Minuten dar, Peak 3 und 4 zeigten eine gute Auflösung. Probenpeaks waren auch hier erst später als die Standardpeptide zu detektieren. Insgesamt traten vier höhere Peaks mit guter Auflösung und mehrere niedrigere Peaks auf. Das größere Injektionsvolumen hatte die gleichen Auswirkungen wie im 40/60-Gradienten.

Nach Trennung des Peptidstandards mit den **80/60-** und **95/60-Gradienten** erschienen die Standardpeptide in noch kürzeren Zeitfenstern (Minuten 3 bis 13 bzw. 4 bis 14) in den LC-MS-Chromatogrammen. Probenpeaks waren auch hier erst später als die Standardpeaks erkennbar. Die Basislinie hob sich bei beiden Gradienten mit fortschreitender Zeit immer weiter an und zeigte im 95/60-Gradienten einen inkonstanten Verlauf (Ansteigen – Plateau – Ansteigen). Das höhere Injektionsvolumen schränkte in beiden Gradienten die Chromatogrammübersichtlichkeit durch ausgeprägtere Darstellung zahlreicher kleiner, annähernd gleichgroßer und in ähnlichen Abständen auftretender Peaks ein und hob die Basislinie zusätzlich bogenförmig an.

Die schlechteste Trennleistung des Peptidstandards zeigte sich im 20/60-Gradienten. Außerdem ist davon auszugehen, dass in diesem Gradienten hydrophobe Analyten nicht rechtzeitig bzw. erst beim Spülen eluiert wurden und daher nicht detektiert werden konnten. In den Gradienten 80/60 und 95/60 wurden die Standardpeptide zwar sauber getrennt, aber in einem kleinen Zeitfenster eluiert. Bei rasch ansteigender Konzentration des hydrophoben Eluenten B ist anzunehmen, dass Analyten in den Proben unter Umständen sehr dicht hintereinander eluiert und nicht voneinander getrennt werden konnten.

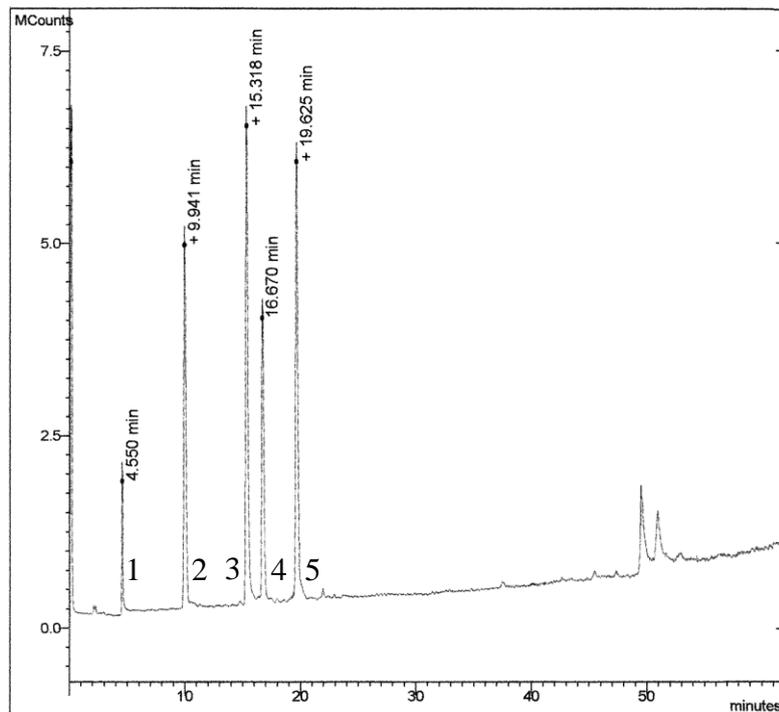


Abb. 3.10: LC-Chromatogramm des Peptidstandards:
 Gradient 60/60, Flussrate 0,2 mL/min, Injektionsvolumen 10 μ L
 Peak 1 = Gly-Tyr; Peak 2 = Val-Tyr-Val; Peak 3 = Met-Enkephalin;
 Peak 4 = Leu-Enkephalin; Peak 5 = Angiotensin II

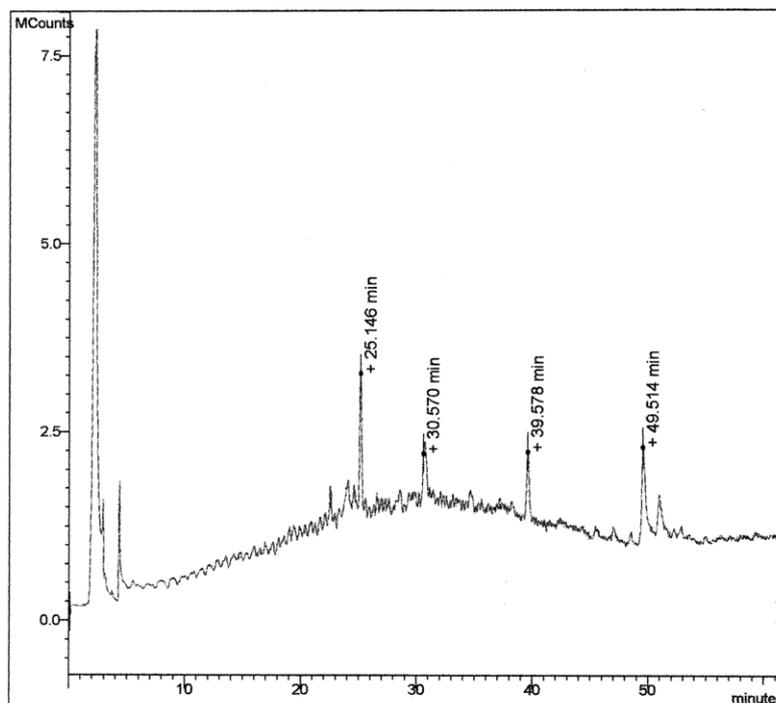


Abb. 3.11: LC-Chromatogramm einer Pansensaftprobe:
 Gradient 60/60, Flussrate 0,2 mL/min, Injektionsvolumen 10 μ L

Die Peakdarstellung in den Pansensaftproben war im 60/60-Gradienten (Peakanzahl und -auflösung) am besten. Der 40/60-Gradient führte zwar zu geringgradig schlechterer Trennung als der 60/60-Gradient, die Standardpeaks wurden aber auch hier in einem annehmbaren Zeitfenster detektiert. In beiden Gradienten blieb mehr Zeit als im 20/60-Gradienten, um auch hydrophobe Verbindungen zu eluieren. Gleichzeitig sollten die Analyten mit größeren Abständen eluiert werden als in den 80/60- und 95/60-Gradienten. Größeres Injektionsvolumen erwies sich als nachteilig für die chromatographische Darstellung.

3.3.3.2.2 LC-MS-Chromatogramme bei einer Flussrate von 0,3 mL/min

Da bei einer Flussrate von 0,2 mL/min die 60/60- und 60/40-Gradienten die besten Trennleistungen gezeigt hatten, wurde mit diesen Gradienten getestet, ob eine um 0,1 mL/min höhere Flussrate die Trennleistung des LC-Systems weiter verbessern konnte.

Im **40/60-Gradienten** verbesserte die höhere Flussrate die Trennung der Standardpeaks 3 und 4 geringgradig, verschlechterte aber im Vergleich mit den anderen Standardpeptiden die Detektion des Standarddipeptids aus Glycin und Tyrosin (Peak 1). Die Probenchromatogramme wiesen zusätzlich andere Peakverteilungen und -formen, vor allem aber eine höhere Peakanzahl auf. Die Auflösung veränderte sich nicht merklich.

Die höhere Flussrate bewirkte im **60/60-Gradienten** geringfügig bessere Auflösung der Peaks 3 und 4 und saubere Darstellung der Peaks 2 und 5, während Peak 1 leicht erniedrigt wurde. In den Proben traten bei beiden Flussraten acht sich gegen das Hintergrundrauschen abhebende Peaks auf, die Auflösung schien bei größerer Flussrate geringfügig besser zu sein (schmalere, schärfer von einander getrennte Peaks).

Aufgrund der höheren Probenpeakanzahl im 40/60-Gradienten und verbesserten Probenpeakdarstellung im 60/60-Gradienten wurden die folgenden MS/MS-Analysen (s. Kap. 3.3.3.3) bei einer Flussrate von 0,3 mL/min durchgeführt.

3.3.3.3 MS/MS-Spektrogramme der Pansensaftproben

Die LC-Chromatogramme, die im 40/60- und 60/60-Gradienten bei einer Flussrate von 0,3 mL/min und einem Injektionsvolumen von 10 μ L entstanden, wurden näher untersucht und in den Peaks m/z-Verhältnisse ermittelt, die möglicherweise von Peptiden stammten. Ihre Selektion in den Chromatogrammen war mit Hilfe der Software (MS Workstation der Fa. Varian, Palo Alto, CA, USA) möglich. Abbildung 3.12 zeigt dies beispielhaft für die Ionen mit m/z = 294, 313, 367 und 390. Während die Ionen mit m/z = 294, 313 und 390 deutliche Peaks zu bestimmten Zeitpunkten zeigten, an denen auch in den LC-Chromatogrammen Peaks detektiert wurden (s. Abb. 3.11), wurden Ionen mit m/z = 390 über einen Zeitraum von ca. 25 Minuten immer wieder eluiert, ohne dass eindeutige Zuordnung zu einem LC-Chromatogrammpeak möglich war. Für MS/MS-Analysen wurden nur Ionen ausgewählt, sie sich als spezifisch für einen der Probenpeaks erwiesen.

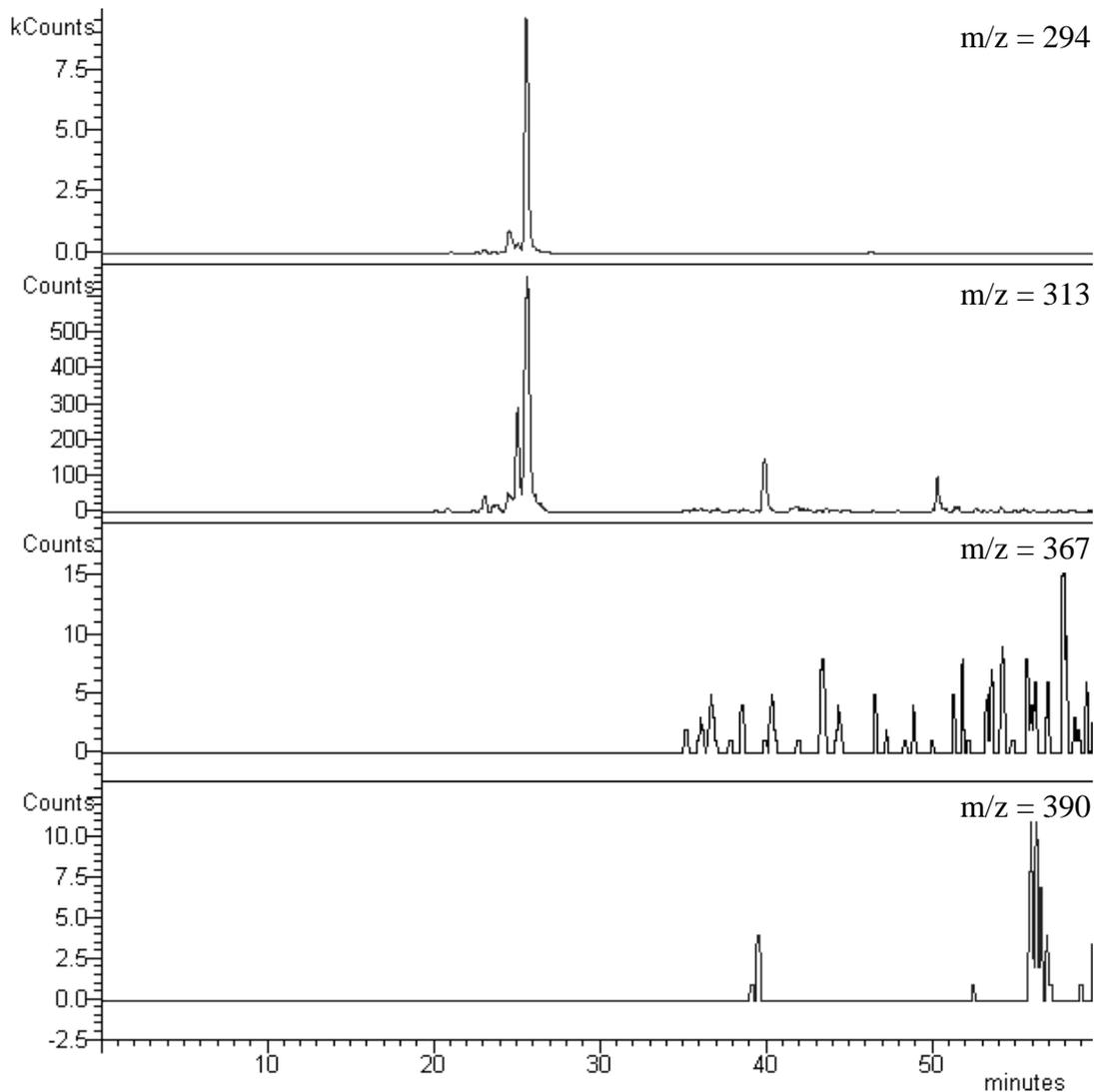


Abb. 3.12: Ionenselektion in einem LC-Chromatogramm am Beispiel der Ionen mit $m/z = 294, 313, 367$ und 390 :
Gradient 60/60, Injektionsvolumen $10 \mu\text{L}$, Flussrate $0,3 \text{ mL/min}$

3.3.3.3.1 Vorgehen bei der Auswertung der MS/MS-Spektrogramme

Zur Auswertung von MS/MS-Spektrogrammen sind Kenntnisse des grundsätzlichen chemischen Peptidaufbaus Voraussetzung. Abbildung 3.13 zeigt ihn schematisch für ein einfach positiv geladenes Peptidion. Bei der Kondensation zweier AS reagieren die Amino-Gruppe der einen und die Carboxylgruppe der anderen AS unter Abspaltung von Wasser. Die so entstandene CONH-Gruppe bildet die Peptidbindung. Am N-Terminus verbleibt eine NH_2 -Gruppe, während C-terminal eine Carboxylgruppe zu finden ist.

Bei Fragmentierung eines Peptidmoleküls können der N- und C-terminale AS-Kern als Bruchstücke entstehen (s. Abb. 3.13, unterbrochene Umrandung). Bei weiterer Fragmentierung treten die Kerne innerhalb der Kette gelegener AS in den Spektrogrammen auf (s.

Abb. 3.13, durchgezogene Umrandung). Hinweise auf AS können auch Differenzen zwischen einzelnen Fragmenten liefern. Immoniumionen ($\text{H}_2\text{N}=\text{CHR}$) der AS hingegen treten immer nur selbst auf und weisen höchstens m/z -Verhältnisse von 159 auf. Tabelle 3.19 zeigt die mittleren Molekulargewichte der AS-Kerne.

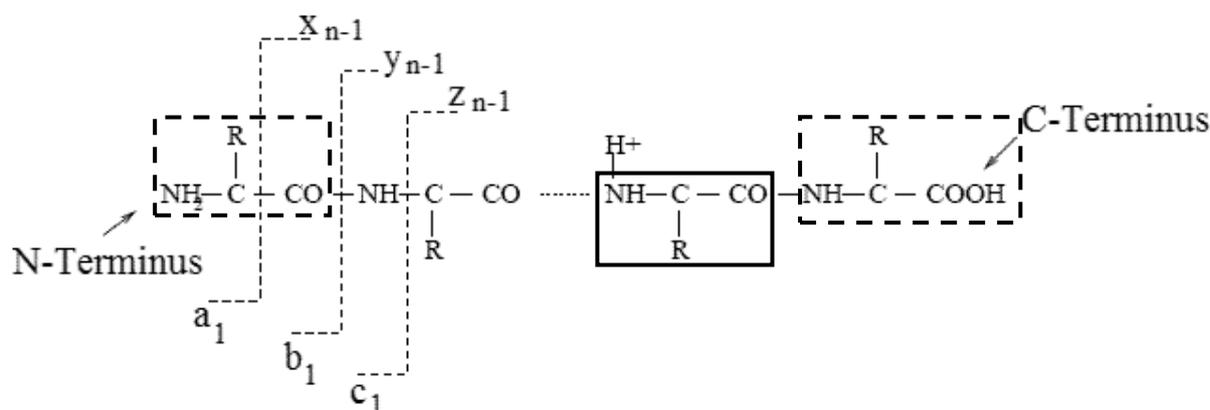


Abb. 3.13: Bildung verschiedener Fragmente bei der MS/MS-Analyse eines ionisierten Peptids (BAFNA u. EDWARDS 2003). Die Fragmente a_1 und b_1 stellen ein sogenanntes Signalpaar mit einer m/z -Differenz von 28 dar, während a_1 und x_{n-1} komplementäre Ionen sind (analog für b_1 und y_{n-1} etc.). Die durchgezogene Umrandung kennzeichnet einen innerhalb der Peptidkette gelegenen AS-Kern, die unterbrochenen Markierungen umranden den N- bzw. C-terminal gelegenen AS-Kern.

Tab. 3.19: Gerundete mittlere Molekulargewichte [Da] der AS-Kerne innerhalb einer Peptidkette und N- und C-terminaler AS-Kerne (REHM u. LETZEL 2010)

| AS | Kern | N-terminal (Kern + 1) | C-terminal (Kern + 19) |
|-----|------|-----------------------|------------------------|
| Ala | 71 | 72 | 90 |
| Arg | 156 | 157 | 175 |
| Asn | 114 | 115 | 133 |
| Asp | 115 | 116 | 134 |
| Cys | 103 | 104 | 122 |
| Gln | 128 | 129 | 147 |
| Glu | 129 | 130 | 148 |
| Gly | 57 | 58 | 76 |
| His | 137 | 138 | 156 |
| Ile | 113 | 114 | 132 |
| Leu | 113 | 114 | 132 |
| Lys | 128 | 129 | 148 |
| Met | 131 | 132 | 150 |
| Phe | 147 | 148 | 166 |
| Pro | 97 | 98 | 116 |

Tab. 3.19: Fortsetzung

| AS | Kern | N-terminal (Kern + 1) | C-terminal (Kern + 19) |
|-----|------|-----------------------|------------------------|
| Ser | 87 | 88 | 106 |
| Thr | 101 | 102 | 120 |
| Trp | 186 | 187 | 205 |
| Tyr | 163 | 164 | 182 |
| Val | 99 | 100 | 118 |

Typischerweise entstehen außerdem sogenannte Signalpaare, die aufgrund von N-terminaler Fragmentierung vor bzw. hinter der C=O-Gruppe in der Peptidbindung m/z -Differenzen von 28, entsprechend den Molekulargewichten von Sauer- und Kohlenstoff aufweisen. In Abbildung 3.13 stellen die Fragmente a_1 und b_1 ein solches Paar dar.

Als komplementäre Ionen werden Ionenpaare bezeichnet, deren m/z -Summe der des Mutterions entspricht (s. Abb. 3.13).

Die Auswertung der MS/MS-Chromatogramme folgte dem Schema aus Abbildung 3.14. Es wurde davon ausgegangen, dass die Muttermolekülionen lediglich einfache Ladungen aufwiesen.

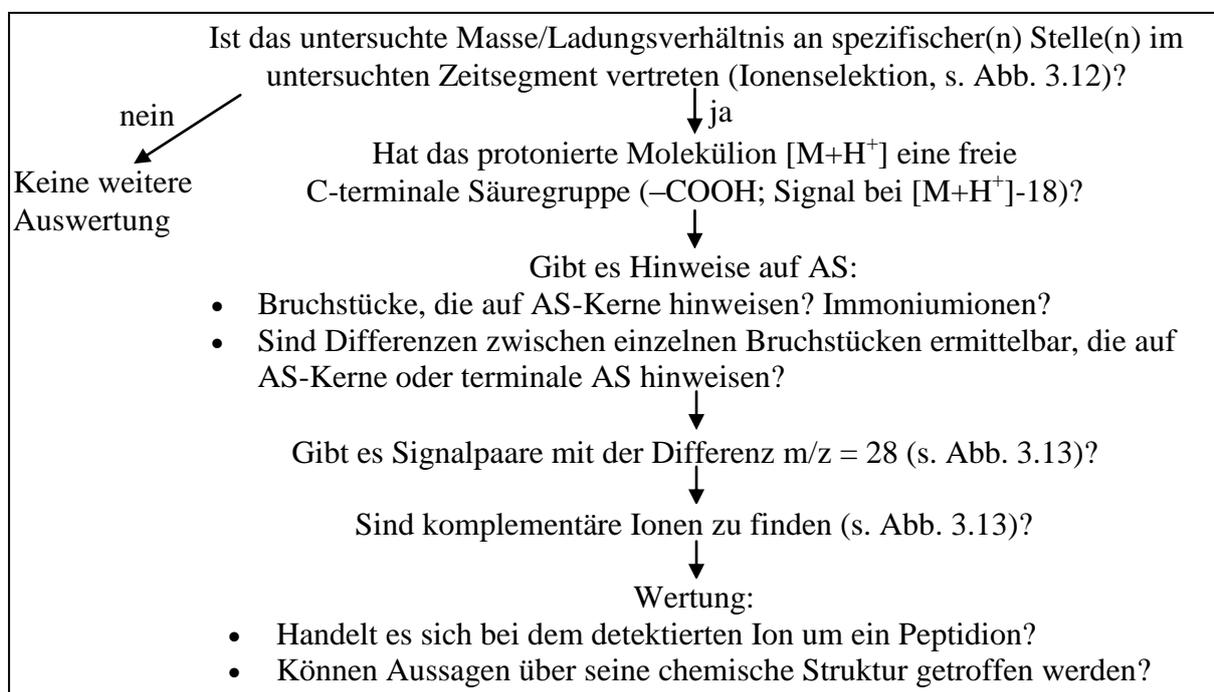


Abb. 3.14: Schema zur Auswertung der MS/MS-Spektrogramme (nach REHM u. LETZEL 2010)

Da sich die Aussagen der MS/MS-Spektrogramme einzelner Ionen untereinander stark ähneln, findet sich im Folgenden beispielhaft die ausführliche Beschreibung des MS/MS-Spektrogramms für das Ion mit $m/z = 249$ (s. Kap. 3.3.3.3.2). Die Auswertung der Spektren der übrigen Ionen wurde tabellarisch zusammengefasst (s. Kap. 3.3.3.3.3 und Tab. 3.21).

3.3.3.3.2 Auswertung des MS/MS-Spektrogramms des Ions mit $m/z = 249$

Abbildung 3.15 zeigt das MS/MS-Spektrogramm des Ions mit $m/z = 249$ im 60/60-Gradienten, während Tabelle 3.20 seine Fragmente und deren Intensitäten²⁶ in beiden Gradienten auflistet. Abbildung 3.16 können die m/z -Differenzen des Mutterions mit den Fragmenten aus Tabelle 3.20 sowie den Fragmenten untereinander entnommen werden.

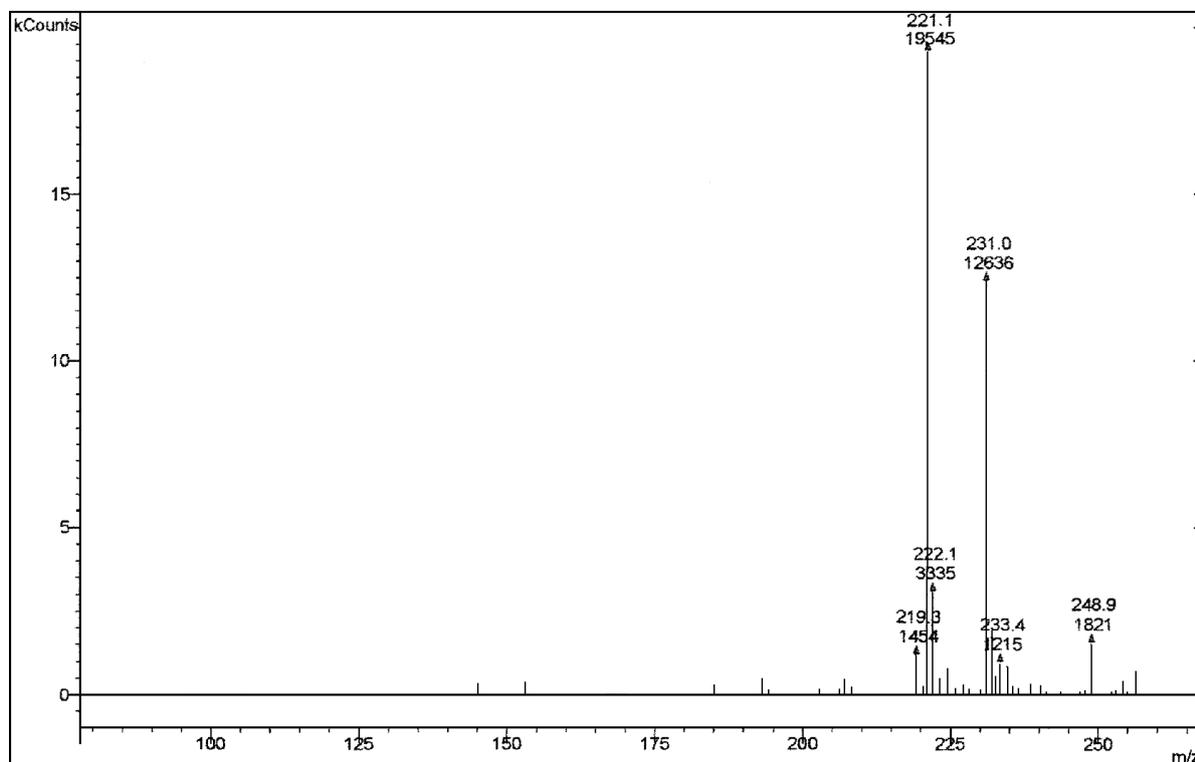


Abb. 3.15: MS/MS-Spektrogramm des Ions mit $m/z = 249$:
Gradient 60/60, Injektionsvolumen 10 μL , Flussrate 0,3 mL/min

Tab. 3.20: Fragmente des Ions mit $m/z = 249$ im 40/60 und 60/60-Gradienten:
Injektionsvolumen 10 μL , Flussrate 0,3 mL/min

| 40/60-Gradient | | 60/60-Gradient | |
|----------------|------------------------------|----------------|------------------------------|
| m/z | Intensität ²⁶ [%] | m/z | Intensität ²⁶ [%] |
| 221,1 | 100 | 221,1 | 100 |
| 222,1 | 17,0 | 222,1 | 17,1 |
| 231,0 | 55,6 | 231,0 | 64,7 |
| 232,0 | 11,2 | 232,1 | 9,99 |
| 219,2 | 6,96 | 219,3 | 7,44 |
| 193,3 | 5,51 | 193,3 | 2,29 |

²⁶ Die Intensität, mit der das häufigste Fragmentation in einem Spektrum detektiert wird, wird jeweils mit 100 % angegeben, die Intensitäten anderer Fragmentationen werden mit diesem Wert verglichen und ebenfalls in % ausgedrückt.

Das Entstehen des Fragments mit $m/z = 231$ ($= 249 - 18$) deutet auf eine freie Carboxylgruppe hin, die in einem Peptid zwingend vorhanden ist. Ein Peptid mit $m/z = 249$ kann aus zwei bis drei AS zusammengesetzt sein, jedoch entspricht keins der einzelnen Fragmente mit seinem m/z -Verhältnis AS-Kernen oder den Immoniumionen einzelner AS. Differenzen, die Hinweise auf AS liefern, wurden ebenfalls nicht gefunden.

Das Mutterion weist zwar gegenüber dem Fragment mit $m/z = 221$ eine Differenz von 28 auf, da C=O-Gruppen in Peptiden in der Regel aber nicht terminal lokalisiert sind, kann dieses Paar unmöglich durch Spaltung innerhalb einer Peptidbindung entstanden sein. Folglich handelt es sich nicht um ein Signalpaar. Bei den Fragmenten mit $m/z = 221$ und 193 kann selbiges hingegen nicht ausgeschlossen werden. Bedacht werden muss aber, dass m/z -Differenzen von 28 auch bei Abspaltung von Carbonylgruppen aus Aldehyden oder Ketonen auftreten können (LEE 1998).

Kleine Massenverluste von $m/z = 2, 15, 17, 26$ und 36 deuten auf Abspaltung von H_2 , CH_3 , NH_3 bzw. OH , C_2H_2 und HCl hin, wohingegen Verluste mit $m/z = 30, 43$ und 56 von jeweils mehreren Fragmenten unterschiedlichster Verbindungen stammen können (LEE 1998).

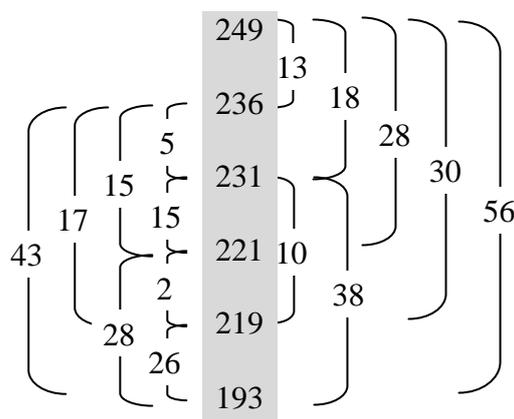


Abb. 3.16: Differenzen [m/z] zwischen dem Mutterion mit $m/z = 249$ und seinen Fragmenten (s. Tab. 3.20) sowie der Fragmente untereinander. Grau unterlegt sind die m/z -Verhältnisse des Mutterions ($m/z = 249$) und seiner Fragmente.

Wenn davon ausgegangen wird, dass das Molekülion mit $m/z = 249$ nur einfach geladen war, spricht das ungerade Molekulargewicht für eine ungerade Anzahl von N-Atomen im Molekül (LEE 1998). Darauf weist auch die Differenz von $m/z = 17$ (NH_3) zwischen den Fragmenten mit $m/z = 236$ und 219 hin. Allerdings ist das Atomgewicht von Chlor mit 35 Da ebenfalls ungerade und ein Hinweis für Chlorabspaltung findet sich ebenso (s.o.).

Dafür, dass es sich bei diesem Ion um ein Peptid handelt, sprechen lediglich die vermutlich vorhandene Carboxylgruppe und die Signalpaarbildung der Fragmente mit $m/z = 221$ und 193 . Besonders die fehlenden Hinweise auf AS lassen es zunächst unwahrscheinlich erscheinen, dass es sich bei dem Ion mit $m/z = 249$ um ein Peptid handelt.

3.3.3.3 Auswertung der MS/MS-Spektrogramme der Ionen mit $m/z = 295, 313, 339, 348, 353, 390, 499, 699$ und 715

Die Aussagen der MS/MS-Spektren der Ionen mit $m/z = 295, 313, 339, 348, 353, 390, 499, 699$ und 715 sind teilweise recht ähnlich zu denen des Ions mit $m/z = 249$. Tabelle 3.21 fasst die Auswertung der zugehörigen Spektren stichpunktartig zusammen. Die meisten Hinweise darauf, dass es sich bei den detektierten Molekülionen um Peptidionen handelte ergaben sich bei den Ionen mit $m/z = 390$ bzw. $m/z = 715$. Immoniumionen traten in keinem der Spektrogramme auf.

3.3.3.4 Auswertung der MS/MS-Spektrogramme der Ionen mit $m/z = 430, 514, 367$ und 901

Das Ion mit $m/z = 430$ tritt bei beiden Gradienten nicht verstärkt im untersuchten Zeitsegment auf und das MS/MS-Spektrum des höchsten Peaks im Segment zeigt mehr als 150 Fragmente, so dass eine nähere Beschreibung der Verbindung nicht möglich ist. Ähnliches gilt für die Ionen mit $m/z = 514, 367$ und 901 (Letzteres nur im 60/60-Gradienten detektierbar).

Tab. 3.21: Auswertung der MS/MS-Spektrogramme der Ionen mit $m/z = 295, 313, 339, 348, 353, 390, 499, 699$ und 715

| Ion [m/z] | Freie Car- boxylgruppe | Hinweise auf Aminosäuren: | | Signal- paare | Kompl. Ionen | Molekülstruktur |
|------------------|---------------------------|--|--|------------------|------------------|---|
| | | AS-Kerne | Terminale AS-Kerne | | | |
| 295 | + | - | - | + | - | Verbindung enthält vermutlich eine COOH-Gruppe |
| 313 ⁵ | + | - | - | - | - | Verbindung enthält vermutlich eine COOH-Gruppe |
| | - | Thr ³ | N-Phe C-Gly/Glu/Lys | - | - | Alle Hinweise auf terminale AS stammen von der selben m/z-Differenz = 148 (Ausnahme Gly); Keine entsprechenden Peptidstrukturen möglich |
| 339 | + | - | - | - | - | Verbindung enthält vermutlich eine COOH-Gruppe |
| | - | Asn ³ | N-Glu, Ile/Leu, Met C-Ile/Leu, Met ³ | - | - | Verbindung ggf. auch aus Aminosäuren aufgebaut; aber keine entsprechenden Peptidstrukturen möglich |
| 348 | (+) ² | - | - | - | - | Verbindung enthält wahrscheinlich CONH ₂ -Gruppe (348-331=17) |
| 353 | (+) ² | Ala ³ | N-Ser, Gly, Cys ³ | - | - | Keine entsprechenden Peptidstrukturen möglich |
| 390 | (+) ⁴ | - | N-Val C-Val ³ | (+) ⁴ | - | Mögliche Peptidstrukturen: Val-Ala-Thr-Val/Val-Thr-Ala-Val Val-Gly-Asp-Val/Val-Asp-Gly-Val |
| 499 | + | - | - | (+) ⁴ | - | > 100 verschiedene m/z-Verhältnisse detektierbar, Signalpaare daher nicht zuordbar |
| 699 | - | - | - | - | - | MS/MS-Spektrogramme unterscheiden sich in beiden LC-Gradienten |
| 715 | - | Thr ^{3,6} , Arg ^{3,6} | N-Val ^{3,6} C-Ala ³ | - | (+) ⁴ | Hinweise auf Peptidstruktur: Val-(Thr, Arg, X)-Ala; X ggf. His und Met |

Kompl. Ionen komplementäre Ionen; X ggf. unbekannte AS-Sequenz; - nicht detektierbar/kein Hinweis; + detektierbar/Hinweis

¹ Differenzen von $m/z = 28$ sind auch bei Abspaltung von Carbonylgruppen an Aldehyden/Ketonen (C=O-Bindung, die nicht Teil einer Peptidbindung ist) denkbar

² ggf. an Molekülbruchstücken

³ Hinweise nur durch Differenzen zwischen Mutterion und Bruchstücken bzw. zwischen Bruchstücken

⁴ geringe Intensität

⁵ das Ion mit $m/z = 315$ war in drei dicht nebeneinander liegenden Peaks detektierbar

⁶ nicht in beiden Gradienten ermittelbar

3.3.3.4 Abschließende Wertung

3.3.3.4.1 LC-MS-Untersuchungen der Pansensaftproben

Peptidscreening von physikalisch aufbereiteten Pansensaftproben mittels LC-MS-Technik scheint nicht ohne Weiteres möglich zu sein, obwohl sich die Hauptsäule nach Herstellerangaben (Fa. Phenomenex, Torrance, CA, USA, 2008) durch effektive Aufreinigung sowie hohes Auflösungsvermögen von Peptiden ähnlicher Länge auszeichnet. Die gewählte mittlere Säulenlänge erlaubte es, unter Erhalt der Trennleistung mit relativ niedrigen Drücken zu arbeiten, die 4 µm im Durchmesser messenden Partikel sollten zu effizienterer Trennung führen als die üblichen 5 µm (GUZZETTA 2007). Zur Peptidanalytik werden normalerweise stationäre Phasen aus hydrophoben Alkylketten verwendet, die Längen zwischen acht (C8-Säulen; TROXLER et al. 1999; SUN et al. 2007; CABRAS et al. 2010) und 18 C-Atomen (C18-Säulen; OOSTERKAMP et al. 1998; FOETTINGER et al. 2006; PASILIS et al. 2008; GROENGIESSER et al. 2009; CABRAS et al. 2010; CHENG et al. 2010; VU et al. 2010) aufweisen. Die C8-Säulen binden vor allem hydrophile Peptide, wohingegen C18-Säulen diese nicht gut binden können (GUZZETTA 2007). Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine C12-Säule, die auch die Analytik hydrophober Peptide, die größere Resistenz gegen ruminalen Abbau zeigen (CHEN et al. 1987 a), ermöglichen sollte. Die Flussraten lagen nach GUZZETTA (2007) mit 0,2 und 0,3 mL/min für Säulen mit 3 mm Durchmesser in einem üblichen Bereich, die Trennung des Probengemisches erfolgte bei 40 °C und beugte Retentionszeitveränderungen durch Raumtemperaturschwankungen vor (GUZZETTA 2007). Dass Probenpeaks erst später als die Standardpeptidepeaks detektiert wurden, spricht zunächst -wie erwartet (s.o.)- für das Vorliegen hydrophober Peptide.

Andererseits werden in der Literatur je nach Fütterung und Probenentnahmezeitpunkt Peptidkonzentrationen in bovinem Pansensaft von 0,0036 (WILLIAMS u. COCKBURN 1991) bis 2,60 mmol/L (CHEN et al. 1987 a) angegeben²⁷ (s. Kap. 2.1.2.1). Die ESI-Methode benötigt zur Analytik 10 bis 100 pmol eines einzelnen Peptids (REHM u. LETZEL 2010), was bei einem Injektionsvolumen von 10 µL einer Peptidkonzentration von 1 bis 10 µmol/L in der Probe entspricht und die maximale ermittelte Peptidgesamtkonzentration von 2,60 mol/L um das 2600-fache unterschreitet. Da die Peptid-N-Konzentration aber bereits drei bis fünf Stunden nach der Fütterung stark abfällt (BRODERICK u. WALLACE 1988; WILLIAMS u. COCKBURN 1991; VOLDEN et al. 2002) und dann maximale Konzentrationen von 0,352 mmol/L erreicht werden (drei Stunden nach der Fütterung²⁷; WILLIAMS u. COCKBURN 1991) ist es möglich, dass einzelne, unterschiedliche Peptide nicht mehr in ausreichender Konzentration im Pansensaft des Spendertiers enthalten waren. In diesem Fall wären andere Substanzen detektiert und als LC-Chromatogrammpeaks dargestellt worden. Hinzu kommen ausgeprägte Matrixeffekte, die die Erkennung einzelner Peaks möglicherweise erschwert bzw. verhindert oder eventuell vorhandene Peptidepeaks sogar überdeckt haben. So ist von anderen komplexen biologischen Matrices wie Serum, Speichel und Harn bekannt, dass Hintergrundeffekte das Erkennen eines Peptidmusters sogar nahezu unmöglich machen können. Abhilfe schaffen aufwendige Trennverfahren vor der LC-MS-Analyse oder möglicherweise auch die Nutzung computergestützter Algorithmen bei der Auswertung (PUSCH et al. 2003).

²⁷ Umrechnung aus in mg Peptid-N/L angegebenen Peptidgehalten. Bei der Umrechnung wurde angenommen, dass jedes Peptid fünf AS lang ist und nur ein N-Atom enthält.

3.3.3.4.2 LC-MS/MS-Untersuchungen der Pansensaftproben

Die LC-MS/MS-Analysen ausgewählter Molekülionen (s. Kap. 3.3.3.3) lieferten nur vereinzelt Hinweise darauf, dass es sich bei diesen um Peptidionen handelte. Unter anderem deuten m/z -Differenzen von 17 und 18 auf neutrale Verluste in Form von NH_3 und H_2O hin, die besonders beim Vorhandensein saurer und basischer AS-Reste auftreten sollen (BAFNA u. EDWARDS 2003). Ähnlich wie hydrophobe Peptide (CHEN et al. 1987 a) sind auch saure Peptide im Pansen eher langsam abbaubar (WALLACE u. McKAIN 1989 b; WALLACE et al. 1993 a; DEPARDON et al. 1998) und neben Ersteren am ehesten in Pansensaftproben zu erwarten. Hinweise auf Glutamat finden sich bei den Ionen mit $m/z = 313$ und 339. Außerdem gibt es bei dem Molekülion mit dem m/z -Verhältnis von 353 Hinweise auf N-terminal gelegenes Glycin, so dass es sich bei diesem Ion möglicherweise um ein schwer ruminal abbaubares Tripeptid mit Gly_2 -Rest am N-Terminus (WALLACE et al. 1993 a) handeln könnte. In ruminal persistierenden Peptidmolekülen reichern sich außerdem Serin, Valin und Lysin an (DEPARDON et al. 1996). Bei den untersuchten Molekülionen wurden dementsprechend häufiger Hinweise auf Valin gefunden und m/z -Differenzen in den Spektren der Ionen mit $m/z = 313$ bzw. 353 entsprechen C-terminalem Lysin bzw. N-terminalem Serin. Auf Threonin und Phenylalanin, die eher in geringerem Umfang in persistierenden Peptiden vorkommen (DEPARDON et al. 1996), gibt es lediglich in drei Fällen Hinweise (s. Tab. 3.21).

Zu beachten ist, dass viele Peptide unvollständig fragmentieren und selten mit ausreichender Gewissheit genügend AS-Monomere zur Strukturaufklärung identifiziert werden können. Auch komplementäre Ionen, die durch Spaltung einer Peptidbindung entstehen, fehlen häufig (BAFNA u. EDWARDS 2003).

Weitere Schwierigkeiten ergeben sich bei der MS/MS-Spektrogrammauswertung infolge Bildung mehrfach geladener Peptidionen in ESI-Quellen, durch die die Spektrenkomplexität stark zunimmt (GASKELL 1997; REHM u. LETZEL 2010). Der zur Auswertung genutzte Algorithmus (s. Abb. 3.14) berücksichtigt ihre Existenz nicht und war somit möglicherweise nicht in der Lage, die molekulare Struktur der untersuchten Molekülionen, sofern es sich um Peptidionen handelte, zu ermitteln. Eine Weiterentwicklung der ESI-MS-Technik, sogenanntes DESI²⁸-MS, reduziert das Auftreten mehrfach geladener Ionen (PASILIS et al. 2008) und könnte die Auswertung vereinfachen.

3.3.3.4.3 Zusammenfassung

Mittels LC-MS-Technik ließen sich Peaks bisher nicht identifizierter Substanzen in Pansensaftproben darstellen. MS/MS-Spektrogramme lieferten vereinzelt Hinweise darauf, dass es sich bei einigen der detektierten Molekülionen möglicherweise um Peptide handelte. Nicht auszuschließen ist aber, dass im Besonderen die Hinweise auf AS zufällige m/z -Differenzen darstellen und Peptide auf Grund zu geringer Konzentration gar nicht detektiert bzw. von Matrixeffekten überlagert wurden.

²⁸ DESI = Desorption Electrospray Ionization: Der Analyt wird durch das Elektrospray eines Lösungsmittels direkt von einer Oberfläche wie beispielsweise einer Dünnschichtchromatographieplatte aufgenommen und in das Massenspektrometer eingespeist (WISEMAN u. LAUGHLIN 2007).

3.4 Datenerfassung und statistische Auswertung

Die während der Versuche erhobenen Messdaten wurden mittels Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmont, WA, USA) erfasst. Statistische Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms SPSS (Version 11.5 der Fa. SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

Die bei der Durchführung des t-Tests für abhängige Stichproben genutzte SPSS-Prozedur [T-TEST PAIRS = ...] erbrachte folgende Aussagen:

- Mittelwerte \bar{x}
- Standardabweichungen s
- Differenzsignifikanzen p gegenüber der Kontrolle

Bei den Berechnungen wurden die Messdaten der Fermenterpaare ($KF_{1,2}$, $VF_{3,4}$ und $VF_{5,6}$) aller drei Läufe der jeweiligen Laufgruppe (s. Kap. 3.2.4, Tab. 3.7) separat für jeden Versuchstag in arithmetischen Mittelwerten \bar{x} zusammengefasst ($n = 6$). Anschließend erfolgte der Vergleich der Mittelwerte \bar{x} der Versuchsfermenter mit denen der jeweiligen Kontrollfermenter.

Zusätzlich wurden die Zusammensetzungen der fAS-Pools in der Fermenterflüssigkeit während der einzelnen Versuchsphasen berechnet. (s. Kap. 4.5). Einfaktorielle univariate Varianzanalysen [Prozedur ANOVA] in Kombination mit Post Hoc Tests nach Scheffé erlaubten in Kontroll- und Auslaufphasen und in den Versuchsphasen bei Zulagen von K01 die Ermittlung von Konzentrations- bzw. Anteilsabweichungen in einzelnen Laufgruppen. Mittels t-Test für abhängige Stichproben [T-TEST PAIRS = ...] wurden in den Versuchs- und Auslaufphasen die fAS-Pools unter bzw. nach Kontroll- und Schadgrassilagezulagen miteinander verglichen. Der t-Test für unabhängige Stichproben [T-Test Groups = ...] ermöglichte den Vergleich der fAS-Pools in den Auslaufphasen nach Zulagen von K01 mit denen der Kontrollphasen.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Mittelwerte der in den Kontrollfermentern (KF₁ und KF₂) unter Zulagen von K01 gemessenen Ammoniakkonzentrationen, Gehalte bakteriellen Proteins, Konzentrationen der freien AS (fAS) sowie ihrer Summe und biogenen Amine den entsprechenden Mittelwerten in den Versuchsfermentern (VF_{3,4} und VF_{5,6}) gegenüber gestellt. Jeder Mittelwert an einem Versuchstag (KF_{1,2}, VF_{3,4}, VF_{5,6}) errechnet sich nach Tabelle 4.1 aus insgesamt sechs Messungen (jeweils gleiche Zulage in zwei Fermentern über drei Läufe). Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (s) und die Signifikanz der Differenzen (p) sind den Tabellen 9.10 bis 9.105 des Anhangs zu entnehmen. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle werden in den Diagrammen der Abbildungen 4.1 bis 4.20 wie folgt gekennzeichnet:

* schwach signifikant ($p < 0,05$)

** signifikant ($p < 0,01$)

*** hoch signifikant ($p < 0,001$)

Kapitel 4.5 beschäftigt sich mit den Zusammensetzungen der fAS-Pools in der Fermenterflüssigkeit während der einzelnen Versuchsphasen (Kontroll-, Versuchs- und Auslaufphase; zur Einteilung der Versuchsphasen s. Abb. 3.8).

Tab. 4.1: Beschickung der Kontroll- und Versuchsfermenter mit den einzelnen Grassilagen während der Versuchsphase (s. Kap. 3.2.4 und Tab. 3.7)

| Laufgruppe | Läufe | Fermentereinheiten | | |
|------------|------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | | KF _{1,2} | VF _{3,4} | VF _{5,6} |
| I | 2, 3, 4 | K01 | S02 | S04 |
| II | 5, 6, 7 | K01 | S05 | S107 |
| III | 8, 9, 10 | K01 | S08 | S09 |
| IV | 11, 12, 13 | K01 | S10 | S11 |
| V | 16, 17, 18 | K01 | S13 | S12 |

KF Kontrollfermenter; VF Versuchsfermenter

Eine genaue Betrachtung der Gehalte einzelner Nährstoffe (s. Tab. 3.5 und 3.6) und der Energiegehalte in den eingesetzten Grassilagen findet sich bei GAST (2010). Die Gesamtgehalte an Aminosäuren und die Gehalte an Ammoniak und freien Aminosäuren, sowie die Anteile letzterer am Aminosäuregesamtgehalt können wiederum den Tabellen 9.2 bis 9.5 [g/kg TS] bzw. den Tabellen 9.2, 9.6 und 9.7 [mmol/kg TS] entnommen werden. Die Abbildungen 5.2 bis 5.4 stellen die Gehalte an (freien) Aminosäuren graphisch dar.

Die Tabelle 3.7 zeigt ferner die täglichen Einwaagen an TS, NEL, Rp, RE, AS, fAS und Ammoniak in den jeweiligen Fermentern während der Versuchsphase.

Des Weiteren wurde ein Vergleich zwischen dem in die Fermenter verbrachten Stickstoffs und dem in N-Verbindungen im RUSITEC wiedergefundenen Stickstoffs erstellt (s. Kap. 9.15). Eine vollständige Bilanzierung ist jedoch nicht möglich, da in dieser Arbeit lediglich ausgewählte Parameter der ruminalen Eiweißfermentation in der Fermenterflüssigkeit erhoben wurden. Zur exakten Berechnung fehlen detaillierte Angaben zu den Stickstoffgehalten in den Futterrückständen und der Überstandflüssigkeit.

4.1 Ammoniakkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.1 sowie Tab. 9.10, 9.28, 9.46 9.66 und 9.86)

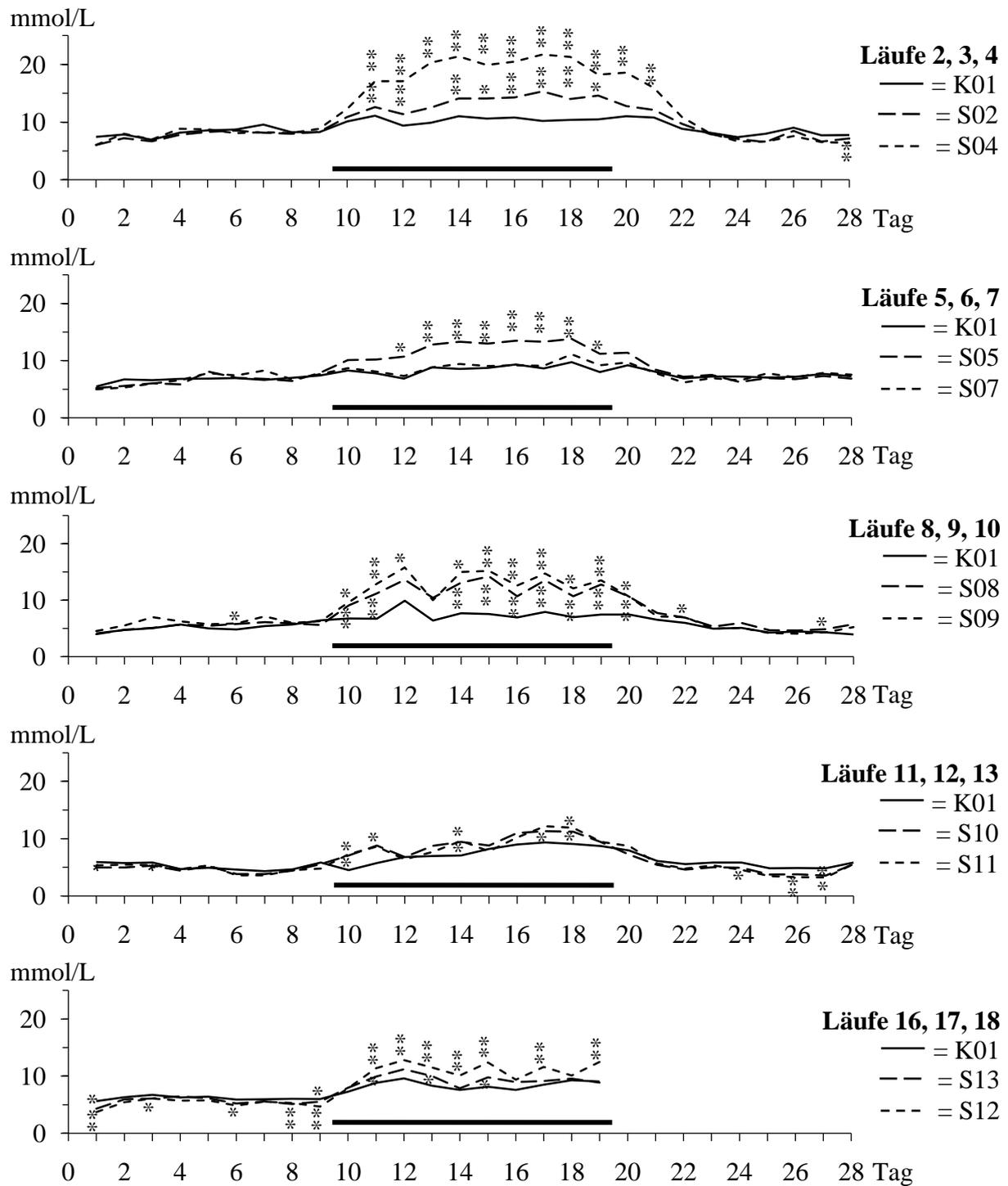


Abb. 4.1: Ammoniakkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [mmol/L]
(Mittelwerte $n = 6$); **—** = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}) und S04 (VF_{5,6})]

Während der Einlauf- und Kontrollphase lagen die Ammoniakkonzentrationen in allen Fermentern zwischen 6 und 10 mmol/L. In der Versuchsphase stiegen sie in KF_{1,2} (K01) leicht an (10 bis 11 mmol/L), während sie sich bei Zulagen von S04 (VF_{5,6}) bis Tag 14 deutlich (21,4 mmol/L) erhöhten und auf diesem Niveau verharrten ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$). Bei Zulagen von S02 wurden über die gesamte Versuchsphase um ca. 1 bis 5 mmol/L höhere Ammoniakkonzentrationen als bei Zulagen von K01 gemessen. Nach dem Ende der Versuchsphase sanken die Konzentrationen in allen Fermentereinheiten. Ab Tag 22 wurden unabhängig von den Zulagen ähnliche Werte wie in der Kontrollphase erreicht.

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}) und S07 (VF_{5,6})]

In der Versuchsphase stiegen mit Zulagen von K01 und S07 die Ammoniakkonzentrationen minimal an, und erreichten ab Tag 21 wieder Werte wie in der Kontrollphase. Die Konzentrationsverläufe bei Zulagen von K01 und S07 waren annähernd deckungsgleich. Unter S05-Zulagen stiegen die Konzentrationen bis Tag 13 langsam an, von Tag 14 bis Tag 18 wurden gegenüber K01 mit Werten zwischen 13,0 und 13,8 mmol/L höhere Konzentrationen erreicht ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$). Ab Tag 19 nahmen diese in VF_{3,4} (S05) ab und erreichten ab Tag 21 wieder das gleiche Niveau wie in KF_{1,2} (K01) und VF_{5,6} (S07).

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Der Konzentrationsverlauf in KF_{1,2} (K01) unterschied sich lediglich durch ein etwas niedrigeres Niveau von dem in den Laufgruppen I und II (s. Abb. 4.1). Sowohl bei Zulagen von S08 als auch S09 nahmen die Ammoniakkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit bis Tag 12 überwiegend signifikant zu und erreichten Werte von 13,6 bzw. 15,8 mmol/L. Bis Tag 19 schwankten sie in VF_{3,4} (S08) mit einer Breite von ca. 4 mmol/L um einen Wert von 12 mmol/L ($p < 0,01$). Bei Zulagen von S09 (VF_{5,6}) lagen sie leicht darüber (ca. 13 mmol/L mit einer Schwankungsbreite von ca. 5 mmol/L; $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Ab Tag 20 nahmen die Konzentrationen in den VF ab und erreichten an Tag 23 wieder Konzentrationen um 5 mmol/L.

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Unter Zulagen von K01 zeigte sich der gleiche Verlauf wie in den übrigen Laufgruppen. Während Einlauf- und Kontrollphasen lagen die Konzentrationen aber mit ca. 5 mmol/L, Spitzenwerten von 9,35 mmol/L in der Versuchsphase und Werten um 4 bis 6 mmol/L in der Auslaufphase etwas niedriger als in den Laufgruppen I und II. Beide Schadgrassilagezulagen (S10 und S11) bewirkten teilweise schwach signifikante Konzentrationsanstiege bis Tag 17 auf 11,3 bzw. 12,2 mmol/L. Danach sanken die Konzentrationen in VF_{3,4} (S10) und VF_{5,6} (S11) ab und erreichten bereits an Tag 20 ähnliche Werte wie in KF_{1,2}.

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Hier zeigte sich in den KF (K01) ein ähnlicher Verlauf wie in Laufgruppe IV. Sowohl S13 als auch S12 bewirkten leicht höhere Ammoniakkonzentrationen als K01 ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Unter Zulagen von S13 schwankten die Konzentrationen um ca. 10 mmol/L, unter S12-Zulagen um ca. 12 mmol/L.

4.2 Gehalt bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit
(s. Abb. 4.2 sowie Tab. 9.11, 9.29, 9.47, 9.67 und 9.87)

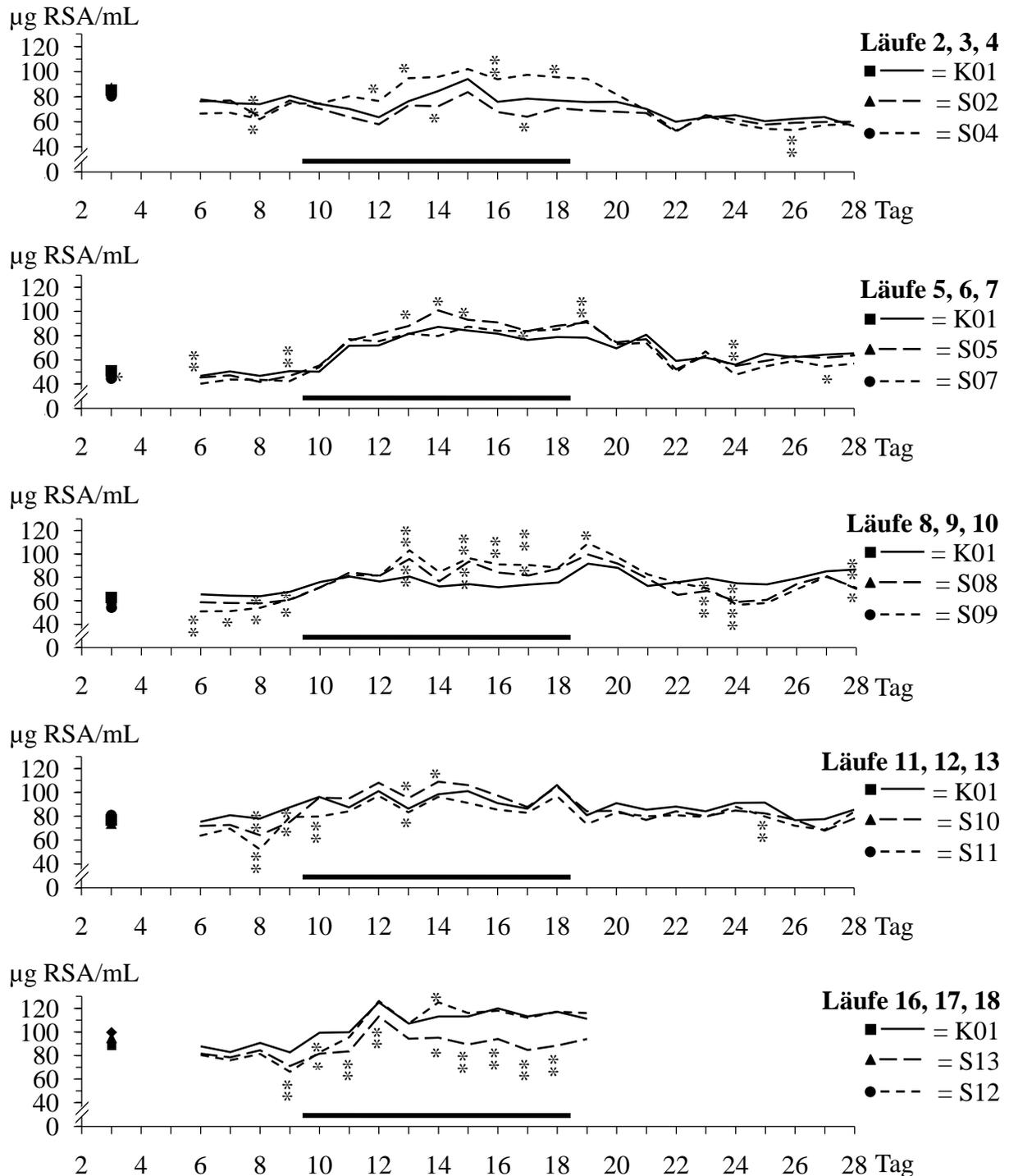


Abb. 4.2: Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{g RSA/mL}$] (Mittelwerte $n = 6$); **—** = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}) und S04 (VF_{5,6})]

In KF_{1,2} (K01) sanken die Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit bis Tag 12 von 85,4 auf 63,6 µg RSA/mL ab, stiegen anschließend bis Tag 15 an (94,2 µg RSA/mL) und fielen dann mit geringen Schwankungen bis zum Versuchsende auf 56,5 µg RSA/mL. Zulagen von S02 bewirkten einen ähnlichen Verlauf, die Gehalte lagen aber während der gesamten Versuchsphase um 7 µg RSA/mL und somit vereinzelt schwach signifikant unter denen der Kontrolle K01. In VF_{5,6} (S04) sanken die Gehalte bis Tag 8 ab und nahmen dann bis Tag 13 zu. Von Tag 13 bis Tag 19 wurden mit Zulagen von S04 Gehalte zwischen 94,0 und 102 µg RSA/mL gemessen (ca. 15 µg RSA/ml höher als in KF_{1,2}; p teilweise < 0,05 bzw. p teilweise < 0,01). Zum Versuchsende glichen sich die Gehalte an.

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}) und S07 (VF_{5,6})]

In Einlauf- und Kontrollphase schwankten die Messwerte in allen Fermentereinheiten zwischen 40,2 und 50,9 µg RSA/mL. Ab Tag 10 stiegen die Gehalte an, so dass von Tag 13 bis Tag 19 Werte zwischen 76,5 und 101 µg RSA/mL erreicht wurden. Die Gehalte nach Zulagen von S05 (VF_{3,4}) lagen während der Versuchsphase teilweise schwach signifikant bzw. signifikant höher (~ 7 µg RSA/mL) als in KF_{1,2} (K01). Mit Versuchsphasenende nahmen die Proteingehalte unter Schwankungen ab und stabilisierten sich in der Auslaufphase bei Werten um 60 µg RSA/mL, wobei nach S07-Zulagen die niedrigsten Gehalte gemessen wurden.

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Die Gehalte bakteriellen Proteins lagen während der Kontrollphase auf unterschiedlichen Niveaus, wobei die Gehalte in den VF überwiegend schwach signifikant unter denen der KF lagen (KF_{1,2} > VF_{3,4} > VF_{5,6} s. Abb. 4.2). Mit Zulagen der Grassilagen stiegen sie an, bis an Tag 11 in allen Fermentern Werte zwischen 80 und 85 µg RSA/mL zu messen waren. Wurden S08 und S09 zugelegt, stiegen die Gehalte weiter an, so dass in VF_{3,4} (S08) an den Tagen 10 bis 20 Konzentrationen um 86 µg RSA/mL, in VF_{5,6} (S09) um 90 µg RSA/mL und somit schwach bis hoch signifikant höhere Gehalte als bei Zulagen von K01 gemessen wurden. Während der Auslaufphase sanken die Konzentrationen in VF_{3,4} (S08) und VF_{5,6} (S09) zunächst unter Kontrollniveau ab (p < 0,05 bzw. p < 0,01), stiegen zum Versuchsende aber wieder an.

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Wie in Laufgruppe III lagen die Proteingehalte in Einlauf- und Kontrollphase auf unterschiedlichen Niveaus (KF_{1,2} > VF_{3,4} > VF_{5,6}; s. Abb. 4.2). Mit Zulage aller drei Grassilagen stiegen die Gehalte leicht an, wobei mit Zulagen von S10 die höchsten Werte (p vereinzelt < 0,05), gefolgt von K01- und S11-Zulagen, erreicht wurden. In allen Fermentern verringerten sich die Gehalte in der Auslaufphase leicht und stabilisierten sich bei geringfügig höheren Werten gegenüber der Einlauf- und Kontrollphase.

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Von Tag 6 bis Tag 9 wurden Gehalte zwischen 66,3 und 90,7 µg RSA/mL gemessen, wobei selbige in KF_{1,2} (K01) höher lagen als in VF_{3,4} (S13) und VF_{5,6} (S12). Mit S12-Zulagen stiegen die Gehalte gegenüber der Kontrollphase am stärksten an (+ 47 %) und es wurden Werte (107 bis 126 µg RSA/mL an Tag 12 bis 19) wie unter K01-Zulagen (+ 30 %) erreicht. S13-Zulagen führten zu geringen Erhöhungen (+16 %) gegenüber der Kontrollphase, die gemessenen Gehalte lagen überwiegend signifikant unter denen der KF (K01).

4.3 Aminosäurenkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit

Die Ergebnisse der Aminosäurenmessung wurden mit unterschiedlichen Verfahren ausgewertet (s. Kap. 5.3.3 sowie Tab. 9.106 und 9.107). In diesem Kapitel entspricht die Darstellung der, die bereits für die Parameter Ammoniakkonzentration und Gehalt bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit genutzt wurde. Da die Kurvenverläufe für einzelne freie AS (fAS) nicht stets in allen drei zusammengehörigen Einzelläufen identisch waren, entsprechen die mittleren, in den Abbildungen 4.3 bis 4.18 dargestellten Verläufe nicht grundsätzlich den individuellen Verläufen. Bei erheblichen Abweichungen ist dies an entsprechender Stelle vermerkt. Weil einzelne fAS nicht an allen Tagen detektierbar waren, sind die jeweiligen n-Anzahlen der Übersichtlichkeit halber den Tabellen 9.13 bis 9.27 (Laufgruppe I), 9.31 bis 9.45 (Laufgruppe II), 9.49 bis 9.63 (Laufgruppe III), 9.69 bis 9.83 (Laufgruppe IV) und 9.89 bis 9.103 (Laufgruppe V) zu entnehmen.

Die Summe der fAS (s. Kap. 4.3.1) wurde berechnet und beinhaltet die gemessenen Aspartat-, Glutamat-, Serin-, Histidin-, Glycin-, Threonin-, Alanin-, Arginin-, Tyrosin-, Valin-, Methionin-, Tryptophan-, Phenylalanin-, Isoleucin- und Leucinkonzentrationen.

Die Gesamtgehalte an Aminosäuren und die Gehalte freier Aminosäuren in den einzelnen eingesetzten Grassilagen können den Tabellen 9.2 bis 9.5 [g/kg TS] bzw. den Tabellen 9.2, 9.6 und 9.7 [mmol/kg TS] entnommen werden. Ferner stellen die Abbildungen 5.2 und 5.3 selbige graphisch dar.

Die Höhe der täglichen Einwaagen an AS und fAS bei der täglichen Beschickung während der Versuchsphase kann Tabelle 3.7 entnommen werden.

4.3.1 Summe der gemessenen freien Aminosäuren in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.3 sowie Tab. 9.12, 9.30, 9.48, 9.68 und 9.88)

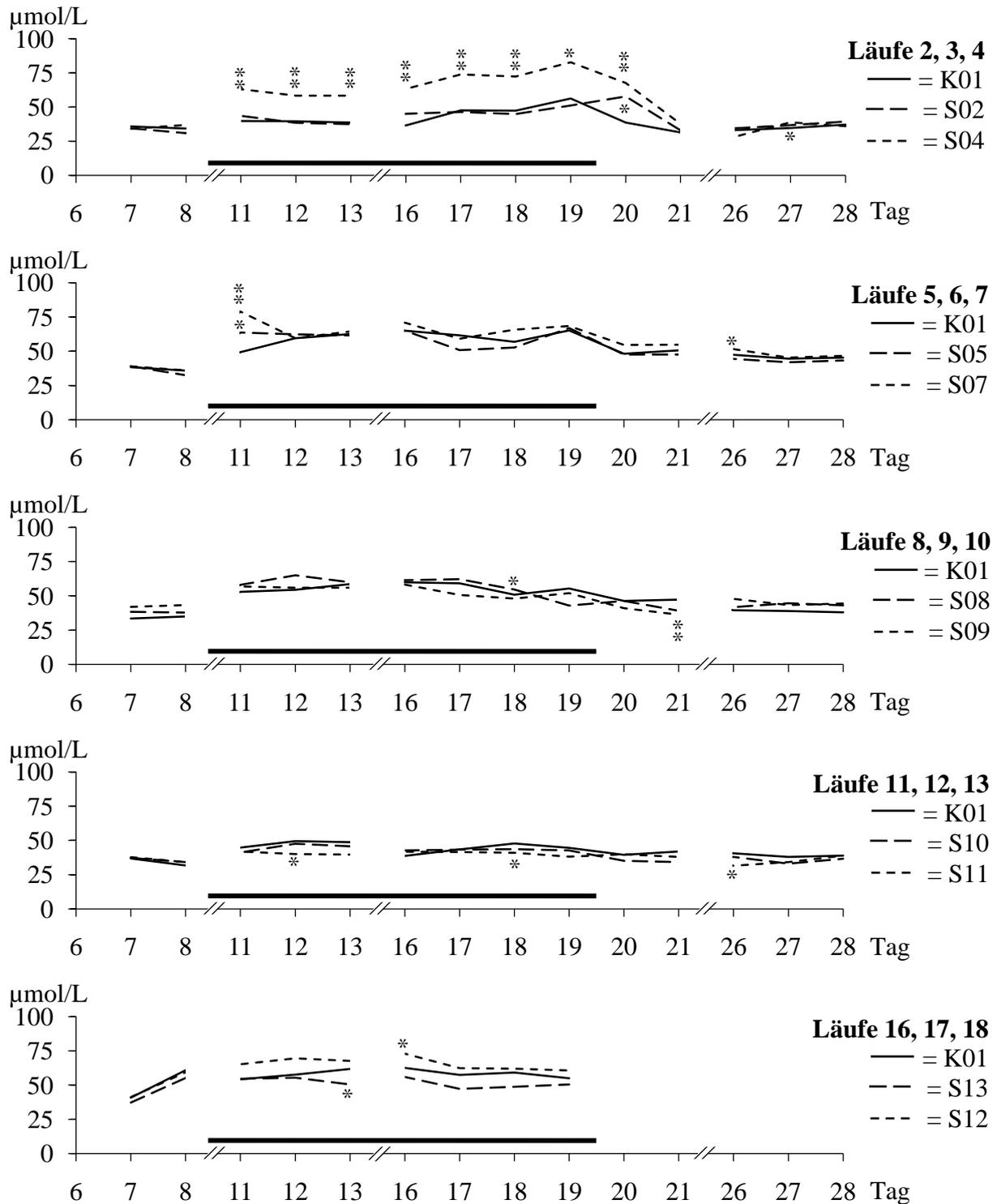


Abb. 4.3: Summen der gemessenen freien Aminosäuren in der Fermenterflüssigkeit [µmol/L]; **—** = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

In der Kontrollphase lagen die fAS-Gesamtkonzentrationen zwischen 30,9 und 36,9 µmol/L. K01 und S02 bewirkten langsames Ansteigen bis auf 56,3 bzw. 57,7 µmol/L an Tag 19 bzw. Tag 20, während die Konzentrationen unter Zulagen von S04 deutlich stärker anstiegen und bis Tag 19 überwiegend signifikant höhere Werte zwischen 68,4 bis 82,7 µmol/L erreichten. Ab Tag 19 (K01, S04) bzw. Tag 20 (S02) fielen die Konzentrationen und stabilisierten sich bereits an Tag 21 auf Kontrollphasenniveau.

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

Bei Zulagen von K01 erhöhten sich die Konzentrationen bis Tag 16 auf 64,9 µmol/L, bis Tag 19 wurde dieses Niveau gehalten. Abgesehen von einem höheren Wert an Tag 11 (63,6 vs. 49,3 µmol/L; $p < 0,01$) zeigte sich bei S05-Zulagen ein ähnlicher Verlauf. Der für S07 entsprach weitestgehend dem für S05, die Konzentrationen lagen aber während Versuchs- und früher bis mittlerer Auslaufphase leicht höher. In der Auslaufphase stellte sich in allen Fermentern ein geringgradig höheres Konzentrationsniveau als in der Kontroll- und der Auslaufphase der Laufgruppe I ein.

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Während der Versuchsphase lagen die Konzentrationen unter Zulagen von S08 tendenziell höher (p teilweise $< 0,1$), mit S09-Zulagen vereinzelt tendenziell niedriger als in KF_{1,2} (K01). Bereits in der Kontrollphase waren in VF_{3,4} (S08) aber bereits um ca. 4 µmol/L höhere Konzentrationen als in KF_{1,2} (K01) gemessen worden, wohingegen sie in VF_{5,6} (S09) um ca. 10 µmol/L höher gelegen hatten. In der späten Auslaufphase traten erneut ähnliche Unterschiede zwischen KF_{1,2} (K01) und den VF auf, während die Konzentrationen geringfügig höher lagen als in der Kontrollphase.

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Zulagen von K01 führten mit einem Maximalwert von 49,5 µmol/L zu geringeren Konzentrationssteigerungen als in den Laufgruppen II und III. S10 bewirkte einen ähnlichen Konzentrationsverlauf wie K01. Zulagen von S11 führten fast während der gesamten Versuchs- und Auslaufphase zu geringgradig, teilweise schwach signifikant niedrigeren Werten als K01.

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

In der Versuchsphase bewirkten Zulagen von S12 um ca. 7,4 µmol/L höhere, S13-Zulagen um ca. 6,4 µmol/L niedrigere Konzentrationen als K01 (p vereinzelt $< 0,05$).

4.3.2 Aspartatkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.4 sowie Tab. 9.13, 9.31, 9.49, 9.69 und 9.89)

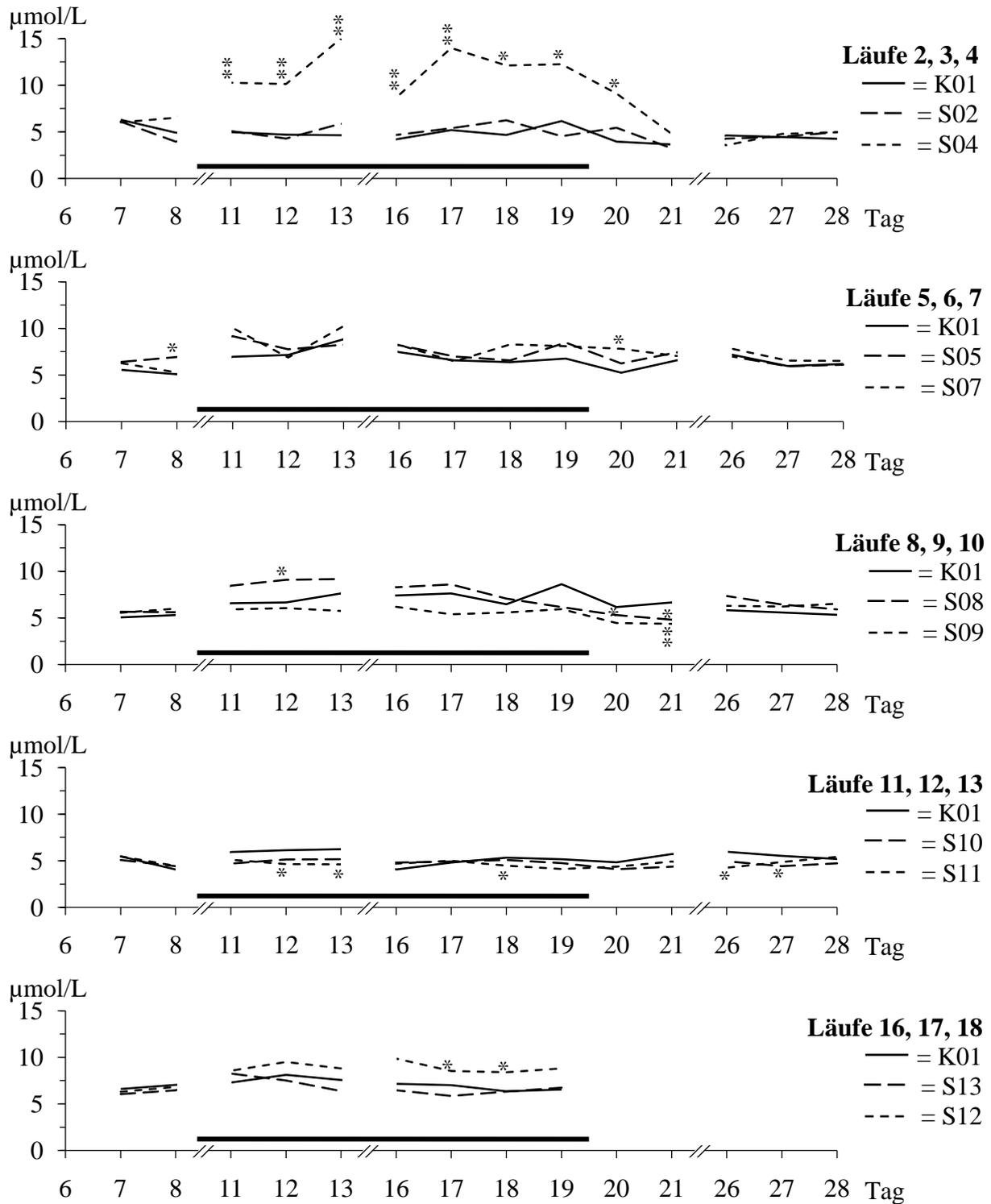


Abb. 4.4: Aspartatkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Zulagen von K01 und S02 bewirkten keine Steigerung der Aspartatkonzentrationen gegenüber der Kontrollphase, während die Konzentrationen unter Zulagen von S04 stark anstiegen und an den Tagen 13 und 17 mit 15,0 bzw. 14,0 µmol/L ($p < 0,01$) höchste Werte erreichten. In der Auslaufphase nahmen diese in VF_{5,6} (S04) wieder ab und glichen sich ab Tag 26 den Werten nach Zulagen von K01 und S02 an.

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

In der Versuchsphase stiegen die Konzentrationen unter Zulagen von K01 von ca. 5 µmol/L leicht bis auf 8,83 µmol/L an Tag 13 an. Die Zulagen von S07 bewirkten geringgradig höhere Konzentrationen. Fermenter mit S05-Zulagen wiesen trotz höherer Konzentrationen in der Kontrollphase ähnliche Konzentrationen wie KF_{1,2} (K01) auf.

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Zulagen von S08 bewirkten mit Konzentrationen zwischen 8,27 und 9,18 µmol/L zunächst geringfügig höhere Werte als K01 (p einmalig $< 0,05$). Ab Tag 18 sanken die Konzentrationen in VF_{3,4} (S08) bis auf 4,81 µmol/L an Tag 21 ab ($p < 0,05$) und lagen somit niedriger als in KF_{1,2}. In VF_{5,6} (S09) wurden während der gesamten Versuchsphase um 1,5 µmol/L geringere Konzentrationen als in KF_{1,2} (K01) gemessen. Während der Auslaufphase nahmen die Konzentrationen in den VF wieder zu und erreichten leicht höhere Werte als in KF_{1,2} (K01). Der Verlauf der Kurven war für S08 gegenüber K01 nicht in allen drei Einzelläufen identisch (s. Tab. 9.106).

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von K01 führten zu einem geringen Konzentrationsanstieg bis Tag 13 (6,23 µmol/L), ab Tag 26 lagen die Konzentrationen mit Werten zwischen 5,20 und 5,97 µmol/L wieder auf Kontrollphasenniveau. Bei Zulagen von S10 und S11 wurden über die gesamte Versuchsdauer Konzentrationen um 5 µmol/L gemessen. In VF_{3,4} (S11) lagen sie somit während der Versuchs- und Auslaufphase teilweise schwach signifikant unter denen der KF.

Die Kurvenverläufe unter S10-Zulagen waren im Vergleich mit der Kontrolle nicht in allen drei Einzelläufen gleich (s. Tab. 9.106).

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von S13 und S12 bewirkten ähnliche, bzw. leicht höhere (p vereinzelt $< 0,05$) Konzentrationen als K01-Zulagen.

Die Kurvenverläufe aus den Einzelläufen waren sehr heterogen und entsprachen nur bedingt denen in Abbildung 4.4 (s. Tab. 9.106).

4.3.3 Glutamatkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.5 sowie Tab. 9.14, 9.32, 9.50, 9.70 und 9.90)

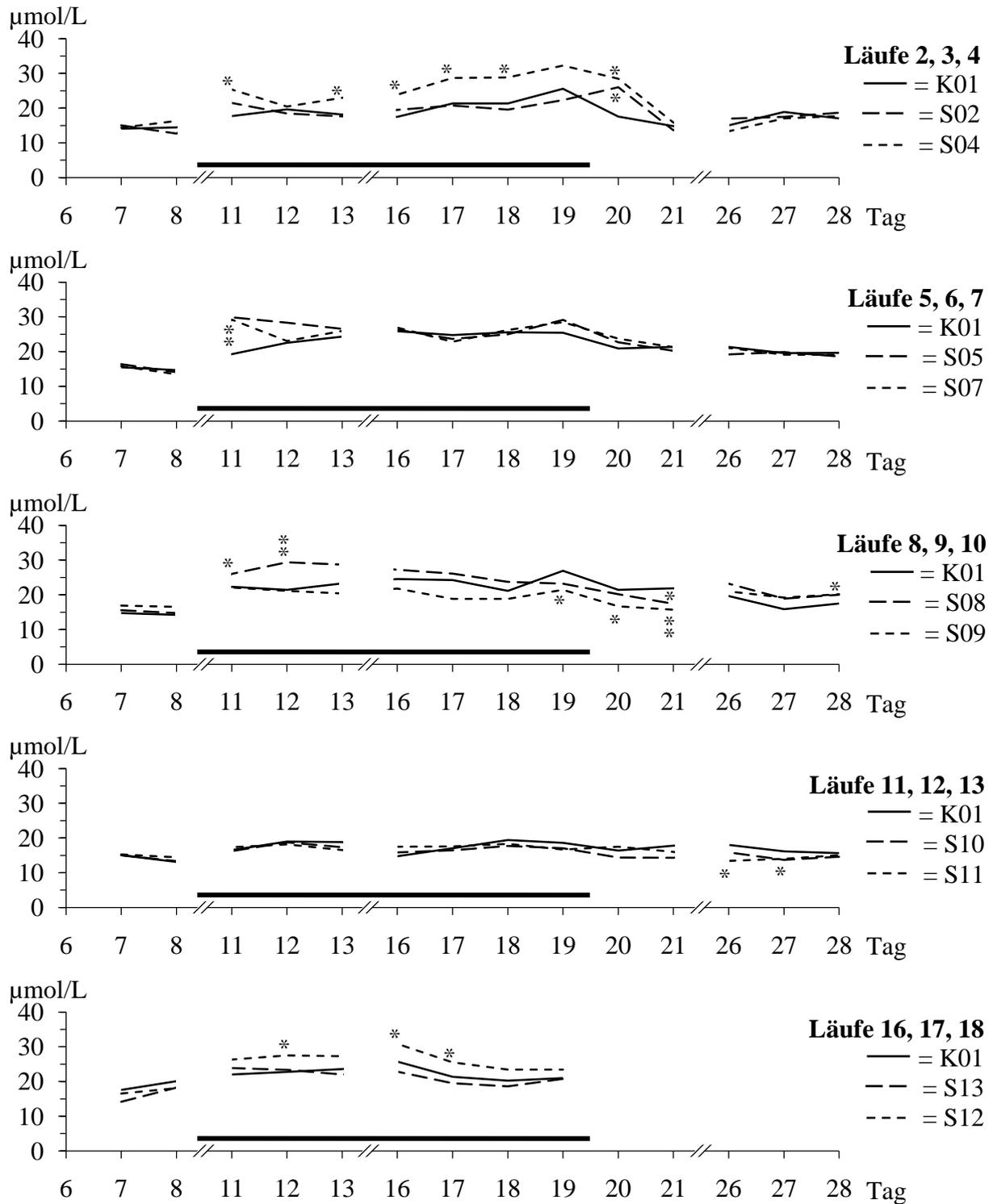


Abb. 4.5: Glutamatkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Unter Zulagen von K01 stiegen die Glutamatkonzentrationen von 14,1 µmol/L bis auf 25,5 µmol/L an Tag 19 an. S02 bewirkte einen ähnlichen Konzentrationsverlauf, während mit S04-Zulagen in der Versuchsphase um 5 bis 11 µmol/L höhere Konzentrationen als unter Zulagen von K01 erreicht wurden ($p < 0,05$). Ab Tag 19 (K01, S04) bzw. Tag 20 (S02) nahmen die Konzentrationen zunächst ab (ca. 15 µmol/L an Tag 21) und stabilisierten sich am Versuchslaufende bei geringgradig höheren Werten als in der Kontrollphase (17,0 bis 18,9 µmol/L).

Die individuellen Kurvenverläufe für S02 und S04 lagen in Lauf 2 unter, in den übrigen beiden Läufen über dem von K01 (s. Tab. 9.106).

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von K01 führten zu einem schnelleren Konzentrationsanstieg als in Laufgruppe I (bis 22,5 und 25,9 µmol/L an den Tagen 12 bis 13 und 16 bis 19). Nach deutlich höheren Anstiegen zu Beginn der Versuchsphase bewirkten S05 und S07 ($p < 0,01$) einen ähnlichen Verlauf wie K01.

Der Kurvenverlauf für S05 lag in Lauf 7, anders als in den Läufen 5 und 6, unter dem von K01 (s. Tab. 9.106).

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von S08 führten bei Versuchsphasenbeginn zu höheren Konzentrationen als K01, die zunächst bis Tag 12 anstiegen (29,3 µmol/L, $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$) und anschließend bis Tag 21 kontinuierlich abnahmen. S09-Zulagen bewirkten bis Tag 12 den gleichen Verlauf wie K01, anschließend lagen die Konzentrationen niedriger (p teilweise $< 0,05$). Wie mit S08 wurde auch mit S09 die niedrigste Konzentration an Tag 21 (15,7 µmol/L, $p < 0,01$) erzielt. An den letzten drei Tagen der Auslaufphase lagen die Gehalte in allen VF um ca. 3 µmol/L höher als in KF_{1,2} (K01).

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Unter den Zulagen von K01 wurden in der Versuchsphase Gehalte zwischen 14,7 und 19,4 µmol/L erreicht. S10- und S11-Zulagen bewirkten im Mittel ähnliche Werte wie K01, verhielten sich in den einzelnen Läufen gegenüber K01 aber nicht einheitlich (s. Tab. 9.106).

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Mit Zulagen von S12 wurden in der Versuchsphase um 2 bis 5 µmol/L höhere Konzentrationen als mit K01 erreicht (p vereinzelt $< 0,05$). Die Zulagen von S13 führten hingegen zu ähnlichen Konzentrationen wie in den KF.

4.3.4 Serinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.6 sowie Tab. 9.15, 9.33, 9.51, 9.71 und 9.91)

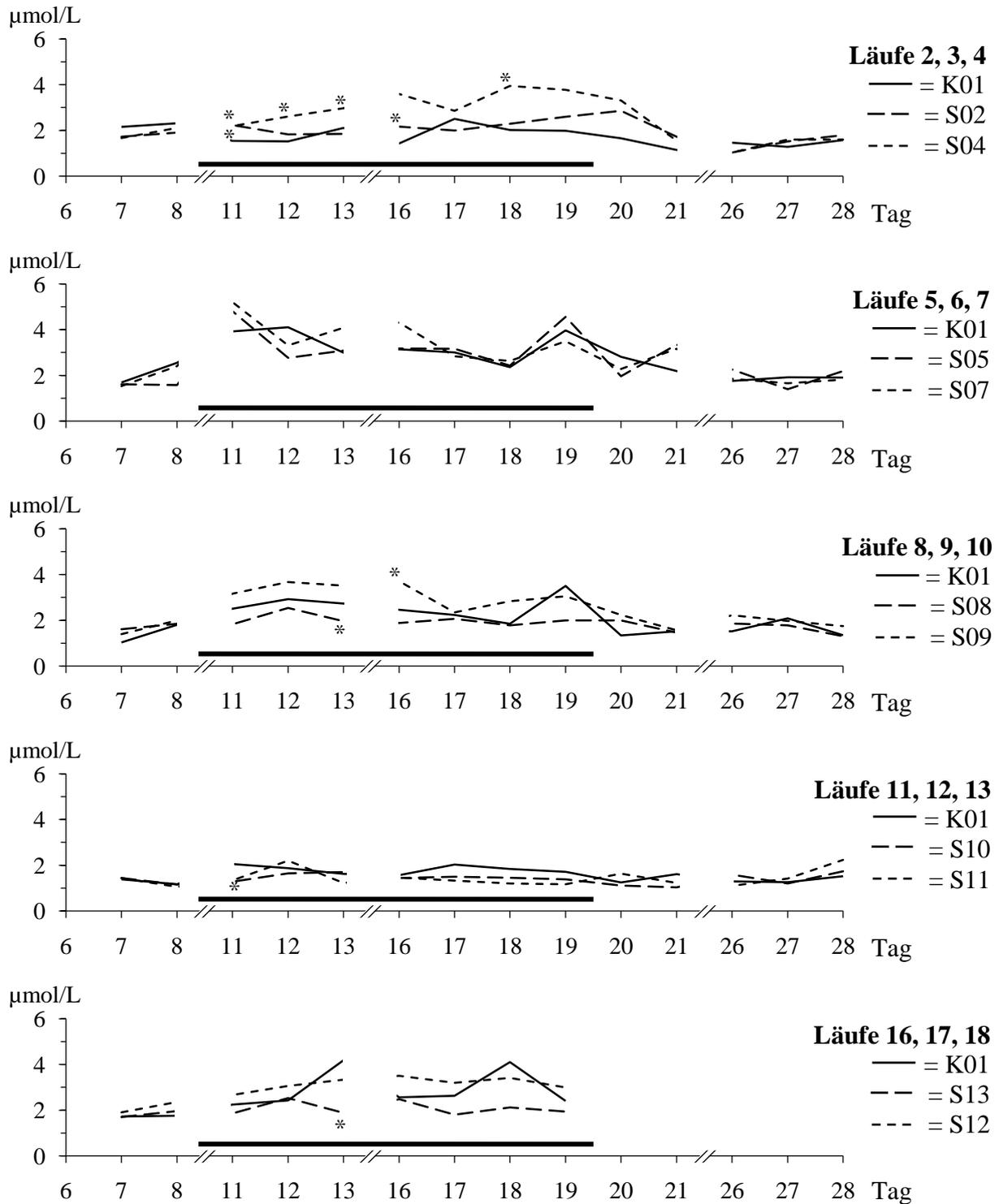


Abb. 4.6: Serinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];

— = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Unter den Zulagen von K01 wurden Serinkonzentrationen zwischen 1,43 und 2,51 µmol/L gemessen. S02-Zulagen führten zu ähnlichen Werten, während sie bei S04-Zulagen in der Versuchsphase auf bis zu 3,94 µmol/L anstiegen ($p < 0,05$). In der Auslaufphase verringerte sich nach Zulagen von K01 die Schwankungsbreite der gemessenen Konzentrationen (1,15 bis 1,58 µmol/L) und in den VF glichen sich die Konzentrationen denen in KF_{1,2} (K01) an.

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

In der Versuchsphase nahmen die Konzentrationen unter Zulagen von K01 leicht zu (2,36 bis 4,11 µmol/L). S05 und S07 bewirkten ebenfalls geringfügige Anstiege, die Schwankungsbreiten waren aber geringgradig größer als mit K01 (1,96 bis 4,80 bzw. 2,28 bis 5,20 µmol/L).

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

In VF_{3,4} (S08) verblieben die Konzentrationen während der Versuchsphase bis Tag 19 leicht unter denen in KF_{1,2} (K01; 1,77 bis 2,54 vs. 1,85 bis 3,50 µmol/L; p einmalig $< 0,05$). Die Zulagen von S09 führten zu einem geringgradig höheren Konzentrationsanstieg ($p < 0,05$ an Tag 16) mit geringeren Schwankungen als K01-Zulagen (2,35 bis 3,70 µmol/L).

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

In den VF lagen die Konzentrationen über die gesamte Versuchsdauer zwischen 1,11 und 2,20 µmol/L und damit leicht unter denen bei Zulagen von K01.

In den drei Einzelläufen (Läufe 11, 12 und 13) verhielten sich die Konzentrationen in den VF heterogen gegenüber denen in KF_{1,2} (K01). Abbildung 4.6 gibt die Auswirkungen der Silagen S10 und S11 nur eingeschränkt wieder (s. Tab. 9.106).

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Unter den Zulagen von K01 nahmen die Konzentrationen mit einer Schwankungsbreite von 1,93 µmol/L gegenüber der Kontrollphase im Mittel leicht zu. Bei S12-Zulagen wurden Konzentrationen auf dem Niveau von K01 erreicht, Schwankungen wie bei K01 fehlten jedoch. Unter Zulagen von S13 lagen die Gehalte teilweise schwach signifikant bzw. tendenziell niedriger als in KF_{1,2}.

4.3.5 Histidinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.7 sowie Tab. 9.16, 9.34, 9.52, 9.72 und 9.92)

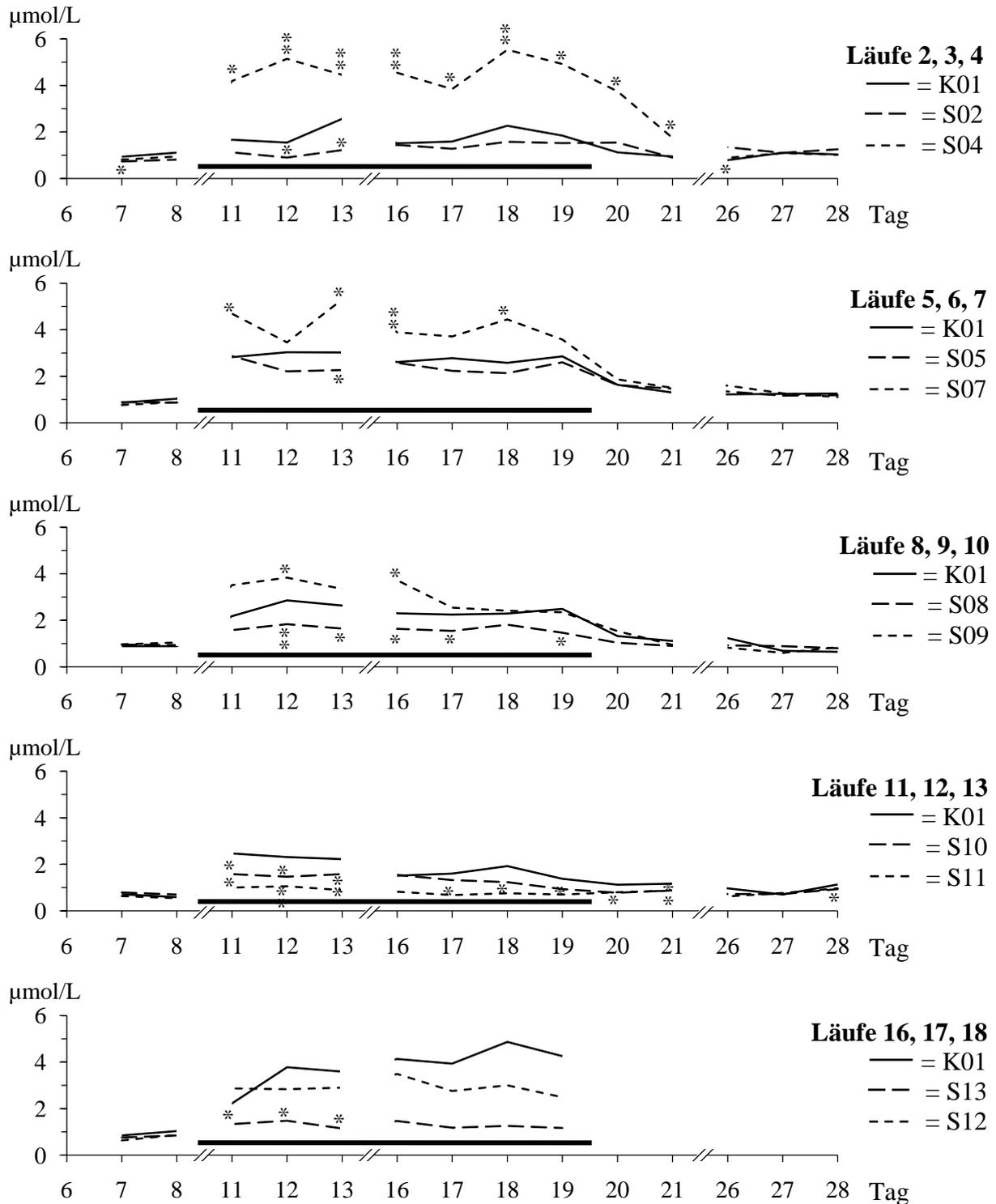


Abb. 4.7: Histidinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Unter den Zulagen von K01 stiegen die Histidinkonzentrationen gegenüber der Kontrollphase leicht an und erreichten an den Tagen 13 und 18 Werte von 2,57 bzw. 2,27 µmol/L. Die Zulagen von S02 bewirkten einen geringeren Konzentrationsanstieg als K01 ($p < 0,05$ an den Tagen 12 und 13; Ausnahme Lauf 2; s. Tab. 9.106) mit Höchstwerten von 1,57 (Tag 18) und 1,55 µmol/L (Tag 20). Wurde S04 zugelegt, zeigte sich ein starker Konzentrationsanstieg auf Werte von bis zu 5,53 µmol/L ($p < 0,01$). Während der gesamten Versuchsphase wurden 3,74 µmol/L in VF_{5,6} (S04) nicht unterschritten und die Konzentrationen lagen schwach signifikant bis signifikant über denen in KF_{1,2} (K01).

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von K01 bedingten Histidingehalte zwischen 2,57 und 3,03 µmol/L an den Tagen 11 bis 13 und 16 bis 19. Bei S05-Zulagen kam es zu einem geringeren Konzentrationsanstieg als mit K01 ($p < 0,05$ an Tag 13), die Zulagen von S07 führten zu teilweise schwach signifikant bis signifikant höheren Konzentrationen als Zulagen von K01 und somit zu ähnlich hohen Konzentrationen wie S04 (s. Laufgruppe I). Bereits ab Tag 21 stabilisierten sich die Gehalte in KF_{1,2} (K01), VF_{3,4} (S05) und VF_{5,6} (S07) auf leicht höherem Niveau als in der Kontrollphase.

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Unter Zulagen von S08 war gegenüber der Kontrollphase lediglich ein sehr geringer Konzentrationsanstieg zu beobachten (Maximalwert von 1,84 µmol/L), der während der gesamten Versuchsphase zu ca. 1 µmol/L niedrigeren Konzentrationen als bei K01 führte (p überwiegend $< 0,05$ bzw. $< 0,01$). Die Zulagen von S09 bedingten bis Tag 18 höhere Konzentrationen als K01 ($p < 0,05$ an den Tagen 12 und 16), danach verliefen die Kurven annähernd deckungsgleich.

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Beide Schadgrassilagezulagen (S10 und S11) bewirkten einen geringeren (S10) bzw. kaum sichtbaren (S11) Konzentrationsanstieg. Dies führte während der gesamten Versuchsphase für S11 zu deutlich niedrigeren (ca. -1 µmol/L) und für S10 zu geringgradig niedrigeren Werten im Vergleich mit K01 (p überwiegend $< 0,05$). Zu beachten ist, dass die Konzentrationsänderungen in Folge der Zulagen von S10 gegenüber der Kontrolle K01 zwischen den Einzelläufen schwankten (-2,38 bis -68,0 %; s. Tab. 9.106).

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von S13 führten ähnlich wie bei S08 zu geringfügig höheren Konzentrationen als in der Kontrollphase, die deutlich unter denen von KF_{1,2} (K01) lagen (im Mittel -66,3 %; $p < 0,05$ an den Tagen 12 bis 13). Bei Zulagen von S12 waren die Konzentrationen im Mittel 1 µmol/L niedriger als in KF_{1,2} (K01), die Kurvenverläufe in den Einzelläufen waren aber heterogen (s. Tab. 9.106).

4.3.6 Glycinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.8 sowie Tab. 9.17, 9.35, 9.53, 9.73 und 9.93)

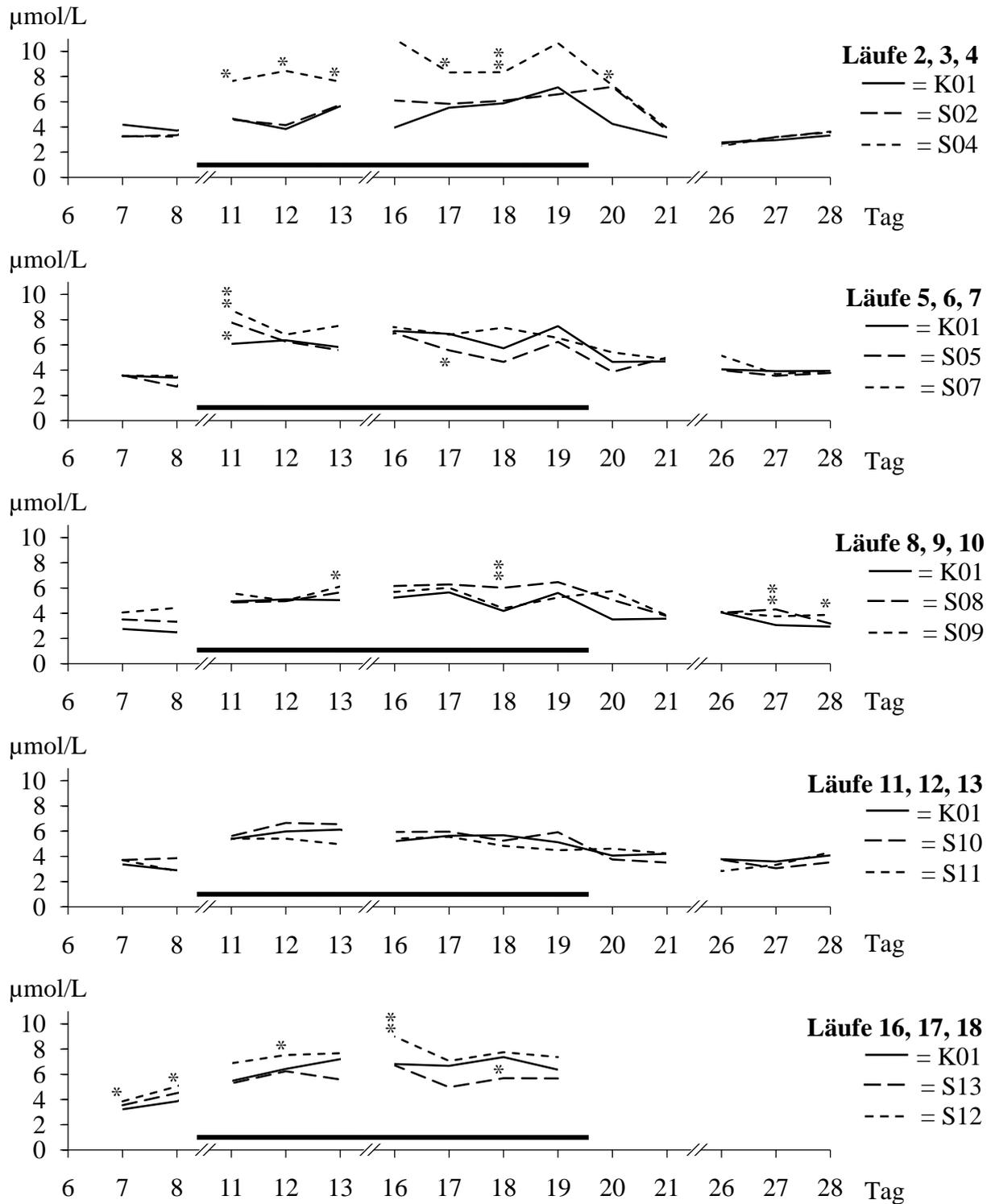


Abb. 4.8: Glycinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Der Konzentrationsverlauf bei Zulagen von S02 entsprach dem in KF_{1,2} (K01; leichter Anstieg in der Versuchsphase, Abfall in der Auslaufphase). S04-Zulagen bewirkten in der Versuchsphase um 2 bis 7 µmol/L höhere Konzentrationen als K01 (p überwiegend < 0,05 bzw. < 0,01).

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

K01 bewirkte einen ähnlichen Konzentrationsverlauf wie in Laufgruppe I. Die Kurven für S05 und S07 verliefen wiederum ähnlich der für K01, die für S05 lag aber in der Versuchsphase geringgradig unter (p einmalig < 0,05), die für S07 leicht über (p einmalig < 0,01) der von K01.

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

In KF_{1,2} (K01) waren ähnliche Konzentrationen wie in den Laufgruppen I und II zu messen. Zulagen von S09 bedingten ähnliche Gehalte wie K01, während S08 in der Versuchsphase zu geringfügig höheren Konzentrationen als K01 führte (p vereinzelt < 0,05 bzw. < 0,01). Die entsprechenden VF wiesen aber bereits in der Kontrollphase höhere Konzentrationen als KF_{1,2} (K01) auf (VF_{5,6} > VF_{3,4}).

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Sowohl S10 als auch S11 bedingten im Mittel einen ähnlichen Kurvenverlauf wie K01. Die Darstellung aus Abbildung 4.8 entspricht aber nur eingeschränkt den Kurvenverläufen der Einzelläufe (s. Tab. 9.106).

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Der Konzentrationsverlauf unter Zulagen von K01 entsprach dem der anderen Laufgruppen. Die S13-Zulagen bewirkten in der Versuchsphase niedrigere Konzentrationen als K01 (p einmalig < 0,05), die S12-Zulagen geringgradig höhere Konzentrationen (p teilweise < 0,01 bzw. < 0,05). In VF_{5,6} (S12) hatten sich aber bereits während der Kontrollphase schwach signifikant höhere Werte gezeigt als in KF_{1,2} (K01).

4.3.7 Threoninkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.9 sowie Tab. 9.18, 9.36, 9.54, 9.74 und 9.94)

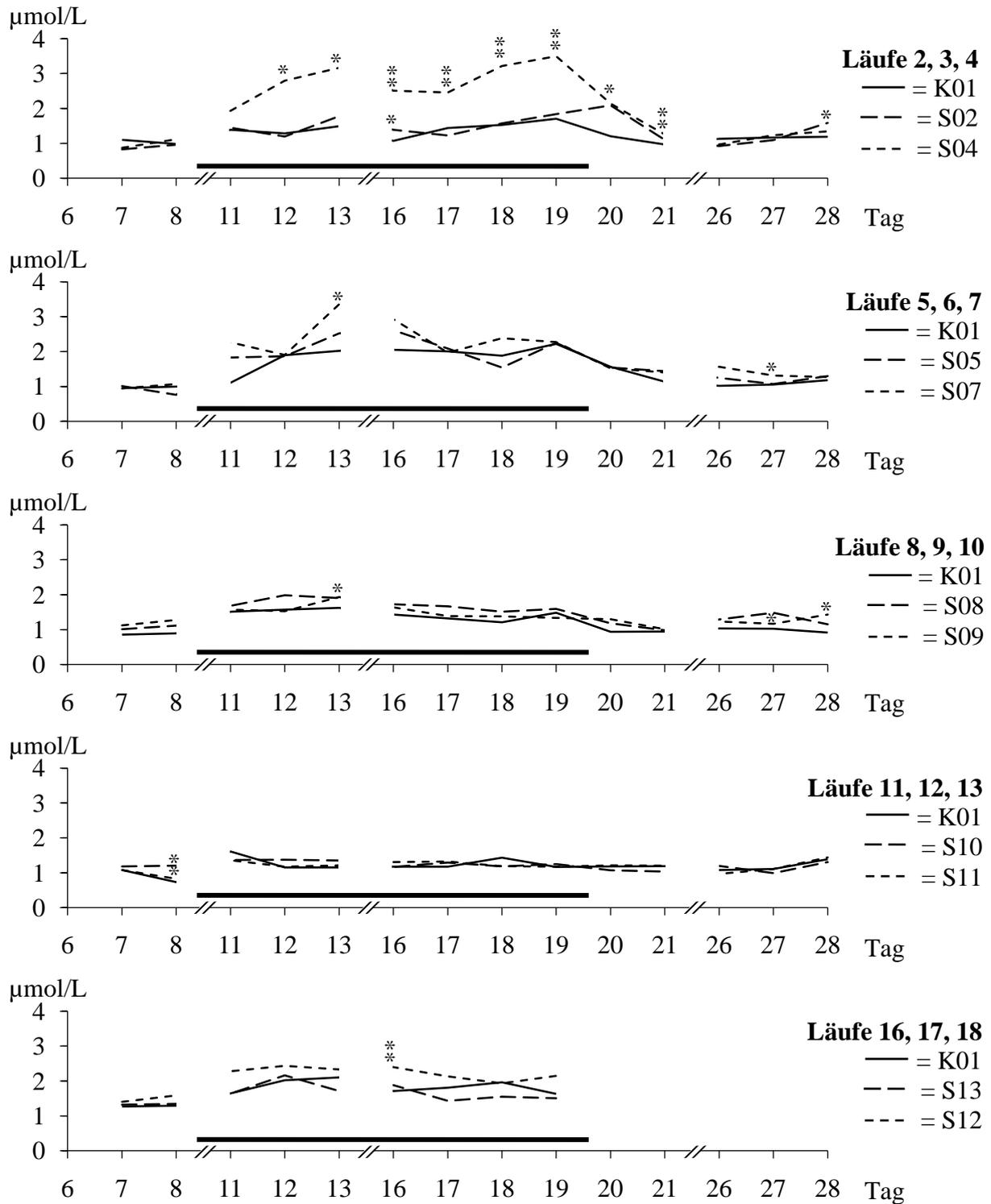


Abb. 4.9: Threoninkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von K01 und S02 erhöhten die Threoninkonzentrationen während der Versuchsphase auf maximal 1,71 bzw. 2,08 µmol/L (Tag 20) gegenüber Gehalten von 0,83 bis 1,58 µmol/L in Kontroll- und Auslaufphase. S04-Zulagen führten mit einem Maximalwert von 3,50 µmol/L (Tag 19; $p < 0,01$) zu schwach signifikant bis signifikant höheren Konzentrationen an den Tagen 12 bis 19.

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

Bei Zulagen von S05 wurden ähnliche Werte wie mit K01 gemessen, während S07 einen deutlicheren Konzentrationsanstieg bis auf Werte von 1,52 bis 3,35 (Tag 13; $p < 0,05$) µmol/L bewirkte.

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Die Konzentrationen in VF_{3,4} (S08) lagen nahezu während der gesamten Versuchsdauer ca. 0,2 bis 0,3 µmol/L über denen von KF_{1,2} (K01). Der Konzentrationsverlauf für die Zulagen von S09 entsprach dem für K01.

Die Kurvenverläufe unterschieden sich zwischen den Einzelläufen (s. Tab. 9.106).

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Die Konzentrationen schwankten während der gesamten Versuchsdauer unabhängig von der Zulage um 1,2 µmol/L.

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Zulagen von S13 führten in der Versuchsphase zu ähnlichen Konzentrationen wie K01, in VF_{5,6} (S12) lagen sie höher als in KF_{1,2} (K01; im Mittel +21,5 %; an Tag 16 $p < 0,01$).

4.3.8 Alaninkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.10 sowie Tab. 9.19, 9.37, 9.55, 9.75 und 9.95)

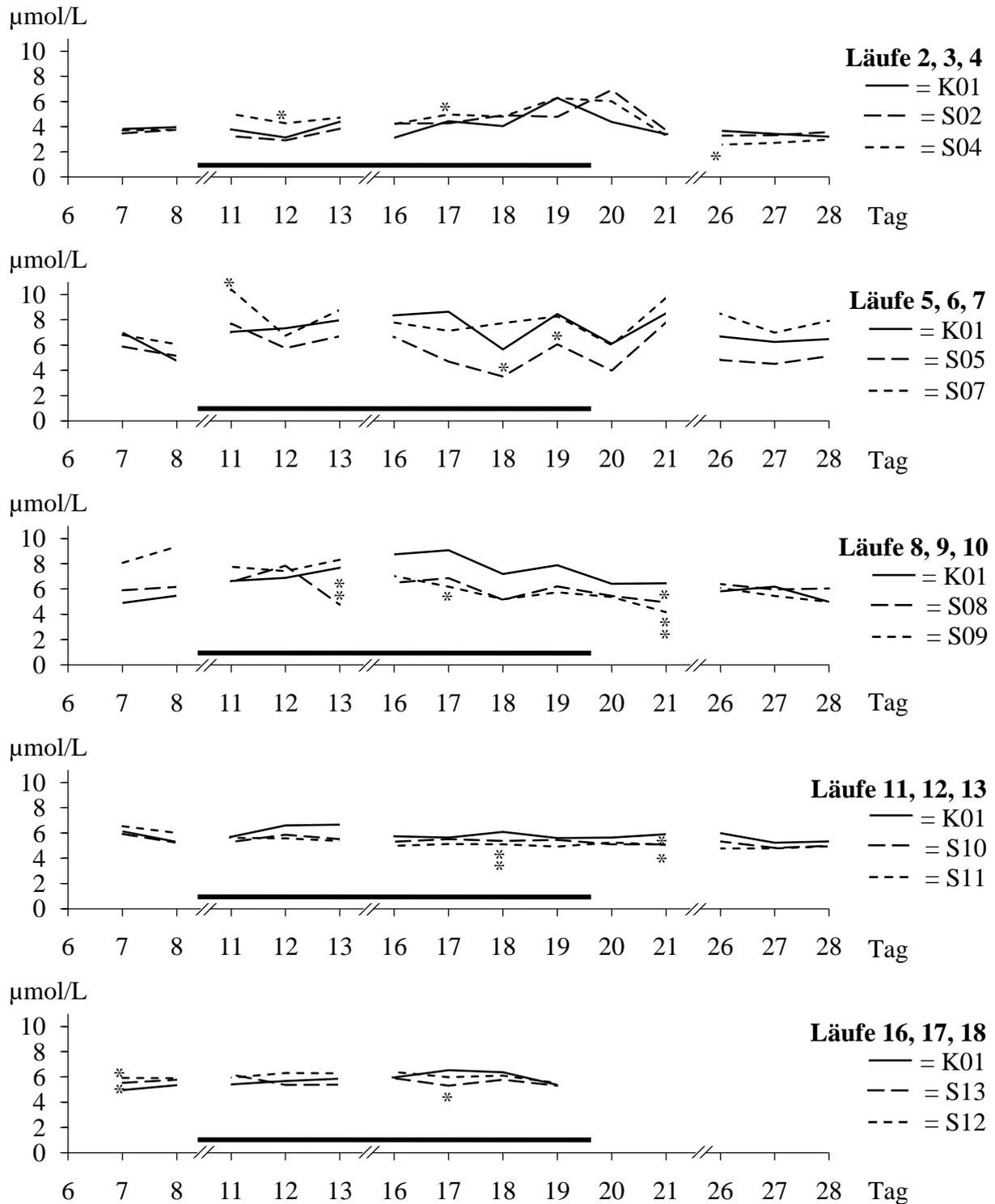


Abb. 4.10: Alaninkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Während der Versuchsphase schwankten die Alaninkonzentrationen in KF_{1,2} (K01) zwischen 3,13 und 6,29 µmol/L und stabilisierten sich in der anschließenden Auslaufphase wie in der Kontrollphase um 3,4 µmol/L. Der Konzentrationsverlauf für S02 war ähnlich, während die Zulagen von S04 geringgradig höhere Konzentrationen in der Versuchsphase und leicht niedrigere Konzentrationen in der Auslaufphase bewirkten (p vereinzelt < 0,05).

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von S05 führten in Versuchs- und Auslaufphase zu teilweise schwach signifikant niedrigeren Gehalten als die Zulagen von K01. In VF_{5,6} (S07) wurden in der Versuchsphase ähnliche Werte wie in KF_{1,2} (K01) gemessen.

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

In der Versuchsphase bewirkten Zulagen von S08 und S09 ab Tag 13 (S08) bzw. Tag 16 (S09) um ca. 2 µmol/L niedrigere Konzentrationen als K01 (p teilweise < 0,01 bzw. < 0,05). Zu beachten ist, dass die Gehalte in VF_{5,6} (S09) in der Kontrollphase deutlich höher als in VF_{3,4} (S08) und KF_{1,2} (K01) waren und bis Tag 21 stetig abfielen. In der Auslaufphase stabilisierten sich die Konzentrationen in den KF und VF bei Werten um 6 µmol/L.

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Während der gesamten Versuchsdauer lagen die Konzentrationen in allen Fermentern zwischen 4,77 und 6,65 µmol/L. Die Zulagen von S11 bedingten einmalig eine signifikant niedrigere Konzentration als solche von K01.

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

In Laufgruppe V lagen die Konzentrationen in Kontroll- und Versuchsphasen zwischen 4,97 und 6,53 µmol/L. Unter Zulagen von S13 und S12 zeigten sich kaum Unterschiede gegenüber K01.

4.3.9 Argininkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.11 sowie Tab. 9.20, 9.38, 9.56, 9.76 und 9.96)

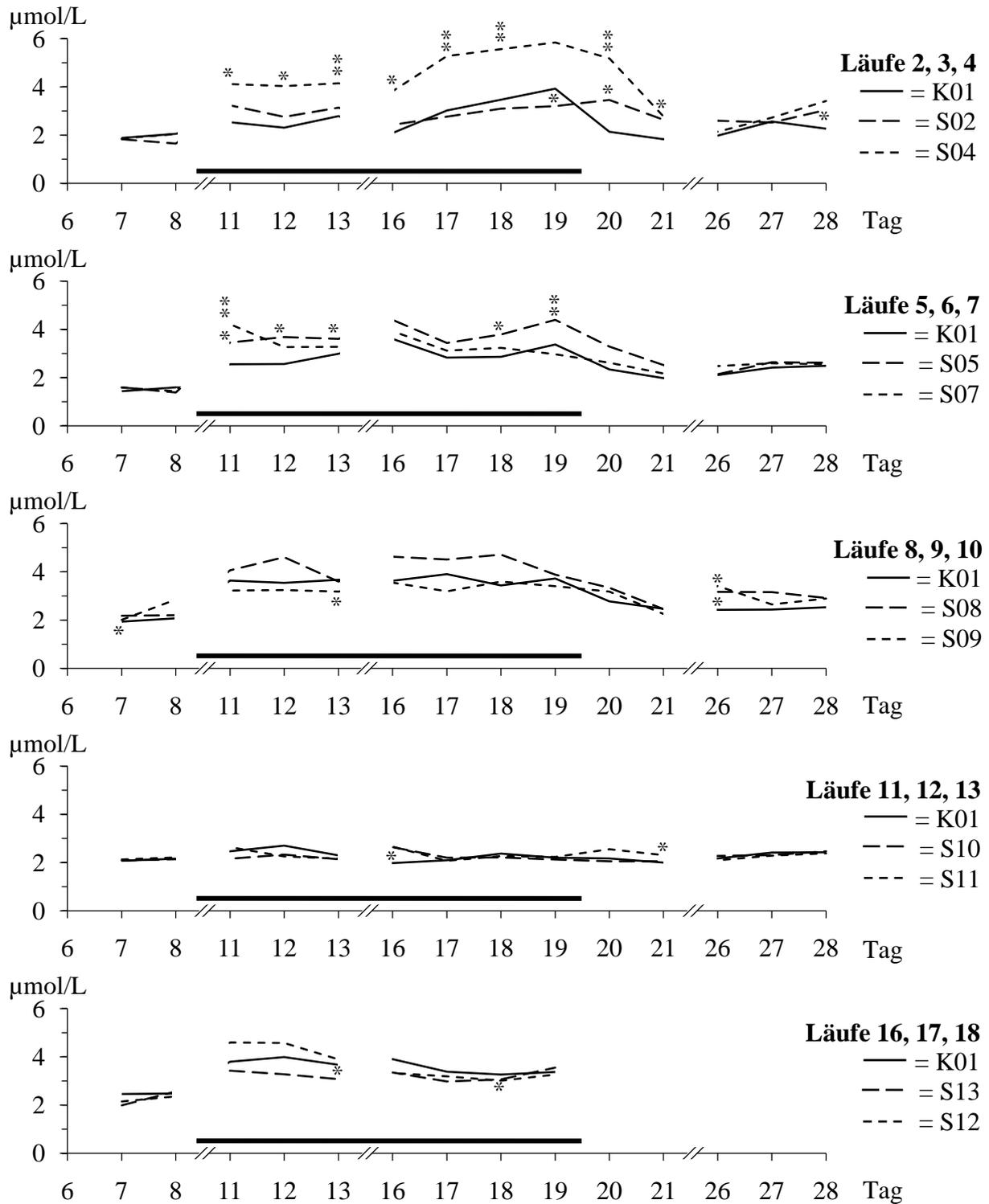


Abb. 4.11: Argininkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Mit den Zulagen von S02 nahmen die Argininkonzentrationen wie mit K01-Zulagen leicht zu und schwankten zwischen 2,43 und 3,46 µmol/L. In der Auslaufphase setzten sich die Schwankungen fort. Die Zulagen von S04 führten an den Tagen 11 bis 13 und 16 zu einem Konzentrationsanstieg auf Werte um 4 µmol/L ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$) und zu einem noch deutlicheren Anstieg an den Tagen 17 bis 20 (p überwiegend $< 0,01$). Am Versuchslaufende trafen sich die Kurven auf vergleichbarem Niveau (ca. 3 µmol/L).

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

Sowohl mit S05 als auch mit S07 zeigten sich ähnliche Verläufe wie mit K01, die Konzentrationen in der Versuchsphase lagen unter Zulagen von S05 aber überwiegend schwach signifikant bis signifikant höher als unter K01-Zulagen (bis 4,39 µmol/L an Tag 19, $p < 0,01$ vs. 2,33 bis 3,61 µmol/L). In der Auslaufphase sanken die Konzentrationen wieder ab, wobei sie über Kontrollphasenniveau verblieben und an den letzten drei Versuchstagen minimal anstiegen.

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von S09 bewirkten in der Versuchsphase geringfügig niedrigere Konzentrationen als K01 (p einmalig $< 0,05$), während S08-Zulagen zu höheren Gehalten führten (im Mittel +17,7 %). Nachdem sich die Konzentrationen an Tag 21 in KF_{1,2} (K01) und den VF angeglichen hatten, lagen sie an den restlichen Tagen der Auslaufphase in den VF über denen von KF_{1,2} ($p < 0,05$ an Tag 26).

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Über die gesamte Versuchsdauer lagen die Konzentrationen in allen Fermentern ohne nennenswerte Dynamik zwischen 1,97 und 2,70 µmol/L.

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Bei Zulagen von S13 wurde in der Versuchsphase ein geringerer Konzentrationsanstieg als mit K01 beobachtet (p teilweise $< 0,05$), S12-Zulagen führten bis Tag 13 zu höheren, dann zu niedrigeren Konzentrationen als K01.

Die Einzelkurven für S12 zeigten gegenüber K01 nicht immer die gleiche Tendenz (s. Tab. 9.106).

4.3.10 Tyrosinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.12 sowie Tab. 9.21, 9.39, 9.57, 9.77 und 9.97)

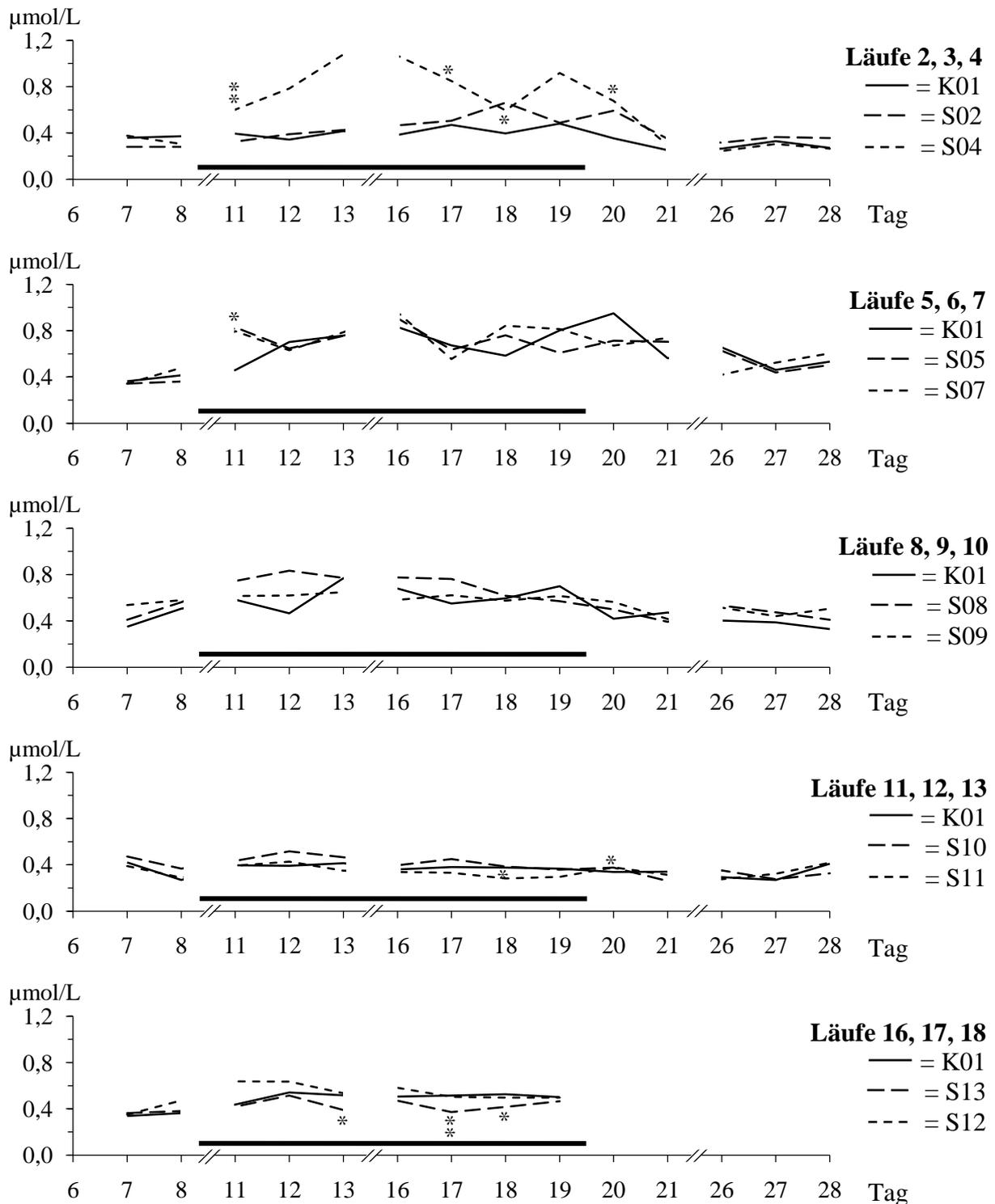


Abb. 4.12: Tyrosinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von K01 bewirkten weder in der Versuchs- noch in der Auslaufphase eine nennenswerte Konzentrationsdynamik (0,25 bis 0,48 µmol/L). Unter S02-Zulagen zeigten sich ähnliche Konzentrationen mit dem maximalen Wert von 0,66 µmol/L ($p < 0,05$) an Tag 18. Zulagen von S04 bedingten in der Versuchsphase einen deutlichen Konzentrationsanstieg bis auf Werte zwischen 0,59 und 1,08 µmol/L (p teilweise $< 0,05$ bzw. $< 0,01$). In der Auslaufphase stabilisierten sich die Konzentrationen in allen Fermentern bei Werten um 0,3 µmol/L.

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

In VF_{3,4} (S05) und VF_{5,6} (S07) zeigten sich ähnliche Konzentrationsverläufe und Schwankungsbreiten wie in KF_{1,2} (K01; Konzentrationszunahme unter Schwankungen). Die Konzentrationen in der Auslaufphase lagen für alle Zulagen geringgradig über dem Niveau der Kontrollphase (0,34 bis 0,48 vs. 0,07 bis 0,74 µmol/L).

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Bei Zulagen der Schadgrassilagen S08 und S09 zeigten sich ähnliche Konzentrationen wie unter den Zulagen von K01. Die Schwankungsbreite der Gehalte war bei S09 jedoch geringer als bei K01 (0,56 bis 0,65 vs. 0,42 bis 0,77 µmol/L).

Die Verläufe der einzelnen Kurven aus den Läufen 8, 9 und 10 gegenüber K01 waren bei beiden Schadsilagen heterogen (s. Tab. 9.106).

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Während der gesamten Versuchsdauer lagen die Konzentrationen zwischen 0,27 und 0,52 µmol/L, Zulagen von S10 und S11 bewirkten ähnliche Gehalte wie K01.

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

In der Versuchsphase lagen die Konzentrationen bei Zulagen von S13 teilweise schwach signifikant bis signifikant unter denen in KF_{1,2}, (K01; im Mittel -13,9 %) während S12 ähnliche Konzentrationen wie K01 bewirkte.

4.3.11 Valinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.13 sowie Tab. 9.22, 9.40, 9.58, 9.78 und 9.98)

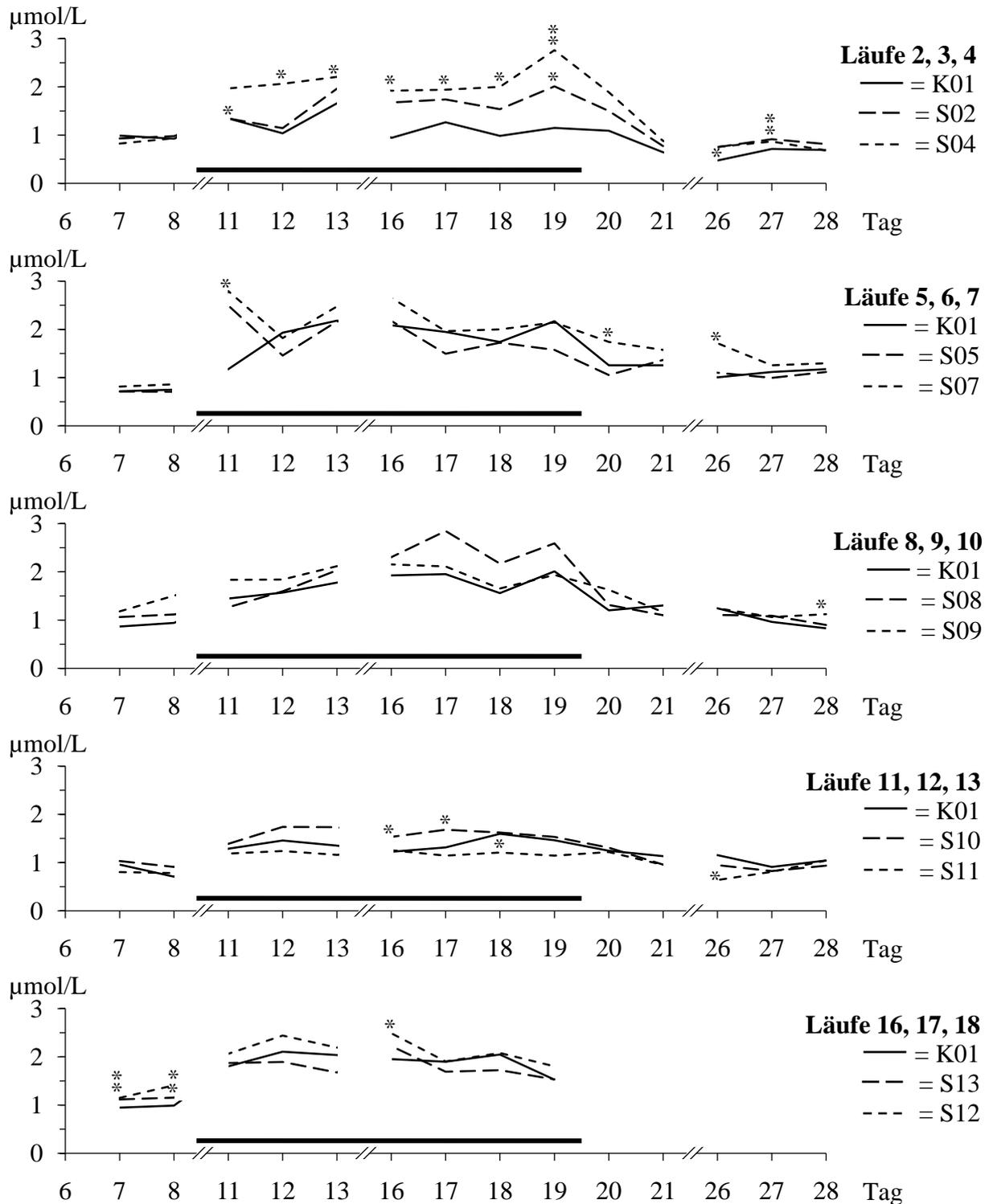


Abb. 4.13: Valinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Der Konzentrationsverlauf für S02 entsprach bis Tag 12 dem von K01, dann stiegen die Gehalte an und erreichten an Tag 19 einen schwach signifikant höheren Wert als KF_{1,2} (K01; 2,01 vs. 1,15 µmol/L). S04-Zulagen bewirkten bereits an Tag 12 schwach signifikant höhere Konzentrationen als K01, bis Tag 19 wurden Konzentrationen zwischen 1,92 und 2,76 µmol/L erreicht ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Die Gehalte in den VF sanken während der Auslaufphase weniger stark ab als in KF_{1,2} und verblieben teilweise schwach signifikant bis signifikant über dem Niveau der Kontrolle.

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

Die Konzentrationsverläufe für die Zulagen von S05 und S07 glichen dem für K01, wiesen ab Tag 12 bis Tag 19 aber größere Schwankungen auf (1,46 bis 2,17 bzw. 1,82 bis 2,65 vs. 1,74 bis 2,18 µmol/L).

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von S08 bewirkten bis Tag 12 einen ähnlichen Verlauf wie K01-Zulagen, dann stiegen die Konzentrationen weiter an und es wurden Werte von 2,84 (Tag 17) und 2,59 (Tag 19) µmol/L erreicht. Die Zulagen von S09 führten zu ähnlichen Konzentrationen wie K01-Zulagen, ab Tag 18 verliefen beide Kurven nahezu deckungsgleich.

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von S10 führten zu teilweise schwach signifikant höheren (im Mittel +14,7 %), S11-Zulagen zu geringfügig niedrigeren Konzentrationen als K01 (p einmalig $< 0,05$).

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Bei den Zulagen von S12 entwickelten sich höhere Konzentrationen als bei K01-Zulagen (p einmalig $< 0,05$; im Mittel +12,1 %), während S13 ähnliche Konzentrationen wie K01 bewirkte. Zu beachten ist, dass die Konzentrationen in den VF bereits in der Kontrollphase überwiegend schwach signifikant bis signifikant über denen in KF_{1,2} (K01) gelegen hatten.

4.3.12 Methioninkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.14 sowie Tab. 9.23, 9.41, 9.59, 9.79 und 9.99)

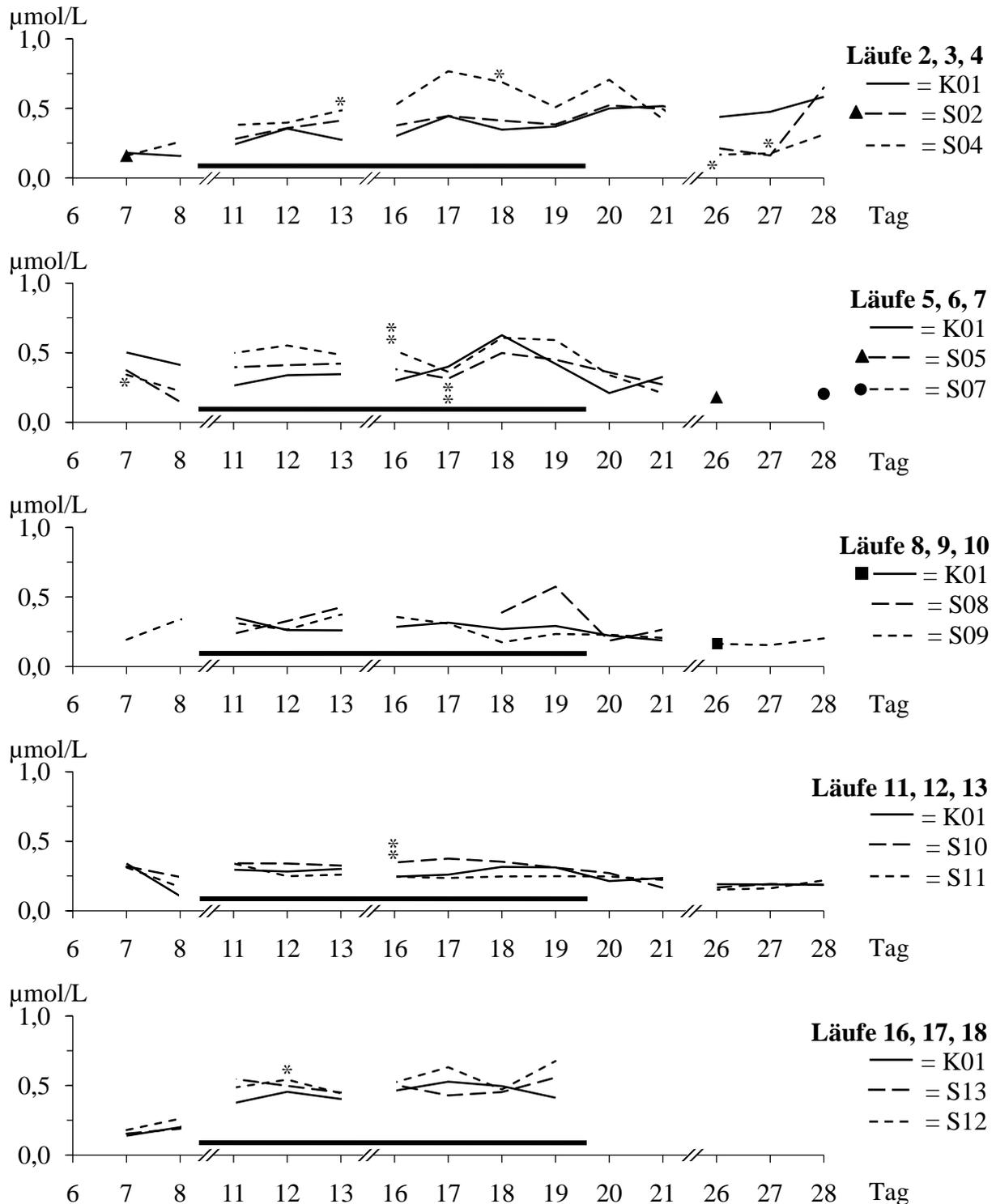


Abb. 4.14: Methioninkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

In KF_{1,2} (K01) stiegen die Methioninkonzentrationen bis zum Versuchslaufende von 0,18 (Tag 7) auf 0,58 µmol/L (Tag 28) an. VF_{3,4} (S02) folgte diesem Verlauf bis Tag 21, dann sanken die Konzentrationen ab und lagen in den letzten drei Tagen der Auslaufphase zwischen 0,16 und 0,65 µmol/L und somit teilweise schwach signifikant unter denen in KF_{1,2} (K01). Unter Zulagen von S04 stiegen die Konzentrationen in der Versuchsphase am stärksten an (p teilweise $p < 0,05$), erreichten an Tag 17 einen Wert von 0,77 µmol/L, nahmen mit Versuchsphasenende wieder ab und stabilisierten sich bei Werten um 0,25 µmol/L.

In Lauf 2 zeigte sich unter Zulagen von S02 ein anderer Verlauf gegenüber K01 als in den Läufen 3 und 4 (s. Tab. 9.106).

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

In der Versuchsphase bewirkten S05 und S07 höhere Methioninkonzentrationen als K01 (im Mittel +10,7 bzw. +36,1 %), obwohl die Konzentrationen in den VF während der Kontrollphase deutlich unter denen in KF_{1,2} (K01) gelegen hatten (0,41 bzw. 0,50 vs. 0,15 bis 0,37 µmol/L; $p < 0,05$ an Tag 7 in VF_{3,4}). In der Auslaufphase konnte Methionin ab Tag 26 lediglich in VF_{5,6} (S07) detektiert werden.

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

In KF_{1,2} (K01) war Methionin nur in der Versuchs- und Auslaufphase bis Tag 26 in Konzentrationen zwischen 0,13 und 0,35 µmol/L messbar. Unter Zulagen von S08 schwankte die Konzentration in Versuchs- und beginnender Auslaufphase zwischen 0,19 und 0,57 µmol/L, es konnte aber nicht kontinuierlich nachgewiesen werden. In VF_{5,6} (S09) war Methionin hingegen stets in Gehalten um 0,25 µmol/L detektierbar.

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S011 (VF_{5,6})]

Die Konzentrationsverläufe für S10 und S11 waren ähnlich dem für K01, wobei Zulagen von S10 im Mittel um 19,8 % höhere Konzentrationen während der Versuchsphase bewirkten (p einmalig $< 0,01$).

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Unter Zulagen von K01 nahmen die Konzentrationen gegenüber der Kontrollphase zu und erreichten Werte zwischen 0,37 und 0,53 µmol/L. Unter S12- und S13-Zulagen waren die Verläufe ähnlich.

4.3.13 Tryptophankonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.15 sowie Tab. 9.24, 9.42, 9.60, 9.80 und 9.100)

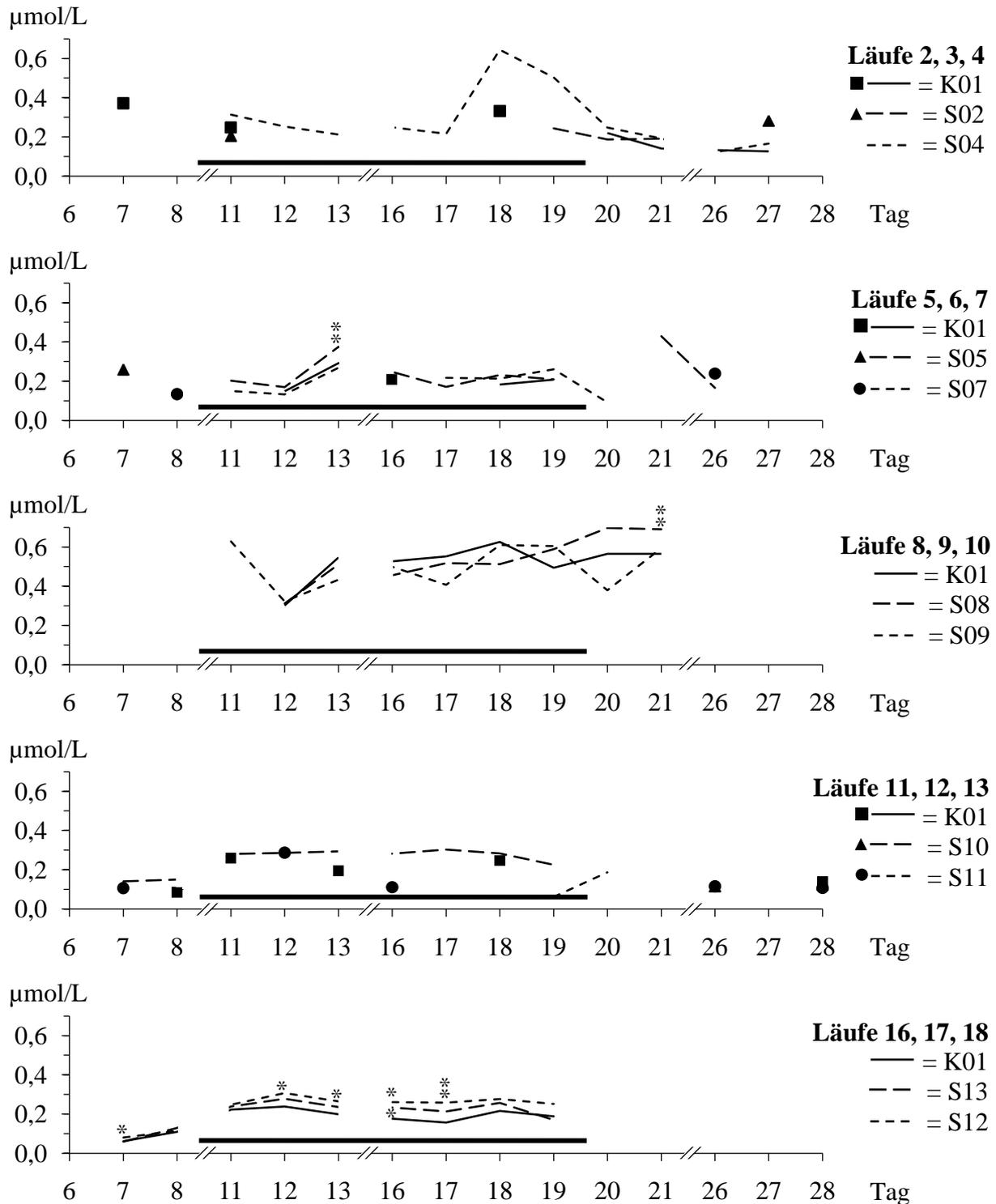


Abb. 4.15: Tryptophankonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

In KF_{1,2} (K01) war Tryptophan in Kontroll- und Versuchsphase nur vereinzelt in Konzentrationen zwischen 0,22 und 0,37 µmol/L nachweisbar. In der Auslaufphase lagen die Konzentrationen an den Tagen 21, 26 und 27 im Bereich von 0,13 bis 0,14 µmol/L. Zulagen von S02 führten zu ähnlichen Ergebnissen. In VF_{5,6} (S04) war Tryptophan ab Tag 11 kontinuierlich nachweisbar. Während der Versuchsphase lagen die Konzentrationen unter S04-Zulagen mit 0,21 bis 0,64 µmol/L höher als in der Auslaufphase (0,12 bis 0,19 µmol/L).

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

Tryptophan war wie in Laufgruppe I nicht über die gesamte Versuchsdauer messbar. Während der Versuchsphase lagen die Konzentrationen zwischen 0,09 und 0,38 µmol/L. In VF_{5,6} (S07) war Tryptophan am häufigsten nachweisbar. Die Konzentrationen in den VF gegenüber den KF waren heterogen (s. Tab. 9.106).

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

In Versuchs- und beginnender Auslaufphase lagen die Konzentrationen in allen Fermentern zwischen 0,30 und 0,70 µmol/L, in Kontroll- und später Auslaufphase war Tryptophan nicht zu detektieren.

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Tryptophan war nur vereinzelt darstellbar, wobei die Konzentrationen zwischen 0,06 und 0,30 µmol/L schwankten. Nur in VF_{3,4} (S10) war es während der Kontroll- bzw. zu Beginn der Versuchsphase stets nachweisbar.

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Unter Zulagen von K01 nahmen die Konzentrationen gegenüber der Kontrollphase leicht zu und erreichten an Tag 12 einen Höchstwert von 0,24 µmol/L. S13- und S12-Zulagen bewirkten geringfügig höhere, teilweise schwach signifikant bis signifikant höhere Konzentrationen als K01 (S12 > S13; im Mittel +15,6 bzw. 32,6 %).

4.3.14 Phenylalaninkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.16 sowie Tab. 9.25, 9.43, 9.61, 9.81 und 9.101)

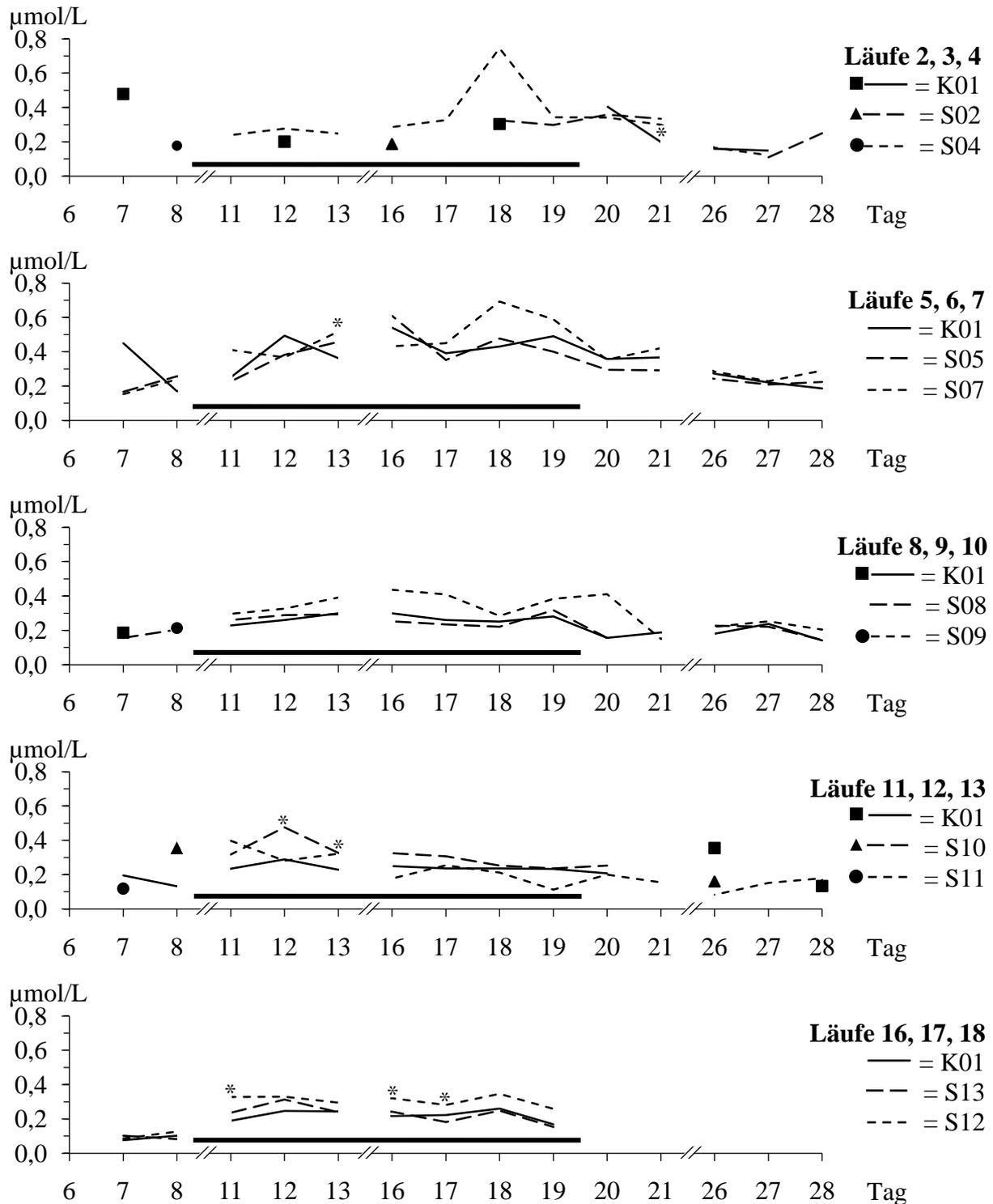


Abb. 4.16: Phenylalaninkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Phenylalanin war in Lauf 2 nicht (s. Tab. 9.106) und in den Läufen 3 und 4 nur vereinzelt nachweisbar. In VF_{5,6} (S04) konnte es mit Konzentrationen zwischen 0,12 und 0,75 µmol/L am häufigsten nachgewiesen werden. Die Konzentrationen unter Zulagen von S02 und S04 zeigten sich gegenüber den Werten unter K01-Zulagen nicht einheitlich (s. Tab. 9.106).

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

Bei Zulagen von S05 und S07 zeigten sich ähnliche Verläufe und Schwankungsbreiten wie bei K01-Zulagen (um 0,2 bis 0,6 µmol/L).

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von S08 bewirkten einen ähnlichen Konzentrationsverlauf wie K01 mit Maximalwerten von 0,32 (S08) bzw. 0,30 µmol/L (K01), während unter S09-Einfluss die Konzentrationen weiter zunahmen und Werte bis 0,44 µmol/L erreichten. Ab Tag 21 glichen sie sich in der Auslaufphase denen in KF_{1,2} (K01) an.

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Die Konzentrationen in KF_{1,2} (K01) lagen während der Versuchsphase zwischen 0,21 und 0,29 µmol/L. S10-Zulagen bewirkten teilweise schwach signifikant höhere Werte (bis 0,48 µmol/L) während Zulagen von S11 ähnliche Konzentrationen wie K01 bedingten. In der Versuchsphase war Phenylalanin nicht immer nachweisbar, in der Auslaufphase nur in VF_{5,6} (S11). Die Konzentrationen lagen niedriger als in der Versuchsphase.

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Mit Zulagen von K01 stiegen die Konzentrationen leicht an und stabilisierten sich von Tag 12 bis Tag 18 bei Werten zwischen 0,22 (Tage 16 und 17) und 0,26 µmol/L (Tag 18). S13 bewirkte ähnliche Konzentrationen, während die Zulagen von S12 teilweise schwach signifikant höhere Konzentrationen als K01 bedingten (im Mittel +39,4 %).

4.3.15 Isoleucinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.17 sowie Tab. 9.26, 9.44, 9.62, 9.82 und 9.102)

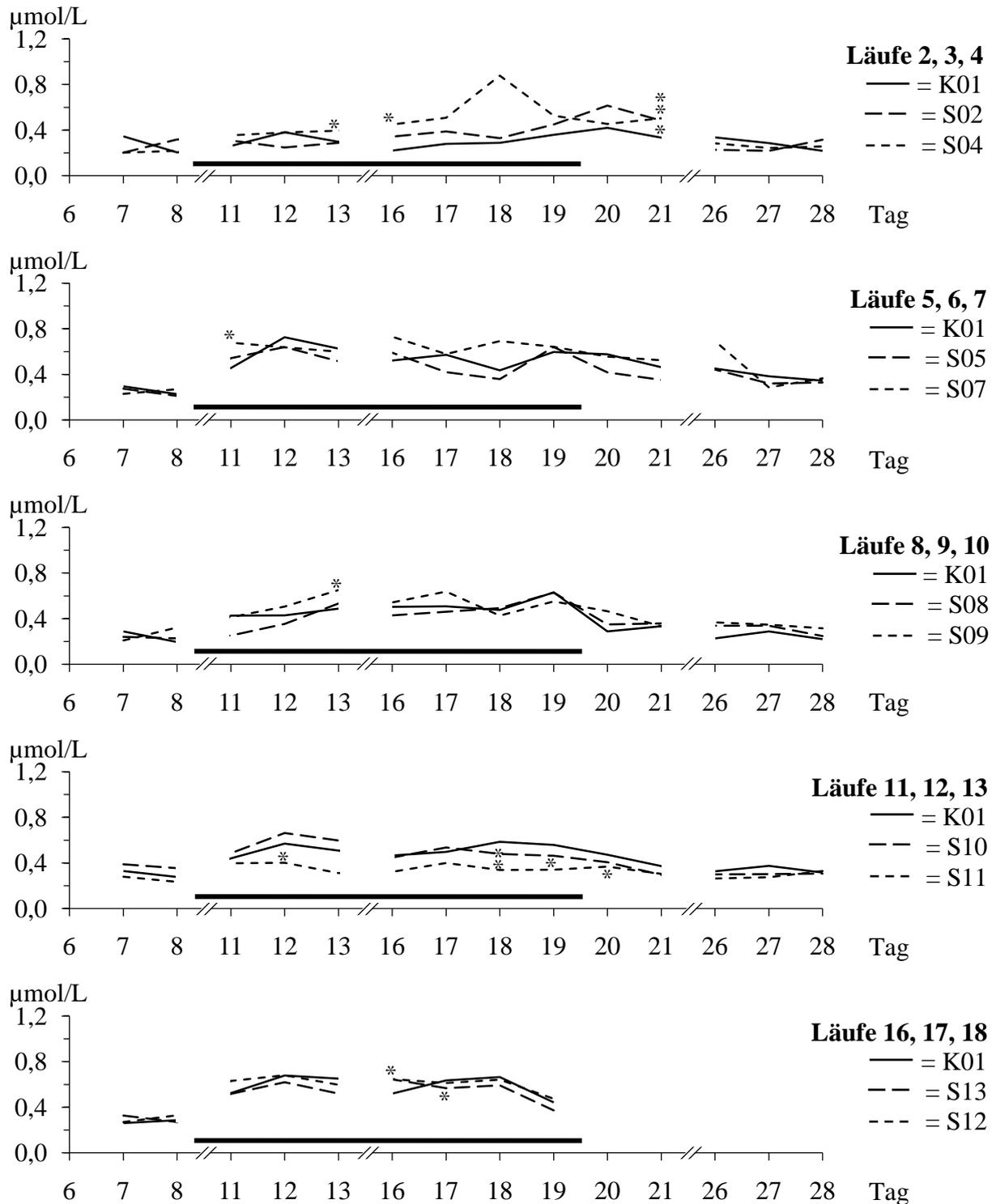


Abb. 4.17: Isoleucinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchssphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

In der Versuchsphase schwankten die Isoleucinkonzentrationen bei Zulagen von K01 zwischen 0,22 und 0,42 µmol/L. Unter Zulagen von S02 wurden ähnliche Werte erreicht, während S04 teilweise schwach signifikant höhere Konzentrationen als K01 bewirkte (im Mittel +57,8 %). Mit Auslaufphasenbeginn sanken die Konzentrationen nicht sofort wieder ab und erreichten erst an den Tagen 26 bis 28 auf das Niveau der Kontrollphase (um 0,25 µmol/L).

In Lauf 2 konnte Isoleucin nicht dargestellt werden (s. Tab. 9.106).

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

In VF_{3,4} (S05) und VF_{5,6} (S07) zeigten sich ähnliche Konzentrationsverläufe wie in KF_{1,2} (K01). An den Tagen 27 und 28 waren die Konzentrationen unabhängig von den Zulagen ähnlich hoch, lagen aber noch immer über den Niveau der Kontrollphase (0,29 bis 0,38 vs. 0,21 bis 0,30 µmol/L).

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Zulagen von S08 bewirkten wie K01 gegenüber der Kontrollphase einen Konzentrationsanstieg auf Werte um 0,5 µmol/L. VF_{5,6} (S09) wies während der Versuchsphase geringgradig höhere ($p < 0,05$ an Tag 13) Gehalte auf als KF_{1,2} (K01; im Mittel +11,7 %).

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von S10 führten zu ähnlichen hohen Konzentrationen wie K01. Der durch S11 verursachte Konzentrationsanstieg war hingegen geringer als bei K01 und führte zu teilweise schwach signifikant niedrigeren Konzentrationen als in KF_{1,2} (K01; im Mittel -29,9 %).

Die Konzentrationsverläufe in den Einzelläufen 12 und 13 stimmten für S10 nicht mit dem in Abbildung 4.17 überein (s. Tab. 9.106).

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Bei Zulagen von S13 und S12 lagen die Konzentrationen ähnlich hoch wie bei der Kontrolle K01.

4.3.16 Leucinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.18 sowie Tab. 9.27, 9.45, 9.63, 9.83 und 9.103)

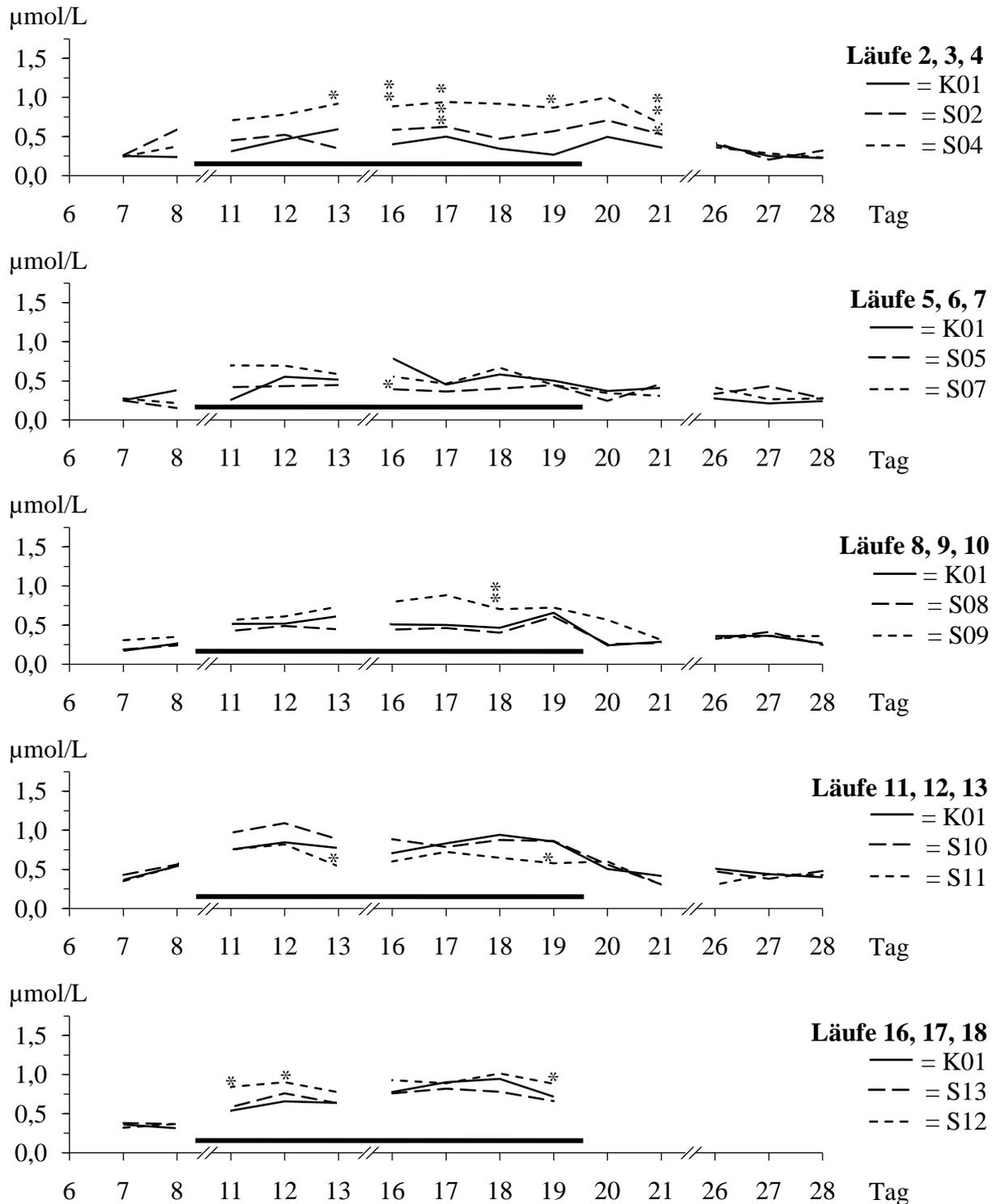


Abb. 4.18: Leucinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 2, 3, 4 [K01 (KF_{1,2}), S02 (VF_{3,4}), S04 (VF_{5,6})]

Unter Zulagen von S02 stiegen die Leucinkonzentrationen im Gegensatz zu K01 ab Tag 16 auf Werte von bis zu 0,71 µmol/L an Tag 20 an ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$ an den Tagen 17 und 21). Die Zulagen von S04 bewirkten mit Höchstwerten von 1,00 µmol/L und überwiegend schwach signifikant bis signifikant höheren Konzentrationen als K01 einen deutlicheren Konzentrationsanstieg als S02. Ab Tag 26 verliefen alle Kurven auf gleichem Niveau.

Läufe 5, 6, 7 [K01 (KF_{1,2}), S05 (VF_{3,4}), S07 (VF_{5,6})]

Die Zulagen von S05 zogen einen um ca. 0,1 bis 0,2 µmol/L geringeren Konzentrationsanstieg nach sich als K01-Zulagen ($p < 0,05$ an Tag 16), während S07 ähnliche Konzentrationen wie K01 bewirkte.

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Der Kurvenverlauf für S08 war annähernd deckungsgleich mit dem für K01, während die S09-Zulagen zu einem größeren Konzentrationsanstieg ($p < 0,01$ an Tag 18) bis auf einen Maximalwert von 0,88 µmol/L (Tag 17) führten. Erst an Tag 26 wiesen KF_{1,2} (K01), VF_{3,4} (S08) und VF_{5,6} (S09) erneut ähnliche Konzentrationen auf (Rückkehr auf das Konzentrationsniveau der Kontrollphase).

Die Konzentrationsverläufe der Einzelläufe 9 und 10 stimmen für S08 nicht mit dem in Abbildung 4.18 überein (s. Tab. 9.106).

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Die Zulage der Grassilage S10 bedingte ähnliche Konzentrationen wie K01 (ca. +0,2 µmol/L gegenüber K01), ab Tag 17 verlief die Kurve für S10 dann nahezu deckungsgleich mit der für K01. Im Gegensatz dazu bewirkte S11 an den Tagen 11 und 12 ebenfalls ähnlich hohe Konzentrationen wie K01, danach lagen diese teilweise schwach signifikant um ca. 0,2 µmol/L niedriger.

Unter S10-Zulagen zeigten die Kurvenverläufe gegenüber K01 keine einheitliche Wirkung (s. Tab. 9.106).

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Unter den Zulagen von S13 lagen die Konzentrationen auf ähnlichem Niveau wie in KF_{1,2} (K01). S12 hingegen bewirkte einen steileren Konzentrationsanstieg und um ca. 0,2 µmol/L höhere Werte als K01 (p teilweise $< 0,05$; im Mittel +19,9 %).

4.4 Konzentrationen biogener Amine in der Fermenterflüssigkeit

Die biogenen Amine Serotonin und Tyramin konnten erst ab Laufgruppe III (Läufe 8, 9, 10) dargestellt werden.

4.4.1 Serotoninkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.19 sowie Tab. 9.64, 9.84 und 9.104)

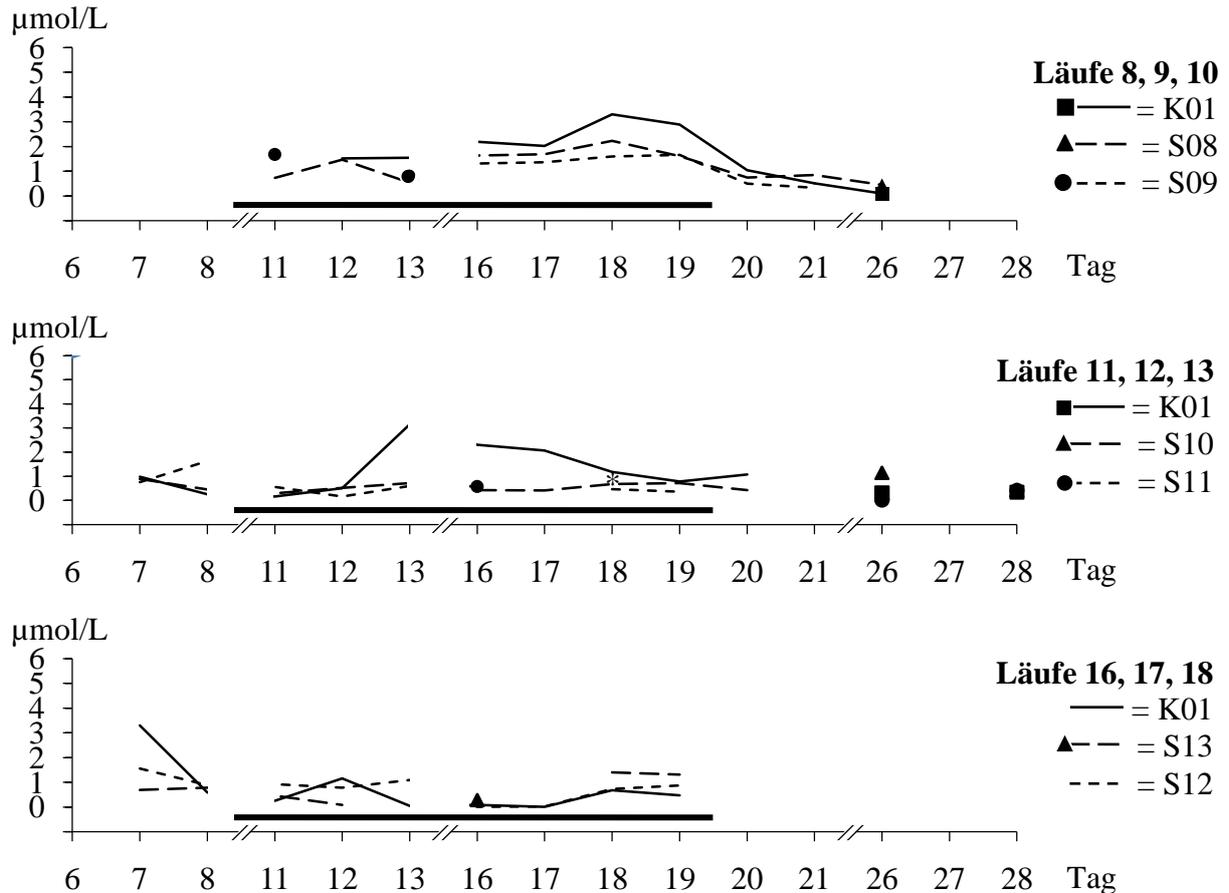


Abb. 4.19: Serotoninkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

Während der Kontrollphase war Serotonin weder in KF_{1,2} (K01) noch in den VF nachweisbar. In der Versuchsphase bewirkten K01-Zulagen Konzentrationen zwischen 1,04 und 3,30 µmol/L. Die Konzentrationen sanken in der Auslaufphase ab und an den Tagen 27 und 28 war kein Serotonin mehr nachweisbar. Zulagen von S08 führten zu einem ähnlichen Kurvenverlauf wie K01, die Konzentrationen lagen aber geringgradig niedriger. In VF_{5,6} (S09) war Serotonin erst ab Tag 13 nachweisbar und der Konzentrationsverlauf entsprach dem für S08. An den letzten beiden Versuchstagen war wie in KF_{1,2} (K01) in den VF kein Serotonin detektierbar.

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Serotonin war bereits in der Kontrollphase in Konzentrationen zwischen 0,26 und 1,64 µmol/L nachweisbar. An Tag 13 stiegen die Konzentrationen in KF_{1,2} (K01) auf 3,15 µmol/L an und sanken dann kontinuierlich bis auf 0,79 µmol/L an Tag 19 ab. Zulagen von S10 und S11 bewirkten gegenüber der Kontrollphase keine Konzentrationsänderungen. In der Auslaufphase war Serotonin nur vereinzelt nachweisbar.

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Ab Tag 8 lagen die Serotoninkonzentrationen in KF_{1,2} (K01) zwischen 0,01 und 1,15 µmol/L. In den VF waren die Konzentrationen ähnlich hoch, unter Zulagen von S13 war Serotonin aber seltener nachweisbar als mit K01 oder S12.

4.4.2 Tyraminkonzentration in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 4.20 sowie Tab. 9.65, 9.85 und 9.105)

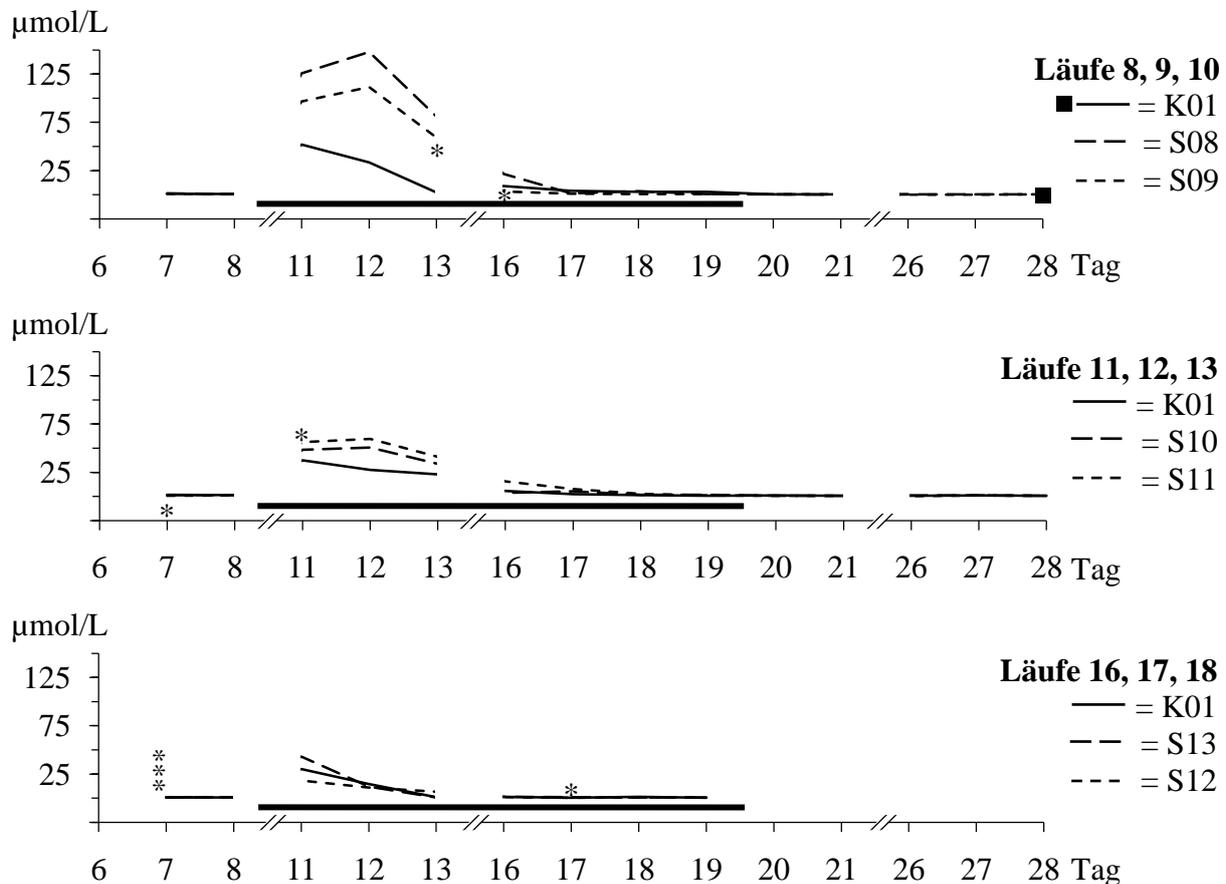


Abb. 4.20: Tyraminkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit [$\mu\text{mol/L}$];
 — = Versuchsphase

Läufe 8, 9, 10 [K01 (KF_{1,2}), S08 (VF_{3,4}), S09 (VF_{5,6})]

An Tag 11 stiegen die Konzentrationen in KF_{1,2} (K01) stark auf 51,9 $\mu\text{mol/L}$ an, erreichten aber bereits an Tag 20 wieder das Konzentrationsniveau der Kontrollphase. Die Konzentrationsverläufe unter Zulagen von S08 und S09 waren ähnlich, die maximalen Konzentrationen lagen aber höher und wurden erst an Tag 12 erreicht (148 bzw. 112 $\mu\text{mol/L}$).

Läufe 11, 12, 13 [K01 (KF_{1,2}), S10 (VF_{3,4}), S11 (VF_{5,6})]

Die Kurvenverläufe entsprachen denen in Laufgruppe III, es wurden aber geringere Maximalkonzentrationen erreicht [37,4 $\mu\text{mol/L}$ an Tag 11 in KF_{1,2} (K01) und 50,8 bzw. 59,7 $\mu\text{mol/L}$ an Tag 12 bei Zulagen von S10 bzw. S11].

Läufe 16, 17, 18 [K01 (KF_{1,2}), S13 (VF_{3,4}), S12 (VF_{5,6})]

Die Kurvenverläufe glichen ebenfalls denen in Laufgruppe III, die Maximalkonzentrationen lagen aber noch niedriger als in Laufgruppe IV (30,2 $\mu\text{mol/L}$ in KF_{1,2} und 43,1 bzw. 18,2 $\mu\text{mol/L}$ bei Zulagen von S13 bzw. S12).

4.5 Freie Aminosäuren-Pools in der Fermenterflüssigkeit und statistische Analyse der Ergebnisse

Um zu erfassen, ob die Konzentrationen einzelner fAS (s. Kap. 4.3) stärker zugenommen hatten als andere, wurde die Zusammensetzung der fAS-Pools in Kontroll-, Versuchs- und Auslaufphasen entsprechend dem Schema in Abbildung 4.21 berechnet²⁹.

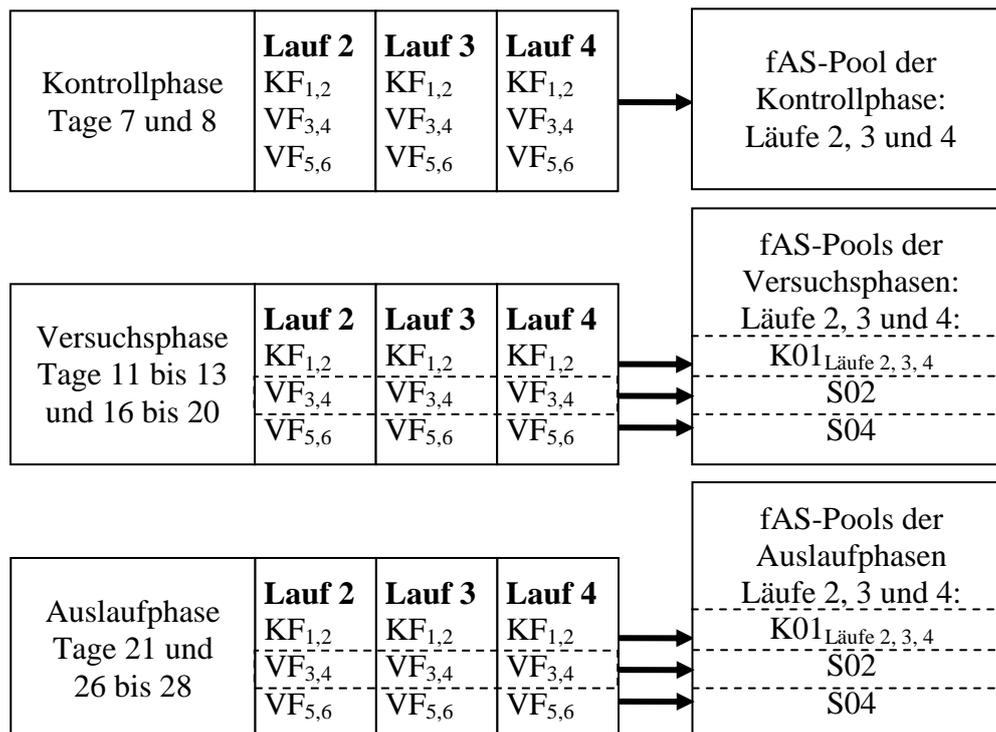


Abb. 4.21: Berechnung der fAS-Pools in Kontroll-, Versuchs- und Auslaufphasen am Beispiel von K01 in Laufgruppe I sowie S02 und S04 (Laufgruppe I)

Mit Hilfe statistischer Berechnungen wurden folgende Fragen beantwortet:

1. Bestanden bereits in den Kontrollphasen trotz identischer Beladungen des RUSITEC-Systems signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen bzw. den prozentualen Anteilen einzelner fAS im fAS-Pool (s. Kap. 4.5.1)?
2. Führten die Zulagen von K01 in den einzelnen Laufgruppen zu signifikanten Konzentrationsunterschieden bzw. unterschiedlichen prozentualen fAS-Anteilen im fAS-Pool (s. Kap. 4.5.2.1)?

²⁹ Zunächst erfolgte die Berechnung der fAS-Pools in den jeweils zueinander gehörenden Läufen für jeden Versuchstag (n = 6), anschließend wurde für jede einzelne fAS der Mittelwert gebildet. Aus dieser Vorgehensweise resultiert, dass die Gesamtheit der einzelnen fAS-Anteile in den fAS-Pools nicht exakt 100 % beträgt.

3. Unterschieden sich fAS-Konzentrationen und/oder -Anteile im fAS-Pool unter den Zulagen von Schadgrassilagen von denen unter den Zulagen von K01 (s. Kap. 4.5.2.2)?
4. Bestanden in den Auslaufphasen nach Zulagen von K01 signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen bzw. den prozentualen Anteilen einzelner AS im fAS-Pool (s. Kap. 4.5.3.1)?
5. Entsprachen die fAS-Konzentrationen und -Anteile während der Auslaufphasen nach Zulagen von K01 denen in den jeweiligen Kontrollphasen (s. Kap. 4.5.3.1)?
6. Unterschieden sich nach Zulage von Schadgrassilagen die fAS-Konzentrationen und -anteile im fAS-Pool von denen nach Zulagen von K01 (s. Kap. 4.5.3.2)?

4.5.1 Freie Aminosäuren-Pools in der Fermenterflüssigkeit während der Kontrollphasen

Die fAS-Gesamtkonzentrationen lagen während der Kontrollphasen im fAS-Pool zwischen 35,6 (Laufgruppe I) und 42,5 (Laufgruppe V) $\mu\text{mol/L}$. Glutamat war die AS mit den höchsten Konzentrationen (14,4 bis 17,4 $\mu\text{mol/L}$). Im Mittel folgten Alanin, Aspartat, Glycin, Arginin, Serin, Threonin, Valin, Histidin, Leucin, Tyrosin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin und Tryptophan in abnehmender Reihenfolge. Die Durchführung einer univariaten einfaktoriellen Varianzanalyse (s. Tab. 4.2) zeigte, dass bereits in der Kontrollphase schwach bis hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Konzentrationen und den Anteilen fast aller einzelnen fAS im fAS-Pool bestanden (**Frage 1**).

Tab. 4.2: Ergebnisse der Varianzanalyse der fAS-Konzentrationen und ihrer prozentualen Anteile im fAS-Pool während der Kontrollphasen

| P | fAS | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Asp | Glu | Ser | His | Gly | Thr | Ala | Arg | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu |
| p_{Konz} | ,000 | ,001 | ,000 | ,000 | ,029 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | n.s. | ,000 |
| $p_{\%}$ | ,005 | ,015 | ,000 | ,000 | ,004 | ,043 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,004 | ,000 |

n.s. nicht signifikant ($p > 0,05$)

p_{Konz} Differenzsignifikanz, bezogen auf Konzentration; $p_{\%}$ bezogen auf prozentualen Anteil

Multiple Vergleiche mittels Post Hoc Test nach Scheffé ermöglichten die Identifizierung der jeweils abweichenden Laufgruppen (s. Tab. 9.108 und 9.109) und ließen erkennen, dass sich nur in Einzelfällen Konzentrationen (Histidin, Threonin, Alanin, Arginin) oder prozentuale Anteile (Alanin, Arginin, Phenylalanin) von allen anderen Werten während der Kontrollphasen unterschieden (s. Abb. 4.22).

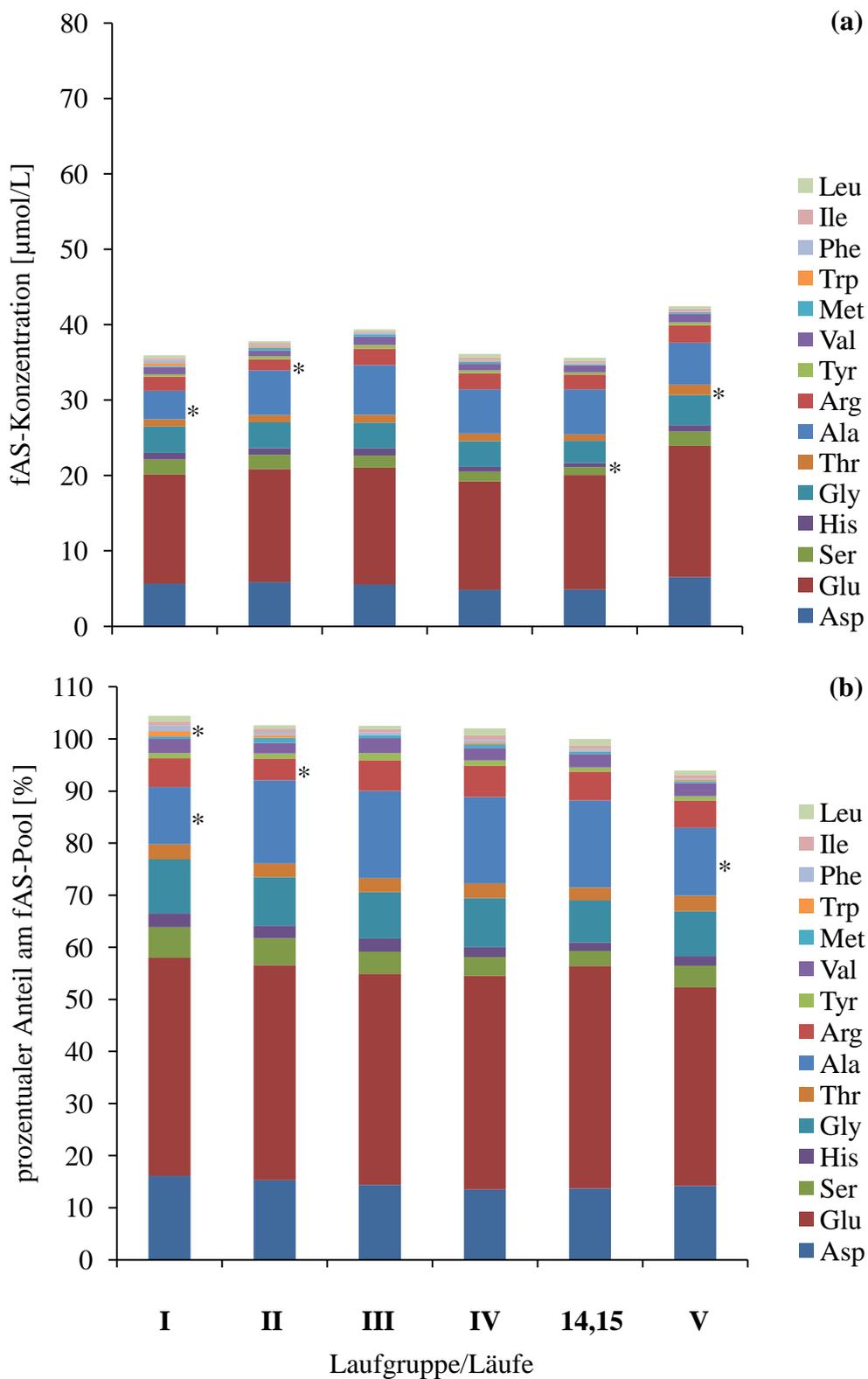


Abb. 4.22: fAS-Konzentrationen (a) in und prozentuale -Anteile (b) an den fAS-Pools der Kontrollphasen. * Unterschied zu den entsprechenden Konzentrationen oder Anteilen aller anderen Laufgruppen: $p < 0,05$

4.5.2 Freie Aminosäuren-Pools in der Fermenterflüssigkeit während der Versuchsphasen

4.5.2.1 Freie Aminosäuren-Pools während der Versuchsphasen unter Zulagen der Kontrollgrassilage 01

Beim Wechsel von Heuzulagen auf Zulagen von K01 blieben Glutamat, Alanin, Aspartat und Glycin die freien AS mit den höchsten Konzentrationen, dann folgten Arginin, Serin und Histidin. Valin und Threonin lagen vor Leucin, Tyrosin und Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan und Methionin kamen tendenziell am seltensten vor. Auch hier zeigte eine univariate einfaktorielle Varianzanalyse, dass sich die Konzentrationen und Anteile fast aller fAS im fAS-Pool von Lauf zu Lauf signifikant voneinander unterschieden (**Frage 2**; s. Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Ergebnisse der Varianzanalyse der fAS-Konzentrationen und ihrer prozentualen Anteile im fAS-Pool während der Versuchsphasen bei K01-Zulagen

| p | fAS | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Asp | Glu | Ser | His | Gly | Thr | Ala | Arg | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu |
| p _{Konz} | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| p _% | n.s. | ,000 | ,002 | ,002 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | n.s. | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |

n.s. nicht signifikant ($p > 0,05$)

p_{Konz} Differenzsignifikanz, bezogen auf Konzentration; p_% bezogen auf prozentualen Anteil

Die anschließende Durchführung des Post Hoc Tests nach Scheffé ließ aber erkennen, dass wie in der Kontrollphase nur Einzelwerte von denen der anderen Laufgruppen abwichen (s. Abb. 4.23; Histidin-, Threonin-, Alanin-, Arginin-, Tryptophan-, Isoleucin- und Leucin-konzentrationen bzw. prozentuale Glutamat-, Arginin-, Phenylalanin- und Leucinanteile). Den Tabellen 9.110 und 9.111 sind die Unterschiede der fAS-Konzentrationen und -Anteile im Detail zu entnehmen.

4.5.2.2 Freie Aminosäuren-Pools während der Versuchsphasen unter Zulagen der Schadgrassilagen

Die Auswirkungen von Schadgrassilagezulagen auf einzelne fAS-Konzentrationen waren heterogen. Glutamat, Aspartat, Glycin und Alanin blieben die häufigsten AS, während Methionin, Tryptophan, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin nur in Spuren vorkamen.

Mittels t-Test für gepaarte Stichproben wurden mittlere Konzentrationen und prozentuale Anteile einzelner fAS am fAS-Pool in der Fermenterflüssigkeit mit denen in den jeweiligen Kontrollfermentern verglichen (**Frage 3**). Unter Zulagen von S04 fielen neben erhöhten Aspartat-, Glutamat-, Serin-, Histidin-, Glycin-, Threonin-, Arginin-, Tyrosin- und Valinpool-konzentrationen ($p < 0,05$) ein gesteigener prozentualer Aspartat- und ein gesunkener Glutamatanteil auf. Sowohl Histidinkonzentrationen als auch -anteile wurden durch Zulagen von S02, S05, S08, S10, S11, S12 und S13 erniedrigt ($p < 0,05$).

Detaillierte Informationen können den Abbildungen 4.24 und 4.25 entnommen werden. Die einzelnen Werte finden sich in den Tabellen 9.112 und 9.113.

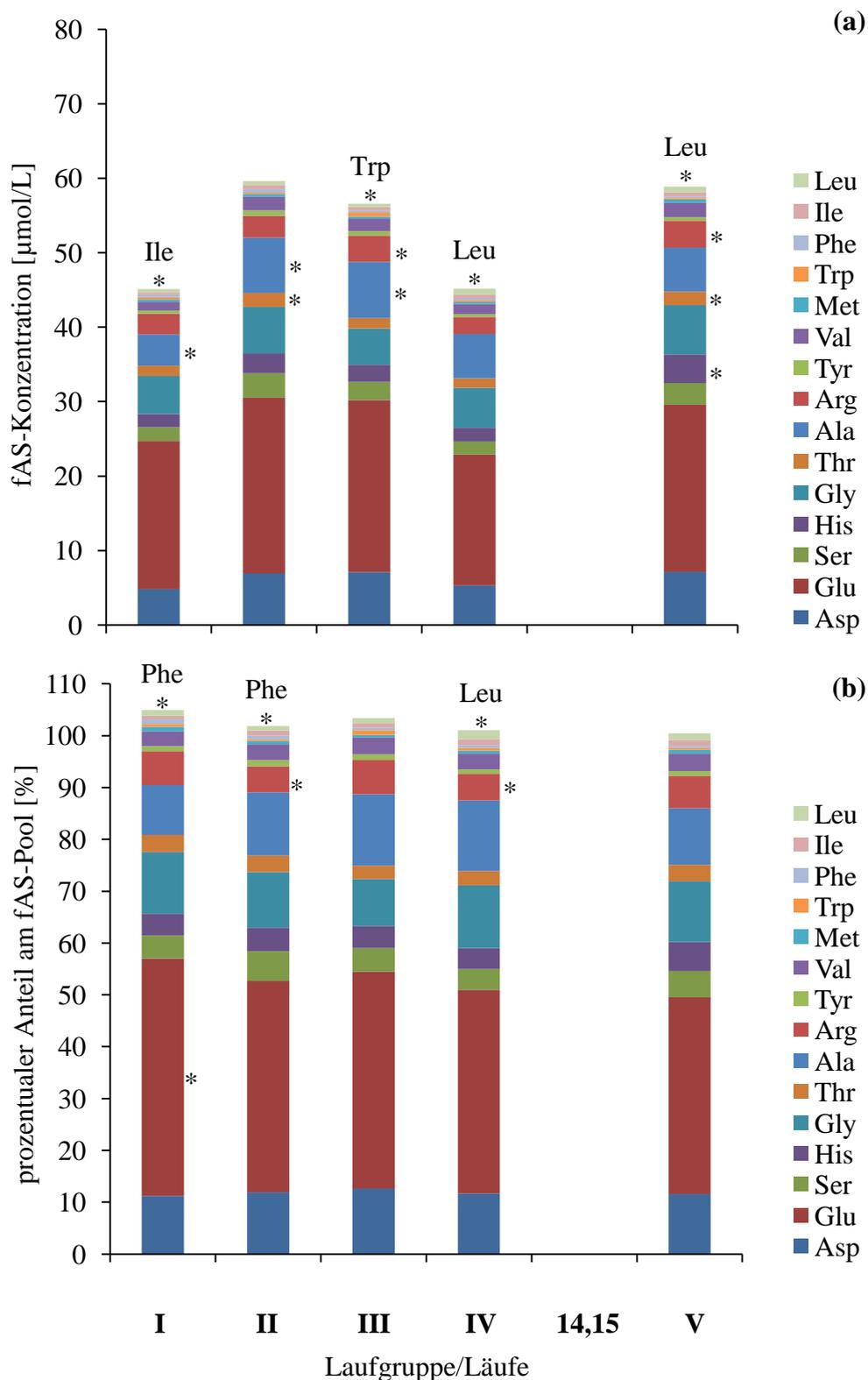


Abb. 4.23: fAS-Konzentrationen (a) in und prozentuale -Anteile (b) an den fAS-Pools der Versuchsphasen bei Zulagen von K01. * Unterschied zu den entsprechenden Anteilen oder Konzentrationen aller anderen Laufgruppen: $p < 0,05$

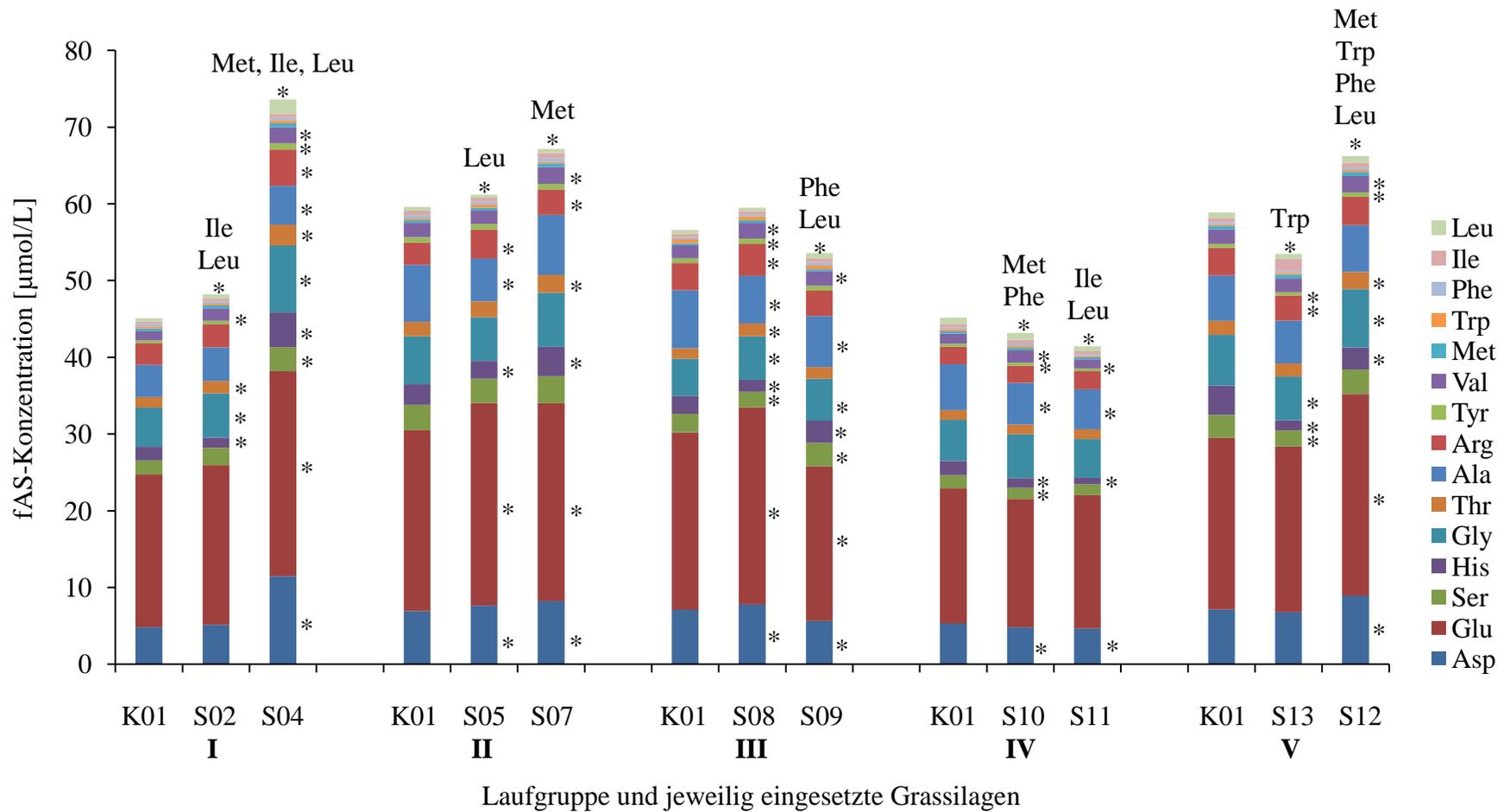


Abb. 4.24: fAS-Konzentrationen in den fAS-Pools während der Versuchsphasen bei Zulagen von K01 und den Schadgrassilagen. *fAS-Konzentration unterscheidet sich von der entsprechenden Konzentration unter Zulagen von K01 in der jeweiligen Laufgruppe: $p < 0,05$

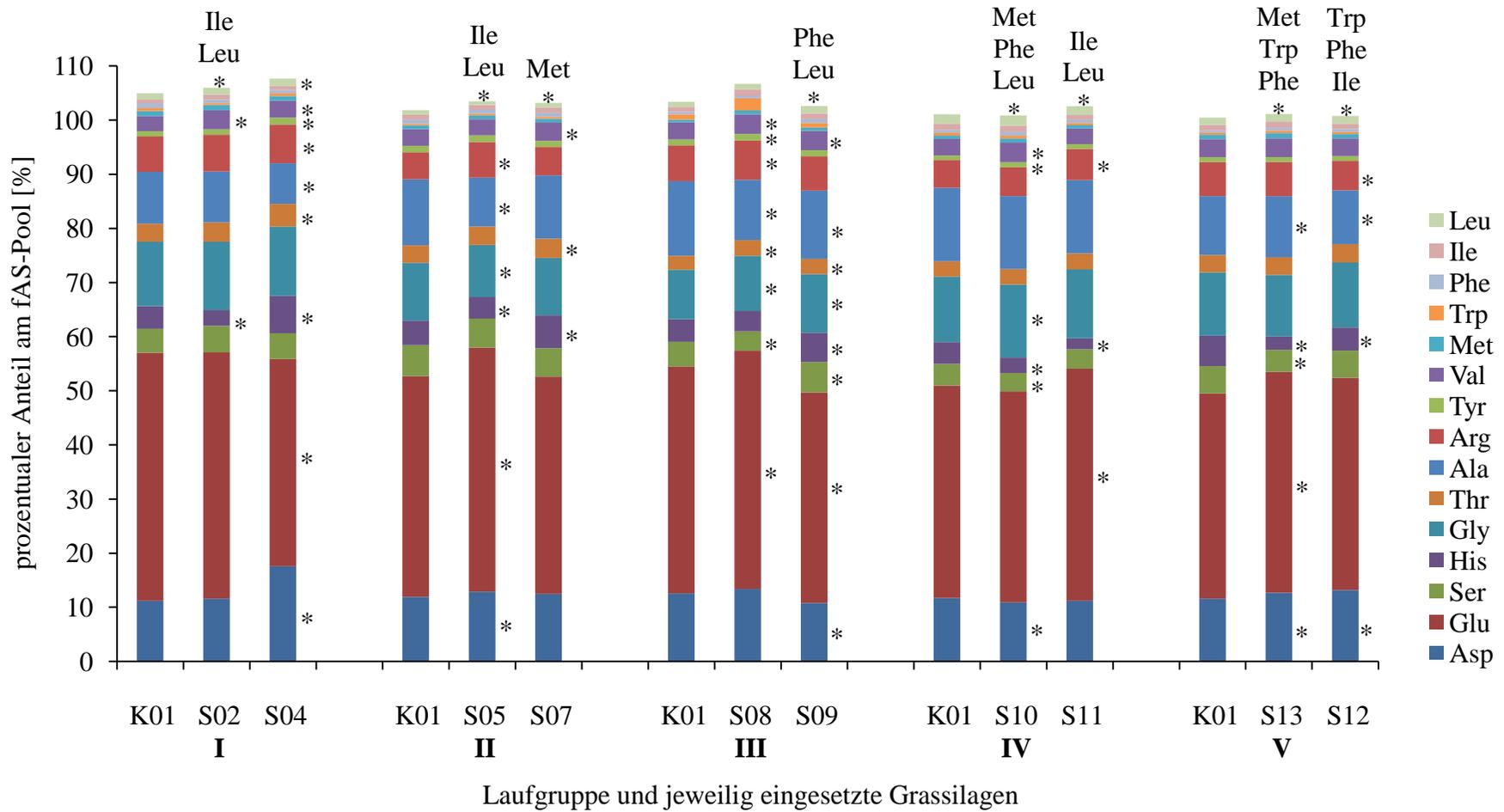


Abb. 4.25: Prozentuale fAS-Anteile an den fAS-Pools während der Versuchsphasen bei Zulagen von K01 und den Schadgras-silagen. * fAS-Anteil unterscheidet sich vom entsprechenden Anteil unter Zulagen von K01 in der jeweiligen Laufgruppe: $p < 0,05$

4.5.3 Freie Aminosäuren-Pools in der Fermenterflüssigkeit während der Auslaufphasen

4.5.3.1 Freie Aminosäuren-Pools während der Auslaufphasen nach Zulagen der Kontrollgrassilage 01

In den Auslaufphasen nahmen die fAS-Gesamtkonzentrationen nach Beendigung der Zulage von K01 und Rückkehr zu Heuzulagen leicht ab. Die univariate einfaktorielle Varianzanalyse zeigte, dass es bei allen fAS außer Phenylalanin signifikante Konzentrations- und/oder Anteilsunterschiede zwischen den Pools der Auslaufphasen nach Zulagen von K01 gab (**Frage 4**; s. Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Ergebnisse der Varianzanalyse der fAS-Konzentrationen und ihrer prozentualen Anteile im fAS-Pool während der Auslaufphasen nach K01-Zulagen

| P | fAS | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Asp | Glu | Ser | His | Gly | Thr | Ala | Arg | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu |
| p _{Konz} | ,000 | ,003 | ,012 | ,007 | ,001 | n.s. | ,000 | n.s. | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | n.s. | ,001 | ,001 |
| p _% | ,010 | ,000 | n.s. | n.s. | n.s. | ,003 | ,000 | ,023 | ,002 | ,000 | ,000 | ,000 | n.s. | ,020 | ,000 |

n.s. nicht signifikant ($p > 0,05$)

p_{Konz} Differenzsignifikanz, bezogen auf Konzentration; p_% bezogen auf prozentualen Anteil

Die Konzentrations- und/oder Anteilsunterschiede bestimmter fAS in den einzelnen Auslaufphasen gegenüber allen anderen Auslaufphasen wurden mittels Post Hoc Test nach Scheffé ermittelt. Wie Abbildung 4.26 zeigt, traten Unterschiede nach Zulagen von K01 größtenteils in Laufgruppe I auf (Alanin- und Valinkonzentrationen sowie Glutamat-, Alanin- und Valinanteile).

Die anschließende Durchführung des t-Tests für unabhängige Stichproben ermöglichte es, Konzentrations- und Anteilsunterschiede gegenüber den jeweiligen Kontrollphasen zu ermitteln (**Frage 5**). In den Auslaufphasen lagen die Glutamat- und Argininkonzentrationen in den Kontrollfermentern über denen der Kontrollphasen ($p < 0,05$ für Glutamat in Laufgruppe II und für Arginin in Laufgruppe III). Auch die prozentualen fAS-Poolanteile dieser AS erhöhten sich (p teilweise $< 0,05$), während die Alaninanteile abnahmen ($p < 0,05$ in den Laufgruppen II und IV). Die Auswirkungen auf andere fAS waren heterogen und überwiegend gering. Detaillierte Informationen können den Tabellen 9.114 und 9.115 entnommen werden.

4.5.3.2 Freie Aminosäuren-Pools während der Auslaufphasen nach Zulagen der Schadgrassilagen

Auch nach Beendigung der Schadgrassilagezulagen nahmen die fAS-Konzentrationen ab und erreichten überwiegend ähnliche Konzentrationen und Anteile wie die jeweiligen Kontrollen. Wie die Abbildung 4.27 und die Tabellen 9.116 und 9.117 zeigen, ermittelte der t-Test für gepaarte Stichproben vor allem nach Zulagen von S04, S07, S09, S10 und S11 sowie bei Alanin-, Arginin- und Valinkonzentrationen und -anteilen Unterschiede ($p < 0,05$) zur jeweiligen Kontrolle (**Frage 6**).

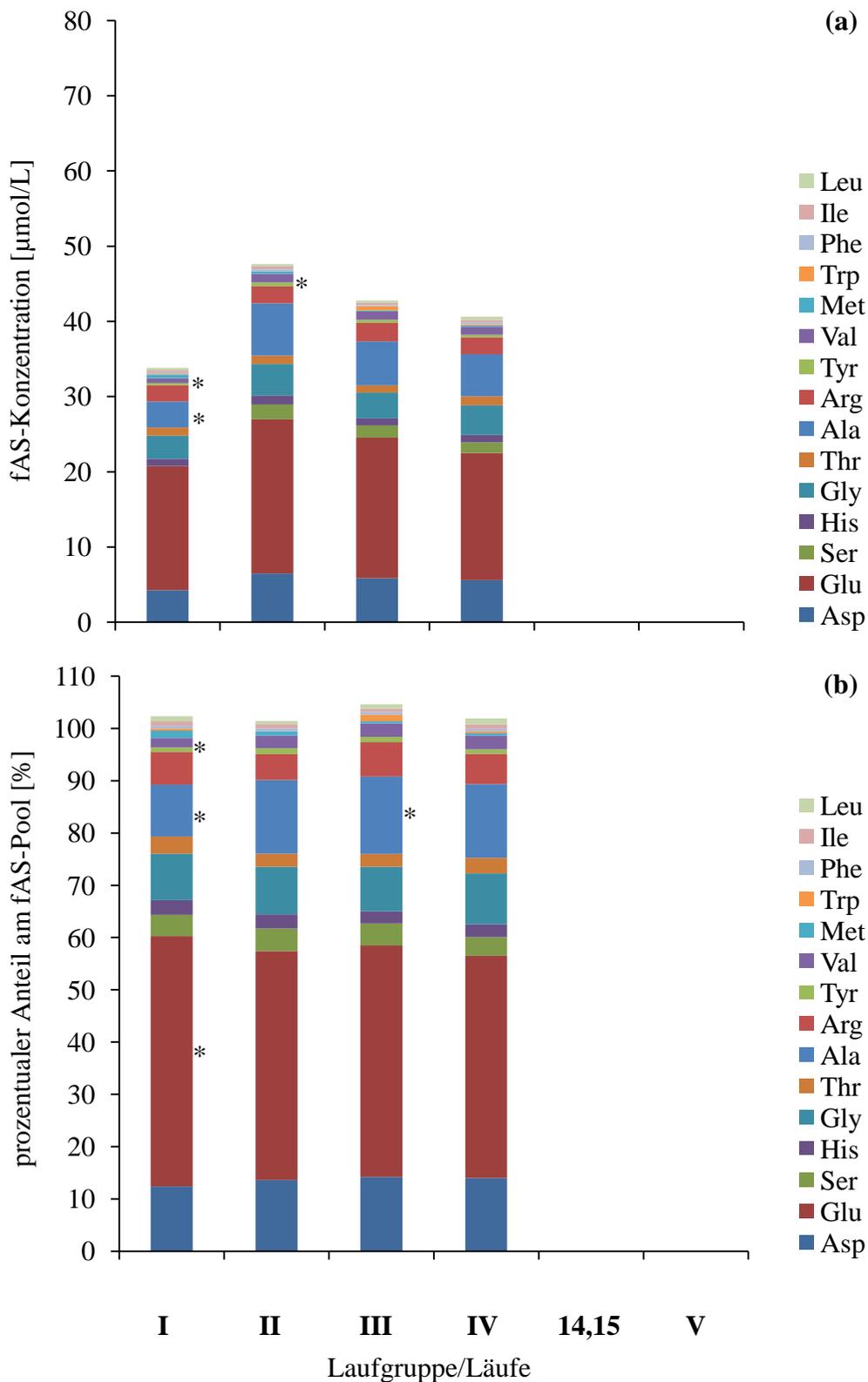


Abb. 4.26: fAS-Konzentrationen (a) in und prozentuale -Anteile (b) an den fAS-Pools der Auslaufphasen nach Zulagen von K01. * Unterschied zu den entsprechenden Anteilen oder Konzentrationen aller anderen Laufgruppen: $p < 0,05$

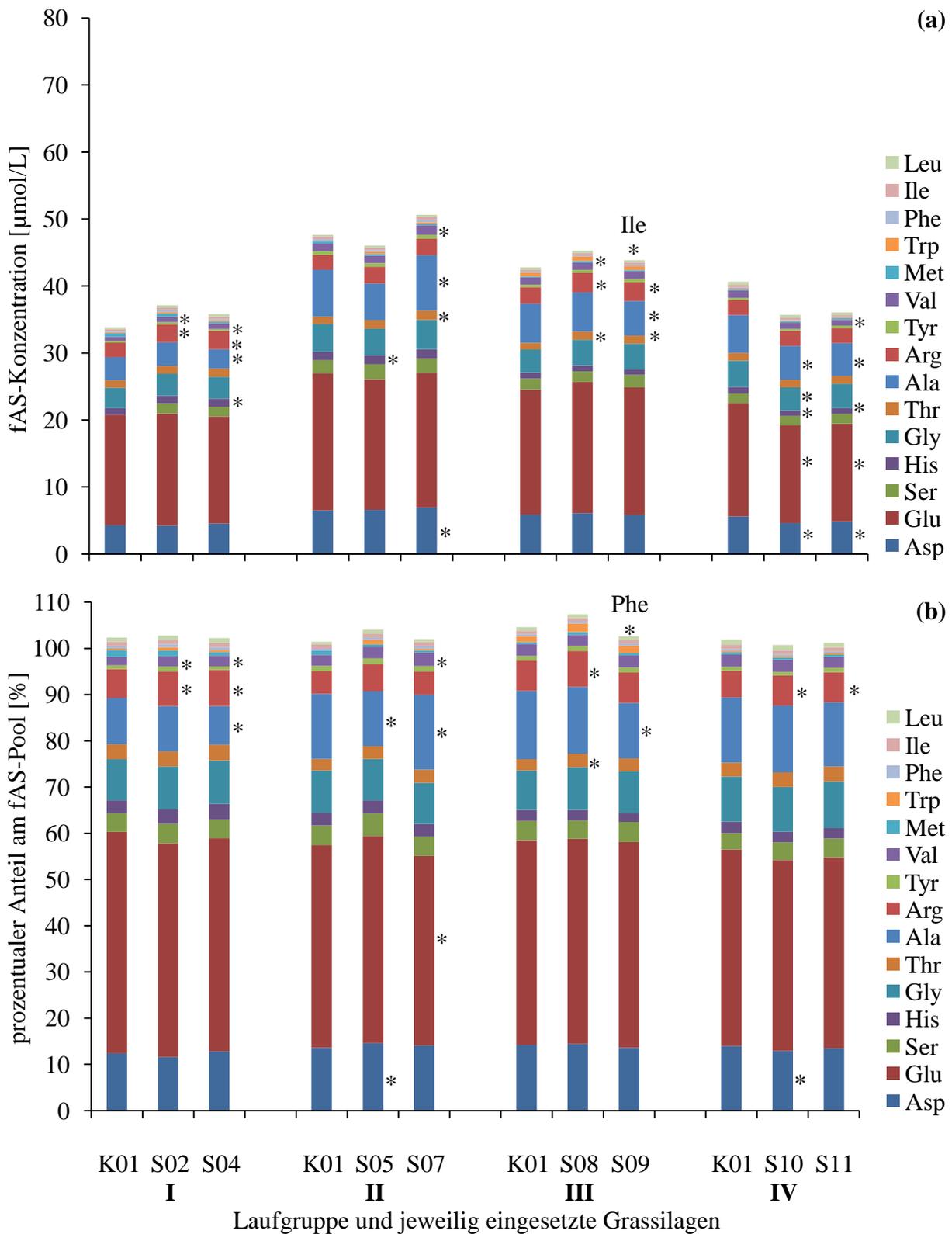


Abb. 4.27: fAS-Konzentrationen (a) in und -Anteile (b) an den fAS-Pools der Auslaufphasen nach Zulagen von K01 und den Schadgrassilagen. * Unterschied zur jeweiligen Kontrolle: $p < 0,05$

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 4.5 zeigt die mittleren prozentualen Veränderungen der erfassten Parameter unter Zulagen von Schadgrassilagen gegenüber der Kontrolle K01 in den Versuchsphasen. Die wichtigsten Versuchsergebnisse sind:

Ammoniakkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit

- Die Zulagen von S04, S09 und S08 führten zu starker Erhöhung der Ammoniakkonzentrationen während der Versuchsphasen (+58,8 bis +81,3 %). Weniger deutlich ausgeprägt war der Effekt bei S05, S12, S02, S11 und S10 (+19,6 bis +41,9 %), S07 und S13 bewirkten die geringsten Konzentrationserhöhungen (+6,12 bzw. +10,8 %).

Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit

- Die Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit stiegen unter Zulagen von S04 am stärksten an (+16,7 %), S13- und S02-Zulagen bewirkten eine Abnahme um 17,9 bzw. 10,0 %. Die übrigen Schadgrassilagen hatten, verglichen mit K01, nur geringgradigen Einfluss auf den Gehalt bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit.

Konzentrationen der freien Aminosäuren in der Fermenterflüssigkeit

- Bei Grassilagezulagen erhöhten sich die Konzentrationen der meisten fAS. Der Grad der Erhöhungen war zwischen den Zulagen unterschiedlich.
- Die Summe der fAS-Konzentrationen gegenüber K01 nahm nur bei Zulagen von S04 deutlich zu (+56,7 %), S12 bewirkte die zweitgrößte Erhöhung (+12,9 %).
- Die Zulagen von S04 bedingten bei allen erfassten fAS außer Tryptophan (im Mittel +23,3 %) und Phenylalanin (+16,2 %) die größten Anstiege im Vergleich mit K01.
- Die Zulagen von S10, S09, S11 und S13 erniedrigten die Gesamtkonzentration der fAS gegenüber K01 (-4,23, -4,41, -9,30 bzw. -10,9 %).
- Histidin war die fAS, die jeweils im Vergleich mit K01 die größten und heterogensten mittleren Konzentrationsabweichungen erfuhr [-66,3 (S13) bis +157 % (S04)]. Es war auch die fAS, deren Konzentration in der Fermenterflüssigkeit durch Zulagen der Schadgrassilagen am häufigsten erniedrigt wurde (S02, S05, S08, S10, S11, S13 und S12).

Konzentrationen der biogenen Amine in der Fermenterflüssigkeit

- Serotonin war überwiegend in der Versuchsphase nachweisbar, wobei die Zulagen von K01 höhere Konzentrationen als solche von S08, S09, S10 und S11 bewirkten.
- Tyramin kam in Kontroll- und Auslaufphase nur in geringen Konzentrationen vor. Mit Versuchsphasenbeginn stieg seine Konzentration schnell und sehr stark an. Mit Ausnahme von S12 lagen die Konzentrationen bei Schadgrassilagezulagen höher als bei K01.

Zusammensetzungen der fAS-Pools in der Fermenterflüssigkeit

- Die fAS-Konzentrationen im und ihre prozentualen Anteile an den fAS-Pools während der Kontrollphase unterschieden sich in den einzelnen Kontrollphasen kaum. Unter Zulagen der Kontrolle K01 kam es hingegen vermehrt zu geringgradigen, wenn auch signifikanten Abweichungen einzelner Laufgruppen(-paare) von den übrigen Laufgruppen.
- Unter Zulagen von S04 und S12 kam es am häufigsten, unter S02-, S05-, S11- und S13-Zulagen eher selten zu Konzentrationsveränderungen gegenüber den jeweiligen Kontrollen in den fAS-Pools der Versuchsphasen. Die Histidinkonzentration wurde durch Zulage aller

Schadgrassilagen beeinflusst, die Isoleucinkonzentration hingegen nur vereinzelt (S02, S04, S11). Zu Verschiebungen der prozentualen Anteile einzelner fAS an den fAS-Pools kam es vor allem, wenn S04, S09 und S10 zugelegt wurden. Außer durch S08 wurde der Histidinanteil durch alle Schadgrassilagen beeinflusst, während Serin, Glycin, Threonin, Tyrosin und Isoleucin in überwiegend stabilen Anteilen auftraten.

- Nach Zulagen von K01 unterschieden sich die fAS-Konzentrationen und ihre Anteile an den fAS-Pools der Auslaufphasen nur in Einzelfällen voneinander. Glutamatkonzentrationen und -anteile lagen aber höher als in der Kontrollphase (p überwiegend $< 0,05$). Die Auswirkungen auf die übrigen fAS waren heterogen und zahlreicher als zwischen den fAS-Pools der Kontrollphasen.
- Nach Schadgrassilagezulagen zeigten sich vor allem bei Histidin, Alanin und Arginin veränderte Konzentrationen in den fAS-Pools ($p < 0,05$), während sich die Serin- und Leucinkonzentrationen nicht von denen nach Zulagen von K01 unterschieden. Die Histidinanteile in den fAS-Pools entsprachen stets der jeweiligen Kontrolle. Die meisten Konzentrationsabweichungen von den jeweiligen Kontrollen wurden nach Zulagen von S10 und S11, die meisten Anteilsabweichungen hingegen nach Zulagen von S04 und S07 beobachtet.
- Zusammengefasst waren die Veränderungen der prozentualen fAS-Poolzusammensetzung durch Schadgrassilagezulagen trotz statistisch signifikanter Unterschiede aber eher gering. Der fAS-Pool in der Fermenterflüssigkeit scheint vielmehr eine charakteristische Zusammensetzung aufzuweisen.

Tab. 4.5: *Mittlere prozentuale Effekte der Schadgrassilagezulagen im Vergleich mit der Kontrollgrassilage K01 [%]*

| Parameter | Schadgrassilagezulage | | | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| Ammoniak | +27,5 | +81,3 | +41,9 | +6,12 | +58,8 | +73,7 | +19,6 | +19,8 | +10,8 | +30,3 |
| Bakterielles Protein | -10,0 | +16,7 | +11,0 | +5,00 | +10,0 | +15,6 | +4,05 | -7,10 | -17,9 | -0,27 |
| Σ fAS | +5,84 | +56,7 | +0,51 | +11,4 | +2,90 | -4,41 | -4,23 | -9,30 | -10,9 | +12,9 |
| Aspartat | +7,84 | +138 | +11,4 | +19,5 | +8,78 | -20,7 | -9,11 | -12,9 | -5,04 | +24,9 |
| Glutamat | +4,41 | +33,1 | +12,1 | +9,44 | +10,4 | -13,0 | -4,84 | -0,71 | -3,64 | +17,6 |
| Serin | +20,6 | +70,9 | -1,48 | +6,92 | -18,1 | +25,4 | -17,4 | -17,2 | -28,9 | +7,94 |
| Histidin | -25,0 | +157 | -13,1 | +45,1 | -31,6 | +27,0 | -28,2 | -53,9 | -66,3 | -23,9 |
| Glycin | +13,1 | +69,3 | -6,49 | +13,0 | +15,8 | +11,6 | +5,73 | -5,77 | -13,3 | +15,0 |
| Threonin | +12,6 | +95,4 | +10,0 | +26,0 | +19,4 | +8,93 | -0,10 | -1,00 | -7,76 | +21,5 |
| Alanin | +4,80 | +20,1 | -24,4 | +5,58 | -18,5 | -12,4 | -8,88 | -12,0 | -4,71 | +3,30 |
| Arginin | +8,09 | +70,7 | +30,1 | +15,1 | +17,7 | -6,22 | -2,14 | +3,18 | -10,6 | +1,89 |
| Tyrosin | +19,2 | +103 | +1,91 | +5,04 | +17,3 | +1,47 | +12,2 | -7,92 | -13,9 | +9,92 |
| Valin | +36,2 | +76,6 | -2,49 | +21,3 | +19,9 | +13,6 | +14,7 | -12,6 | -5,69 | +12,1 |
| Methionin | +12,7 | +57,6 | +10,7 | +36,1 | +26,8 | +0,45 | +19,8 | -6,76 | +10,6 | +20,5 |
| Tryptophan | -20,0 | +23,3 | +10,6 | -8,65 | -0,55 | -6,22 | +17,1 | -31,3 | +15,6 | +32,6 |
| Phenylalanin | -9,67 | +16,2 | -3,32 | +15,1 | -0,49 | +44,1 | +30,7 | +1,56 | +3,87 | +39,4 |
| Isoleucin | +18,3 | +57,8 | -9,05 | +13,0 | -7,18 | +11,7 | -0,73 | -29,9 | -6,59 | +4,39 |
| Leucin | +26,3 | +108 | -21,9 | +10,7 | -12,4 | +38,1 | +11,3 | -15,4 | -3,85 | +19,9 |
| Serotonin | | | | | -35,8 | -38,2 | -62,9 | -67,3 | +85,1 | +64,1 |
| Tyramin | | | | | +256 | +155 | +47,2 | +85,6 | +21,0 | -21,0 |

5 Diskussion

5.1 Intention der Arbeit

Unter *in-vitro*-Bedingungen sollten Grassilagen überprüft werden, die sich durch zwei Besonderheiten auszeichneten. Zum einen stammten die sogenannten Schadgrassilagen (s. Kap. 3.2.3.3) aus Betrieben, in denen nach ihrer Verfütterung die in Kapitel 1 beschriebenen klinischen Erscheinungen aufgetreten waren. Zum anderen lagen in fast allen dieser Grassilagen die RE-Anteile am Rp unter 50 %.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf den Proteinstoffwechsel im Pansensaft. Im Vordergrund stand die Beantwortung der Frage, ob es bei der Fermentation der Schadgrassilagen zu vermehrtem Aminosäurenabbau kam. Des Weiteren wurde ermittelt, ob die Nettoproteinsynthese der flüssigkeitsassoziierten Bakterien im ruminalen Kompartiment 1 (Pansensaft) gegenüber einer Kontrolle erniedrigt wurde.

5.2 Kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus

5.2.1 Das RUSITEC-System und Inokulum

Das in dieser Studie verwendete Langzeitinkubationssystem RUSITEC wurde bereits kritisch in den Dissertationen von SCHIRMER (1990), KRAKOW (1992), BECKER (1994) und MAIWORM (1994) diskutiert. Es wurde als geeignet befunden, *in-vivo*-Bedingungen simulieren zu können.

Vor Einbringung in die RUSITEC-Fermenter wurde Pansensaft des Spendertiers durch eine doppelte Gazelage geseiht und entsprach somit dem strukturell-funktionellen ruminalen Kompartiment 1 (Pansenflüssigkeit; Näheres s. HÖLTERSHINKEN 1990) nach CZERKAWSKI (1979). Durch die Einwaage festen Panseninhalts sind im RUSITEC die Kompartimente 2 (enthält reversibel gebundene Bakterien, Entfernung durch Waschen der Futterbeutel möglich) und 3 (enthält irreversibel gebundene Bakterien) vorhanden. Kompartiment 4 (Pansenwand und anhaftende Bakterien) kann im RUSITEC-System nicht simuliert werden (CZERKAWSKI 1979). Ausführliche Informationen zur Kompartimentierung können ELIAS (1999) entnommen werden.

Die Dichtigkeit des Systems in der vorliegenden Studie spiegelten die Parameter Gasvolumen sowie N₂- und CO₂-Konzentrationen wider, einheitliche Überstandsvolumina während der Kontrollphasen sprachen für eine gleichmäßige Funktion des Systems (Pufferzufuhr, Einwaagen)³⁰. Konstante Ammoniakkonzentrationen und pH-Werte (s. GAST 2010) in der Kontrollphase zeigten zudem die Entstehung eines „steady state“ mit gleich bleibenden Fermentationsbedingungen an.

In Kontroll- und Auslaufphasen erfolgte die tägliche Beladung der Fermenter mit 12,0 g Heu (10,5 g TS) und 3,4 g Kraftfutter (3,0 g TS), während in den Versuchsphasen neben 3,4 g Kraftfutter 10,5 g TS der jeweiligen Grassilagen zu täglichen Beladung der Fermenter einge-

³⁰ laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lump, Hannover am 12.03.2010

setzt wurden. Art und Menge des eingewogenen Kraftfutters waren identisch mit denen in Kontroll- und Auslaufphasen. Durch diese Vorgehensweise wurden die Bedingungen in der Praxis soweit wie möglich simuliert.

5.2.2 Eingesetzte Grassilagen

Die hier als „Schadgrassilagen“ bezeichneten Futterproben stammten aus Betrieben, in denen nach ihrer Verfütterung das Auftreten von Krankheitsfällen beobachtet worden war (s. Kap. 1). Sie wiesen bis auf S08 und S12 RE-Anteile am Rp unter 50 % auf (s. Tab. 3.6). Auf die Zusammensetzung der eingesetzten Grassilagen hinsichtlich der Parameter TS-, Rohasche-, Rp-, RE-, Rohfett-, Rohfaser-, NfE-, NDF- und ADF-Gehalt sowie den pH-Wert der Grassilagen und mögliche lagerungsbedingte Veränderungen (Tiefgefrieren bis zum Einsatz im RUSITEC) wird bei GAST (2010) eingegangen.

5.2.2.1 Reineiweißgehalte der eingesetzten Grassilagen

Die RE-Gehalte der eingesetzten Grassilagen (s. Tab. 3.5 und 3.6) wurden nach BARNSTEIN (1900) entsprechend den VDLUFA-Richtlinien (NAUMANN u. BASSLER 2004; Methode 4.4.1; Proteinfällung mit alkalischer Kupfersulfatlösung) bestimmt. In Voruntersuchungen der LUFA wies die Grassilage K01, die aus einem erkrankungsfreien Milchviehbetrieb stammte, einen RE-Gehalt von 129 g/kg TS entsprechend 83,2 % RE am Rp-Gehalt auf und wurde als Kontrollsilage ausgewählt. In Folgeuntersuchungen (s. Tab. 3.5) konnte der sehr hohe prozentuale RE-Anteil nicht bestätigt werden³¹. Wie Abbildung 5.1 zeigt, sind möglicherweise unterschiedliche Trocknungsverfahren vor der eigentlichen RE-Bestimmung oder lagerungsbedingte Veränderungen (unterschiedliche Probenentnahmetermine und -orte) Ursachen der ungleichen Analysenergebnisse. Bei Anwendung gleicher Trocknungsverfahren scheinen die Ergebnisse der Messungen nach BARNSTEIN (1900) reproduzierbar zu sein. Nach MOTHEs (1925; VDLUFA-Methode 4.4.2; Proteinfällung mit Tanninlösung) ermittelte RE-Gehalte liegen in den untersuchten Grassilagen leicht unter denen, die nach BARNSTEIN (1900) bestimmt wurden. Sowohl BARNSTEIN (1900) als auch MOTHEs (1925) geben weder Standardabweichungen noch Variationskoeffizienten für ihre Methoden an, nach Angaben des Autors soll die Proteinbestimmung mit Hilfe von Tanninlösung aber genügend exaktes Arbeiten ermöglichen (MOTHEs 1925). Bei WESTHAUSSER (1911) jedoch liegen mittels Tanninfällung ermittelte RE-Gehalte in Fäzes von Schafen um bis zu 80 % unter den nach BARNSTEIN (1900) bestimmten. Ursache ist womöglich, dass Kupfersulfat neben Proteinen auch andere Stoffe (ZAITSCHEK 1903) bzw. alle reduzierenden Substanzen bis auf Zucker (SOMOGYI 1931; Versuche mit Blut) und wahrscheinlich auch Carbonate präzipitiert³². Andererseits wurden eine Hemmung der Kupfer-Proteinatbildung durch fAS in Serum (QUIGLEY u. MURASCHI 1945) und Komplexbildung durch Fällungsmittelüberschüsse bei Fällungen mit Schwermetallionen (KODAMA 1923) beschrieben. Beides könnte zur Unterschätzung des RE-Gehalts bei gleichzeitig hohen fAS-Gehalten bzw. Fällungsmittelüberschüssen führen.

³¹ Beide Bestimmungen der RE-Gehalte wurden nach dem gleichen Verfahren durchgeführt.

³² laut persönlicher Mitteilung von Herrn Prof. B. Huchzermeyer, Hannover am 22.10.2010

Des Weiteren werden Polypeptide bis 5000 Da (entsprechend ca. 50 AS Länge) nicht durch alkalische Kupfersulfatlösung gefällt, wodurch beispielsweise das in Pflanzen regulativ tätige Ferredoxin in Lösung bleibt. Da die Fällung von Proteinen ab 30.000 Da sicher ist, ist aber davon auszugehen, dass mehr als 90 % der pflanzlichen Proteine tatsächlich in der RE-Fraktion nach BARNSTEIN (1900) erfasst werden³².

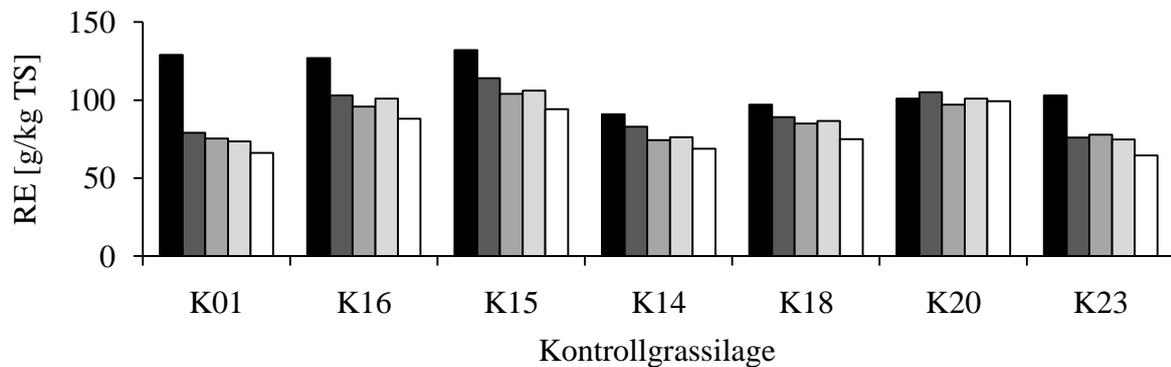


Abb. 5.1: RE-Gehalte [g/kg TS]³³ der Kontrollgrassilagen bei Anwendung unterschiedlicher Trocknungsverfahren und Methoden zur RE-Bestimmung. Die Analysen durch die LUFA Nord-West und das Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover wurden nach BARNSTEIN (1900) durchgeführt (VDLUFA-Methode 4.4.1). Die Proben A.1 bis A.3 entstammten jeweils demselben Silo, Proben mit der Bezeichnung B waren identisch.

- Bestimmung durch die LUFA nach Trocknung bei 70 °C (Probe A.1)
- Bestimmung durch die LUFA nach Gefriertrocknung (Probe A.2)
- Bestimmung durch das Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover nach Gefriertrocknung (Probe A.3)
- Bestimmung durch das Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover nach Gefriertrocknung (Probe B)
- Bestimmung durch Blgg in Parchim nach MOTHES (1925, VDLUFA-Methode 4.4.1; Probe B)

Das CNCPS (SNIFFEN et al. 1992; CHALUPA u. SNIFFEN 1996; LICITRA et al. 1996; s. Kap. 2.2) nutzt im Gegensatz zu den VDLUFA-Methoden die Proteinfällung mittels Wolfram- (VAN SOEST 1994) oder Trichloressigsäure (TCA; KRISHNAMORTHY 1982; VAN SOEST 1994) und die Löslichkeit einzelner Präzipitatfraktionen zur Proteingehaltsbestimmung. Unklar ist auch hier, ob nur Proteine bzw. Polypeptide gefällt werden, oder ob auch andere Stoffe (beispielsweise aminoglycosidische Verbindungen) im Präzipitat enthalten sind. Des Weiteren wird bei der Säurefällung vermutlich nicht der isoelektrische Punkt aller proteinogenen Stoffe erreicht, so dass diese teilweise unerfasst in Lösung bleiben müssen. Weitere Studien zeigen, dass sich die Wiederfindungsrate mit steigenden Proteinkonzentrationen (BENSADOUN u. WEINSTEIN 1976) und bei fraktionierter Fällung mit steigenden TCA-Konzentrationen zwar verbessert, aber trotzdem nicht 100 % erreicht (SUTHERLAND et al. 1949). Neue Untersuchungen (SIVARAMAN et al. 1997) weisen zudem darauf hin, dass der TCA-Fällmechanismus möglicherweise in TCA-induzierten Strukturveränderungen

³³ Die Messwerte wurden durch das Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

in den zu präzipitierenden Proteinen begründet ist (Überführung in einen „klebrigen A-Zustand“, in dem vermehrt hydrophobe Reste nach außen gedreht werden). Letzteres erklärt verbesserte Wiederfindungsraten bei höheren (BENSADOUN u. WEINSTEIN 1976) bzw. mittleren TCA-Konzentrationen (BENSADOUN u. WEINSTEIN 1976; LeBRUN et al. 2008). In der Folge kommt es zu Assoziation und reversibler Präzipitation der Proteine. Bei weiter steigenden TCA-Konzentrationen wird der A-Zustand übergangen und die Proteine liegen in vollständig entfaltetem und löslichem Zustand vor (SIVARAMAN et al. 1997). Bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen ist daher möglicherweise keine vollständige Proteinassoziation und somit keine Präzipitation möglich. Zusammengefasst erlaubt das CNCPS die folgenden Aussagen bezüglich der RE-Fraktion:

- RE im Sinne des CNCPS umfasst neben Proteinen ggf. weitere Substanzen, die durch TCA bzw. Wolframsäure präzipitiert werden.
- RE beinhaltet keine NPN-Verbindungen und Peptide mit einer Kettenlänge unter zehn bzw. drei AS (s. Kap. 2.2).
- Verbindungen der C-Fraktion und proteinogene Substanzen, die nicht mit TCA bzw. Wolframsäure fällbar sind, sind nicht enthalten (s. Kap. 2.2).

Aus der Literatur ist auch bei der RE-Bestimmung nach BARNSTEIN (1900) nicht im Detail ersichtlich, welche weiteren Verbindungen neben Proteinen mit Molekulargewichten ab 30.000 Da gefällt und als „Reineiweiß“ erfasst werden (s.o.). Möglicherweise variieren die Wiederfindungsraten, jedoch entfällt die Schwierigkeit der Fällung am isoelektrischen Punkt der Proteine. Trotz dieser Einschränkungen handelt es sich um eine offizielle Untersuchungsvorschrift des VDLUFA (NAUMANN u. BASSLER 2004; Methode 4.4.1), deren Verwendung sich bei der Grassilagebewertung im Alltag bereits bewährt hat (EICKEN 2005 a).

5.2.2.2 Gehalte freier Aminosäuren in den eingesetzten Grassilagen

Freie AS können im Pansen durch die HAP-Spezies *Psc. anaerobius* (CHEN u. RUSSELL 1988), *C. sticklandii* und *C. aminophilum* (CHEN u. RUSSELL 1989 a) sowie bestimmte *M. elsdenii*-Stämme (RYCHLIK u. RUSSELL 2002 a) schnell zu Ammoniak und flüchtigen Fettsäuren sowie ihren i-Varianten abgebaut werden (s. Kap. 2.1.8.1.11.1).

In K01 kamen Alanin und die verzweigtkettigen AS Leucin und Valin in den größten Massenkonzentrationen vor. Es folgten Phenylalanin, Isoleucin, Glutamat, Threonin und Glycin. Arginin und Methionin hatten nur geringe Anteile. Die Gehalte an freiem Glutamat, Glycin, Threonin, Alanin, Arginin, Valin, Methionin, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin in K01 lagen größtenteils im Konzentrationsbereich der in der Studie WINTERS et al. (2001)³⁴ eingesetzten Grassilage. Sowohl K01 als auch die Grassilage der Studie WINTERS et al. (2001) wiesen höhere Glutamat- und Arginin-, sowie niedrigere Glycin-, Alanin-, Valin-, Isoleucin- und Leucingehalte auf als die Grassilage in der Studie HERON et al. (1986)³⁴. OHSHIMA et al. (1979) dokumentierten auffällig hohe Gehalte freien Glycins, Threonins, Alanins, Valins, Phenylalanins, Isoleucins und Leucins. Ursachen für die unterschiedlichen fAS-Gehalte sind möglicherweise abweichende Silier- bzw. Lagerungsdauern, die Lagerungsbedingungen (Lagerung von K01 bei -20 °C; s. GAST 2010) und die Probenaufbereitung bzw. -analytik sowie ungleiche botanische Zusammensetzungen (s. Tab. 9.118).

³⁴ In den Studien HERON et al. (1986), VON KEYSERLINGK et al. (1998) und WINTERS et al. (2001) konnten Asp und Asn sowie Glu und Gln nur gemeinsam detektiert werden, die Vergleichbarkeit mit K01 ist daher eingeschränkt.

Angaben zu fAS-Gehalten in Schadgrassilagen nach obiger Definition (s. Kap. 3.2.3.3) gibt es in der Literatur nicht. Es ist aber nicht auszuschließen, dass zumindest die Grassilagen der Studien HERON et al. (1986; noch ein Drittel des Proteingehalts des Siliermaterials enthalten) und WINTERS et al. (2001; größere Mengen an fAS-N als Protein- und Peptid-N enthalten: 15,1 vs. 25,1 und 20,5 mol/kg N) RE-Anteile unter 50 % am Rp enthielten.

Die eingesetzten Schadgrassilagen wiesen tendenziell höhere fAS-Gehalte auf als K01 und die übrigen Kontrollgrassilagen (s. Abb. 5.2). Bei S08 und S12 waren die höheren fAS-Gehalte auf hohe Rp-Gehalte zurückzuführen (s. Tab. 3.6), wohingegen in S09 der N-Abbau vermutlich schon so weit fortgeschritten war, dass die fAS-Konzentrationen bereits wieder abgenommen hatten (s. Kap. 5.2.2.5 und Abb. 5.5).

Lediglich die Gehalte freien Arginins lagen in den Kontroll- eher höher als in den Schadgrassilagen, was möglicherweise durch unterschiedlich schnelle pH-Wertabsenkung während der Silierung bedingt war (Verbleiben höherer Argininanteile bei rascher pH-Wert-Absenkung; MACPHERSON u. VIOLANTE 1966 a, b). Die Argininkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit lagen jedoch nur bei Zulagen von S09, S10 und S13 geringgradig tiefer als bei den jeweiligen Kontrollen (s. Tab. 4.5), so dass eine Beeinflussung ihrer Höhe durch den Gehalt freien Arginins in den Grassilagen unwahrscheinlich ist.

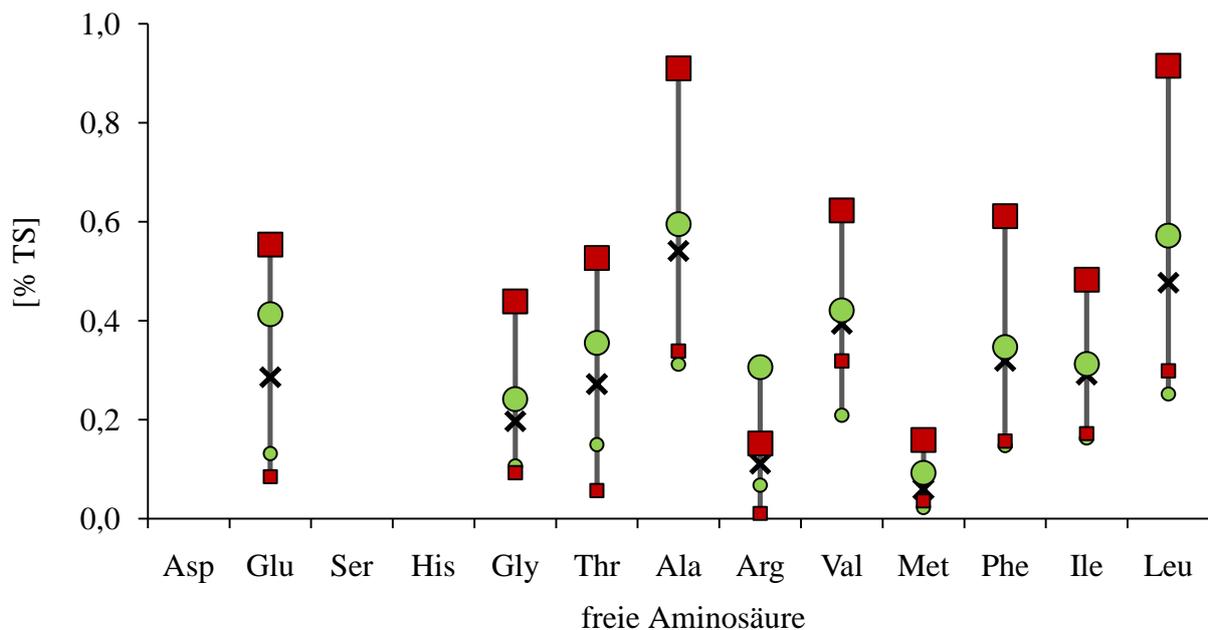


Abb. 5.2: fAS-Gehalte in K01, den übrigen Kontroll- und den Schadgrassilagen: geringster Gehalt [% der TS] in Kontroll (○)- und Schadgrassilagen (■), höchster Gehalt [% der TS] in Kontroll (○)- und Schadgrassilagen (■) und Gehalt [% der TS] in K01 (×)
Die senkrechte Markierung gibt die Spannweite aller gemessenen Gehalte an.

5.2.2.3 Aminosäuregesamt- und Ammoniakgehalte in den eingesetzten Grassilagen

Nach extrazellulärem ruminalen Abbau höhermolekularer N-Verbindungen wie Peptiden und Proteinen werden AS frei (TAMMINGA 1979), die anschließend wie fAS metabolisiert werden können. Wie Abbildung 5.3 zeigt, wiesen in K01 Aspartat, Glutamat, Leucin, Alanin und

Valin die höchsten Gesamtgehalte, Glycin, Phenylalanin, Isoleucin, Threonin, Serin und Arginin hingegen nur mittlere Gehalte auf. Histidin und Methionin kamen weniger oft vor. Die Gesamtgehalte einzelner AS in K01 glichen weitestgehend denen der Studien SEYFARTH et al. (1989), VON KEYSERLINGK et al. (1998)³⁴, WINTERS et al. (2001) und ARRIGO (2006). Abweichungen gab es vor allem bei Aspartat und/oder Glutamat (höher bei VON KEYSERLINGK et al. 1998 und niedriger bei SEYFARTH et al. 1989, WINTERS et al. 2001 bzw. ARRIGO 2006), während die Valin- und/oder Leucinanteile nur in den Studien VON KEYSERLINGK et al. (1998) und ARRIGO (2006) geringgradig tiefer lagen. Gegenüber der Studie HERON et al. (1986) wies K01 höhere Aspartat-, Glutamat-, Serin- und Threoninanteile, sowie niedrigere Alanin- und Argininanteile auf. Eine Knautgrassilage (SEYFARTH et al. 1989) zeigte höhere Gehalte fast aller AS mit Ausnahme von Glutamat, Serin, Threonin, Tyrosin, Methionin und Isoleucin. Möglicherweise sind die Gehaltsunterschiede durch die gleichen Gründe wie bei den fAS-Gehalten bedingt (s. Kap. 5.2.2.2), wobei die botanische Zusammensetzung für die AS-Gesamtgehalte aber vermutlich von größerer Bedeutung ist. Auch bezüglich der AS-Gesamtgehalte gibt es in der Literatur keine Angaben zu Schadgrassilagen nach obiger Definition (s. Kap. 3.2.3.3). Die AS-Gesamtgehalte in den eingesetzten Schadgrassilagen korrelierten zwar mit den Rp-Gehalten, eindeutige Zusammenhänge mit den RE-Gehalten bzw. prozentualen RE-Anteilen am Rp bestanden aber nicht.

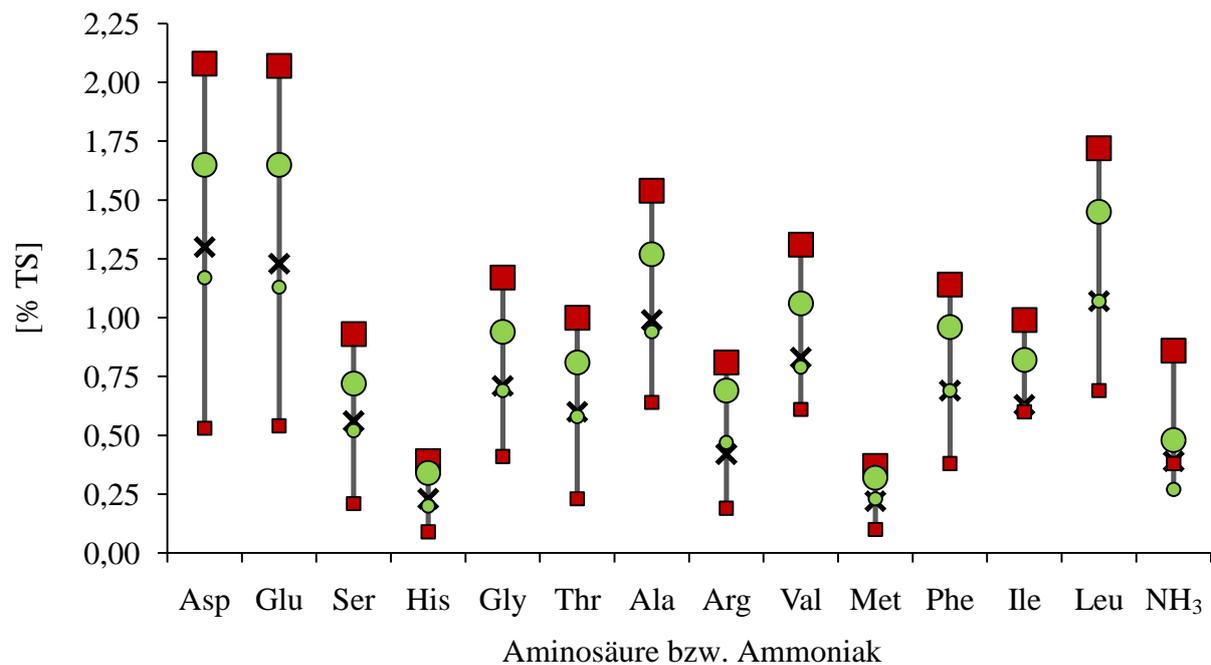


Abb. 5.3: AS-Gesamt- und Ammoniakgehalte in K01, den übrigen Kontroll- und den Schadgrassilagen:
geringster Gehalt [% der TS] in Kontroll (○)- und Schadgrassilagen (■),
höchster Gehalt [% der TS] in Kontroll (●)- und Schadgrassilagen (■) und
Gehalt [% der TS] in K01 (×)
Die senkrechte Markierung gibt die Spannweite aller gemessenen Gehalte an.

Die Ammoniakgehalte lagen in den Schadgrassilagen tendenziell höher als in Kontrollgrassilagen, wobei die von SEYFARTH et al. (1989) beobachtete negative Korrelation mit den

TS-Gehalten nur teilweise bestätigt wurde. S09 und S12 zeigten deutlich höhere Ammoniakgehalte, K23 einen geringfügig niedrigeren Ammoniakgehalt bezogen auf den TS-Gehalt im Vergleich mit den übrigen Grassilagen.

5.2.2.4 Anteile freier Aminosäuren an den Gesamtaminosäuregehalten in den eingesetzten Grassilagen

Je höher der Anteil der in freier Form vorliegenden AS ist, desto schneller vollzieht sich ihr ruminaler Gesamtabbau. In der Folge kann es möglicherweise zu Verknappung bzw. Anreicherung bestimmter AS im Pansensaft kommen. In K01 lagen die freien Anteile der einzelnen AS teilweise deutlich unter den aus der Literatur berechneten Werten (Glycin, Threonin, Alanin, Leucin). Der freie Argininanteil war mit 26 % relativ niedrig (s. Abb. 5.4) und vergleichbar mit den Anteilen in der Studie WINTERS et al. (2001). Abweichungen zeigten sich zur Grassilage aus der Studie HERON et al. (1986), in der die Anteile freien Valins, Isoleucins und Leucins deutlich höher als in K01 lagen. Ursache waren möglicherweise weitergehende proteolytische Vorgänge als bei K01, worauf auch der niedrige Proteingehalt im Endprodukt hindeutet (s. Kap. 5.2.2.2). Des Weiteren wurde in Gräsern das Auftreten zirkardianer fAS-Konzentrationschwankungen beobachtet³⁵, was sich durch die Wahl des Schnitzeitpunktes im Tagesverlauf ebenfalls auf den prozentualen Anteil freier AS am AS-Gesamtgehalt im Pflanzenmaterial auswirken kann.

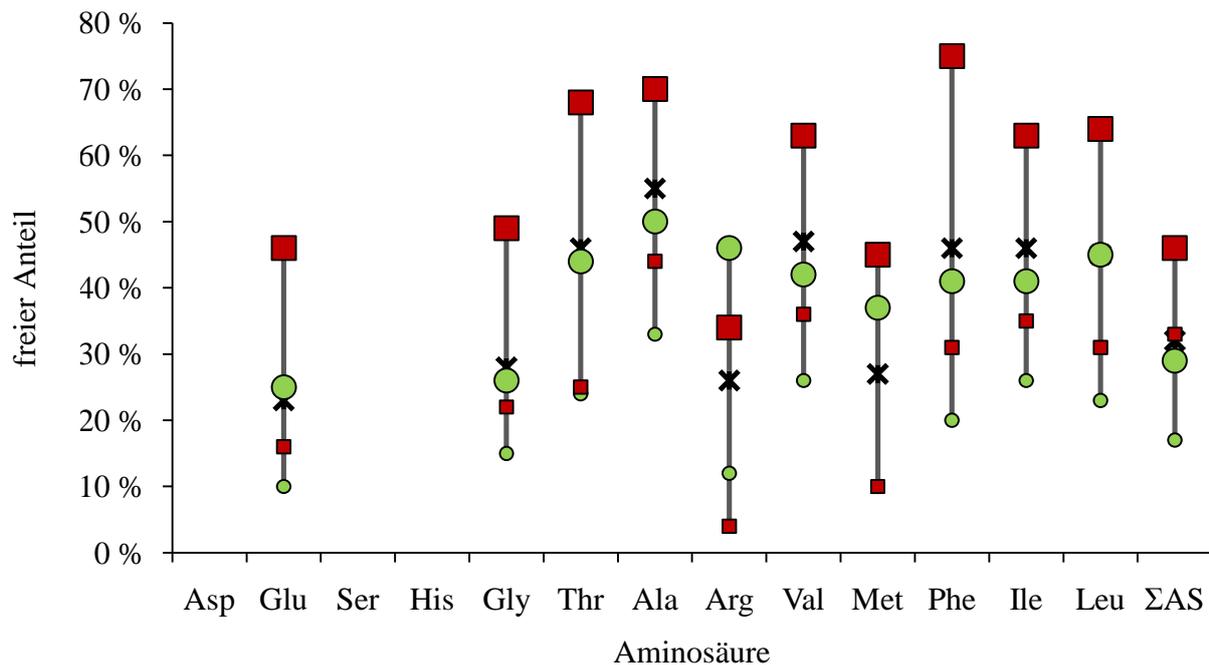


Abb. 5.4: fAS-Anteile am AS-Gesamtgehalt in K01, den übrigen Kontroll- und den Schadgrassilagen:
geringster freier Anteil [%] in Kontroll (●)- und Schadgrassilagen (■),
höchster freier Anteil [% der TS] in Kontroll (●)- und Schadgrassilagen (■) und
freier Anteil [%] in K01 (X)
Die senkrechte Markierung gibt die Spannweite der freien Anteile an.

³⁵ laut persönlicher Mitteilung von Herrn Dr. M. Höltershinken, Hannover am 18.09.2010

Angaben bezüglich des Anteils freier AS am AS-Gesamtgehalt in Schadgrassilagen gibt es in der Literatur ebenfalls nicht. Fast alle eingesetzten Schadgrassilagen wiesen höhere Anteile freier AS auf als K01. Nur in S09 war der N-Abbau möglicherweise schon so weit fortgeschritten, dass bereits auch fAS abgebaut worden waren (s. Kap. 5.2.2.2 und 5.2.2.5). Außerdem wiesen S08 und S12 mit hohen prozentualen RE-Anteilen am Rp dementsprechend niedrige fAS-Anteile bezogen auf ihre AS-Gesamtgehalte auf (s. Abb. 5.5).

5.2.2.5 Prozentuale Anteile einzelner Stickstoffverbindungsfraktionen in den eingesetzten Grassilagen

Abbildung 5.5 zeigt die N-Verbindungsfraktionen in den eingesetzten Grassilagen. Auf Grund der hohen prozentualen RE-Anteile am Rp in S08 und S12 lagen trotz hoher fAS-Konzentrationen die prozentualen fAS- und NPN-Anteile niedriger als in K01. Je geringer der RE-Anteil am Rp war und je höher fAS- und NPN-Anteile wurden, desto weiter mussten proteolytische Vorgänge fortgeschritten sein. Bei exzessivem N-Verbindungsabbau wie in S09 verkleinerte sich der fAS-Anteil wieder und die NPN- bzw. Ammoniakgehalte stiegen an. Auf die fAS-Gesamt- und Ammoniakkonzentrationen in der RUSITEC-Fermenterflüssigkeit hatten die fAS- und Ammoniak-N-Fraktionsanteile in den Grassilagen aber nur in Einzelfällen Einfluss (s. Kap. 5.5.1 und 5.5.4).

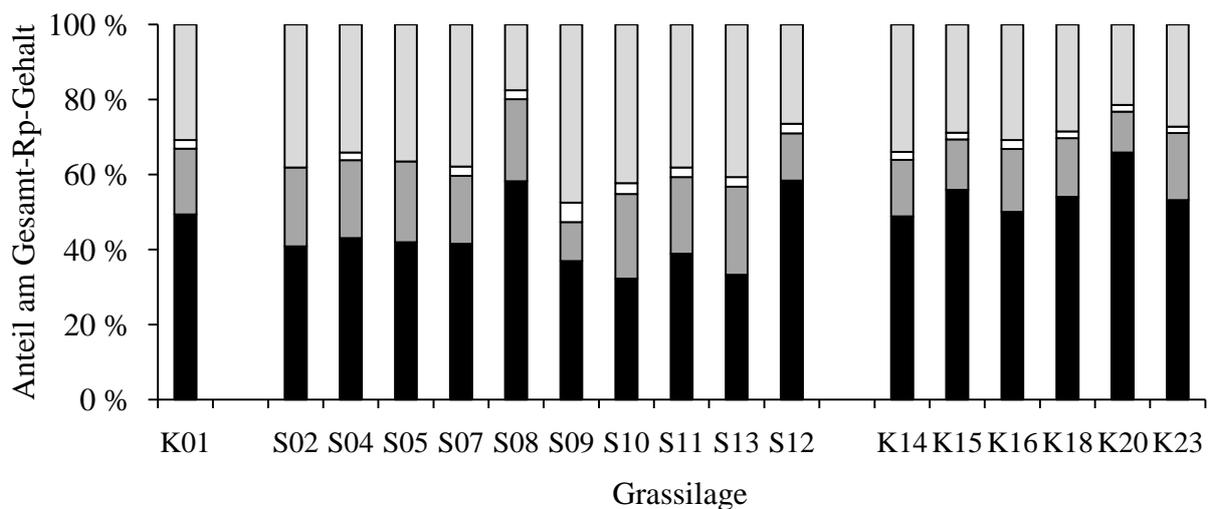


Abb. 5.5: Prozentuale Massenanteile (Gew.-%) der RE-, fAS-, Ammoniak- und NRE-N-Fraktionen in den eingesetzten Grassilagen an den Rp-Gehalten (= 100 %):
 ■ RE-, ■ fAS-, □ Ammoniak- und □ NRE-N-Anteil am Rp-Gehalt
 Die NRE-N-Anteile (nicht-Reineiweiß-N-Anteile) wurden als Differenzen zwischen den Rp- und RE- sowie fAS- und Ammoniakanteilen berechnet. Zu beachten ist, dass der fAS-Anteil nur die AS Glu, Gly, Thr, Ala, Arg, Val, Met, Phe, Ile und Leu umfasst, d.h. der NRE-N-Anteil neben niedermolekularen N-Verbindungen und nicht fällbaren Peptiden weitere AS beinhaltet. Der Ammoniakgehalt in S02 und S05 konnte nicht isoliert bestimmt werden (s. Tab. 9.4) und ist in der NRE-N-Fraktion enthalten.

5.3 Kritik der erfassten Parameter zur Kontrolle des ruminalen Proteinstoffwechsels

5.3.1 Ammoniakkonzentration und Gehalt an bakteriellem Protein

Die Eignung dieser Parameter zur Beurteilung des ruminalen Metabolismus im RUSITEC wurde bereits mehrfach hervorgehoben (s. HÖLTERSHINKEN 1990; SCHIRMER 1990; KRAKOW 1992).

In den Kontroll- und Auslaufphasen lagen die Ammoniakkonzentrationen geringfügig höher als bei BRÖCKER (1996; RUSITEC: 4,23 bis 5,73 mmol/L). Da Ammoniak beim ruminalen Abbau N-haltiger Verbindungen entsteht (EL-SHAZLY 1952; TAMMINGA 1979; NOCEK u. RUSSELL 1988), und seine Konzentration mit zusätzlicher Peptid-, AS- und Harnstoffzufuhr steigt (CRUZ SOTO et al. 1994), war möglicherweise die Verwendung des Kraftfutters mit einem Rp-Gehalt von 18,0 % (s. Tab. 3.4) anstelle von Maisstärke (s. BRÖCKER 1996) die Ursache. Beim Einsatz von Luzerneheu und einer gerstebasierten Konzentratkomponente (WANG et al. 1998; 5,35 bis 8,81 mmol/L) ergaben sich ähnliche Konzentrationen wie in den Einlauf- und Kontrollphasen der vorliegenden Studie. In den Versuchsphasen lagen die Konzentrationen jedoch teilweise über denen, die mit ähnlich hohen Grassilagezulagen (12,0 bzw. 11,1 g TS) von JAURENA et al. (2005) und MERRY et al. (2006) in RUSITEC-Fermentern gemessen worden waren (ca. 5 bis 16 bzw. 8 bis 12 mmol/L).

Die Ergebnisse der Proteinbestimmung in der Fermenterflüssigkeit lagen im unteren Bereich früherer Versuche (s. BRÖCKER 1996; MAURUSCHAT 1996; 94,6 bis 350 µg RSA/mL).

Bei der Bewertung der gemessenen Gehalte ist zu beachten, dass durch den ersten Zentrifugationsschritt bei der Probenaufbereitung (s. Kap. 3.2.5.2) Protozoen separiert wurden und auf Grund der Probenentnahme aus der Fermenterflüssigkeit nur das Protein der Bakterien des Kompartiments 1 (FAB₁; flüssigkeitsassoziierte Bakterien) erfasst werden konnte. Über die Gehalte bakteriellen Proteins in den Kompartimenten 2 und 3 (PAB: partikelassoziierte Bakterien) sind daher keine Aussagen möglich.

5.3.2 Konzentrationen freier Aminosäuren und biogener Amine

Das verwendete Analysesystem ermöglichte in einem Standardgemisch die Detektion der AS Aspartat, Glutamat, Serin, Histidin, Glycin, Threonin, Alanin, Arginin, Tyrosin, Valin, Methionin, Tryptophan, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin und Lysin sowie der biogenen Amine Histamin, Serotonin und Tyramin.

In den Fermenterflüssigkeitsproben waren Lysin und Histamin nur vereinzelt darstellbar und nicht sicher identifizierbar. Der vermeintliche Lysinpeak verschob sich diskontinuierlich, und wurde, wie bereits von BRÖCKER (1996) beschrieben, von einem weiteren bzw. Doppelpeak überlagert, bei dem unsicher war, welchem Peak bzw. ob der Lysinpeak zuzuordnen war. Histamin ließ sich in den Proben keinem Peak eindeutig zuordnen. Möglicherweise wurde die Analyse durch den sehr großen Peak behindert, der auch die Messung von Tryptophan, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin erschwerte (s.u.).

Schwierigkeiten bereitete auch die Bestimmung der Serotoninkonzentration. Da die Analysenpräzision sehr stark schwankte (VK 20,1 %) und Serotonin erst ab Laufgruppe III (Läufe

8, 9 und 10), und auch dann keineswegs in allen Proben nachweisbar war, wird auch bei Serotonin von weiterer Betrachtung abgesehen. Ähnliches gilt für die gemessenen Tyraminkonzentrationen (VK 12,6 %, erstmals in Laufgruppe III nachweisbar). Darüber hinaus deuten extrem hohe Konzentrationen darauf hin, dass zumindest zu Beginn der Versuchsphasen weitere Substanzen eluiert wurden, die die alleinige Detektion von Tyramin unmöglich machten.

Die Aussagekraft der gemessenen Glycin-, Threonin-, Alanin-, Arginin-, Valin-, Methionin-, Tryptophan-, Phenylalanin-, Isoleucin- und Leucinkonzentrationen dürfte aus folgenden Gründen teilweise eingeschränkt sein:

- Glycin und Threonin sowie Valin und Methionin wurden durch den Gradienten 05 (Lauf 6 Tag 12 bis Lauf 9 Tag 21, s. Tab. 9.9 sowie Abb. 9.3 und 9.5) relativ schlecht getrennt (s. auch Tab. 3.10; VK). In den Standards wurde der Valin und Methionin entsprechende Peak zu gleichen Anteilen Valin und Methionin, in den Proben der gesamte Peak Valin zugeordnet, da Methionin in anderen, besser getrennten Proben in weitaus geringeren Konzentrationen auftrat als Valin.
- Der Alaninpeak vergrößerte sich mit zunehmender Laufdauer des Systems im Standardgemisch, bis er schließlich seine Peakfläche verdoppelt hatte. Gleichzeitig fiel ein kleinerer Peak einer unbekannt Substanz zunehmend mit dem Alaninpeak zusammen. Bereits NUGENT und MANGAN (1981) berichteten von einer unbekannt Substanz, die in einem Ninhydrin-Analysesystem den gleichen Eluationspunkt wie Alanin hat.
- Bei Nutzung des Gradienten 05 (Lauf 6 Tag 12 bis Lauf 9 Tag 21) wurde Arginin nicht wie im Gradienten 01 (s. Tab. 9.8 und 9.9 sowie Abb. 9.2 bis 9.5) später als Alanin, sondern sehr kurz vor Glycin eluiert. Arginin und Glycin waren sowohl in Proben als auch im Standardgemisch bei Nutzung des Gradienten 05 schwer voneinander trennbar (s. auch Tab. 3.10; VK).
- Tryptophan und Phenylalanin ließen sich in den Proben nur vereinzelt und in geringen Konzentrationen nachweisen. Ferner waren Tryptophan, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin, bzw. an einigen Versuchstagen nur die letzten zwei bis drei AS, in den Proben von einem sehr großen Peak unbekannter Zusammensetzung (s. Abb. 9.4 Peak ab Minute 30 und Abb. 9.5 Peak ab Minute 35) überlagert, auf dem sie nur als „Sekundärpeaks“ identifizierbar waren.

Die in der Fermenterflüssigkeit gemessenen Aspartat-, Glutamat-, Serin-, Glycin- und Methioninkonzentrationen lagen überwiegend in den in der Literatur angegebenen Bereichen (s. Tab. 9.119), während Histidin in deutlich geringeren Konzentrationen vorkam als bei VELLE et al. (1997), die ihre Versuche aber *in-vivo* durchführten. Threonin, Alanin, Arginin, Tyrosin, Valin, Tryptophan, Isoleucin und Leucin wiesen geringere Konzentrationen auf, als in der Literatur beschrieben (s. Tab. 9.119). Möglicherweise sind fAS-Konzentrationen im RUSITEC-System generell niedriger, als *in-vivo* zu erwarten ist. Zu beachten ist außerdem, dass die Proben in der vorliegenden Studie 23 Stunden nach der jeweils letzten Fütterung entnommen wurden, und daher einen „nüchternen“ Zustand repräsentieren. Die Pansensaftinokulate des Spendertiers (Entnahme drei Stunden nach der Fütterung) wiesen teilweise deutlich höhere fAS-Konzentrationen als die RUSITEC-Fermenterflüssigkeit auf (s. Tab. 9.121). Threonin, Tyrosin, Tryptophan, Isoleucin und Leucin und teilweise auch Alanin, Arginin, Valin und Methionin lagen aber auch in originären Pansensaftproben in niedrigeren Konzentrationen vor, als nach Tabelle 9.119 zu erwarten gewesen wäre. Als Ursachen kommen unterschiedliche Fütterung des Spendertiers und der beprobten Tiere in den Studien

ALLISON et al. (1962), WRIGHT und HUNGATE (1967 a), VELLE et al. (1997) und VOLDEN et al. (1998), vor allem aber unterschiedliche Probenaufbereitung und analytische Verfahren in Frage (s. Tab. 9.120). Womöglich ist die Schädigung bakterieller Zellmembranen vor der eigentlichen fAS-Bestimmung durch Deproteinisierung mit Schwefelsäure (folgende Freisetzung von fAS aus Bakterien; WRIGHT u. HUNGATE 1967 a) sowie TCA (VELLE et al. 1997; VOLDEN et al. 1998) schwerer als bei Verwendung von Sulfosalicylsäure (s. Kap. 3.2.5.3) und führt zu vermeintlich höheren fAS-Konzentrationen im Pansensaft.

Angaben zur Phenylalaninkonzentration im bovinen Pansensaft wurden nicht gefunden. In den Fermenterflüssigkeitsproben waren sie, sofern freies Phenylalanin nachweisbar war, sehr niedrig.

5.3.3 Ergebnisdarstellung der Konzentrationsbestimmungen der freien Aminosäuren

Teilweise zeigten die fAS-Konzentrationen in der Fermenterflüssigkeit von Lauf zu Lauf trotz identischer Beladungen der Fermenter unterschiedliche Konzentrationsniveaus und -verläufe gegenüber den jeweiligen Kontrollen. Um auszuschließen, dass arithmetische Auswertung neben sehr großen Standardabweichungen (s. Tab. 9.12 bis 9.27, 9.30 bis 9.45, 9.48 bis 9.63, 9.68 bis 9.83 und 9.88 bis 9.103) zu nivellierten Mittelwerten und falschen Eindrücken von der Wirkung einzelner Silagen führt (Überlagerung von Effekten), wurden neben der Ergebnisdarstellung aus Kapitel 4.3 die mittleren prozentualen Abweichungen vom Mittelwert der jeweiligen Kontrolle in Versuchs- und Auslaufphasen für jeden einzelnen Lauf berechnet (s. Tab. 9.106 und 9.107). Das Darstellungsverfahren in Kapitel 4.3 zeigt aber gleiche Tendenzen auf und erlaubt darüber hinaus einen schnellen optischen Vergleich der Konzentrationsniveaus in den Kontroll- und Auslaufphasen.

5.4 Statistik

Die Ergebnisse der statistischen Berechnungen zu den Darstellungen aus den Kapiteln 4.1 bis 4.4 sind auf Grund der geringen Wiederholungszahl ($n = 6$) nur begrenzt aussagekräftig. Da die erhobenen Messwerte innerhalb eines Laufs voneinander abhängig sind, können sie nicht als Wiederholungen angesehen werden.

Die mit Hilfe des t-Tests für gepaarte Stichproben und der univariaten einfaktoriellen Varianzanalyse (annähernd gleiche Standardabweichungen vorausgesetzt) mit nachfolgendem Test nach Scheffé ermittelten Signifikanzen der Differenzen in Kapitel 4.5 sind deskriptiv aufzufassen. Sie sollten daher nur als Hinweise auf mögliche Unterschiede gedeutet werden. Eine sichere Aussage ist im Gegensatz zu den mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben ermittelten Signifikanzen der Differenzen nicht möglich.

5.5 Auswirkungen der Schadgrassilagen auf den ruminalen Proteinstoffwechsel

Die Auswirkungen der einzelnen Schadgrassilagen auf die Parameter des Proteinstoffwechsels in der RUSITEC-Fermenterflüssigkeit waren heterogen. Grundsätzliche Zusammenhänge, mögliche Ursachen und Beeinflussungen der einzelnen Parameter werden in den folgenden Unterkapiteln diskutiert. Kapitel 5.6 teilt die eingesetzten Schadgrassilagen anschließend in drei „Reaktionsgruppen“ ein und fasst ihre Auswirkungen auf den Proteinstoffwechsel im Kompartiment 1 zusammen. Die Schadgrassilagen S07 und S10 führten zu eher geringgradigen Auswirkungen (Gruppe 1), während S02 und S11 bereits stärkere Veränderungen bedingten (mittelgradige Beeinflussung; Gruppe 2). Noch größere Beeinflussungen zeigten sich bei Zulagen der Schadgrassilagen mit hohen Rp-Gehalten (S05, S08, S12 und S13; Gruppe 3). Die Schadgrassilagen S04 und S09 ließen sich keiner der drei Reaktionsgruppen zuordnen. Ihre Zulage führte aber zu massiven Veränderungen des ruminalen Proteinstoffwechsels im Kompartiment 1, welche sich im Gehalt bakteriellen Proteins und den Konzentrationen an Ammoniak sowie den fAS widerspiegelten.

5.5.1 Auswirkungen auf die Ammoniakkonzentration im Pansensaft

Besonders durch Zulagen von S04 wurden die Ammoniakkonzentrationen gegenüber der Kontrolle K01 deutlich erhöht, doch auch fast alle anderen Schadgrassilagen bedingten eine Erhöhung der Konzentrationen (exkl. S07). Im RUSITEC-System kann Ammoniak nur über den Überlauf aus dem System entweichen, ein analoger Vorgang zur Resorption über die Pansenwand besteht nicht (CZERKAWSKI 1984). Bei gleichbleibender Flussrate und konstantem pH-Wert akkumuliert es im Fermenter, wenn mehr freigesetzt wird, als mikrobiell genutzt werden kann oder in den Überstand gelangt. Folgende Faktoren können zu den Konzentrationserhöhungen gegenüber der jeweiligen Kontrolle während der Versuchsphasen beigetragen haben:

- Erhöhte Ammoniakeinträge mit den Grassilagen:

Die meisten Schadgrassilagen wiesen höhere Ammoniakgehalte auf als K01. Ein quantitativer Zusammenhang zwischen den Ammoniakgehalten der Grassilagen und den Konzentrationserhöhungen in den Fermentern bestand aber nicht (s. Tab. 9.4 und 9.5 sowie Abb. 4.1). Möglicherweise konnten höhere Gehalte leicht fermentierbarer bzw. nutzbarer Energie in einzelnen Grassilagen (S07, S10, S13) die Ammoniakproduktion verringern bzw. seine -aufnahme durch Mikroorganismen erhöhen (HRISTOV et al. 2005).

- Verstärkter Abbau N-haltiger Verbindungen (HRISTOV et al. 2004):

Die Erhöhung der Ammoniakkonzentration ist möglich, wenn AS aus den Grassilagen direkt oder nach Metabolisierung und erneutem Durchlaufen des fAS-Pools in der Fermenterflüssigkeit abgebaut werden. Als Indikatoren für die Fermentation von AS gelten die verzweigt-kettigen Fettsäuren i-Butter- und i-Valeriansäure (CARRO u. MILLER 1999).

Erhöhte i-Valeriansäureproduktionen³⁶ und Ammoniakkonzentrationen deuten so besonders bei Zulagen von S04, S08 und S09 auf gesteigerten Leucinabbau hin (OTAGAKI et al. 1955; BLADEN et al. 1961 b). Zulagen der Schadgrassilagen (S10, S11, S13), die nur zu moderaten

³⁶ laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lumpff, Hannover am 12.03.2010

Anstiegen der Ammoniakkonzentration geführt hatten, bewirkten dementsprechend nur geringgradig höhere i-Valeriansäureproduktionen als die Kontrolle. Ein positiver Zusammenhang bestand zwischen den i-Valeriansäureproduktionen³⁷ und Leucingehalten nicht, wohl aber mit den Gehalten freien Leucins in den Schadgrassilagen (exkl. S04 und S09, hier deutlich höhere i-Valeriansäureproduktionen als zu erwarten). Zu beachten ist, dass die täglichen i-Valeriansäureproduktionen (ca. 1 bis 4 mmol/Tag) in den meisten Fällen nicht allein durch den Leucingehalt der Grassilagen (ca. 1 mmol/Einwaage, s. Tab. 9.4 und 9.5) erklärt werden können. Es folgt, dass Leucin bei mikrobiellen Stoffwechselfvorgängen im RUSITEC zwar gebildet, dann aber nicht zur Proteinsynthese genutzt wurde, sondern der Energiegewinnung durch Desaminierung diente (TAMMINGA 1979; NOCEK u. RUSSELL 1988; BRODERICK et al. 1991).

Die Ammoniakkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit und die i-Buttersäureproduktionen³⁷, deren Ansteigen bei verstärktem ruminalem Valinabbau zu erwarten ist (DEHORITY et al. 1958), korrelieren weniger deutlich. Da die i-Buttersäureproduktionen aber nur ca. 1/5 der i-Valeriansäureproduktionen erreichten³⁷, wurde ein Effekt möglicherweise durch die Produktion Letzterer überdeckt. Zwischen den Valingehalten in den Grassilagen und den i-Buttersäureproduktionen bestand ebenfalls kein eindeutiger Zusammenhang. Im Gegensatz zu Leucin lagen die täglich zugeführten Valinmengen (ca. 1 mmol/Tag) über den i-Buttersäureproduktionsraten, so dass es keinen Hinweis darauf gibt, dass zusätzlich mikrobiell synthetisiertes Valin aus dem fAS-Pool entnommen und desaminiert wurde.

Ursächlich für den gesteigerten N- bzw. AS-Abbau ist möglicherweise eine erhöhte metabolische Aktivität bzw. das Wachstum AS-fermentierender Bakterien (s. Kap. 2.1.8.1.11). In Frage kommen die HAP-Spezies *Psc. anaerobius* (CHEN u. RUSSELL 1988), *C. sticklandii* und *C. aminophilum* (CHEN u. RUSSELL 1989 a), *Eu. pyruvativorans* (WALLACE et al. 2003) oder auch spezielle *M. elsdenii*-Stämme (RYCHLIK u. RUSSELL 2002 a).

- Menge und Beschaffenheit der Rp-Zulagen:

Niedrigere nutritive Rp-Gehalte führen zu geringeren Ammoniakkonzentrationen in RUSITEC-Fermentern mit Zulagen von Gras- bzw. Rotkleesilagen als höhere Rp-Gehalte (JAURENA et al. 2005). Bei Zulagen der Schadgrassilagen bestand hingegen kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Rp-Zulagen [g/Tag] und den gemessenen Ammoniakkonzentrationen. CARRO und MILLER (1999) berichten ferner von niedrigeren Ammoniakkonzentrationen in RUSITEC-Fermentern, wenn Peptid- oder Protein-N, nicht aber AS- oder Ammoniak-N zugelegt werden. Niedrigere tägliche NPN-Zulagen bzw. höhere RE-Zulagen führten aber entgegen der Studie von CARRO und MILLER (1999) zu eher höheren Ammoniakkonzentrationen (Ausnahmen: S05, S07, S12). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit der Nutzbarkeit des RE oder den mikrobiell verfügbaren Energiegehalten der Grassilagen.

- Mangelhafte Energieverfügbarkeit bzw. verminderte Ammoniaknutzung durch Mikroorganismen:

Da Ammoniak nur zur mikrobiellen Proteinsynthese genutzt werden kann, wenn mikrobiell fermentierbare Energie verfügbar ist, bestimmt unter anderem ihre Verfügbarkeit die ruminale Ammoniakkonzentration (HRISTOV et al. 2004). Dementsprechend nahmen für sieben von zehn Schadgrassilagen mit steigenden NfE-Gehalten die Ammoniakkonzentrationen in der

³⁷ laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lumpp, Hannover am 12.03.2010

Fermenterflüssigkeit ab (Ausnahmen S04, S11 und S12). Mit den NEL-Gehalten der Schadgrassilagen bestand kein Zusammenhang.

- pH-Wert-Änderungen:

In saurer Lösung liegt Ammoniak in Form von Ammoniumionen vor. Je niedriger der pH-Wert, desto weniger Ammonium kann als neutrales Ammoniak aus der Fermenterflüssigkeit entweichen und vor der messtechnischen Erfassung entkommen. Ein entsprechender Zusammenhang mit den pH-Werten (s. GAST 2010) zeigte sich nur unter Zulagen von S02, S04 und S08. Entgegengesetztes Verhalten bei gleichen bzw. höheren pH-Werten als der Kontrolle war bei den Silagen S05, S09, S12 und S13 zu beobachten. Ursache ist womöglich, dass bei höheren pH-Werten mehr nicht-ionisierter Ammoniak vorliegt und dadurch schlechter von Mikroorganismen aufgenommen wird (SIDDONNS et al. 1985).

Abbildung 5.6 zeigt die möglichen Beeinflussungen der Ammoniakkonzentration unter Zulagen der Schadgrassilagen. Zu beachten ist, dass sich die Effekte überlagern und einzelne Beeinflussungen in den RUSITEC-Versuchen möglicherweise nicht mehr erkennbar waren. Der wichtigste Einflussfaktor scheint bei Zulagen der Schadgrassilagen der vermehrte Abbau N-haltiger Verbindungen gewesen zu sein.

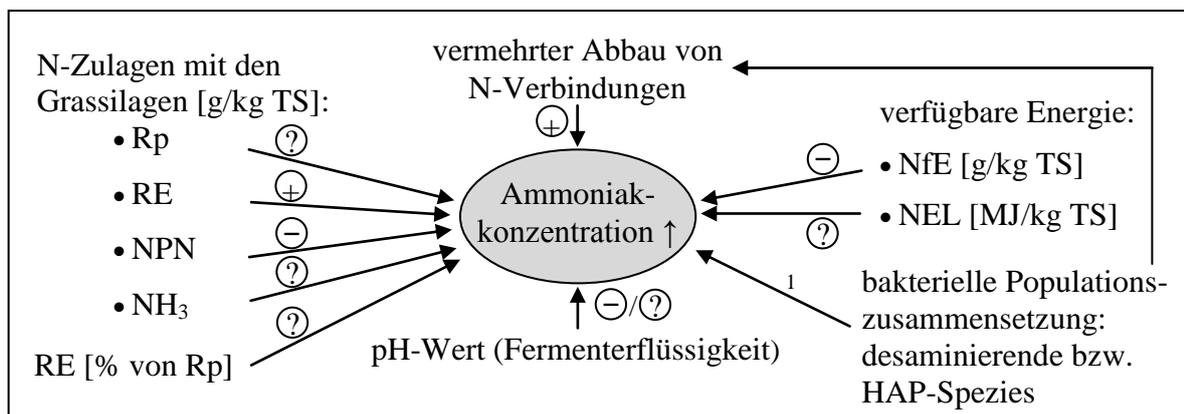


Abb. 5.6: Mögliche Beeinflussungen der Ammoniakkonzentration in der Fermenterflüssigkeit durch Schadgrassilagezulagen:

- ⊕ positiver Zusammenhang (je mehr desto mehr/je weniger desto weniger)
- ⊖ negativer Zusammenhang (je mehr desto weniger/je weniger desto mehr)
- ⊙ kein Zusammenhang, bzw. nur bei einigen Schadgrassilagen
- ¹ keine Aussage möglich (bakterielle Population wurde nicht untersucht)

5.5.2 Auswirkungen auf den Gehalt an bakteriellem Protein im Pansensaft

Neben nicht abgebauten Futterproteinen (MUSCATO et al. 1983; SHABI et al. 2000) sind im Pansen synthetisierte mikrobielle Proteine die Hauptproteinquelle eines Wiederkäuers (MUSCATO et al. 1983; WALLACE 1992 c; BEEVER 1993; NOLAN 1993; FIRKINS 1996; WALLACE et al. 1997 a; BRODERICK et al. 2006). Effiziente bakterielle Proteinsynthese im Pansen ist daher von zentraler Bedeutung für das Wirtstier.

Bei erhöhten Ammoniak- und fAS-Konzentrationen im Pansensaft ist zunächst von einer Zunahme des bakteriellen Proteins auszugehen (erhöhtes Substratangebot bzw. stimulatorische Wirkung von AS auf das mikrobielle Wachstum und somit auch die bakterielle Proteinsyn-

these; BEEVER u. COTTRILL 1994; CRUZ SOTO et al. 1994; ATASOGLU et al. 1998, 1999, 2001; CARRO u. MILLER 1999; KAJIKAWA et al. 2002). **Weitere Faktoren, die zunächst eine Erhöhung der Gehalte an bakteriellem Protein in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der Schadgrassilagen erwarten ließen, sind:**

- Höheres Rp- oder RE-Angebot:

Höhere Zulagen an N-Verbindungen mit den Grassilagen sollten zu höheren Gehalten mikrobieller N-Verbindungen führen. *In-vivo* werden höchste mikrobielle nicht-Ammonium-N-Flüsse zum Blättermagen jedoch bei Rp-Gehalten von 16,5 % der TS erreicht, eine weitere Steigerung ist nicht möglich (OLMOS COLMENERO u. BRODERICK 2006). Während K01 einen Rp-Gehalt von 16,5 % (bezogen auf TS) zeigte, wiesen alle Schadgrassilagen bis auf S09 höhere Rp-Gehalte auf, was dementsprechend teilweise mit niedrigen N-Nutzungseffizienzen durch FAB₁ (s. Kap. 5.5.3) und fehlender bzw. nicht erwartungsgemäßer Steigerung der Gehalte bakteriellen Proteins einher ging.

Für fünf Schadgrassilagen (S02, S05, S08, S11, S13) bestand hingegen ein positiver Zusammenhang zwischen ihren RE-Gehalten und den Gehalten bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit, während S09 trotz niedrigster RE-Gehalte die zweithöchsten Proteingehalte in der Fermenterflüssigkeit generierte. Der prozentuale RE-Anteil am Rp wiederum schien zumindest keinen alleinigen Einfluss auf die gemessenen Proteingehalte in der Fermenterflüssigkeit zu haben (s. Tab. 3.6 und Abb. 4.2).

- Absterben von Protozoen und Proteinfreisetzung (WELLS u. RUSSELL 1996):

Sinkt die Protozoenpopulation, ist mit der Zunahme der bakteriellen Zellmasse zu rechnen (KOENIG et al. 2000). Beim Absterben freigesetzte protozoale Proteine werden darüber hinaus ggf. unvollständig von Bakterien abgebaut und würden bei der BRADFORD-Proteinmessung erhöhte bakterielle Proteingehalte vortäuschen. Da nicht zwischen bakteriellem Protein der FAB₁ und bereits in der Fermenterflüssigkeit gelösten Proteinen unterschieden werden konnte (s. Kap. 5.3.1.), ist dies zwar denkbar, anhand der gemessenen Parameter aber nicht belegbar.

- Vortäuschung erhöhter bakterieller Proteingehalte durch nicht abgebaute Futterproteine in der Fermenterflüssigkeit:

Da die Schadgrassilagen eher niedrigere RE-Gehalte und höhere Gehalte niedermolekularer N-Verbindungen aufwiesen, erscheint dies unwahrscheinlich. Die LSU- und SSU-Untereinheiten des Hauptblattproteins Rubisco werden zudem ebenfalls relativ schnell ruminal abgebaut (BEEVER et al. 1993; AERTS et al. 1999).

Bei Zulagen einiger Schadgrassilagen wurden nur geringe bzw. keine Erhöhungen (S07, S12) oder sogar **Erniedrigungen** (S02, S11, S13) der bakteriellen Proteingehalte gegenüber der Kontrolle beobachtet. **Bei anderen fiel die Erhöhung geringer aus, als zu erwarten gewesen wäre** (S05, S08). **Mögliche Ursachen sind:**

- Inadäquate Energieversorgung der FAB₁:

Die mikrobielle Proteinsynthese hängt sowohl von der N- als auch der Energieverfügbarkeit ab (ROOKE et al. 1987; ERASMUS 1991; CHINKUNYA et al. 1996; BACH et al. 2005; NOLAN u. DOBOS 2005; MERRY et al. 2006; FIRKINS et al. 2007). Während *in-vivo* N- und Energiezulage durch Nutzung des ruminohepatischen Kreislaufs um bis zu 48 Stunden gegeneinander verschoben werden können, ohne dass die mikrobielle Proteinsynthese abnimmt (VALKENERS et al. 2004; s. Kap. 2.1.9.1), existiert in RUSITEC-Fermentern kein

Mechanismus zur Rückführung in den Überlauf gelangter N-Verbindungen. Spätere Nutzung bei verzögerter Energiebereitstellung ist nicht möglich. Hinzukommend soll von vornherein limitierte Energieverfügbarkeit bei grassilagebasiert gefütterten Tieren die bakterielle Proteinsynthese begrenzen (JAURENA et al. 2005). Dementsprechend war möglicherweise die Energieverfügbarkeit bei Zulagen bestimmter Schadgrassilagen andauernd oder vorübergehend nicht ausreichend, um N-haltige Substrate zu fixieren (S05, S08, S12 und S13; s. Kap. 5.6.3).

Im Gegensatz zu den Ammoniakkonzentrationen (s. Kap. 5.5.1) ist aber weder zwischen NfE- noch den NEL-Gehalten und den Gehalten bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit ein Zusammenhang erkennbar.

- Limitierte Verfügbarkeit bestimmter Substrate (Ammoniak, flüchtige Fettsäuren, AS, Peptide) und/oder Wachstumsfaktoren:

Ammoniak kann als Proteinsynthese-limitierender Faktor bei Fütterung von Grassilage in Einklang mit ROOKE et al. (1987) ausgeschlossen werden, da alle Schadgrassilagen gegenüber den jeweiligen Kontrollen gleiche oder höhere Ammoniakkonzentrationen bedingten. Ferner sind aromatische AS (KAJIKAWA et al. 2005; Tyrosin, Tryptophan), Methionin (PITTMAN u. BRYANT 1964), die i-Varianten flüchtiger Fettsäuren (ALLISON u. BRYANT 1963) und Hexansäure (WEGNER u. FOSTER 1962) essentiell für das Wachstum bestimmter Bakterienspezies. Da die Konzentrationen der flüchtigen Fettsäuren³⁸ bei Zulagen der Schadgrassilagen überwiegend (Ausnahme S13) höher oder genauso hoch wie in den jeweiligen Kontrollfermentern lagen, waren sie aber vermutlich nicht limitierend. Auch die Konzentrationen der aromatischen AS Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin lagen gegenüber der Kontrolle überwiegend höher. Hingegen fällt auf, dass die Konzentrationen des ebenfalls aromatischen Histidins durch alle Schadgrassilagezulagen mit Ausnahme von S04, S07 und S09 erniedrigt wurden. Möglicherweise begrenzte die Histidinverfügbarkeit bei Zulagen von S02, S05, S08, S10, S11, S12 und S13 die bakterielle Proteinsynthese der FAB₁ (s. Kap. 5.5.3; N-Nutzungseffizienz).

Das Wachstum nicht-zellulolytischer Bakterien auf Peptiden ist höher als auf AS (CRUZ SOTO et al. 1994). Speziell *Prevotella*-Spezies, die in hohen Zahlen im Pansensaft vorkommen (STEVENSON u. WEIMER 2007; WEIMER et al. 2008), bevorzugen Peptide als N-Quelle (PITTMAN u. BRYANT 1964). Bei Energielimitierung kann *P. ruminicola* 23 diese aber nicht mehr aufnehmen (PITTMAN et al. 1967). Folglich waren möglicherweise nur wenige Peptide in der Fermenterflüssigkeit enthalten, es handelte sich um Peptide, die nicht genutzt wurden (s.u. und Kap. 2.1.2.5) und/oder temporäre Energielimitierung verhinderte ihre Aufnahme und weitere Nutzung zur Proteinsynthese.

- Steigerung des Proteinkatabolismus (WALLACE 1994):

Möglich ist dies unter anderem bei Zunahme des bakteriellen Proteinturnovers durch Protozoen (WALLACE et al. 1997 a) oder durch schnelleren bakteriellen Zelltod, wie er bei *P. ruminicola* (keine aktuelle Stammdefinition möglich, s. Seite 11) unter N-Mangel beschrieben ist (WELLS u. RUSSELL 1996). Die Gehalte bakteriellen und protozoalen Proteins im Pansensaft sind auf Grund von Nährstoffkonkurrenz negativ korreliert (TEATHER et al. 1984). Bei Zunahme der Protozoen auf Kosten der Bakterienpopulation, würde dementsprechend der Gehalt bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit sinken. Isolierte Zunahme der Protozoenpopulation erscheint jedoch unwahrscheinlich, da in *in-vitro*-Systemen

³⁸ laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lumpp, Hannover am 12.03.2010

men eher geringere Protozoenzahlen als *in-vivo* üblich sind (BACH et al. 2005), und eine Zunahme bei Bestimmungen der Protozoenzahlen in den Läufen 10 bis 16 auch nicht beobachtet wurde (s. GAST 2010; gegenüber K01). Möglich ist aber, dass Protozoen unter Zulagen der Schadgrassilagen mehr bakterielles Protein aufnahmen als unter Kontrollbedingungen, wenn diätetisches Protein durch die Schadgrassilagen in zu geringer Menge zur Verfügung gestellt wurde. In der Folge wäre ein Abfall der bakteriellen Proteinsynthese zu beobachten gewesen.

Vermutlich ist eine Steigerung des ruminalen Proteinkatabolismus aber auch durch erhöhte Fermentation von AS möglich. Die Hinweise auf derartige metabolische Aktivität wurden bereits in Kapitel 5.5.1 diskutiert und sind möglicherweise in der bakteriellen Populationszusammensetzung begründet (s. auch Abb. 5.6).

- Veränderung des Proteingehalts der FAB_1 :

Der RE-Gehalt ruminaler Mikroorganismen variiert zwischen 30 und 50 % (NOLAN 1993) und bereits einzelne Stämme von Pansenbakterienspezies weisen unterschiedliche Proteingehalte auf (RUSSELL u. ROBINSON 1984; *Sc. bovis*: 40,6 bis 49,0 % Protein). Bei Populationsveränderungen, die unter anderem durch ungleiche Lysisraten der Spezies bedingt sein können (WELLS u. RUSSELL 1996), kann es daher zur Verminderung der bakteriellen Proteingehalte gekommen sein, auch wenn die Bakterienmasse gleich blieb oder sich sogar erhöhte. Populationsveränderungen wiederum wirken sich auf Proteolyse und Desaminierung aus (FIRKINS et al. 2007). Sie könnten innerhalb der proteolytischen Population zur Freisetzung anderer Peptide als gewöhnlich (WALLACE 1996) geführt haben, die dann ungenutzt in der Fermenterflüssigkeit verblieben (Hinweise bei S02, S05, S07, S08, S12 und S13; s. Kap 5.6.1 bis 5.6.3).

Denkbar ist aber auch, dass Bakterien auf Grund eines Mangelzustandes im Kompartiment 1 gezwungen waren, intrazelluläres Protein aufzubrechen (s. Kap. 5.6.2 und 5.6.3). Dementsprechend sanken bei Zulagen von S02, S11 und S13 die bakteriellen Proteingehalte gegenüber der Kontrolle, während die Nukleobasenkonzentrationen als Indikator für die Bakterienmasse sogar stiegen (S02, S11) bzw. gleich blieben (S13; s. GAST 2010).

- Hemmung des bakteriellen Wachstums bzw. der Proteinsynthese durch bestimmte AS wie Threonin, Phenylalanin und Isoleucin (KAJIKAWA et al. 2005):

Bei Zulagen von Schadgrassilagen, die Anstiege der Threonin- (S04, S07, S08, S12), Phenylalanin- (S09, S12) oder Isoleucinkonzentration (S04, S09) gegenüber der jeweiligen Kontrolle bewirkten, wurden keine niedrigeren Gehalte bakteriellen Proteins als bei Zulagen von K01 gemessen. Möglicherweise trugen Threonin und Phenylalanin aber dazu bei, dass die Proteingehalte bei Zulagen von S08 und S12 nicht (weiter) anstiegen. Wahrscheinlicher ist aber, dass die Konzentrationen in der Fermenterflüssigkeit zu niedrig waren, um sich negativ auf die Proteinsynthese auszuwirken (*in-vitro* Regulation von Enzymaktivitäten durch AS erst ab einer Konzentration von 1 mmol/L; UMBARGER et al. 1969).

- Vermehrtes Entkommen von FAB_1 aus dem Pansen bzw. den RUSITEC-Fermentern infolge erhöhter Verdünnungsrate (WELLS u. RUSSELL 1996):

Die Verdünnungsrate in den RUSITEC-Versuchen wurde jedoch konstant gehalten bzw. stieg allenfalls geringgradig auf Grund höherer Flüssigkeitsverdrängung durch das Einbringen der Grassilagen gegenüber Heu an (s. Kap. 9.12).

- Absinken der bakteriellen Proteinsynthese infolge niedrigerer pH-Werte:

Mit sinkenden pH-Werten (RUSSELL u. STROBEL 1987) bzw. zunehmender Wirkdauer

niedriger pH-Werte (DE VETH u. KOLVER 2001) sinkt die bakterielle Proteinsynthese in Pansenmikroorganismenkulturen (RUSSELL u. STROBEL 1987). Auch bei Zulagen der Schadgrassilagen traten aber zumindest nach 24-stündiger Fermentation keine nennenswerten pH-Wertsenkungen mehr auf (s. GAST 2010). Stärkeres Absinken im Anschluss an die tägliche Beladung nach Zulage bestimmter Grassilagen kann hingegen nicht ausgeschlossen werden. Eine gerichtete Beeinflussung der Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit war so nicht zu verzeichnen.

Abbildung 5.7 fasst die möglichen Beeinflussungen des Gehalts an bakteriellem Protein in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der Schadgrassilagen zusammen.

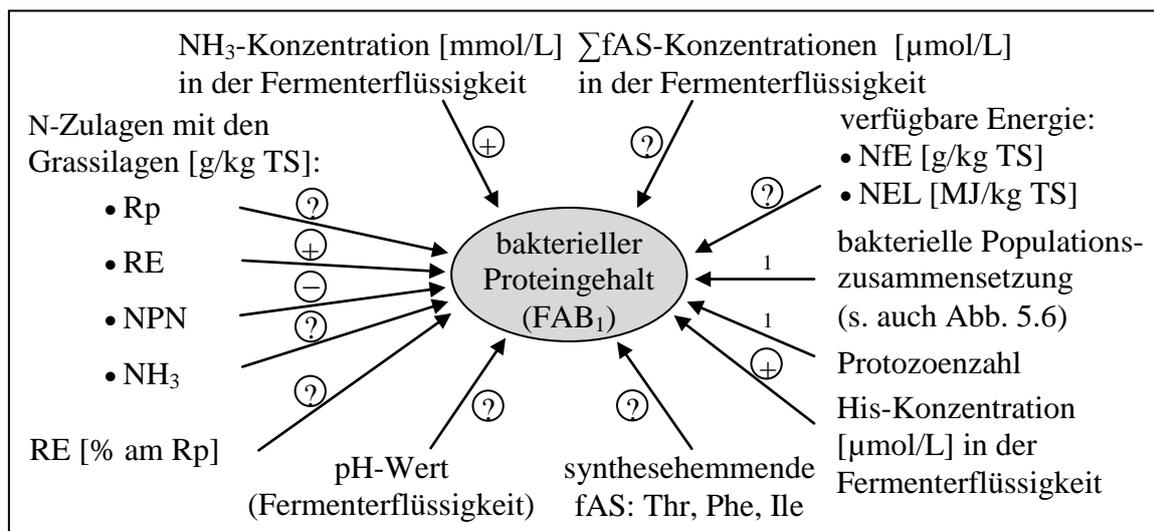


Abb. 5.7: Mögliche Beeinflussungen der bakteriellen Proteingehalte in der Fermenterflüssigkeit durch Schadgrassilagezulagen:

- ⊕ positiver Zusammenhang (je mehr desto mehr/je weniger desto weniger)
- ⊖ negativer Zusammenhang (je mehr desto weniger/je weniger desto mehr)
- ⊙ kein Zusammenhang, bzw. nur bei einigen Schadgrassilagen

¹ Da die bakteriellen Populationsstrukturen nicht untersucht, und Protozoenzahlen nur in sechs Versuchsläufen erfasst wurden, kann keine allgemeine Aussage über einen Zusammenhang mit den Gehalten bakteriellen Proteins getroffen werden.

Von großem Interesse ist im Zusammenhang mit der bakteriellen Proteinsynthese außerdem der **Verbleib des zugelegten Stickstoffs im RUSITEC-System** (s. auch Kap. 9.15), zudem zwar Grassilagen mit sehr unterschiedlichen Rp-Gehalten (15,0 bis 27,7 % der TS) eingesetzt wurden, es aber in der Fermenterflüssigkeit überwiegend zu ähnlich hohen Ammoniak- und Proteinkonzentrationen kam. Da die N-Wiederfindungsrate im RUSITEC bei nahezu 100 % liegt (CZERKAWSKI 1984; CZERKAWSKI u. BRECKENRIDGE 1985), bestehen folgende Erklärungsmöglichkeiten:

- Steigen die Ammoniakkonzentrationen über 3,57 mmol/L, wird darüber hinaus abgebautes RE (SATTER u. ROFFLER 1975) bzw. zusätzlich zugelegter NPN (SATTER u. SLYTER 1974) nicht mehr von Mikroorganismen genutzt (SATTER u. ROFFLER 1975). Es ist daher möglich, dass N-Verbindungen überstürzt freigesetzt, bzw. in Einklang mit OLMOS

COLMENERO und BRODERICK (2006) im Überfluss zugelegt wurden, und durch FAB₁ nicht fixiert werden konnten (s. Kap. 5.5.3). Nicht auszuschließen ist daher, dass sich bei Schadgrassilagezulagen die Konzentrationen leicht löslicher N-Verbindungen direkt nach der Zulage stark erhöhten, und aus diesem Grund höhere N-Mengen in den Überstand gelangten. Andererseits musste nach täglicher Beladung des RUSITEC und damit verbundener Leerung der Überlaufschläuche (s. Abb. 3.1) zunächst für ca. drei Stunden Puffer (Flussrate 280 µL/min; s. Kap. 3.2.1.1) zugeführt werden, bevor erneut Fermenterflüssigkeit in die Überstandsgefäße gelangen konnte. Innerhalb dieser Zeitspanne nehmen Ammoniak-, fAS- und Peptidkonzentrationen im Pansensaft aber sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* bereits wieder ab (BRODERICK u. WALLACE 1988; WLLIAMS u. COCKBURN 1991; VELLE et al. 1997; VOLDEN et al. 2002). In Kombination mit dem täglichen zugeführten Puffervolumen (ca. 390 mL, entsprechend 39 % des maximalen Volumens an Fermenterflüssigkeit) erscheint es daher unwahrscheinlich, dass sehr große N-Mengen ungenutzt in den Überstand gelangen konnten. Bei weiteren Untersuchungen sollte aber zur Bestätigung die Messung des N-Gehalts im Überstand erfolgen.

- Die genutzte Methode bestimmte nur den bakteriellen Proteingehalt der FAB₁. Möglicherweise steigerten aber PAB aus den Kompartimenten 2 und 3 oder Protozoen ihre Proteinsynthese (Hinweise bei S07, S05, S08 S12 und S13). Die Schadgrassilagen S04 und S09 hingegen haben vermutlich die Proteinsynthese der PAB erniedrigt (s. Kap. 5.6.4 und 5.6.5).
- Bestimmte N-Verbindungen oder ihre ruminalen Abbauprodukte in einzelnen Grassilagen konnten unter Umständen nicht genutzt werden. Womöglich lagen in den Schadsilagen hohe N-Anteile als kurzkettige Peptide vor. Bei Zunahme von Pansenbakterien, die eher freie AS aufnehmen (*S. ruminantium*, *F. succinogenes* und *Anaerovibrio lipolytica*; LING u. ARMSTEAD 1995) oder andere Peptide nutzen, käme es folglich im Kompartiment 1 zu Peptidakkumulation und niedrigeren Gehalten bakteriellen Proteins. Hemmung des Pflanzenproteinabbaus (McNABB et al. 1993; JONES et al. 1994; TANNER et al. 1994; AERTS et al. 1999) oder von Enzymaktivitäten (McLEOD 1974; AERTS et al. 1999) durch Tannine ist hingegen eher unwahrscheinlich, da in Gräsern kaum sekundäre Pflanzenmetaboliten enthalten sind (LOURENÇO et al. 2008; *Lolium perenne*). Hinweise auf Akkumulation mikrobiell nicht nutzbarer N-Verbindungen gibt es bei Zulagen mehrerer Schadgrassilagen (s. Kap. 5.6.1 bis 5.6.3).
- Im RUSITEC-System machen Protozoen 20 bis 30 % der mikrobiellen Masse im Kompartiment 1 aus (CZERKAWSKI 1979). Bei Zulage geringer Mengen durch Protozoen nutzbare, unlösliche Proteine (JOUANY 1996) hätten Protozoen zur Deckung ihres Proteinbedarfs verstärkt Bakterien aufnehmen müssen. Dies wiederum hätte zur Abnahme der Gehalte bakteriellen Proteins und der Bakterienmasse geführt. Gegenüber den Kontrollen erhöhte Nukleobasengesamtgehalte (s. GAST 2010) sprechen allerdings gegen eine Verringerung der Bakterienmasse.

5.5.3 Auswirkungen auf die Stickstoffnutzungseffizienz der flüssigkeitsassoziierten Bakterien

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese bei Grassilagefütterung durch im Überfluss anflutende N-Abbauprodukte niedrig ist (ROOKE et al.

1985; BEEVER u. COTTRILL 1994). Im Überfluss zugelegtes ruminal abbaubares Protein kann daher nicht effizient für die mikrobielle Proteinsynthese genutzt werden (s. Kap. 5.5.2). Berechnung der mittleren Proteinsyntheseeffizienz³⁹ nach CZERKAWSKI (1984) und CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE [1985; s. Kap. 9.11, anschließend Umrechnung in die Einheit (g N in bakteriellem Protein/g N-Input)] bzw. der N-Nutzungseffizienz der FAB₁ zeigt, dass selbige unter Schadgrassilagezulagen tendenziell geringer war als mit Zulagen der Kontrollgrassilagen (s. Abb. 5.8). Bei den Kontrollgrassilagen deutete sich außerdem mit zunehmendem RE-Anteil am Rp eine Effizienzsteigerung an (schwach positive lineare Korrelation: $r = 0,231$; Berechnung mit Mittelwert für K01), während die Effizienz bei Schadgrassilagen abnahm (negativ lineare Korrelation: $r = -0,412$; s. Trendgraden in Abb. 5.8).

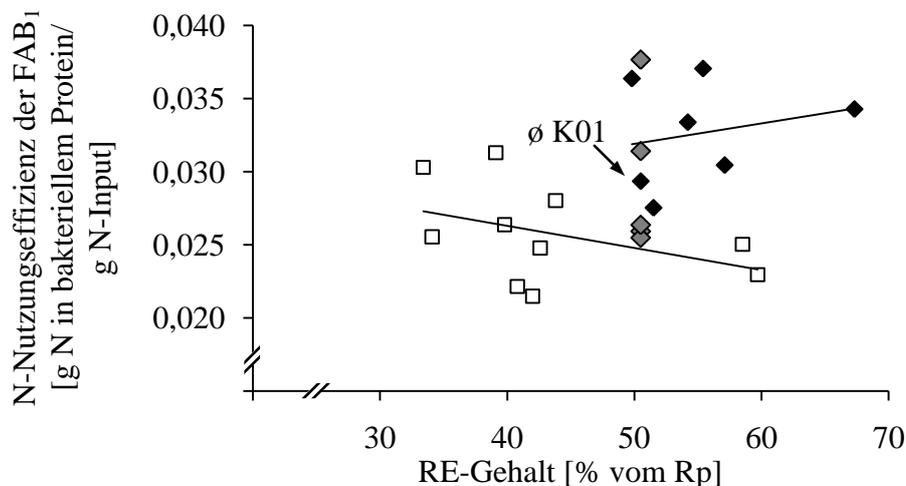


Abb. 5.8: Berechnete N-Nutzungseffizienzen der flüssigkeitsassoziierten Bakterien (FAB₁) in Abhängigkeit von den RE-Anteilen am Rp in den Grassilagen [%]. Einzelne Werte können Tab. 9.122 entnommen werden.
 ◆ Kontrollgrassilagen; □ Schadgrassilagen; ◆ K01 in einzelnen Laufgruppen;
 — Trendgeraden; ø Mittelwert

BRITO et al. (2009) hingegen stellten *in-vivo* fest, dass die bakterielle Proteinsyntheseeffizienz (in g bakterieller NAN-Verbindungen/g N-Aufnahme) bei höherem NPN-Gehalt in Luzerne-Ballensilage (50,3 vs. 47,1 %) um 10 % größer war. Zu beachten ist aber, dass bereits die Kontrollgrassilagen K14 und K16 mit sehr ähnlichen RE-Anteilen am Rp um 24,5 % unterschiedliche N-Nutzungseffizienzen bedingten, und bei Zulagen von K01 von Laufgruppe zu Laufgruppe Schwankungen um bis zu 47,8 % auftraten (s. Abb. 5.8 und Tab. 9.122). Außerdem hat in der Studie von BRITO et al. (2009) „N-Recycling“ über den ruminohepatischen Kreislauf möglicherweise zu effizienterer NPN-Nutzung geführt.

Anders als CZERKAWSKI (1984) und CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE (1985) geben BACH et al. (2005) die Effizienz der N-Nutzung in g bakteriellem N je g verfügbarem N⁴⁰ an. Obwohl die Vergleichbarkeit mit den in dieser Studie berechneten Werten eingeschränkt ist (Effizienz auf gesamtes Rp-Angebot bezogen), sanken sowohl die nach CZERKAWSKI (1984) und CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE (1985) berechneten

³⁹ in der Studie MERRY et al. (2006) als N-Nutzungseffizienz bezeichnet: g mikrobieller N/ g Futter-N

⁴⁰ N-Input abzüglich nicht abgebauten Ns

Effizienzen, als auch die von BACH et al. (2005) ermittelten Werte mit steigenden Ammoniakkonzentrationen in den RUSITEC-Fermentern ab (s. Abb. 9.6). Dies zeigt so womöglich eine verringerte Ammoniaknutzung an.

Wie die Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit waren die N-Nutzungseffizienzen im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle umso geringer, je niedriger die Histidinkonzentrationen lagen (s. Abb. 4.7 und Tab. 9.122). Da Histidin vermutlich eine essentielle AS für die Proteinsynthese der Pansenmikroorganismen darstellt (WADUD et al. 2001 b), verhinderte seine Limitierung möglicherweise eine effizientere N-Nutzung durch FAB₁.

Die unterschiedlichen N-Nutzungseffizienzen der FAB₁ scheinen letztendlich das Resultat der Einwirkung mehrerer Faktoren zu sein, die auch die Höhe des Gehalts an bakteriellem Protein bestimmen (s. Abb. 5.7). Es deutet sich aber an, dass N aus Schadgrassilagen schlechter durch FAB₁ nutzbar war als solches aus Kontrollgrassilagen.

5.5.4 Auswirkungen auf die Konzentrationen freier Aminosäuren und die Zusammensetzung des Pools der freien Aminosäuren im Pansensaft

Freie AS tragen zur AS-Versorgung des Wiederkäuers bei. So können beispielsweise postminale Histidinzulagen bei Grassilagefütterung die Milchleistung und -produktion steigern (KORHONEN et al. 2000). Auffällig sind daher unter anderem die gegenüber den jeweiligen Kontrollen erniedrigten Histidinkonzentrationen bei Zulagen von S02, S05, S08, S10, S11, S12 und S13, für die bereits ein Zusammenhang mit fallenden N-Nutzungseffizienzen und dem Parameter „Gehalt an bakteriellem Protein“ hergestellt wurde (s. Kap. 5.5.2 und 5.5.3).

Der Ursprung von fAS in der Fermenterflüssigkeit kann nutritiv oder mikrobiell sein. NOLAN und DOBOS (2005) nehmen jedoch an, dass die meisten extrazellulären fAS im Pansensaft von lebenden Zellen ausgeschieden werden oder N-Abbauprodukte aus lytischen Zellen sind. Die bestimmten fAS-Pools (s. Kap. 4.5) zeigten dementsprechend mit deutlich höheren Glutamat- und Arginin-, sowie sehr viel geringeren Valin-, Phenylalanin-, Isoleucin- und Leucinanteilen kaum Ähnlichkeiten mit den prozentualen [mol-%] AS- und fAS-Zusammensetzungen der eingesetzten Grassilagen (s. Tab. 9.2, 9.6 und 9.7). Eine alleinige Beeinflussung der fAS-Konzentrationen durch die eingesetzten Futtermittel erscheint daher tatsächlich unwahrscheinlich. Der Vergleich eingebrachter Stoffmengen (48,8 bis 135 mmol AS/Tag bzw. 14,3 bis 45,3 mmol fAS/Tag) mit den gemessenen fAS-Stoffmengenkonzentrationen (< 100 µmol/L) deutet darüber hinaus auf nahezu vollständige AS-Nutzung bzw. den Verbleib in nicht nutzbaren Verbindungen hin.

Außerdem fällt auf, dass die molaren Glutamatanteile der fAS-Pools in der Fermenterflüssigkeit (s. Kap. 4.5) deutlich höher als in der Studie WILLIAMS und COCKBURN⁴¹ (1991; 11,0 bis 16,3 %) lagen. Zu beachten sind abweichende Versuchsbedingungen (*in-vivo*, Futtermittel, Probenentnahmezeitpunkt) und vor allem die Nutzung von Ultrafiltraten zur AS-Analytik in der Studie WILLIAMS und COCKBURN (1991). Bei Deproteinisierung mittels Säuren (s. Kap. 3.2.5.3) ist infolge Membranschädigungen der Austritt von fAS aus Bakterien möglich (WILLIAMS u. COCKBURN 1991; s. Kap. 5.3.2). Da Glutamat mit über 40 bzw. 50 % den größten Anteil am bakteriellen fAS-Pool stellt (TEMPEST et al. 1970; BROWN u. STANLEY 1972; CLARK et al. 1972; HUA et al. 1982), können so seine hohen prozentualen Anteile am fAS-Pool in der Fermenterflüssigkeit erklärt werden. Neben Glutamat sind Alanin

⁴¹ Die Studie WILLIAMS u. COCKBURN (1991) berücksichtigt ferner die AS Pro, Cys und Lys.

(TEMPEST et al. 1970; CLARK et al. 1972; PULMAN u. JOHNSON 1978), Aspartat und Valin die Hauptkomponenten des bakteriellen fAS-Pools (PULMAN u. JOHNSON 1978). Sowohl Alanin als auch Aspartat traten in dementsprechend hohen Anteilen in den fAS-Pools in den Proben aus dem RUSITEC auf, während die Valinanteile meistens deutlich niedriger lagen (s. Abb. 4.22 bis 4.27). Wie auch in den fAS-Pools der Fermenterflüssigkeit tragen nach TEMPEST et al. (1970) Serin, Isoleucin und Leucin sowie nach TAYLOR (1947) auch Tyrosin und Histidin nur in kleineren Anteilen zum fAS-Pool grampositiver und gramnegativer Bakterien bei.

Da im Pansen gramnegative Spezies dominieren (HUNGATE 1966), zeigte sich erwartungsgemäß besonders gute Übereinstimmung der Fermenterflüssigkeits-fAS-Pools [mol-%] mit den intrazellulären Pools der gramnegativen Spezies *Rhizobium* sp. (HUA et al. 1982) und *Erwinia* sp. (PULMAN u. JOHNSON 1978), aber auch der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (exkl. Arginin; WATSON 1976).

Im Gegensatz zu bakteriellen Pools, in denen kein oder nur sehr wenig Arginin vorhanden ist (TAYLOR 1947; TEMPEST et al. 1970), kam es in der Fermenterflüssigkeit in etwas höheren Anteilen als Serin vor. Der Gesamtarginingehalt in den Proben wurde daher vermutlich nicht erst während der Aufbereitung nach Schädigung der bakteriellen Zellmembranen freigesetzt, sondern gelangte wahrscheinlich bereits teilweise mit den Grassilagen in die Fermenter. Da die fAS in der Fermenterflüssigkeit folglich überwiegend intrazellulären bakteriellen fAS-Pools zu entstammen schienen, ist die Beeinflussung der fAS-Pools bzw. der fAS-Gesamtkonzentrationen in der RUSITEC-Fermenterflüssigkeit durch folgende Faktoren denkbar:

- Wachstum der bakteriellen Population bzw. Zunahme grampositiver Spezies:
Steigt die Bakterienzahl im Kompartiment 1, werden bei der Probenaufbereitung nach Kapitel 3.2.5.3 mehr fAS aus FAB₁ freigesetzt. Erhöhte fAS-Gesamtkonzentrationen infolge Zulagen von S04, S07 und S12 deuten daher auf Vergrößerung, erniedrigte bei S13-Zulagen auf Verkleinerung der bakteriellen Population in der Fermenterflüssigkeit hin.
Hinzukommend enthalten grampositive Spezies ca. 20-fach höhere fAS-Konzentrationen (TEMPEST et al. 1970). Zulagen von S04 haben daher möglicherweise besonders durch Zunahme grampositiver Bakterien die hohen Konzentrationsanstiege der fAS im Kompartiment 1 bewirkt.
- Bakterielle Wachstumsrate:
Mit steigender Wachstumsrate nimmt die Größe des intrazellulären fAS-Pools zu. Hohe Wachstumsraten führen dabei zur Erhöhung des Arginin-, niedrige zur Erhöhung des Aspartatanteils am fAS-Pool (WATSON 1976). Bei Zulagen von S04 deuten hohe fAS-Konzentrationen zwar dementsprechend auf eine hohe Wachstumsrate hin, der relativ große Aspartatanteil (s. Abb. 4.25) spricht jedoch gegen diese Annahme.
- Hohes N-Angebot:
Bei erhöhtem Ammoniak-N-Angebot vergrößert sich der bakterielle fAS-Pool (PULMAN u. JOHNSON 1978). Eindeutige Zusammenhänge zwischen den Ammoniakkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit, Rp-, RE-, AS- und fAS-Gehalten in den Grassilagen mit den fAS-Konzentrationen in den Fermentern waren aber nicht zu verzeichnen.

Obwohl die fAS-Pools in der Fermenterflüssigkeit kaum Ähnlichkeiten mit den fAS- und AS-Zusammensetzungen der eingesetzten Grassilagen zeigten, sind zumindest Modifikationen durch fAS-Eintrag mit den Silagen bzw. den Abbau höhermolekularer N-Verbindungen denkbar. Da Arginin in den Grassilagen kaum als freie AS vorlag (s. Abb. 5.2), konnte es erst

bei fortgeschrittenem N-Verbindungsabbau freigesetzt worden sein. Auf Grund seiner mäßigen ruminalen Abbaubarkeit (VELLE et al. 1997) akkumulierte Arginin möglicherweise zum Ende eines Versuchstages bei Zulagen von S04, S05 und ggf. auch S08 in der Fermenterflüssigkeit (s.o.).

Hinzu kommen direkte Beeinflussungen durch die metabolische Aktivität der Mikroorganismen im RUSITEC. Zu nennen sind:

- Vermehrte bzw. verminderte Nutzung freier AS:

P. ruminicola 23 und *P. brevis* GA33 können für ihr Wachstum keine fAS nutzen (PITTMAN u. BRYANT 1964) bzw. selbige nicht aufnehmen (PITTMAN et al. 1967; Prolin, Glutamat und Valin im Versuch). Bei Zunahme der *Prevotella*-Population auf Kosten anderer Spezies scheinen fAS-Konzentrationszunahmen daher möglich zu sein (S04).

- Abbau mikrobiellen Proteins:

Die Zusammensetzung des bakteriellen fAS-Pools zeigt keine Ähnlichkeiten mit der prozentualen AS-Zusammensetzung des bakteriellen Proteins (PULMAN u. JOHNSON 1978). Dementsprechend wiesen die prozentualen (mol-%) AS-Zusammensetzungen des Proteins der FAB und Protozoen bei Grassilagefütterung (KORHONEN et al. 2002⁴²; s. Kap. 2.1.3.11) ebenfalls keine Übereinstimmung mit den bestimmten Zusammensetzungen der fAS-Pools in der Fermenterflüssigkeit auf. Wie auch in den Grassilagen zeigen sich FAB- und Protozoenprotein deutlich höhere Anteile an Valin, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin sowie ein niedrigerer Glutamatanteil (KORHONEN et al. 2002). Da Glutamat zu den schnell, Valin, Isoleucin, Leucin (VELLE et al. 1997) und Phenylalanin (ARMSTEAD u. LING 1993) aber zu den ruminal eher langsam abbaubaren AS zählen, sprechen ihre hohen (Glutamat) bzw. geringen (Valin, Isoleucin, Leucin) Anteile in den fAS-Pools eher gegen einen umfassenden Beitrag von AS aus bakteriellen Proteinen zu den bestimmten fAS-Pools. Lediglich bei Zulagen von S04 lag der Glutamatanteil am fAS-Pool relativ niedrig (s. Abb. 4.25) und wies möglicherweise auf einen erhöhten Beitrag von AS aus mikrobiellem Protein zum fAS-Pool hin.

Die Zusammensetzungen der fAS-Pools unter Zulagen von K01 und den Schadgrassilagen unterschieden sich zwar teilweise signifikant voneinander, die Unterschiede waren aber überwiegend relativ gering. Für Verschiebungen waren möglicherweise verantwortlich:

- Unterschiedliches Peptidangebot in einzelnen Schadgrassilagen:

P. ruminicola 23 und *P. brevis* GA33 bevorzugen Peptide mit mindestens drei AS als N-Quelle (PITTMAN u. BRYANT 1964). Veränderte proteolytische Vorgänge in den Schadgrassilagen hatten während der Silierung möglicherweise zu erhöhten Gehalten spezieller, bzw. hydrophober oder saurer Peptide geführt, die von mikrobiellen Peptidasen im Pansen anders als gewöhnlich, oder nicht abgebaut bzw. von Mikroorganismen nicht genutzt wurden (WALLACE u. McKAIN 1989 b; WALLACE et al. 1993 a; DEPARDON et al. 1996). Da *Prevotella*-Spezies bei Grassilagefütterung die vorherrschenden Bakterien in bovinem Panseninhalt sind (VAN GYLSWYK 1990; STEVENSON u. WEIMER 2007; WEIMER et al. 2008), erscheint eine Beeinflussung über die *Prevotella*-Population durchaus möglich.

Peptide, die langsam ruminal abbaubar sind, enthalten niedrigere Histidin-, Threonin- und Phenylalaninanteile (DEPARDON et al. 1996). Steigt der Anteil schlecht abbaubarer Peptide, nehmen ggf. die Konzentration freien Histidins, Threonins und Phenylalanins zu („Konzentrierung“ in gut abbaubaren Peptiden). Serin- und Valinanteile (DEPARDON et al. 1996)

⁴² Zum Vergleich ist die Umrechnung der Gehalte in mmol erforderlich.

sowie Aspartat- (WALLACE et al. 1993 a) und Glutamatanteile (DEPARDON et al. 1998) sind in langsam abbaubaren Peptiden höher, was möglicherweise zu erniedrigten Serinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit bei Zulagen von S08, S10, S11 und S13 gegenüber der Kontrolle geführt hat. Erhöhte Histidin-, Threonin- und Phenylalanin-, in Kombination mit erniedrigten Aspartat- und Glutamatkonzentrationen, zeigten sich aber nur bei Zulagen von S09. Allerdings gibt es auf Grund des niedrigen Rp-Gehalts in S09 keinen Anhaltspunkt, dass analytisch nicht erfasste Peptide in der Fermenterflüssigkeit akkumulierten (s. Kap. 5.6.5).

- Populationsverschiebungen:

P. bryantii B₁₄, *S. ruminantium*, *Sc. bovis*, *M. elsdenii* und *B. fibrisolvans* nutzen zwar einzelne AS aus Trypticasepeptiden in unterschiedlichem Umfang (COTTA u. RUSSELL 1982). Die prozentualen AS-Zusammensetzungen (mol-%) der FAB und PAB (KORHONEN et al. 2002; s. Kap. 2.1.3.11⁴²) unterscheiden sich bei Grassilagefütterung aber nur minimal. Isolierte Zu- oder Abnahme einzelner Bakterienspezies oder -gruppen kann daher allenfalls zu leicht verstärkter bzw. verminderter Entnahme bestimmter AS aus dem fAS-Pool geführt haben.

- Desaminasefreisetzung:

Alte Zellkulturen und -suspensionen setzen Desaminasen frei (PITTMAN u. BRYANT 1964). Analoge Vorgänge in RUSITEC-Fermentern (Absterben von Bakterien) mit nachfolgender, möglicherweise selektiver Desaminierung einzelner fAS erscheinen möglich, können aber, unter der Annahme, dass die meisten der gemessenen fAS erst während der Probenaufbereitung freigesetzt wurden, nur zu geringen Konzentrationsänderungen geführt haben. Konzentrationsänderungen durch Einwirkung mikrobieller Enzyme erst nach der Probennahme sind auf Grund der Deproteinisierung mit Sulfosalicylsäure unwahrscheinlich (Fällung mikrobieller Enzyme).

- Energiegewinnung durch Desaminierung von AS:

Falls AS zur Energiegewinnung genutzt wurden, ist von bevorzugter Fermentation bestimmter, schnell abbaubarer AS (Aspartat, Glutamat, Serin) auszugehen, während langsamer abbaubares Histidin und Threonin (VELLE et al. 1997) akkumulieren müssten. Gegenüber der Kontrolle waren erniedrigte Aspartat-, Glutamat- und Serinkonzentrationen in Verbindung mit erhöhten Histidin- und Threoninkonzentrationen aber nur unter Zulagen von S09 zu dokumentieren.

- Bevorzugung bestimmter AS-Synthesewege:

Durch Bevorzugung bestimmter Stoffwechselwege (s. Abb. 2.9; AS-Synthese) sind AS mit ähnlichen Synthesewegen ggf. vermehrt oder vermindert synthetisiert worden und in den fAS-Pool gelangt. Der Vergleich der gemessenen fAS-Konzentrationen zeigt jedoch, dass es überwiegend nicht zu selektiven Konzentrationsanstiegen von AS bestimmter AS-Synthesegruppen kam (Aspartat-, Glutamat-, Serin- und Pyruvatfamilie sowie aromatische AS). Möglicherweise wurden die Effekte aber auch durch den AS-Katabolismus überlagert.

Bei der Diskussion der Wirkung der einzelnen Schadgrassilagen (s. Kap. 5.6.1 bis 5.6.5) wird nur in Ausnahmefällen auf Gründe für fAS-Konzentrationsänderungen bzw. Verschiebungen in den fAS-Pools eingegangen, da die Veränderungen letztendlich wahrscheinlich das Resultat komplexer biochemischer und mikrobiologischer Prozesse sind, die anhand der bisher

erhobenen Parameter nicht nachvollzogen werden können. Abbildung 5.9 fasst mögliche Beeinflussungen der fAS-Konzentrationen in der Fermenterflüssigkeit zusammen.

Bei der Beantwortung der Frage, warum fAS-Konzentrationsänderungen und Verschiebungen im fAS-Pool auftraten, könnten in Zukunft folgende Untersuchungen weiterhelfen:

- Analytik von Ultrafiltraten der Fermenterflüssigkeit zur Ermittlung des tatsächlichen Beitrags freier AS aus Bakterien bei Deproteinisierung mittels Sulfosalicylsäure
- Bestimmung der fAS-Konzentrationen in engen Zeitintervallen nach der täglichen Beladung des RUSITEC, um weitere Hinweise auf die Herkunft der fAS zu erhalten (Silagen: RE- oder NPN-Anteil/mikrobielles Protein)
- Peptidsequenzanalysen (weiterführende LC-MS/MS-Analytik, Edmann-Abbau) möglicherweise vorhandener Peptide in der Fermenterflüssigkeit und den Grassilagen, anschließend Ermittlung ihrer ruminalen Abbaubarkeit (Peptide in Grassilagen)
- Untersuchung der bakteriellen Population:
 - Populationszusammensetzungen und -dynamiken der FAB₁ und PAB (kulturell/molekularbiologisch) sowie Ermittlung der AS-Zusammensetzungen ihres Proteins und ihrer intrazellulären fAS-Pools
 - Ermittlung der Bedeutung von HAP-Bakterien bei (Schad-)Grassilagefütterung
- Untersuchung von Enzymaktivitäten wie Desaminase- und Peptidaseaktivität

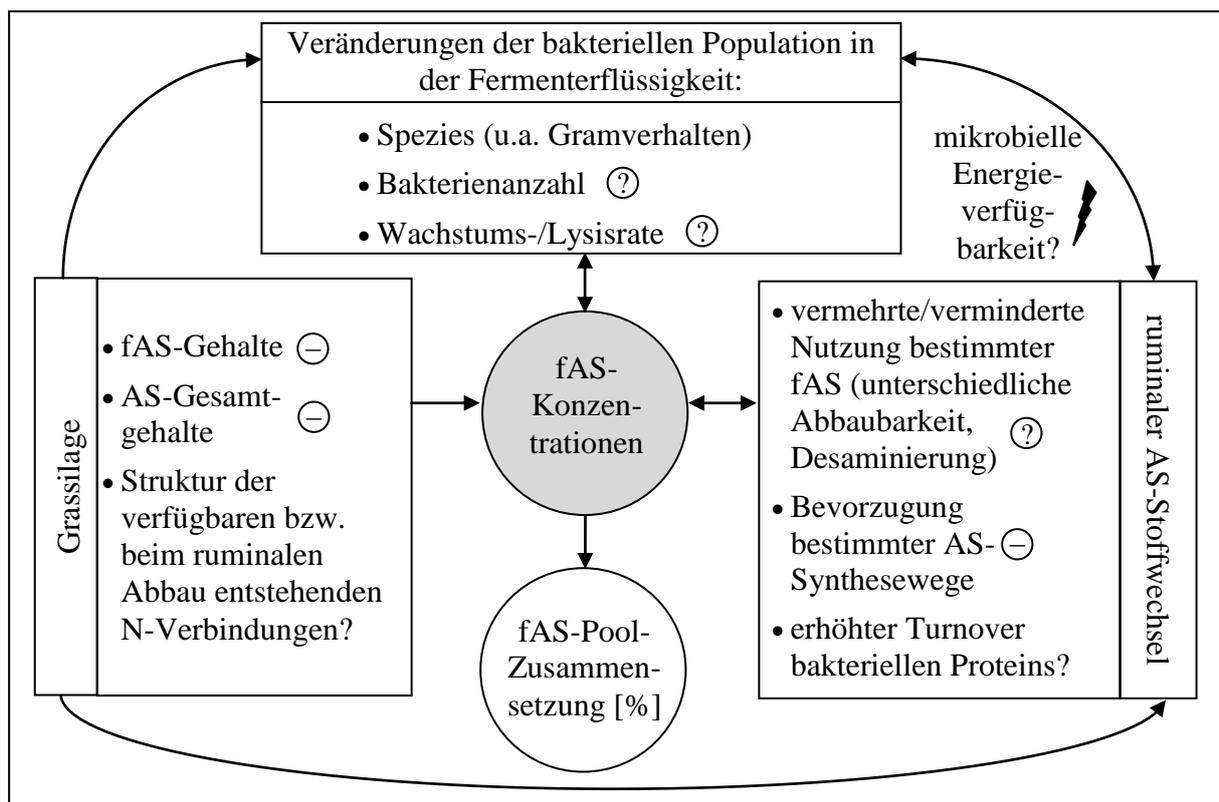


Abb. 5.9: Mögliche Beeinflussungen der fAS-Gehalte und der fAS-Anteile im fAS-Pool in der Fermenterflüssigkeit durch Schadgrassilagezulagen.

- ⊖ kein Zusammenhang bzw. kein Hinweis auf eine Beeinflussung
- ⊕ vereinzelt Hinweise auf Beeinflussung

5.6 Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch Schadgrassilagen der Gruppen 1, 2 und 3 sowie durch die Schadgrassilagen 04 und 09

5.6.1 Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilagen 07 und 10 (Gruppe 1)

Sowohl S07 als auch S10 beeinflussten den Proteinstoffwechsel im Pansensaft in ähnlicher Weise und wurden daher in der Reaktionsgruppe 1 zusammengefasst (s. Kap. 5.5). Sie wiesen bei unterschiedlichen prozentualen RE-Anteilen und fAS-Gehalten nur geringgradig höhere Rp-Gehalte auf als K01 (s. Kreisdiagramme in Abb. 5.10 und 9.7).

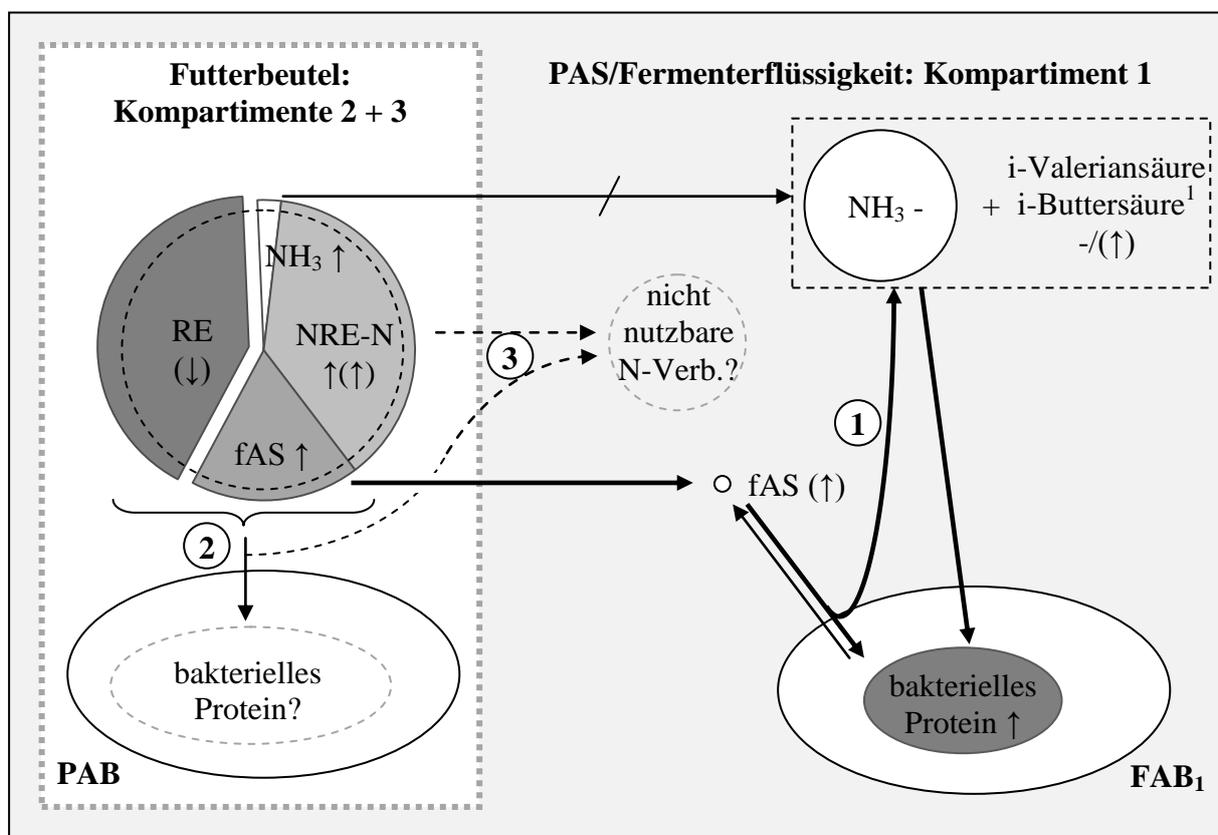


Abb. 5.10: Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft (PAS) durch S07. Das Kreisdiagramm zeigt die quantitative Verteilung der N-Fractionen in S07 (Angaben in g/kg TS). Der gestrichelte schwarze Kreis symbolisiert die entsprechende Höhe des Rp-Angebots bei Zulagen von K01. Nur die wichtigsten Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Parametern sind dargestellt.

¹ laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lumpp, Hannover am 12.03.2010; NRE-N = nicht-Reineiweiß-N (u.a. messtechnisch nicht erfasste AS und kleine Peptide sowie sonstige N-Verbindungen, s. auch Abb. 5.5)

Die N-Nutzungseffizienzen (s. Tab. 9.122) befanden sich ebenfalls im Bereich der jeweiligen Kontrollen, obwohl es unter Zulagen von S07 zu minimal (s. Abb. 5.10, Punkt ①) und bei

Zulagen von S10 bereits zu stärker gestiegener Fermentation von AS kam (verkleinerter fAS-Pool trotz höheren Eintrags mit S10 und gestiegene i-Säurenproduktionen, s. Abb. 9.7, Punkt ①).

Bei S07 deutete sich erstmals die Frage an, warum die bakteriellen Proteingehalte in der Fermenterflüssigkeit im Mittel nur minimal anstiegen, obwohl geringgradig höhere Mengen an Rp in S07 gegenüber K01 enthalten waren. Möglicherweise erhöhten sich die bakteriellen Proteingehalte der PAB geringfügig (Punkt ②) oder es akkumulierten kleine Mengen niedermolekularer, nicht detektierter N-Verbindungen in der Fermenterflüssigkeit (Punkt ③). Bei Zulagen von S10 ist der geringgradig gestiegene bakterielle Proteingehalt (FAB₁) von gering- bis hochgradig gestiegenen i-Säurenproduktionen begleitet, so dass die anscheinend gegenüber K01 erniedrigte N-Wiederfindungsrate vermutlich bereits durch gesteigerte Desaminierung von AS zu erklären ist (s. Abb. 9.7, Punkt ①).

Hinweise auf unzureichende Energieverfügbarkeit (gleiche bzw. leicht gesteigerte flüchtige Fettsäurenproduktionen⁴³) bzw. Unfähigkeit der FAB₁, Protein zu synthetisieren gibt es nicht. Sowohl die Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit als auch die Bakterienmasse (s. GAST 2010; Summe der Nucleobasen als Indikator für die Bakterienmasse) stiegen gleichermaßen an.

Im Vergleich mit Schadgrassilagen der Gruppen 2 und 3 sowie S04 und S09 (s. Kap. 5.6.2 bis 5.6.5) ergaben sich folglich nur geringgradige Beeinflussungen des Proteinstoffwechsels im ruminalen Kompartiment 1.

5.6.2 Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilagen 02 und 11 (Gruppe 2)

Niedrigere Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit (s. Abb. 5.11) bei gegenüber K01 kaum veränderten Massen der FAB₁ (s. GAST 2010, Summe der Nucleobasen) deuten auf temporäre Energieunterversorgung der FAB₁ im Sinne eines Hungerzustandes an den Enden der einzelnen Versuchstage hin. Selbiger hat möglicherweise die N-Fixierung und die Proteinneusynthese um den Probenentnahmezeitpunkt limitiert (s. Abb. 5.11, Punkt ①; s. auch Kap. 5.5.3, N-Nutzungseffizienzen) und bei S11 zur vermehrten fAS-Nutzung aus dem fAS-Pool geführt (s. Abb. 9.8, Punkt ⑤). Fortdauernder Energiemangel ist unter Zulagen von S02 unwahrscheinlich (gestiegene flüchtige Fettsäurenproduktion⁴³ bei ähnlichem Rp-Gehalt wie K01), während bei Zulagen von S11 möglicherweise auch insgesamt zu wenig Energie verfügbar war, um die gegenüber K01 leicht erhöhten Rp-Mengen zu fixieren (nur geringgradig erhöhte tägliche flüchtige Fettsäurenproduktionen⁴³).

Die erniedrigten N-Wiederfindungsraten (ähnlicher/erhöhter N-Eintrag bei gesenkten Gehalten bakteriellen Proteins und lediglich leicht gestiegenen Ammoniakkonzentrationen in Kompartiment 1) deuten außerdem wie bei der Schadgrassilage 07 (Gruppe 1) darauf hin, dass entweder vermehrte N-Fixation durch PAB statt fand (Punkt ②) oder dass auch bei Zulagen von Silagen der Gruppe 2 niedermolekulare, nicht nutzbare N-Verbindungen akkumulierten (Punkt ③).

Beide Schadgrassilagen bedingten außerdem eine gering- bis mittelgradige Erhöhung des N-Verbindungsabbaus (Punkt ④). Die Zunahme der Hexansäureproduktionsraten⁴³ (ALLISON 1978) weist dementsprechend wie bei S05 und S08 (Gruppe 3) sowie S04 und

⁴³ laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lumpp, Hannover am 12.03.2010

S09 auf Vergrößerung bzw. Etablierung einer *M. elsdenii*-Population hin, welche möglicherweise am erhöhten N-Verbindungsabbau beteiligt war (s. Kap. 5.6.3 bis 5.6.5). Denkbar ist, dass auch die Vermehrung anderer AS-fermentierender Spezies durch S02 und S11 gefördert wurde.

Im Gegensatz zu den Silagen der Gruppe 1 führten S02 und S11 zu offensichtlichen Veränderungen im Proteinstoffwechsel im Kompartiment 1. Neben deutlicheren Hinweisen auf Akkumulation nicht nutzbarer, nicht detektierter N-Verbindungen bzw. vermehrter N-Fixierung im Protein der PAB kam es bei Zulagen dieser Schadgrassilagen zu Veränderungen in der mikrobiellen Populationsstruktur.

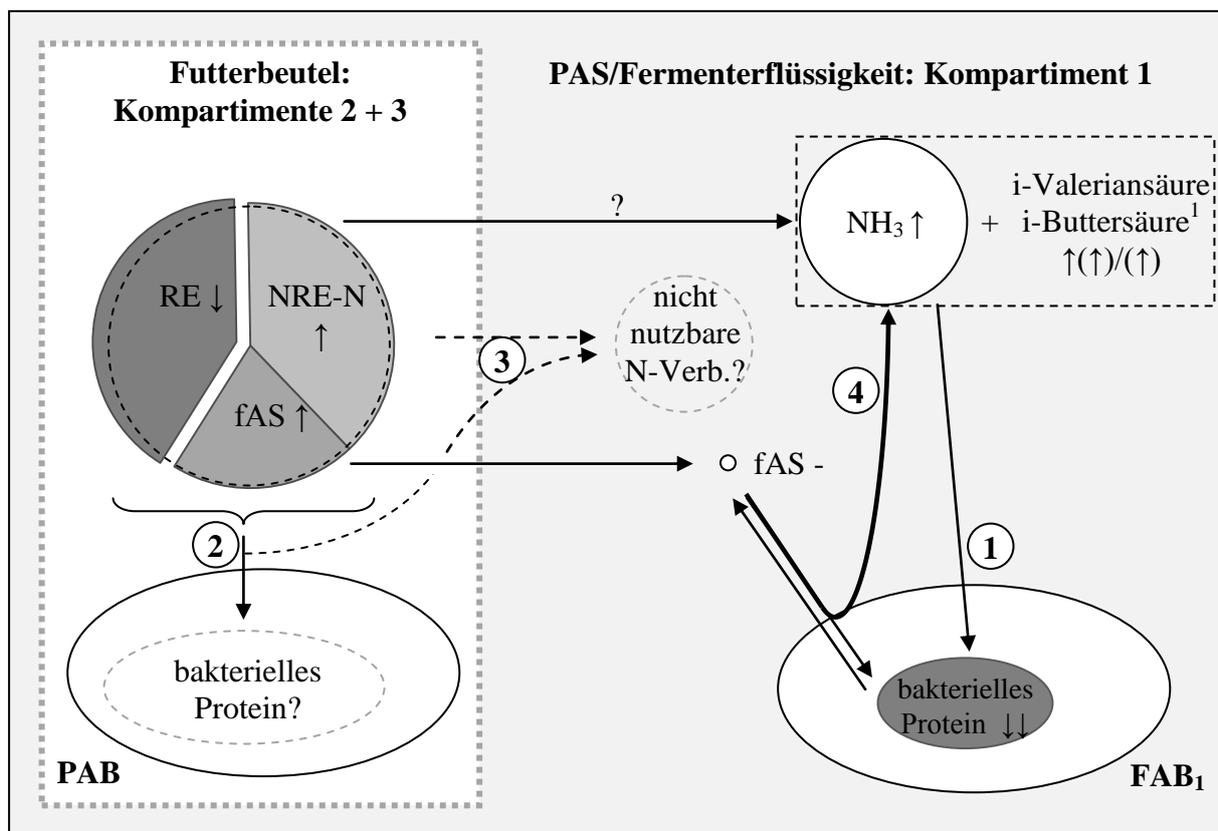


Abb. 5.11: Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft (PAS) durch S02. Legende s. Abb. 5.10, Abb. 9.8 zeigt das Flussdiagramm für S11

5.6.3 Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilagen 05, 08, 12 und 13 (Gruppe 3)

Trotz unterschiedlicher Auswirkungen auf den Gehalt bakteriellen Proteins (s. Abb. 5.12, 9.9, 9.10 und 9.11) in der Fermenterflüssigkeit war diesen vier Rp-reichen Schadgrassilagen gemein, dass die gemessenen Gehalte bakteriellen Proteins teilweise deutlich hinter dem Erwartungswert zurück blieben (bereits geringgradig gesteigerte Gehalte bei Zulage von S07 mit einem Rp-Gehalt von 178 g/kg TS vs. 207 bis 277 g/kg TS in Gruppe 3).

Da sich Protein- und/oder Ammoniakkonzentrationen höchstens mittelgradig erhöhten, muss auch bei diesen Schadgrassilagen davon ausgegangen werden, das N von PAB gebunden wurde (s. Abb. 5.12, Punkt ①) oder in Form mikrobiell nicht nutzbarer, nicht detektierter N-Verbindungen akkumulierte (Punkt ②). Nicht ausgeschlossen werden kann, dass die durch S05 und S08, besonders aber durch S12 und S13 zur Verfügung gestellte Fermentationsenergie nicht zur Fixierung der hohen N-Mengen in den Silagen der Gruppe 3 ausreichte bzw. genutzt werden konnte (gegenüber K01 gering- bis mittelgradig höhere flüchtige Fettsäureproduktionen bei S05 und S08 und ähnliche Produktionen bei S12 und S13⁴⁴).

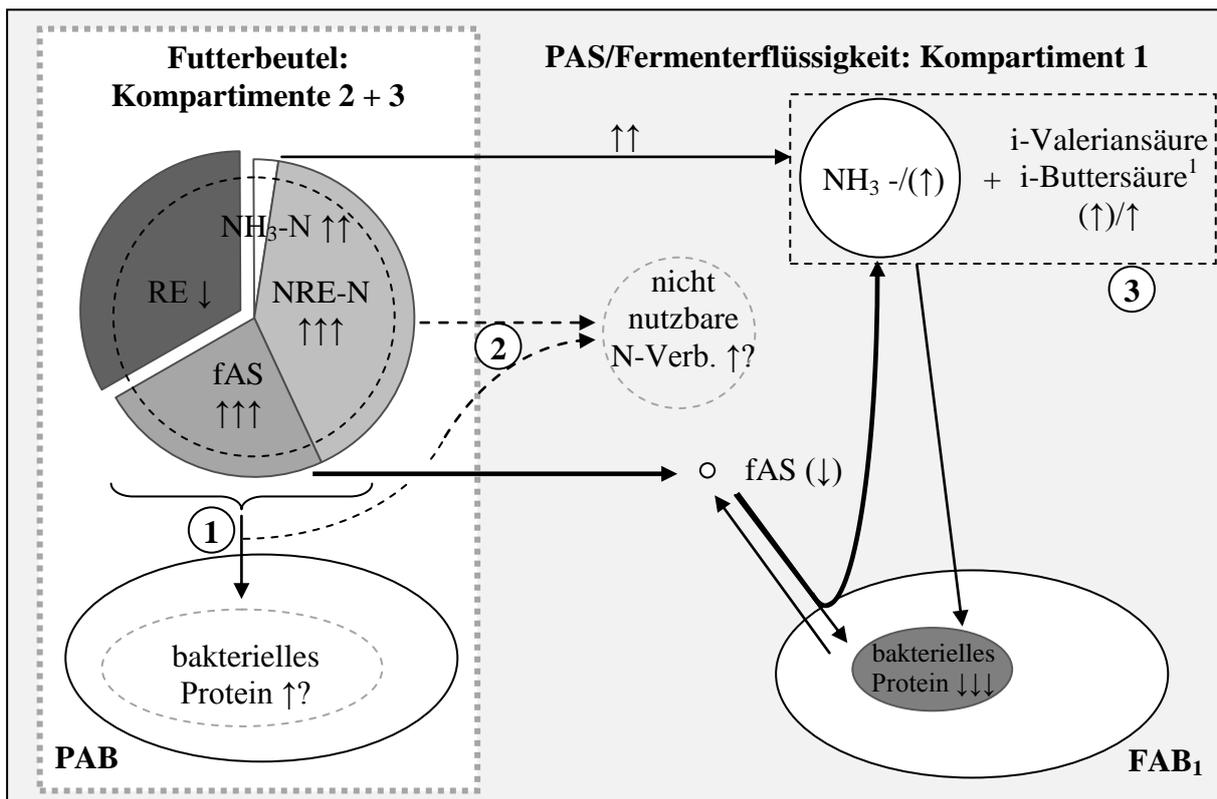


Abb. 5.12: Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft (PAS) durch S13 (Gruppe 3). Legende s. Abb. 5.10, die Abb. 9.9, 9.10 und 9.11 zeigen die Flussdiagramme für S05, S08 und S12

Mit Hilfe beider Ansätze können die niedrigen N-Nutzungseffizienzen der FAB₁ (s. Kap. 5.5.3 und Tab. 9.122) bei Zulagen dieser Schadgrassilagen erklärt werden, während die verminderten N-Wiederfindungsraten nicht allein durch energetische Unterversorgung der Pansenmikroorganismen begründbar sind. Denkbar ist jedoch, dass PAB (Kompartimente 2 und 3), deren Zahl im RUSITEC-System mindestens zwei- bis dreimal so hoch ist wie die der FAB₁ (CZERKAWSKI u. BRECKENRIDGE 1982), energiereichere Substrate besser bzw. länger nutzen konnten und ihre Proteinsynthese, sowie dementsprechend die N-Fixierung, stärker steigerten als FAB₁ (Punkt ①). Lediglich gering- (S05, S12, S13) bis mittelgradig (S08)

⁴⁴ laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lumpp, Hannover am 12.03.2010

gestiegene i-Säurenproduktionsraten⁴⁴ (Punkt ③) scheinen zu bestätigen, dass größere Mengen an N fixiert worden sein müssen oder aber gar nicht erst in Form von Ammoniak und i-Säuren frei wurden.

Bei Zulagen von S05 und S08 deuten außerdem wie bei S11 (Gruppe 2), S04 und S09 gesteigerte Hexansäureproduktionen⁴⁵ auf erhöhte Stoffwechselaktivität AS-fermentierender *M. elsdenii*-Stämme hin. Selbige verschärfte eine möglicherweise (temporär) bestehende Energiemangelsituation anderer FAB₁ und trug über Erhöhung des N-Turnovers zusätzlich zur Begrenzung der Nettoproteinsynthese der FAB₁ bei. Verstärkte Vermehrung von *M. elsdenii* konnte möglicherweise verhindern, dass Zulagen von S05 und S08, wie solche von S12 und S13, zu erniedrigten bzw. nicht gesteigerten Proteingehalten in der Fermenterflüssigkeit führten.

Rohproteinreiche Grassilagen der Gruppe 3 bedingten somit ähnliche, aber noch deutlichere Veränderungen im Proteinstoffwechsel im Pansensaft als Silagen der Gruppe 2. Neben N-Akkumulation im Pansensaft bzw. den PAB und Etablierung von *M. elsdenii* spielt aber möglicherweise auch eine entstehende energetische Unterversorgung der FAB₁ bei Zulagen dieser Schadgrassilagen eine Rolle bei der bakteriellen Proteinsynthese im Pansensaft.

5.6.4 Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilage 04

Zulagen von S04 führten zu massiv erhöhtem N-Verbindungs- bzw. AS-Abbau (s. Abb. 5.13, Punkt ①). So sind die stark erhöhten Ammoniakkonzentrationen und i-Säurenproduktionen sowie fAS-Konzentrationen vermutlich auf Zunahme bzw. Etablierung AS-fermentierender grampositiver HAP-Spezies (CHEN u. RUSSELL 1988, 1989 a; WALLACE et al. 2003) und bestimmter *M. elsdenii*-Stämme (RYCHLIK u. RUSSELL 2002 a) zurückzuführen. Letzteres bestätigen die gegenüber K01 stark erhöhten Hexansäureproduktionen⁴⁵ (ALLISON 1978). Folglich verbesserten Zulagen von S04 die Vermehrungsbedingungen für AS-fermentierende FAB₁ entscheidend. Ihre Populationsgröße nahm, möglicherweise auf Kosten anderer Spezies, stark zu (s. GAST 2010; Bestätigung durch deutlich erhöhte Nukleobasengehalte in der Fermenterflüssigkeit). Dies führte zu einer ebenfalls merklichen Erhöhung der Gehalte bakteriellen Proteins im Kompartiment 1 (Punkt ②).

Da bei Vergrößerung der AS-fermentierenden Population nicht mit erhöhten fAS-Konzentrationen zu rechnen ist, sind selbige vermutlich erst bei der Probenaufbereitung aus FAB₁ freigesetzt worden (Punkt ③). Die deutliche Konzentrationserhöhung lässt sich sowohl auf eine Vergrößerung der Population als auch die Zunahme grampositiver Spezies zurückführen (s. Kap. 5.5.4, Seite 180).

Hinweise auf unzureichende Energieverfügbarkeit (stark gestiegene Produktionen aller flüchtigen Fettsäuren⁴⁵) oder Akkumulation nicht nutzbarer, niedermolekularer N-Verbindungen sowie Erhöhung der Gehalte bakteriellen Proteins in den Kompartimenten 2 und 3 (PAB) finden sich nicht. Vielmehr muss sogar davon ausgegangen werden, dass es zur Abnahme des PAB-Proteins kam (Punkt ④). Dies steht im Einklang mit den gestiegenen Ammoniakkonzentrationen, da Ammoniak möglicherweise speziell durch zellulolytische Bakterien (NOLAN u. DOBOS 2005) an den Futterpartikeln nicht mehr genutzt wurde. Außerdem weisen die stark erhöhten i-Säurenkonzentrationen⁴⁵ darauf hin, dass die Kapazität

⁴⁵ laut persönlicher Mitteilung durch Frau L. Lumpp, Hannover am 12.03.2010

faserassoziierter Mikroorganismen diese als Substrate für ihre AS-Synthese zu nutzen, überschritten wurde.

Im Gegensatz zu den Schadgrassilagen der Gruppen 1, 2 und 3 kam es belegbar zur Verbesserung der Lebensbedingungen (bestimmter) flüssigkeitsassoziierter Bakterien. Die gemessenen Ammoniakkonzentrationen und i-Säuren- sowie Hexansäureproduktionen⁴⁶ zeigen massive Verschiebungen in der bakteriellen Population im Pansensaft auf.

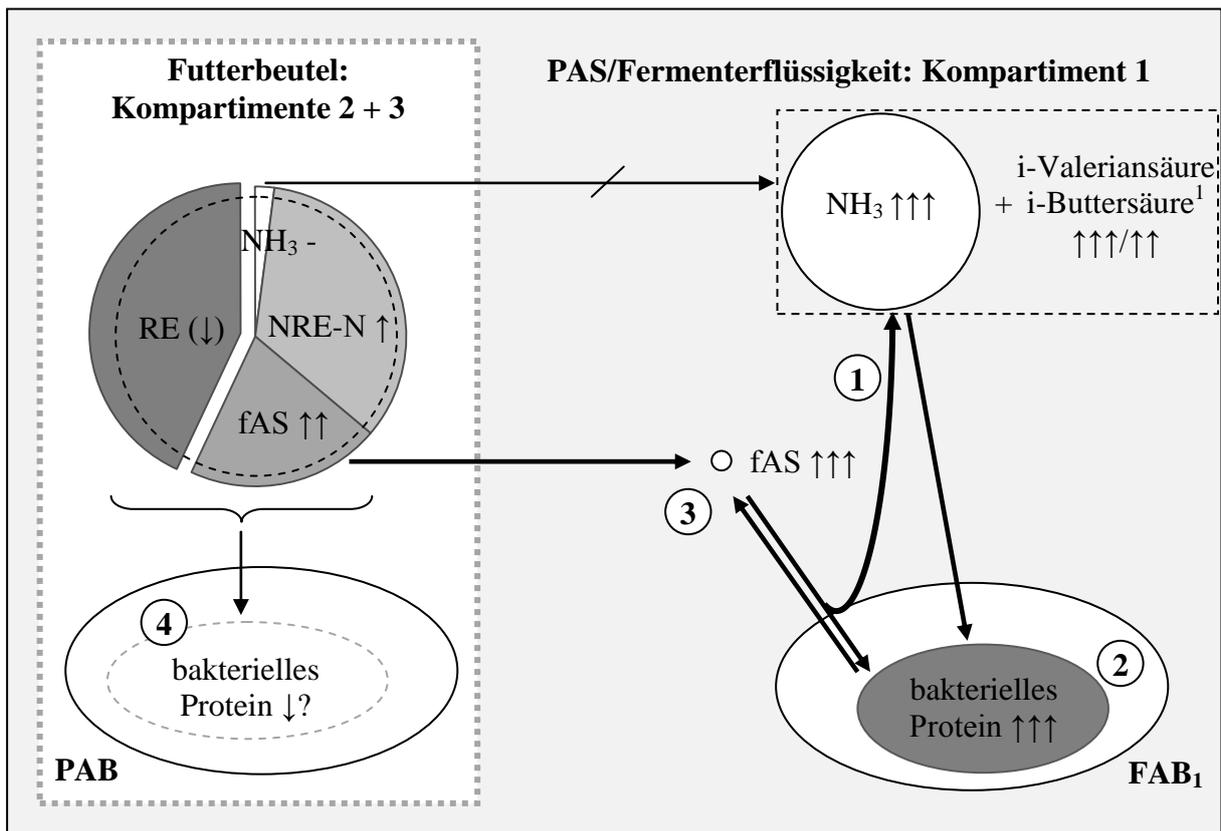


Abb. 5.13: Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft (PAS) durch S04. Legende s. Abb. 5.10

5.6.5 Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilage 09

Wie bei Zulagen von S04 kam es auch unter Zulagen von S09 zu einem stark gesteigerten AS-Abbau (s. i-Säurenproduktionen und verkleinerter fAS-Pool in Abb. 5.14, Punkt ①). Die AS wurden wahrscheinlich zur Proteinsynthese und vor allem zur Energiegewinnung genutzt, obwohl die täglichen Produktionen der flüchtigen Fettsäuren (S09 > K01⁴⁶) per se keine unzureichende Energieverfügbarkeit erkennen lassen. Neben den hohen i-Säurenproduktionen (Hinweis auf desaminierende Spezies) deuten dementsprechend hohe Hexansäureproduktionen⁴⁶ auf Zunahme der *M. elsdenii*-Population hin. Die Gehalte bakteriellen Proteins in

⁴⁶ laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lumpp, Hannover am 12.03.2010

Kompartiment 1 lagen ebenfalls wie bei Zulagen von S04 nach 23-stündiger Fermentation vermeintlich höher als bei der Kontrolle. Annähernd gleiche Nukleobasengesamtgehalte in der Fermenterflüssigkeit (s. GAST 2010) zeigen aber im Gegensatz zu Zulagen von S04 (s. Kap. 5.5.5), dass die Bakterienmasse nicht (mehr) höher war als in den Kontrollfermentern. Es muss vielmehr davon ausgegangen werden, dass bei der Lysis von PAB (Punkt ②), Proteine frei wurden und erhöhte bakterielle Proteingehalte vortäuschten (Punkt ③). Dies wiederum resultierte in vermeintlich hohen N-Nutzungseffizienzen der FAB₁ (s. Kap. 5.5.3). Zusammengefasst kam es auch unter Zulagen von S09 zu starken, teilweise S04-ähnlichen Veränderungen der bakteriellen Population im Kompartiment 1 (Zunahme desaminierender Spezies). Anders als unter Zulagen von S04 wurden im weiteren Fermentationsverlauf aber vermutlich bereits auch Bakterien im Pansensaft negativ beeinflusst.

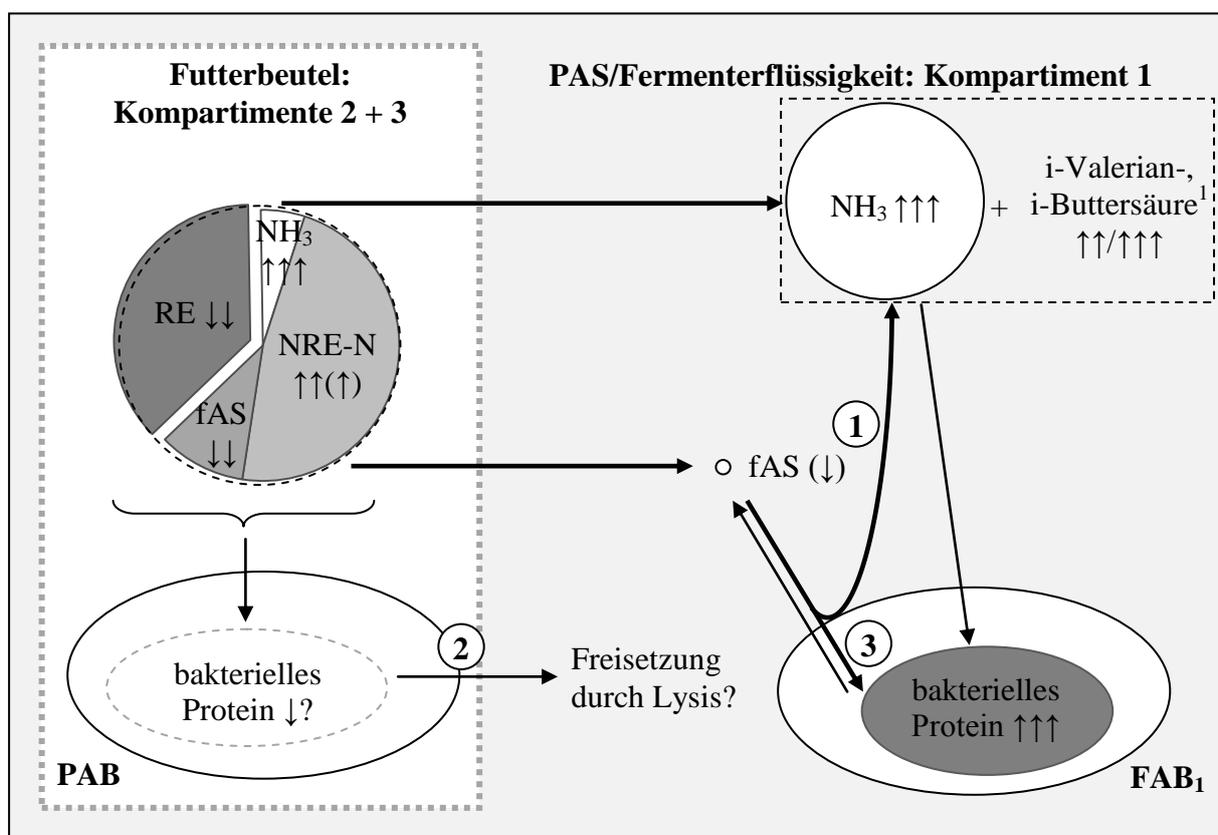


Abb. 5.14: Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft (PAS) durch S09.
Legende s. Abb. 5.10

5.7 Ergänzende Kontrollgrassilagen (isogenic counterparts)

Um zu überprüfen, ob es sich bei K01 um eine repräsentative Kontrollgrassilage handelte, wurden die Wirkungen sechs weiterer Grassilagen (s. Kap. 3.2.3.3) auf den ruminalen Proteinstoffwechsel im RUSITEC-System untersucht. Die sechs ergänzenden Kontrollgrassilagen

(K14, K15, K16, K18, K20 und K23) wiesen RE-Anteile am Rp über 50 % auf (s. Tab. 3.5; Ausnahme K14) und ihre Verfütterung hatte nicht zu Erkrankungen in Milchviehherden geführt. Als Vergleichswerte dienten die jeweiligen Mittelwerte für K01 über alle 15 Läufe, in denen selbige eingesetzt worden war ($n = 30$ bzw. $n = 25$ in der Auslaufphase).

Fast alle ergänzenden Kontrollgrassilagen bewirkten allenfalls leichte Anstiege der Ammoniakkonzentration. Lediglich bei Zulagen von K16 kam es zu einem etwas größeren Anstieg (s. Abb. 9.12). Die Konzentration bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit erreichte unter Zulagen aller ergänzenden Kontrollen höhere Werte, die Erhöhungen gegenüber den jeweiligen Kontrollphasen hatten aber bei allen Kontrollen (inkl. K01) im Mittel ein ähnliches Ausmaß (s. Abb. 9.13). Des Weiteren entsprachen die in den Läufen 14 (K14, K15, K16) und 15 (K18, K20, K23) gemessenen Gehalte bakteriellen Proteins weitestgehend denen unter Zulagen von K01 in den Laufgruppen IV und V (Läufe 11 bis 13 bzw. 16 bis 18). Die N-Nutzungseffizienzen lagen bei größtenteils ähnlichen oder sogar niedrigeren Rp-Gehalten der ergänzenden Kontrollgrassilagen auf gleichem oder höherem Niveau (s. Abb. 5.8 sowie Tab. 9.122). Zu geringfügig niedrigerer N-Nutzungseffizienz führten lediglich Zulagen von K16. Die Gesamtkonzentrationen an fAS lagen bei Zulagen von K14 und K15 über den Mittelwerten von K01, während die übrigen Kontrollgrassilagen ähnliche oder geringgradig niedrigere fAS-Gesamtkonzentrationen bewirkten (s. Abb. 9.14). Analoges Verhalten zeigte sich auch bei fast allen individuellen fAS. K16 bedingte außerdem die niedrigsten Histidin-, Threonin-, Arginin- und Valinkonzentrationen (s. Abb. 9.18, 9.20, 9.22 und 9.24).

Während die Auswirkungen aller Kontrollgrassilagen einschließlich K01 auf die Parameter Ammoniakkonzentration und Gehalt bakteriellen Proteins gleichgerichtet waren, sind die heterogenen Auswirkungen auf einzelne fAS-Konzentrationen möglicherweise bereits durch unterschiedliche botanische Zusammensetzungen erklärbar. Des Weiteren betrug die Anzahl der Wiederholungen bei den ergänzenden Kontrollen lediglich $n = 2$, so dass größere Schwankungen bzw. Abweichungen von der Kontrolle K01 bereits aufgrund der niedrigen Stichprobenanzahl möglich sind. Hinzukommend wurden K14, K15, K16, K18, K20 und K23 frisch eingesetzt, während K01 zuvor bei -20 °C aufbewahrt werden musste und daher ggf. lagerungsbedingte Veränderungen aufwies (s. GAST 2010).

Da die unter Zulagen von K01 gemessenen Werte aber bei allen Parametern überwiegend in mittleren Bereichen der unter Zulagen der ergänzenden Kontrollen bestimmten Konzentrationen lagen, bzw. entsprechende Verläufe zeigten, stellt K01, die erfassten Parameter des Proteinstoffwechsels betreffend, eine repräsentative Kontrollgrassilage dar.

5.8 Abschließende Wertung

Die Auswirkungen der Schadgrassilagen auf die Parameter Ammoniak- und fAS-Konzentrationen sowie den Gehalt bakteriellen Proteins im ruminalem Kompartiment 1 waren teilweise heterogen und das Ausmaß der Veränderungen zeigte keine Korrelation mit den prozentualen RE-Anteilen am Rp. Den Schadgrassilagen gemein waren aber im Vergleich mit den Kontrollgrassilagen tendenziell niedrigere N-Nutzungseffizienzen durch FAB_1 (s. Abb. 5.8). Ursächlich waren, wie Abbildung 5.15 zeigt, zum einen Veränderungen der mikrobiellen Population im Pansensaft.

Zum anderen scheint es teilweise zur Akkumulation nicht nutzbarer, nicht detektierter N-Verbindungen gekommen zu sein. Zurzeit laufen Studien im Pansenlabor der Rinderklinik der

Tierärztlichen Hochschule Hannover, die sich dementsprechend mit der Detektion weiterer N-Verbindungen im Pansensaft beschäftigen⁴⁷.

Während desaminierende Spezies wie *M. elsdenii* und ggf. auch HAP-Bakterien einen selektiven Vorteil durch die hohen fAS-Gehalte in den Schadgrassilagen erfuhren, und sich vermehren konnten, fehlten Proteo- und Peptidolyten möglicherweise bestimmte, wichtige Proteinbruchstücke oder Peptide bzw. waren ihnen nicht zugänglich. Da aber speziell das proteolytische Bakterium *B. fibrisolvans* eine Substanz bildet, welche die Größe der HAP-Population reguliert (RYCHLIK u. RUSSELL 2002 a; s. Kap. 2.1.8.1.11.1), verstärkte sich der Selektionsvorteil der desaminierenden Spezies und sie drängten die anderen Bakterien weiter zurück. Wenn es nicht, wie bei Zulagen von S04, zu sehr starker Vermehrung der desaminierenden Bakterien kam, waren erniedrigte Gehalte bakteriellen Proteins im Pansensaft die Folge, da erhöhter Proteinturnover durch Desaminierung die N-Nutzungseffizienzen weiter senkte.

Nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine (temporäre) energetische Unterversorgung spezieller Bakteriengruppen zu bestimmten Zeitpunkten die Proteinsynthese limitierte, während desaminierende Spezies weiterhin Energie aus dem Abbau von AS gewinnen konnten. Alleinige Ursache für die Veränderungen im ruminalen Eiweißstoffwechsel im Kompartiment 1 ist eine unzureichende Energieverfügbarkeit aber vermutlich nicht.

Darüber hinaus deutet die Erholung erkrankter Bestände durch zusätzliche Fütterung RE-reichen Sojaschrots (ohne zusätzliche Gabe energiehaltiger Konzentrate) darauf hin, dass tatsächlich die Supplementierung bestimmter, bisher unbekannter Proteinkomponenten für die Rekonvaleszenz entscheidend ist (EICKEN 2005 b). Durch ihre Zulage erholt sich womöglich die Population der Peptido- und Proteolyten und es kommt über vermehrtes Wachstum und Konkurrenz zur Rückdrängung desaminierender Spezies und zur Verbesserung der N-Nutzungseffizienzen (s. Abb. 5.15). So berichten bereits ROOKE et al. (1983, 1985) von erhöhten mikrobiellen Proteinsyntheseeffizienzen (g N/g scheinbar ruminal verdauter uS), wenn grassilagebasierte Rationen mit Sojabohnenmehl supplementiert werden. Eine weitere Studie folgert, dass die Verfügbarkeit ruminal abbaubarer Proteinquellen bei Grassilagefütterung besonders wichtig für die mikrobielle Proteinsynthese ist (ROOKE u. ARMSTRONG 1988). MAY et al. (1993) dokumentierten ferner höheres bakterielles Wachstum auf Sojaproteinen gegenüber isonitrogenen Ammoniak-N-Zulagen (*in-vitro*) und auch zunehmende Peptidanteile am Rp sollen die N-Konversion zu mikrobiellen N-Verbindungen fördern (JONES et al. 1998).

Die beobachteten Veränderungen im Proteinstoffwechsel im Pansensaft sind jedoch vermutlich zu gering, um allein verantwortlich für die erhöhte Inzidenz von Produktionskrankungen in den Milchviehbetrieben zu sein, die die sog. Schadgrassilagen verfüttert hatten. Jedoch kann eine ineffiziente mikrobielle Proteinproduktion durchaus zu marginalen Proteinmangelzuständen bei Wiederkäuern mit hoher Milchleistung führen und relativ zum Energiegehalt der Ration eine inadäquate Adsorption bestimmter, essentieller AS bedingen (NOLAN u. DOBOS 2005). Sollten tatsächlich nicht ruminal abbaubare N-Verbindungen (beispielsweise schwer abbaubare Peptide oder Alkaloide) akkumulieren, stellt sich außerdem die Frage nach der Nutzbarkeit dieser Substanzen durch das Rind und ihrer Wirkung im Organismus nach intestinaler Resorption.

⁴⁷ Laut persönlicher Mitteilung von Frau S. Özmen und Frau A. Wichern (Hannover am 23.07.2010) laufen im Pansenlabor der Rinderklinik derzeit Studien, die sich u.a. mit dem quantitativen und qualitativen Peptidnachweis in den Fermenterflüssigkeitsproben aus den RUSITEC-Läufen 2 bis 18 beschäftigen.

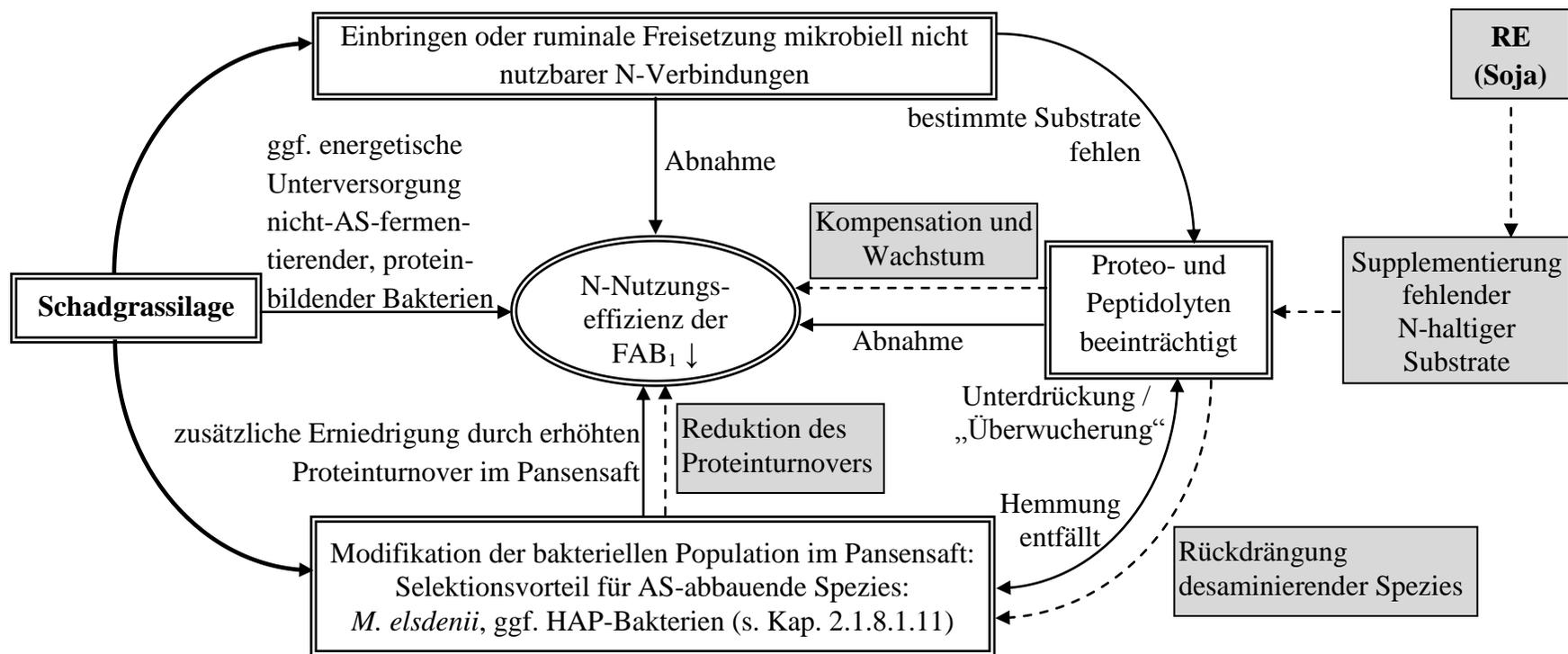


Abb. 5.15: Mögliche Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft bei Zulage der Schadgrassilagen. Dicke schwarze Pfeile kennzeichnen die vermuteten Hauptwirkungen der Schadgrassilagen, grau unterlegte Kästen und gestrichelte Pfeile zeigen mögliche Modifikationen durch Zulage von Soja-RE.

Gresner, N. (2011): Untersuchungen zum Einfluss von Grassilagen mit niedrigen Reineiweißgehalten auf den Eiweißstoffwechsel im Pansensaft *in-vitro*

6 Zusammenfassung

Grassilagen mit niedrigem prozentualem Reineiweißanteil am Rohprotein sollen zur Entstehung des Krankheitsbildes „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ bzw. einer erhöhten Inzidenz von Produktionserkrankungen in Milchviehbeständen ursächlich beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Auswirkungen von zehn dieser sogenannten Schadgrassilagen auf den Proteinstoffwechsel im Pansensaft mit Hilfe des Langzeitinkubationssystems RUSITEC untersucht. Die eingesetzten Schadgrassilagen wiesen mehrheitlich Reineiweißanteile am Rohprotein unter 50 % auf (siehe Tabelle 6.1) und während ihrer Verfütterung waren in den Herkunftsbetrieben vermehrt klinische Erkrankungen in Form von Fruchtbarkeits-, Stoffwechsel- und Verdauungsstörungen sowie erhöhte Milchzellzahlen, Lahmheiten und plötzliche Todesfälle aufgetreten. Als Standardkontrolle diente eine Grassilage, deren Verfütterung nicht mit gesundheitlichen Beeinträchtigungen assoziiert wurde und deren Reineiweißanteil am Rohprotein über 50 % lag.

Tabelle 6.1: Rohprotein- und Reineiweißgehalte sowie prozentuale Reineiweißanteile am Rohprotein der eingesetzten Schadgrassilagen und der Kontrollgrassilage K01

| Bezeichnung | Dimension | Grassilage | | | | | | | | | | |
|-------------|-----------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | K01 | S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| Rohprotein | g/kg TS | 156 | 174 | 180 | 231 | 178 | 221 | 156 | 180 | 188 | 207 | 277 |
| Reinprotein | g/kg TS | 83,3 | 71,0 | 78,9 | 97,0 | 75,9 | 132 | 61,0 | 60,1 | 74,8 | 70,6 | 162 |
| Reineiweiß | % von Rp | 50,5 | 40,8 | 43,8 | 42,0 | 42,6 | 59,7 | 39,1 | 33,4 | 39,8 | 34,1 | 58,5 |

K Kontrollgrassilage; Rp Rohprotein; S Schadgrassilage; TS Trockensubstanz

Jeder RUSITEC-Lauf begann mit einer achttägigen Einlauf- und Kontrollphase, in der täglich 10,5 g Trockensubstanz an Heu und 3,4 g Kraftfutter (18 % Rohprotein) zur Beladung der Fermenter eingesetzt wurden. Anschließend erfolgten, anstelle von Heu, die Zulagen der Grassilagen (jeweils 10,5 g Trockensubstanz/Tag) über eine Dauer von insgesamt zehn Tagen (Versuchsphase). Die täglich zugeführte Kraftfuttermenge blieb konstant. Die nachfolgende Auslaufphase (zehn Tage), in der die Beschickung der Fermenter derer der Einlauf- und Kontrollphase entsprach, endete an Tag 28.

In Fermenterflüssigkeitsproben, die vor der täglichen Futterzulage entnommen wurden, erfolgte die Messung der Ammoniakkonzentration und des Gehalts an bakteriellem Protein, sowie der Konzentrationen der freien Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Serin, Histidin, Glycin, Threonin, Alanin, Arginin, Tyrosin, Valin, Methionin, Tryptophan, Phenylalanin Isoleucin und Leucin. Die Gesamtgehalte an freien Aminosäuren wurden berechnet.

Unter Zulagen der Schadgrassilagen erreichten die Ammoniakkonzentrationen im Mittel 6,12 bis 81,3 % höhere Werte als unter Zulagen der Kontrolle (8,45 versus 9,06 mmol/L, entsprechend 11,8 versus 12,7 mg/dL bis 10,5 versus 18,9 mmol/L, entsprechend 14,7 versus 26,5 mg/dL). Die mittlere Beeinflussung der Gehalte bakteriellen Proteins war bei unter-

schiedlichen Rohproteingehalten in den Schadgrassilagen (siehe Tabelle 6.1: 156 bis 277 g/kg Trockensubstanz) gegenüber der Kontrolle geringeren Ausmaßes (-17,9 bis +16,7 %). Ebenso zeigten die Gesamtkonzentrationen der freien Aminosäuren unter Zulagen der meisten Schadgrassilagen eher geringe Abweichungen gegenüber der Kontrolle (exklusive S04, siehe Tabelle 6.2: -8,82 bis +13,7 %).

Tabelle 6.2: Veränderungen [%] der Ammoniakkonzentration, des Gehalts an bakteriellem Protein und der Gesamtkonzentration freier Aminosäuren in der Fermenterflüssigkeit beim Einsatz der Schadgrassilagen gegenüber der Kontrollgrassilage K01

| Parameter | Schadgrassilage | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| Ammoniakkonzentration | +27,5 | +81,3 | +41,9 | +6,12 | +58,8 | +73,7 | +19,6 | +19,8 | +10,8 | +30,3 |
| Gehalt bakteriellen Proteins | -10,0 | +16,7 | +11,0 | +5,00 | +10,0 | +15,6 | +4,05 | -7,10 | -17,9 | -0,27 |
| Σ fAS-Konzentration | +7,31 | +62,2 | +3,37 | +13,7 | +6,53 | -5,35 | -5,41 | -8,82 | -6,71 | +11,8 |

fAS freie Aminosäuren; S Schadgrassilage

Zulagen der Schadgrassilagen verbesserten folglich das Substratangebot für aminosäurenfermentierende Bakterien und führten zu erhöhtem N-Verbindungsabbau sowie der Vermehrung desaminierender Spezies. Der demzufolge erhöhte N-Turnover und vermutlich auch die Benachteiligung proteo- und peptidolytisch aktiver Bakterien verringerten die Netto-Proteinsynthese von Bakterien in der RUSITEC-Fermenterflüssigkeit. Selbiges äußerte sich in überwiegend erniedrigten N-Nutzungseffizienzen der flüssigkeitsassoziierten Bakterien bei der Fermentation von Schadgrassilagen im Vergleich mit Kontrollgrassilagen (0,028 bis 0,037 versus 0,022 bis 0,030 g bakterielles N/g N-Input). Diskrepanzen zwischen der Höhe der Rohproteinzulagen und den N-Wiederfindungsraten im RUSITEC (bezogen auf die erfassten Parameter) deuten aber möglicherweise auch auf eine Akkumulation bakteriell nicht genutzter N-Verbindungen, wie zum Beispiel schwer ruminal abbaubarer Peptide im Pansensaft hin. Eine Korrelation zwischen der Höhe des prozentualen Reineiweißanteils am Rohproteingehalt in den Schadgrassilagen und dem Grad der Auswirkungen auf den ruminalen Proteinstoffwechsel im Pansensaft war dagegen nicht zu verzeichnen. Es ist daher davon auszugehen, dass weitere Faktoren wie die Abbaubarkeit vorhandener N-Verbindungen oder auch die absolute Höhe des Rohproteinangebots im Zusammenhang mit der den Bakterien zur Verfügung stehenden Energie ebenfalls Einfluss auf den Eiweißstoffwechsel im RUSITEC nahmen.

Es ist möglich, dass die beobachteten Veränderungen im Proteinstoffwechsel im Pansensaft durch Grassilagen mit niedrigem prozentualen Reineiweißanteil am Rohprotein zur Ätiologie der „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ bzw. zu einer erhöhten Inzidenz von Produktionskrankungen in Milchviehbeständen beitragen. Jedoch sind die beobachteten Auswirkungen auf die erhobenen Parameter nicht ausreichend, um allein dafür verantwortlich zu sein.

Gresner, N. (2011): Studies on the effects of grass silages with low true protein contents on protein metabolism in ruminal fluid *in-vitro*

7 Summary

Grass silages with a low true protein percentage in the total crude protein are supposed to contribute to the aetiology of a disease that is described as “Faktorenerkrankung Milchviehherde” (“factorial disease of dairy herds”) or a higher incidence of production diseases, respectively.

Therefore, in the present study, the effects of ten of these so-called suspected grass silages on protein metabolism in ruminal fluid were investigated by means of the long-term incubation system RUSITEC. The majority of the tested suspected grass silages showed less than 50 % of true protein in the total crude protein (see table 7.1) and the occurrence of clinical diseases on the origin farms had increased during the feeding of these grass silages. The dairy herds in question showed higher incidences of fertility diseases, metabolic as well as digestive dysfunctions, increased somatic cell counts in milk, lameness, and cases of sudden death. As standard control served the grass silage K01, whose feeding was not associated with a high incidence of disorders and whose percentage of true protein in the total crude protein was higher than 50 %.

Table 7.1: Contents of crude protein and true protein as well as percentages of true protein in the total crude protein in the tested suspected grass silages and the control grass silage K01

| Nutrient | Dimension | Grass silage | | | | | | | | | | |
|---------------|-----------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | K01 | S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| Crude protein | g/kg DM | 156 | 174 | 180 | 231 | 178 | 221 | 156 | 180 | 188 | 207 | 277 |
| True protein | g/kg DM | 83.3 | 71.0 | 78.9 | 97.0 | 75.9 | 132 | 61.0 | 60.1 | 74.8 | 70.6 | 162 |
| True protein | % of CP | 50.5 | 40.8 | 43.8 | 42.0 | 42.6 | 59.7 | 39.1 | 33.4 | 39.8 | 34.1 | 58.5 |

CP crude protein; DM dry mass; K control grass silage; S suspected grass silage

Each RUSITEC run started with an eight-day adaption and control phase during that 10.5 g dry matter of hay and 3.4 g of a concentrate (18 % crude protein) were added daily to the fermenters. Afterwards, silages (10.5 g dry matter/day) were supplemented over a period of ten days instead of hay (experimental phase). The amount of the daily added concentrate remained constant. The following run-out phase (ten days) during which the additions of feeds were conform with those of the adaption and control phase ended on day 28.

Samples of fermenter fluid were taken once a day before adding the feed and analyzed for the concentration of ammonia and the content of bacterial protein, as well as the concentrations of the free amino acids aspartate, glutamate, serine, histidine, glycine, threonine, alanine, arginine, tyrosine, valine, methionine, tryptophan, phenylalanine, isoleucine, and leucine. Total amino acid concentrations were calculated.

Under additions of the suspected grass silages ammonia concentrations reached 6.12 to 81.3 % higher values than under additions of the control (8.45 versus 9.06 mmol/L and 11.8

versus 12.7 mg/dL, respectively, to 10.5 versus 18.9 mmol/L and 14.7 versus 26.5 mg/dL, respectively). The average influence on contents of bacterial protein was of lesser extent (-17.9 to +16.7 %) despite of differing contents of crude protein in the suspected grass silages (see table 7.1: 156 to 277 g/kg dry matter). Also, total concentrations of the free amino acids showed minor deviations from the control under additions of most of the suspected grass silages (excluding S04, see table 7.2: -8.82 to +13.7 %).

Table 7.2: Changes [%] of ammonia concentration, content of bacterial protein and total concentration of free amino acids in the fermenter fluid under additions of the suspected grass silages compared to the control grass silage K01

| Parameter | Suspected grass silage | | | | | | | | | |
|------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| Ammonia concentration | +27.5 | +81.3 | +41.9 | +6.12 | +58.8 | +73.7 | +19.6 | +19.8 | +10.8 | +30.3 |
| Content of bacterial protein | -10.0 | +16.7 | +11.0 | +5.00 | +10.0 | +15.6 | +4.05 | -7.10 | -17.9 | -0.27 |
| Σ fAA concentration | +7.31 | +62.2 | +3.37 | +13.7 | +6.53 | -5.35 | -5.41 | -8.82 | -6.71 | +11.8 |

fAA free amino acids; S suspected grass silage

Accordingly, additions of the suspected grass silages improved substrate supply to amino acid fermenting bacteria and gave rise to increased degradation of N containing compounds as well as an increase of deaminating species. The consequently augmented N turnover and probably also disadvantaging of proteo- and peptidolytic bacteria decreased net protein synthesis of bacteria in RUSITEC fermenter fluid. This is expressed by predominantly decreased efficiencies of utilization of N by liquid associated bacteria when suspected grass silages in contrast to control grass silages were fermented (0.028 to 0.037 versus 0.022 to 0.030 g bacterial N/g of input of N). Discrepancies between the amounts of crude protein additions and N recovery in the RUSITEC (concerning the monitored parameters) probably also indicate accumulation of bacterially unused N containing compounds in ruminal fluid.

In contrast, a correlation between the percentage of true protein in the total crude protein in the suspected grass silages and the degree of modifications in ruminal protein metabolism in ruminal fluid could not be observed. It is to be assumed that further factors like the degradability of present N containing compounds as well as the total amount of crude protein supply in connection with energy available for bacteria influenced the protein metabolism in the RUSITEC.

It is considered possible, that the detected changes in protein metabolism in ruminal fluid due to grass silages with a low percentage of true protein in the total crude protein contribute to the aetiology of "Faktorenerkrankung Milchviehherde" or a higher incidence of production diseases in dairy cattle herds, respectively. Nevertheless, the observed effects on the monitored parameters are not severe enough to be judged as the only cause.

8 Schrifttumsverzeichnis

ABDELGADIR, I. E. O., J. L. MORRIL u. J. J. HIGGINS (1996):

Ruminal availabilities of protein and starch: effects on growth and ruminal and plasma metabolites of dairy calves.

J. Dairy Sci. 79, 283 - 290

ABOU AKKADA, A. R., u. T. H. BLACKBURN (1963):

Some observations on the nitrogen metabolism of rumen proteolytic bacteria.

J. Gen. Microbiol. 31, 461 - 469

AERTS, R. J., W. C. McNABB, A. MOLAN, A. BRAND, T. N. BARRY u. J. S. PETERS (1999):

Condensed tannins from *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus* exert different effects on the *in vitro* rumen degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) protein.

J. Sci. Food Agric. 79, 79 - 85

AHVENJARVI, S., A. VANHATALO, P. HUHTANEN u. A. N. HRISTOV (2007):

Ruminal metabolism of ¹⁵N labeled ammonium-N and grass silage soluble non-ammonia-N. in: Joint Annual Meeting, durchgeführt von der American Dairy Science Association und der American Society of Animal Science, 08.-12.07.2007 in San Antonio, TX

2007 Annual Meeting Abstracts, Abstr.-Nr. 349, J. Anim. Sci. 85, Suppl. 1, 232

[Internet: URL: <http://adsa.asas.org/meetings/2007/abstracts/0232.pdf>]

ALDRICH, J. M., L. D. MULLER, G. A. VARGA u. L. C. GRIEL, JR. (1993):

Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen fermentation, nutrient flow, and performance of dairy cows.

J. Dairy Sci. 76, 1091 - 1105

ALLISON, M. J. (1965):

Phenylalanine biosynthesis from phenylacetic acid by anaerobic bacteria from the rumen.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 30 - 35

ALLISON, M. J. (1978):

Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria.

Appl. Environ. Microbiol. 35, 872 - 877

ALLISON, M. J., u. M. P. BRYANT (1963):

Biosynthesis of branched-chain amino acids from branched-chain fatty acids by rumen bacteria.

Arch. Biochem. Biophys. 101, 269 - 277

ALLISON, M. J., u. J. L. PEEL (1971):

The biosynthesis of valine from isobutyrate by *Peptostreptococcus elsdenii* und *Bacteroides ruminicola*.

Biochem. J. 121, 431 - 437

- ALLISON, M. J., M. P. BRYANT u. R. N. DOETSCH (1962):
Studies on the metabolic function of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for ruminococci. Mitt. 1. Incorporation of isovalerate into leucine.
J. Bacteriol. 83, 523 - 532
- ALLISON, M. J., J. A. BUCKLIN u. I. M. ROBINSON (1966):
Importance of the isovalerate carboxylation pathway of leucine biosynthesis in the rumen.
Appl. Environ. Microbiol. 14, 807 - 814
- ALLISON, M. J., I. M. ROBINSON u. A. L. BAETZ (1974):
Tryptophan biosynthesis from indole-3-acetic acid by anaerobic bacteria from the rumen.
J. Bacteriol. 117, 175 - 180
- ALLISON, M. J., A. L. BAETZ u. J. WIEGEL (1984):
Alternative pathways for biosynthesis of leucine and other amino acids in *Bacteroides ruminicola* and *Bacteroides fragilis*.
Appl. Environ. Microbiol. 48, 1111 - 1117
- ALVING, K., R. KÖRNER, H. PAULSEN u. J. PETER-KATALINIC (1998):
Nanospray-ESI low-energy CID and MALDI Post-source decay for determination of O-glycosylation sites in MUC4 peptides.
J. Mass Spectrom. 33, 1124 - 1133
- AMIN, M. R., u. R. ONODERA (1997 a):
In vitro metabolism of phenylalanine by ruminal bacteria, protozoa, and their mixture.
J. Gen. Appl. Microbiol. 43, 1 - 7
- AMIN, M. R., u. R. ONODERA (1997 b):
Synthesis of phenylalanine and production of other related compounds from phenylpyruvic acid and phenylacetic acid by ruminal bacteria, protozoa, and their mixture *in vitro*.
J. Gen. Appl. Microbiol. 43, 9 - 15
- ARMSTEAD, I. P., u. J. R. LING (1993):
Variations in the uptake and metabolism of peptides and amino acids by mixed ruminal bacteria *in vitro*.
Appl. Environ. Microbiol. 59, 3360 - 3366
- ARRIGO, Y. (2006):
Einfluss der Konservierung auf den Aminosäuregehalt des Futters.
Agrarforschung 13, 272 - 277
- ASADA, Y., K. TANIZAWA, Y. KAWABATA, H. MISONO u. K. SODA (1981):
Purification and properties of meso- α,ϵ -diaminopimelate decarboxylase from *Bacillus sphaericus*.
Agric. Biol. Chem. 45, 1513 - 1514
- ASSOUMANI, M. B., F. VEDEAU, L. JAQUOT u. C. J. SNIFFEN (1992):
Refinement of an enzymatic method for estimating the theoretical degradability of proteins in feedstuffs for ruminants.
Anim. Feed Sci. Technol. 39, 357 - 368

ATASOGLU, C., C. VALDÉS, N. D. WALKER, C. J. NEWBOLD u. R. J. WALLACE (1998):

De novo synthesis of amino acids by the ruminal bacteria *Prevotella bryantii* B₁₄, *Selenomonas ruminantium* HD4 and *Streptococcus bovis* ES1.
Appl. Environ. Microbiol. 64, 2836 - 2843

ATASOGLU, C., C. VALDÉS, C. J. NEWBOLD u. R. J. WALLACE (1999):

Influence of peptides and amino acids on fermentation rate and *de novo* synthesis of amino acids by mixed micro-organisms from the sheep rumen.
Br. J. Nutr. 81, 307 - 314

ATASOGLU, C., C. J. NEWBOLD u. R. J. WALLACE (2001):

Incorporation of [¹⁵N]ammonia by the cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3 and *Ruminococcus flavefaciens* 17.
Appl. Environ. Microbiol. 67, 2819 - 2822

ATTWOOD, G. T., u. K. REILLY (1995):

Identification of proteolytic rumen bacteria isolated from New Zealand cattle.
J. Appl. Bacteriol. 79, 22 - 29

ATTWOOD, G. T., u. K. REILLY (1996):

Characterization of proteolytic activities of ruminal bacterial isolates from forage-fed cattle.
J. Appl. Bacteriol. 81, 545 - 552

ATTWOOD, G. T., K. REILLY u. B. K. C. PATEL (1996):

Clostridium proteoclasticum sp. nov., a novel proteolytic bacterium from the bovine rumen.
Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 753 - 758

ATTWOOD, G. T., A. V. KLIEVE, D. OUWERKERK u. B. K. C. PATEL (1998):

Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants.
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1796 - 1804

AUFRÈRE, J., D. GRAVIOU u. B. MICHALET-DOREAU (1994):

Degradation in the rumen of proteins of 2 legumes: soybean meal and field pea.
Reprod. Nutr. Dev. 34, 483 - 490

AUSTIN, P. J., L. A. SUCHAR, C. T. ROBBINS u. A. E. HAGERMAN (1989):

Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle.
J. Chem. Ecol. 15, 1335 - 1347

AVGUŠTIN, G., R. J. WALLACE u. H. J. FLINT (1997):

Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*.
Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 284 - 288

BACH, A., u. M. D. STERN (1999):

Effects of different levels of methionine and ruminally undegradable protein on the amino acid profile of effluent from continuous culture fermenters.
J. Anim. Sci. 77, 3377 - 3384

- BACH, A., S. CALSAMIGLIA u. M. D. STERN (2005):
Nitrogen metabolism in the rumen.
J. Dairy Sci. 88, Suppl., 9 - 21
- BAE, H. D., T. A. McALLISTER, J. YANKE, K.- J. CHENG u. A. D. MUIR (1993):
Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by
Fibrobacter succinogenes S85.
Appl. Environ. Microbiol. 59, 2132 - 2138
- BAFNA, V., u. N. EDWARDS (2003):
On *de novo* interpretation of tandem mass spectra for peptide identification.
in: 7th Annual conference on research in computational molecular biology, durchgeführt vom
Max Planck Institut für molekulare Genetik, 2003 in Berlin
Kongr.ber., S. 9 - 18
- BARNSTEIN, F. (1900):
Über eine Modifikation des von Ritthausen vorgeschlagenen Verfahrens zur
Eiweißbestimmung.
Landwirtsch. Versuchsstn. 54, 327 - 336
- BARRY, T. N., u. T. R. MANLEY (1984):
The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep.
Br. J. Nutr. 51, 493 - 504
- BARRY, T. N., u. T. R. MANLEY (1986):
Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin
and lignin in *Lotus* sp. and their possible consequences in ruminant nutrition.
J. Sci. Food Agric. 37, 248 - 254
- BARRY, T. N., u. W. C. McNABB (1999):
The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to
ruminants.
Br. J. Nutr. 87, 263 - 272
- BASSO, A. L., E. RICCA, C. CARUSO, L. FERRARA u. M. DE FELICE (1993):
Acetohydroxy acid synthase and threonine deaminase activities, and the biosynthesis of
isoleucine-leucine-valine in *Streptococcus bovis*.
Res. Microbiol. 144, 539 - 545
- BECK, B. J., u. J. B. RUSSELL (1994):
Electrogenic glutamine uptake by *Peptostreptococcus anaerobius* and generation of a
transmembrane potential.
J. Bacteriol. 176, 1303 - 1308
- BECKER, J. (1994):
Untersuchungen zum Einfluß eines Pansenstimulans auf ruminale Fermentationsvorgänge des
Rindes (*in vitro*).
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BEEVER, D. E. (1993):

Rumen function.

in: J. M. FORBES u. J. FRANCE (Hrsg.): Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.

Verlag CAB International, Wallingford, S. 187 - 215

BEEVER, D. E., u. B. R. COTTRILL (1994):

Symposium: Protein systems for feeding ruminant livestock: a European assessment.

J. Dairy Sci. 77, 2031 - 2043

BEHA, E. M., M. K. THEODOROU, B. J. THOMAS u. A. H. KINGSTON-SMITH (2002):

Grass cells ingested by ruminants undergo autolysis which differs from senescence:

implications for grass breeding targets and livestock production.

Plant Cell Environ. 25, 1299 - 1312

BENCHAAR, C., H. V. PETIT, R. BERTHIAUME, T. D. WHYTE u. P. Y. CHOUINARD (2006):

Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows.

J. Dairy Sci. 89, 4352 - 4364

BENCHAAR, C., H. V. PETIT, R. BERTHIAUME, D. R. QUELLET, J. CHIQUETTE u. P. Y. CHOUINARD (2007):

Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage.

J. Dairy Sci. 90, 886 - 897

BENCHAAR, C., S. CALSAMIGLIA, A. V. CHAVES, G. R. FRASER, D.

COLOMBATTO, T. A. McALLISTER u. K. A. BEAUCHEMIN (2008 a):

A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production.

Anim. Feed Sci. Technol. 145, 209 - 228

BENCHAAR, C., T. A. McALLISTOR u. P. Y. CHOUINARD (2008 b):

Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts.

J. Dairy Sci. 91, 4765 - 4777

BENSADOUN, A., u. D. WEINSTEIN (1976):

Assay of proteins in the presence of interfering materials.

Anal. Biochem. 70, 241 - 250

BHAT, T. K., B. SINGH u. O. P. SHARMA (1998):

Microbial degradation of tannins - A current perspective.

Biodegradation 9, 343 - 357

BLADEN, H. A., M. P. BRYANT u. R. N. DOETSCH (1961 a):

A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolyzate.

Appl. Microbiol. 9, 175 - 180

- BLADEN, H. A., M. P. BRYANT u. R. N. DOETSCH (1961 b):
Production of isovaleric acid from leucine by *Bacteroides ruminicola*.
J. Dairy Sci. 44, 173 - 174
- BOGUHN, J., H. KLUTH u. M. RODEHUTSCORD (2006 a):
Effect of total mixed ration composition on fermentation and efficiency of ruminal microbial crude protein synthesis *in vitro*.
J. Dairy Sci. 89, 1580 - 1591
- BOGUHN, J., H. KLUTH u. M. RODEHUTSCORD (2006 b):
Effect of total mixed ration composition on amino acid profiles of different fractions of ruminal microbes *in vitro*.
J. Dairy Sci. 89, 1592 - 1603
- BONHOMME, A. (1990):
Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts.
Anim. Feed Sci. Technol. 30, 203 - 266
- BRADFORD, M. M. (1976):
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248 - 254
- BRITO, A. F., G. A. BRODERICK u. S. M. REYNAL (2006):
Effect of varying dietary ratios of alfalfa silage to corn silage on omasal flow and microbial protein synthesis in dairy cows.
J. Dairy Sci. 89, 3939 - 3953
- BRITO, A. F., G. F TREMBLAY, H. LAPIERRE, A. BERTRAND, Y. CASTONGUAY, G. BÉLANGER, R. MICHAUD, C. BENCHAAAR, D. R. QUELLET u. R. BERTHIAUME (2009):
Alfalfa cut at sundown and harvested as baleage increases bacterial protein synthesis in late-lactation dairy cows.
J. Dairy Sci. 92, 1092 - 1107
- BRODERICK, G. A. (1995):
Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants.
J. Anim. Sci. 73, 2760 - 2773
- BRODERICK, G. A. (2006):
Improving nitrogen utilization in the rumen of the lactating dairy cow.
in: 17th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, durchgeführt vom Fachber. Tierwissensch. des Instituts für Lebensmittel- und Agrarwissensch. der Univ. Florida, 01.-02.02.2006 in Gainesville, FL
[Internet: URL: <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2006/Broderick.pdf>]
- BRODERICK, G. A., u. R. J. WALLACE (1988):
Effects of dietary nitrogen source on concentrations of ammonia, free amino acids and fluorescaminereactive peptides in the sheep rumen.
J. Anim. Sci. 66, 2233 - 2238

- BRODERICK, G. A., R. J. WALLACE u. N. McKAIN (1988):
Uptake of small neutral peptides by mixed rumen microorganisms *in vitro*.
J. Sci. Food Agric. 42, 109 - 118
- BRODERICK, G. A., R. J. WALLACE u. E. R. ØRSKOV (1991):
Control of rate and extent of protein degradation.
in: T. TSUDA, Y. SASAKI u. R. KAWASHIMA (Hrsg.): Physiological aspects of digestion
and metabolism in ruminants: proceedings of the seventh international symposium on
ruminant physiology.
Verlag Academic Press, San Diego, New York, S. 541 - 592
- BRODERICK G. A., M. L. MURPHY u. P. UDÉN, P. (2004):
Effect of inhibitor concentration and end-product accumulation on estimates of ruminal *in vitro* protein degradation.
J. Dairy Sci. 87, 1360 - 1371
- BRÖCKER, R. (1996):
Auswirkungen von Selenzulagen auf Fermentationsvorgänge im Pansensaft des Rindes (*in vitro*).
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- BROOKER, J. D., L. A. O'DONOVAN, I. SKENE, K. CLARKE, L. BLACKALL, P. MUSLERA (1994):
Streptococcus caprinus sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats.
Lett. Appl. Microbiol. 18, 313 - 318
- BROWN, C. M., u. S. O. STANLEY (1972):
Environment-mediated changes in the cellular content of the "pool" constituents and their associated changes in cell physiology.
J. Appl. Chem. Biotechnol. 22, 363 - 389
- BRYANT, M. P., u. I. M. ROBINSON (1962):
Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria.
J. Bacteriol. 84, 605 - 614
- BUSQUET, M., S. CALSAMIGLIA, A. FERRET, P. W. CARDOZO u. C. KAMEL (2005):
Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on ruminal microbial fermentation in a dual flow continuous culture.
J. Dairy Sci. 88, 2508 - 2516
- BUSQUET, M., S. CALSAMIGLIA, A. FERRET u. C. KAMEL (2006):
Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation.
J. Dairy Sci. 89, 61 - 771
- CABRAS, T., E. PISANO, A. MASTINU, G. DENOTTI, P. P. PUSCEDDU, R. INZITARI, C. FANALI, S. NEMOLATO, M. CASTAGNOLA u. I. MESSANA (2010):
Alterations of the salivary secretory peptidome profile in children affected by type 1 diabetes.
Mol. Cell. Proteomics 9, 2099 - 2108

- CABRITA, A. R. J., A. J. M. FONSECA, R. J. DEWURST, C. V. P. SAMPAIO, M. F. S. MIRANDA, G. N. S. SOUSA, I. M. F. MIRANDA u. E. GOMES (2003):
Nitrogen supplementation of corn silages. Mitt. 1. Effects on feed intake and milk production of dairy cows.
J. Dairy Sci. 86, 4008 - 4019
- CALSAMIGLIA, S., M. BUSQUET, P. W. CARDOZO, L. CASTILLEJOS u. A. FERRET (2007):
Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation.
J. Dairy Sci. 90, 2580 - 2595
- CAO, Z. J., S. L. LI, Y. J. WANG, M. MA u. P. CHEN (2007):
Effect of acetylated soyabean peptides on rumen fermentation and nitrogen metabolism in sheep.
J. Anim. Feed Sci. 16, Suppl. 2, 161 - 165
- CARDOZO, P. W., S. CALSAMIGLIA, A. FERRET u. C. KAMEL (2004):
Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture.
J. Anim. Sci. 82, 3230 - 3236
- CARDOZO, P. W., S. CALSAMIGLIA, A. FERRET u. C. KAMEL (2005):
Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* ruminal microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle.
J. Anim. Sci. 83, 2572 - 2579
- CARDOZO, P. W., S. CALSAMIGLIA, A. FERRET u. C. KAMEL, C. (2006):
Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet.
J. Anim. Sci. 84, 2801 - 2808
- CARRO, M. D., u. E. L. MILLER (1999):
Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semi-continuous culture system (RUSITEC).
Br. J. Nutr. 82, 149 - 157
- CASPAR, D. P., H. A. MAIGA, M. J. BROUK u. D. J. SCHINGOETHE (1999):
Synchronization of carbohydrate and protein sources on fermentation and passage rates in dairy cows.
J. Dairy Sci. 82, 1779 - 1790
- CASTILLEJOS, L., S. CALSMIGLIA u. A. FERRET (2006):
Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems.
J. Dairy Sci. 89, 2649 - 2658
- CHALUPA, W., u. C. J. SNIFFEN (1996):
Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle - today and tomorrow.
Anim. Feed Sci. Technol. 58, 65 - 75

- CHAMBERLAIN, D. G., P. C. THOMAS u. J. QUIG (1986):
Utilization of silage nitrogen in sheep and cows: amino acid composition of duodenal digesta and rumen microbes.
Grass Forage Sci. 41, 31 - 38
- CHANG, A., M. SCHEER, A. GROTE, I. SCHOMBURG u. D. SCHOMBURG (2009)
BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009.
Nucleic Acids Res. 37, Database issue, 588 - 592
- CHEN, G., u. J. B. RUSSELL (1988):
Fermentation of peptides and amino acids by a monensin-sensitive ruminal *Peptostreptococcus*.
Appl. Environ. Microbiol. 54, 2742 - 2749
- CHEN, G., u. J. B. RUSSELL (1989 a):
More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen.
Appl. Environ. Microbiol. 55, 1052 - 1057
- CHEN, G., u. J. B. RUSSELL (1989 b):
Sodium-dependent transport of branched-chain amino acids by a monensin-sensitive ruminal *Peptostreptococcus*.
Appl. Environ. Microbiol. 55, 2658 - 2663
- CHEN, G., u. J. B. RUSSELL (1989 c):
Transport of glutamine by *Streptococcus bovis* and conversion of glutamine to pyroglutamic acid and ammonia.
J. Bacteriol. 171, 2981 - 2985
- CHEN, G., u. J. B. RUSSELL (1990):
Transport and deamination of amino acids by a gram-positive, monensin-sensitive ruminal bacterium.
Appl. Environ. Microbiol. 56, 2186 - 2192
- CHEN, G., u. J. B. RUSSELL (1991):
Effect of monensin and a protonophore on protein degradation, peptide accumulation, and deamination by mixed ruminal microorganisms *in vitro*.
J. Anim. Sci. 69, 2196 - 2203
- CHEN, G., C. J. SNIFFEN u. J. B. RUSSELL (1987 a):
Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: effects of protein quantity, protein solubility and feeding frequency.
J. Dairy Sci. 70, 983 - 992
- CHEN, G., J. B. RUSSELL u. C. J. SNIFFEN (1987 b):
A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate-limiting step in ruminal protein degradation.
J. Dairy Sci. 70, 1211 - 1219
- CHEN, G., H. J. STROBEL, J. B. RUSSELL u. C. J. SNIFFEN (1987 c):
Effect of hydrophobicity on utilization of peptides by ruminal bacteria *in vitro*.
Appl. Environ. Microbiol. 53, 2021 - 2025

- CHEN, X. L., J. K. WANG, Y. M. WU u. J. X. LIU (2007):
Effect of form of nitrogen on populations of fibre-associated ruminal microbes in pre-treated rice straw *in vitro*.
J. Anim. Feed Sci. 16, Suppl. 2, 95 - 100
- CHENG, Y., J. CHEN u. Y. L. XIONG (2010):
Chromatographic separation and tandem MS identification of active peptides in potato protein hydrolysate that inhibit autoxidation of soybean oil-in-water emulsions.
J. Agric. Food Chem. 58, 8825 - 8832
- CHIKUNYA, S., C. J. NEWBOLD, L. RODE, X. B. CHEN u. R. J. WALLACE (1996):
Influence of dietary rumen-degradable protein on bacterial growth in the rumen of sheep receiving different energy sources.
Anim. Feed Sci. Technol. 63, 333 - 340
- CHOI, C. W. (2002):
Assessment of the flow of soluble dietary non-ammonia nitrogen escaping degradation in the rumen of dairy cows fed grass silage based diets.
Helsinki, Univ., Land- und forstwissenschaftl. Fak., Diss.
- CHUNG, Y. W., H. G. BATEMAN, C. C. WILLIAMS, C. C. STANLEY, D. T. GANTT, T. W. BRAUD, L. L. SOUTHERN, J. D. WARD, P. G. HOYT u. G. A. SOD (2006):
Effects of methionine and lysine on fermentation *in vitro* and *in vivo*, nutrient flow to the intestine, and milk production.
J. Dairy Sci. 89, 1613 - 1620
- CLARK, V. L., D. E. PETERSON u. R. W. BERNLOHR (1972):
Changes in free amino acid production and intracellular amino acid pools of *Bacillus licheniformis* as a function of culture age and growth media.
J. Bacteriol. 112, 715 - 725
- CLARK, J. H., T. H. KLUSMEYER u. M. R. CAMERON (1992):
Symposium: Nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle.
Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows.
J. Dairy Sci. 75, 2304 - 2323
- COENEN, M. (2004)
Rohprotein und Reineiweiß.
in: Grassilage in der Milchviehfütterung. Haben wir die richtigen Bewertungsmaßstäbe?
Fortbildungsveranstaltung, durchgeführt vom Institut für Tierernährung und der Klinik für Rinderkrankheiten der Tierärztl. Hochsch. Hannover und der DVG Fachgruppe Rinderkrankheiten und der Degussa AG, 27.02.2004 in Hannover
Kongr.-Ber., S. 48 - 55
- COLOMBATTO, D., G. HERVÁS, W. Z. YANG u. K. A. BEAUCHEMIN (2003):
Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH.
J. Anim. Sci. 81, 2617 - 2627

- COTTA, M. A., u. R. B. HESPELL (1986):
Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*.
Appl. Environ. Microbiol. 52, 51 - 58
- COTTA, M. A., u. J. B. RUSSELL (1982):
Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture.
J. Dairy Sci. 65, 226 - 234
- COTTLE, D. J., u. W. VELLE (1988):
Degradation and outflow of amino acids from the rumen of sheep.
Br. J. Nutr. 61, 397 - 408
- COZZI, G., I. ANDRIGHETTO, P. BERZAGHI u. C. E. POLAN (1995):
In situ ruminal disappearance of essential amino acids in protein feedstuffs.
J. Dairy Sci. 78, 161 - 171
- CROOKER, B. A., J. H. CLARK, R. D. SHANKS u. E. E. HATFIELD (1986):
Effects of ruminal exposure on the amino acid profile of heated and formaldehyd-treated soybean meal.
J. Dairy Sci. 69, 2648 - 2657
- CRUZ SOTO, R., S. A. MUHAMMED, C. J. NEWBOLD, C. S. STEWARD u. R. J. WALLACE (1994):
Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria *in vitro*.
Anim. Feed Sci. Technol. 49, 151 - 161
- CZERKAWSKI, J. W. (1979):
Compartmentation in the rumen.
Annual Report of the Hannah Research Institute 1979, 69 - 85
- CZERKAWSKI, J. W. (1984):
Microbial fermentation in the rumen.
Proc. Nutr. Soc. 43, 101 - 118
- CZERKAWSKI, J. W., u. G. BRECKENRIDGE (1977):
Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC).
Br. J. Nutr. 38, 371 - 384
- CZERKAWSKI, J. W., u. G. BRECKENRIDGE (1982):
Distribution and changes in urease (*EC* 3.5.1.5) activity in rumen simulation technique (RUSITEC).
Br. J. Nutr. 47, 331 - 348
- CZERKAWSKI, J. W., u. G. BRECKENRIDGE (1985):
Metabolism of protein supplements studied by the rumen simulation technique (RUSITEC).
Arch. Anim. Nutr. 35, 261 - 277

- DEBROAS, D., u. G. BLANCHART (1993):
Interactions between proteolytic and cellulolytic rumen bacteria during hydrolysis of plant cell wall protein.
Reprod. Nutr. Dev. 33, 283 - 288
- DEHARENG, D., u. J.-M. GODEAU (1988):
Incidence of liquid volume variations on endogenous and exogenous ammonia concentration in the rumen liquor of a mature dry cow.
Arch. Anim. Nutr. 38, 767 - 774
- DEHORITY, B. A., R. R. JOHNSON, O. G. BENTLEY u. A. L. MOXON (1958):
Studies on the metabolism of valine, proline, leucine and isoleucine by rumen microorganisms *in vitro*.
Arch. Biochem. Biophys. 78, 15 - 27
- DE JONGE, L. H., W. SPEK, H. VAN LAAR u. J. DIJKSTRA (2009):
The effect of pH and osmolarity on the level and composition of soluble N in untreated legumes for ruminants.
in: Y. CILLIARD, F. GLASSER, Y. FAULCONNIER, F. BOCQUIER, I. VEISSIER u. M. DOREAU (Hrsg.): Ruminant physiology: digestion, metabolism and effects of nutrition on reproduction and welfare.
Verlag Wageningen Academic Publishers, Wageningen, S. 152-153
- DEPARDON, N., D. DEBROAS u. G. BLANCHART (1996):
Breakdown of peptides from a casein hydrolysate by rumen bacteria. Simultaneous study of enzyme activities and physicochemical parameters.
Reprod. Nutr. Dev. 36, 457 - 466
- DEPARDON, N., D. DEBROAS u. G. BLANCHART (1998):
In vitro study of molecular weight, hydrophobicity and amino acid composition of peptides during breakdown of a casein hydrolysate by two strains of *Prevotella ruminicola*.
Reprod. Nutr. Dev. 38, 567 - 576
- DESAI, M. J., u. D. W. ARMSTRONG (2004):
Analysis of native amino acid and peptide enantiomers by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.
J. Mass Spectrom. 39, 177 - 187
- DE VETH, M. J., u. E. S. KOLVER (2001):
Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture.
J. Dairy Sci. 84, 2066 - 2072
- DUNCAN, P. A., B. A. WHITE u. R. I. MAKIE (1992):
Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1.
Appl. Environ. Microbiol. 58, 4032 - 4037
- EICKEN, K. (2005 a):
Mögliche gesundheitliche Probleme von Milchkühen bei Grassilage-betonten Rationen.
Nutztierpraxis Aktuell 13, 13 - 16

EICKEN, K. (2005 b):

Erfahrungen aus der tierärztlichen Praxis bei Umsetzung bestimmter, gezielter Fütterungsempfehlungen.

Nutztierpraxis Aktuell 14; 56 - 60

EINSPANIER, R., B. LUTZ, S. RIEF, O. BEREZINA, V. ZVERLOV, W. SCHWARZ u. J. MAYER (2004):

Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize.

Eur. Food Res. Technol. 218, 269 - 273

ELIAS, K. (1999):

Ruminale Fermentation unter chronisch-azidotischen Bedingungen (*in-vitro*) bei unterschiedlicher Vitamin B₁-Verfügbarkeit.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

EL-SHAZLY, K. (1952):

Degradation of protein in the rumen of the sheep. Mitt. 1. Some volatile fatty acids, including branched-chain isomers found *in vivo*. Mitt. 2. The action of rumen micro-organisms on amino-acids.

Biochem. J. 51, 640 - 647; 647 - 653

EL-WAZIRY, A. M., u. R. ONODERA (1996):

In vitro metabolism of the stereoisomers of 2,6-diaminopimelic acid by mixed rumen protozoa and bacteria.

Curr. Microbiol. 33, 306 - 311

ERASMUS, L. J. (1991):

The importance of duodenal amino acid profiles for dairy cows and significance of changes in these profiles following the use of Yea-Sacc¹⁰²⁶.

in: Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's seventh annual symposium. Verlag Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY, S. 193 - 203

ERASMUS, L. J., P. M. BOTHA, C. W. CRUYWAGEN u. H. H. MEISSNER (1994 a):

Amino acid profile and intestinal digestibility in dairy cows of rumen-undegradable protein from various feedstuffs.

J. Dairy Sci. 77, 541 - 551

ERASMUS, L. J., P. M. BOTHA u. H. H. MEISSNER (1994 b):

Effect of protein source on ruminal fermentation and passage of amino acids to the small intestine of lactating cows.

J. Dairy Sci. 77, 3655 - 3665

ESCHENLAUER, S. C. P., N. MCKAIN, N. D. WALKER, N. R. McEWAN, C. J. NEWBOLD u. R. J. WALLACE (2002):

Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen.

Appl. Environ. Microbiol. 68, 4925 - 4931

- EVANS, C. S., J. CLARDY, P. F. HUGHEST u. E. A. BELL (1985):
2-Amino-4-acetylaminobutyric acid, 2,4-diaminobutyric acid and 2-amino-6N-oxalylureidopropionic acid (oxalylbizzine) in seeds of *Acacia angustissima*.
Phytochemistry 24, 2273 - 2275
- FALCONER, M. L., u. R. J. WALLACE (1998):
Variation in proteinase activities in the rumen.
J. Appl. Microbiol. 84, 377 - 382
- FARMER, C. G., R. C. COCHRAN, T. G. NAGARAJA, E. C. TITGEMEYER, D. E. JOHNSON u. T. A. WICKERSHAM (2004):
Ruminal and host adaptations to changes in frequency of protein supplementation.
J. Anim. Sci. 82, 895 - 903
- FILIGENZI, M. S., L. W. WOODS, M. C. BOOTH, E. R. TOR u. B. PUSCHNER (2004):
Determination of strophanthidin in ingesta and plant material by LC-MS/MS.
J. Agric. Food Chem. 52, 2174 - 2178
- FIRKINS, J. L. (1996):
Maximizing microbial protein synthesis in the rumen.
J. Nutr. 126, Suppl., 1347 - 1354
- FIRKINS, J. L., L. L. BERGER, N. R. MERCHEN, G. C. FAHER JR. u. R. L. MULVANEY (1987):
Ruminal nitrogen metabolism in steers as affected by feed intake and dietary urea concentration.
J. Dairy Sci. 70, 2302 - 2311
- FIRKINS, J. L., A. N. HRISTOV, M. B. HALL, G. A. VARGA u. N. R. ST-PIERRE (2006):
Integration of ruminal metabolism in dairy cattle.
J. Dairy Sci. 89, Suppl., 31 - 51
- FIRKINS, J. L., Z. YU u. M. MORRISON (2007):
Ruminal nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy.
J. Dairy Sci. 90, Suppl., 1 - 16
- FOETTINGER, A., A. LEITNER u. W. LINDNER (2006):
Derivatisation of arginine residues with malondialdehyde for the analysis of peptides and protein digests by LC-ESI-MS/MS.
J. Mass Spectrom. 41, 623 - 632
- FOO, L. Y., W. T. JONES, L. J. PORTER u. V. M. WILLIAMS (1982):
Proanthocyanidin polymers of fodder legumes.
Phytochemistry 21, 933 - 935
- FOO, L. Y., R. NEWMAN, G. WAGHORN, W. C. McNABB u. M. J. ULYATT (1996):
Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*.
Phytochemistry 41, 617 - 624

- FOO, L. Y., Y. LU, W. C. McNABB, G. WAGHORN u. M. J. ULYATT (1997):
Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*.
Phytochemistry 45, 1689 - 1696
- FRASER, G. R., A. V. CHAVES, Y. WANG, T. A. McALLISTER, K. A. BEAUCHEMIN u. C. BENCHAAAR (2007):
Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems.
J. Dairy Sci. 90, 2315 - 2328
- FU, C. J., E. E. D. FELTON, J. W. LEHMKUHLER u. M. S. KERLEY (2001):
Ruminal peptide concentration required to optimize microbial growth and efficiency.
J. Anim. Sci. 79, 1305 - 1312
- FUJIMAKI, T., Y. KOBAYASHI, M. WAKITA u. S. HOSHINO (1992):
Amino acid supplements: a least combination that increases microbial yields of washed cell suspension from goat rumen.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 67, 41 - 50
- GARNER, M. R., J. F. FLINT u. J. B. RUSSELL (2002):
Allisonella histaminiformans gen. nov., sp. nov..
A novel bacterium that produces histamine, utilizes histidine as its sole energy source, and could play a role in bovine and equine laminitis.
System. Appl. Microbiol. 25, 498 - 506
- GARNER, M. R., M. R. GRONQUIST u. J. B. RUSSELL (2004):
Nutritional requirements of *Allisonella histaminiformans*, a ruminal bacterium that decarboxylates histidine and produces histamine.
Curr. Microbiol. 49, 295 - 299
- GASKELL, S. J. (1997):
Electrospray: principles and practice.
J. Mass Spectrom. 32, 677 - 688
- GAST, A. (2010):
Untersuchungen zum Einfluss von Grassilagen mit auffälligen Reineiweißgehalten auf die Zahl der Bakterien und der Protozoen im Pansen (in vitro).
Hannover, Stiftung Tierärztl. Hochsch., Diss.
- GOEL, G., H. P. S. MAKKAR u. K. BECKER (2008):
Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials.
J. Appl. Microbiol. 105, 770 - 777
- GONZÁLEZ, J., J. M. ARROYO, M. QUARTI u. C. CENTENO (2009):
Efficacy of the combined use of acids and heat to protect protein from sunflower meal against rumen degradation: 2. Feed amino acid supply.
in: Y. CILLIARD, F. GLASSER, Y. FAULCONNIER, F. BOCQUIER, I. VEISSIER u. M. DOREAU (Hrsg.): Ruminant physiology: digestion, metabolism and effects of nutrition on reproduction and welfare.
Verlag Wageningen Academic Publishers, Wageningen, S. 188-189

- GREENBERG, N. A., u. W. F. SHIPE (1979):
Comparison of the abilities of trichloroacetic, picric, sulfosalicylic, and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins.
J. Food Sci. 44, 735 - 737
- GRISWOLD, K. E., u. R. I. MACKIE (1997):
Degradation of protein and utilization of the hydrolytic products by a predominant ruminal bacterium, *Prevotella ruminicola* B₁₄.
J. Dairy Sci. 80, 167 - 175
- GRISWOLD, K. E., W. H. HOOVER, T. K. MILLER u. W. V. THAYNE (1996):
Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture.
J. Anim. Sci. 74, 483 - 491
- GROPENGIESSER, J., B. T. VARADARAJAN, H. STEPHANOWITZ u. E. KRAUSE (2009):
The relative influence of phosphorylation and methylation on responsiveness of peptides to MALDI und ESI mass spectrometry.
J. Mass Spectrom. 44, 821 - 831
- GUZZETTA, A. (2007):
Reverse phase HPLC basics for LC/MS.
[Internet: URL: <http://ionsource.com/tutorial/chromatography/rphplc.htm>]
- HANLEY, T. A., C. T. ROBBINS, A. E. HAGERMAN u. C. McARTHUR (1992):
Predicting digestible protein and digestible dry matter in tannin-containing forages consumed by ruminants.
Ecology 73, 537 - 541
- HARSTAD, O. M., u. E. PRESTLØKKEN (2001):
Rumen degradability and intestinal indigestibility of individual amino acids in corn gluten meal, canola meal and fish meal determined *in situ*.
Anim. Feed Sci. Technol. 94, 127 - 135
- HEADON, D. R. (1992):
From rain forests to deserts: new natural components with far reaching effects from estrus synchronization to pollution control.
in: Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's eighth annual symposium. Verlag Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY, S. 273 - 292
- HEDQVIST, H., I. MUELLER-HARVEY, J. D. REED, C. G. KRUEGER u. M. MURPHY (2000):
Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties.
Anim. Feed Sci. Technol. 87, 41 - 56
- HELANDER, I. M., H.-L. ALAKOMI, K. LATVA-KALA, T. MATTILA-SANDHOLM, I. POL, E. J. SMID, L. G. M. GORRIS u. A. VON WRIGHT (1998):
Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria.
J. Agric. Food Chem. 46, 3590 - 3595

- HENNING, P. H., D. G. STEYN u. H. H. MEISSNER (1993):
Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth.
J. Anim. Sci. 71, 2516 - 2528
- HENNING, S., J. PETER-KATALINIĆ u. G. POHLENTZ (2007):
Structure elucidation of glycoproteins by direct nanoESI MS and MS/MS analysis of proteolytic glycopeptides.
J. Mass Spectrom. 42, 1415 - 1421
- HERON, S. J. E., R. A. EDWARDS u. P. McDONALD (1986):
Changes in the nitrogenous components of gamma-irradiated and inoculated ensiled ryegrass.
J. Sci. Food Agric. 37, 979 - 985
- HERRERA-SALDANA, R., u. J. T. HUBER (1989):
Influence of varying protein and starch degradabilities on performance of lactating cows.
J. Dairy Sci. 72, 1477 - 1483
- HERRERA-SALDANA, R., R. GOMEZ-ALARCON, M. TORABI u. J. T. HUBER (1990):
Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis.
J. Dairy Sci. 73, 142 - 148
- HESS, H. D., L. M. MONSALVE, C. E. LASCANO, J. E. CARULLA, T. E. DÍAZ u. M. KREUZER (2003):
Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis.
Aust. J. Agric. Res. 54, 703 - 713
- HESS, H. D., R. A. BEURET, M. LÖTSCHER, I. K. HINDRICHSEN, A. MACHMÜLLER, J. E. CARULLA, C. E. LASCANO u. M. KREUZER (2004):
Ruminal fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage.
Anim. Sci. 79, 177 - 189
- HÖHLING, A. (2000):
Auswirkungen von verschimmeltem Futter, chronischer Pansenazidose sowie Schwefel-Zulagen auf die Protozoenpopulation im Pansen (*in vitro*).
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- HÖLTERSHINKEN, M. (1990):
In-vitro-Untersuchungen über die Wirkungen von Baquiloprim/Sulfadimidin auf die Fermentationsvorgänge im Pansensaft des Rindes.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- HÖLTERSHINKEN, M., u. H. SCHOLZ (1990):
Analytik von N-Verbindungen im bovinen Pansensaft mit Hilfe der HPLC.
in: 2. Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin u. Labordiagnostik" in der DVG, 1990 in München (unveröffentlicht)

- HOLSTEGE, D. M., B. PUSCHNER u. T. LE (2001):
Determination of grayanotoxins in biological samples by LC-MS/MS.
J. Agric. Food Chem. 49, 1648 - 1651
- HOOVER, W. H., u. S. R. STOKES (1991):
Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield.
J. Dairy Sci. 74, 3630 - 3644
- HRISTOV, A. N., u. G. A. BRODERICK (1996):
Synthesis of microbial protein in ruminally cannulated cows fed alfalfa silage, alfalfa hay, or corn silage.
J. Dairy Sci. 79, 1627 - 1637
- HRISTOV, A. N., u. J. K. ROPP (2003):
Effect of dietary carbohydrate composition and availability on utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows.
J. Dairy Sci. 86, 2416 - 2427
- HRISTOV, A. N., T. A. McALLISTER, F. H. VAN HERK, K.-J. CHENG, C. J. NEWBOLD u. P. R. CHEEKE (1999):
Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers.
J. Anim. Sci. 77, 2554 - 2563
- HRISTOV, A. N., M. IVAN, L. NEILL u. T. A. McALLISTER (2003):
Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity *in vitro*.
Anim. Feed Sci. Technol. 105, 163 - 184
- HRISTOV, A. N., R. P. ETTER, J. K. ROPP u. K. L. GRANDEEN (2004):
Effect of dietary crude protein level and degradability on ruminal fermentation and nitrogen utilization in lactating dairy cows.
J. Anim. Sci. 82, 3219 - 3229
- HRISTOV, A. N., J. K. ROPP, K. L. GRANDEEN, S. ABEDI, R. P. ETTER, A. MELGAR u. A. E. FOLEY (2005):
Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows.
J. Anim. Sci. 83, 408 - 421
- HUA, S.-S. T., V. Y. TSAI, G. M. LICHENS u. A. T. NOMA (1982):
Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. Strain WR1001 in response to sodium chloride salinity.
Appl. Environ. Microbiol. 44, 135 - 140
- HUBER, J. T., u. R. HERRERA-SALDANA (1994):
Synchrony of protein and energy supply to enhance fermentation.
in: J. M. ASPLUND (Hrsg.): Principles of protein nutrition of ruminants.
Verlag CRC Press, Boca Raton, FL, S. 113 - 126
- HUNGATE, R. E. (1966):
The rumen and its microbes.
Verlag Academic Press, New York

- HUSSEIN, H. S., N. R. MERCHEN u. G. C. FAHEY JR. (1995):
Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary forage level and fat supplementation.
J. Anim. Sci. 73, 2469 - 2473
- HUSSEIN, H. S., N. R. MERCHEN u. G. C. FAHEY JR. (1996):
Effects of forage percentage and canola seed on ruminal protein metabolism and duodenal flows of amino acids in steers.
J. Dairy Sci. 79, 98 - 104
- JAURENA, G., J. M. MOORBY u. D. R. DAVIES (2005):
Efficiency of microbial protein synthesis on red clover and ryegrass silages supplemented with barley by rumen simulation technique (RUSITEC).
Anim. Feed Sci. Technol. 118, 79 - 91
- JONES, W. T., u. J. L. MANGAN (1977):
Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH.
J. Sci. Food Agric. 28, 126 - 136
- JONES, G. A., T. A. McALLISTER, A. D. MUIR u. K.-J. CHENG (1994):
Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria.
Appl. Environ. Microbiol. 60, 1374 - 1378
- JONES, D. F., W. H. HOOVER u. T. K. MILLER WEBSTER (1998):
Effects of concentrations of peptides on microbial metabolism in continuous culture.
J. Anim. Sci. 76, 611 - 616
- JOUANY, J.-P. (1996):
Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants.
J. Nutr. 126, Suppl., 1335 - 1346
- KAJIKAWA, H., M. MITSUMORI u. S. OHMOMO (2002):
Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria.
J. Dairy Sci. 85, 2015 - 2022
- KAJIKAWA, H., M. MITSUMORI, K. TAJIMA u. M. KURIHARA (2005):
Short communication: Amino acids antagonistic to the amino acids inhibitory for growth rate of mixed ruminal bacteria.
J. Dairy Sci. 88, 2601 - 2603
- KAMANDE, G. M., J. BAAH, K.-J. CHENG, T. A. McALLISTER u. J. A. SHELFORD (2000):
Effects of Tween 60 and Tween 80 on protease activity, thiol group reactivity, protein adsorption, and cellulose degradation by rumen microbial enzymes.
J. Dairy Sci. 83, 536 - 542

- KAMPHUES, J., M. COENEN, C. IBEN, E. KIENZLE, J. PALLAUF, O. SIMON, M. WANNER u. J. ZENTEK (Hrsg.; 2009):
Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung.
11. Aufl., Verlag M.&H. Schaper, Hannover
- KARNATI, S. K. R., J. T. SYLVESTER, S. M. NOFTSGER, Z. YU, N. R. ST-PIERRE u. J. L. FIRKINS (2007):
Assessment of ruminal bacterial populations and protozoal generation time in cows fed different methionine sources.
J. Dairy Sci. 90, 798 - 809
- KHANBABAEI, K., u. T. VAN REE (2001):
Tannins: classification and definition.
Nat. Prod. Rep. 18, 641 - 649
- KHORASANI, G. R., G. DE BOER, B. ROBINSON u. J. J. KENNELLY (1994):
Influence of dietary protein and starch on production and metabolic responses of dairy cows.
J. Dairy Sci. 77, 813 - 824
- KIM, K. H., Y.-G. OH, J.-J. CHOUNG u. D. G. CHAMBERLAIN (1999):
Effects of varying degrees of synchrony of energy and nitrogen release in the rumen on the synthesis of microbial protein in cattle consuming grass silage.
J. Sci. Food Agric. 79, 833 - 838
- KINGSTON-SMITH, A. H., u. M. K. THEODOROU (2000):
Post-ingestion metabolism of fresh forage.
New Phytol. 148, 37 - 55
- KINGSTON-SMITH, A. H., A. L. BOLLARD, M. O. HUMPHREYS u. M. K. THEODOROU (2002):
An assessment of the ability of the stay-green phenotype in *Lolium* species to provide an improved protein supply for ruminants.
Ann. Bot. 89, 731 - 740
- KINGSTON-SMITH, A. H., A. L. BOLLARD, I. P. ARMSTEAD, B. J. THOMAS u. M. K. THEODOROU (2003):
Proteolysis and cell death in clover leaves is induced by grazing.
Protoplasma 220, 119 - 129
- KINGSTON-SMITH, A. H., R. J. MERRY, D. K. LEEMANS, H. THOMAS u. M. K. THEODOROU (2005):
Evidence in support of a role for plant-mediated proteolysis in the rumens of grazing animals.
Br. J. Nutr. 93, 73 - 79
- KLEINER, D. (1985):
Bacterial ammonium transport.
FEMS Microbiol. Rev. 32, 87 - 100

- KOCHERGINSKAYA, S. A., R. I. AMINOV u. B. A. WHITE (2001):
Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches.
Anaerobe 7, 119 - 134
- KODAMA, K. (1923):
Studies on the interaction between heavy metal salt and protein.
J. Biochem. 2, 505 - 524
- KOENIG, K. M., L. M. RODE, C. D. KNIGHT u. P. R. McCULLOUGH (1999):
Ruminal escape, gastrointestinal absorption, and response of serum methionine to supplementation of liquid methionine hydroxy analog in dairy cows.
J. Dairy Sci. 82, 355 - 361
- KOENIG, K. M., C. J. NEWBOLD, F. M. McINTOSH u. L. M. RODE (2000):
Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen.
J. Anim. Sci. 78, 2431 - 2445
- KOENIG, K. M., L. M. RODE, C. D. KNIGHT u. M. VÁZQUEZ-AÑÓN (2002):
Rumen degradation and availability of various amounts of liquid methionine hydroxy analog in lactating dairy cows.
J. Dairy Sci. 85, 930 - 938
- KOHN, R. A., u. M. S. ALLEN (1995):
In vitro protein degradation of feeds using concentrated enzymes extracted from rumen contents.
Anim. Feed Sci. Technol. 52, 15 - 28
- KOIKE, S., J. PAN, Y. KOBAYASHI u. K. TANAKA (2003):
Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR.
J. Dairy Sci. 86, 1429 - 1435
- KOPEČNÝ, J., M. ZOREC, J. MRÁZEK, Y. KOBAYASHI, R. MARINŠEK-LOGAR (2003):
Butyrivibrio hungatei sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 201 - 209
- KORHONEN, M., A. VANHATALO, T. VARVIKKO u. P. HUHTANEN (2000):
Responses to graded postruminal doses of histidine in dairy cows fed grass silage diets.
J. Dairy Sci. 83, 2596 - 2608
- KORHONEN M., S. AHVENJÄRVI, A. VANHATALO u. P. HUHTANEN (2002)
Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage. Mitt. 2. Amino acid profile of microbial fractions.
J. Anim. Sci. 80, 2188 - 2196

- KRAKOW, L. (1992):
Untersuchungen (RUSITEC-System) zum Einfluss von Magnesiumoxid auf
Fermentationsvorgänge im Panseninhalt des Rindes.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- KRAUSE, D. O., u. J. B. RUSSELL (1996 a):
An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in
ruminal amino acid deamination.
Appl. Environ. Microbiol. 62, 815 - 821
- KRAUSE, D. O., u. J. B. RUSSELL (1996 b):
How many ruminal bacteria are there?
J. Dairy Sci. 79, 1467 - 1475
- KRAUSE, D. O., W. J. M. SMITH u. C. S. McSWEENEY (2004):
Use of community genome arrays (CGAs) to assess the effects of *Acacia angustissima* on
rumen ecology.
Microbiology 150, 2899 - 2909
- KRISHNAMOORTHY, U., T. V. MUSCATO, C. J. SNIFFEN u. P. J. VAN SOEST (1982):
Nitrogen fractions in selected feedstuffs.
J. Dairy Sci. 65, 217 - 225
- LARUE, R., Z. YU, V. A. PARISI, A. R. EGAN u. M. MORRISON (2005):
Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as
revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing.
Environ. Microbiol. 7, 530 - 543
- LeBRUN, M., H. HUANG, R. HE, S. BOOTH, A. BALACHANDRAN u. X. LI (2008):
Comparison of trichloroacetic acid with other protein-precipitating agents in enriching
abnormal prion protein for Western blot analysis.
Can. J. Microbiol. 54, 467 - 471
- LEE, T. A. (1998):
A beginner's guide to mass spectral interpretation.
Verlag John Wiley, Chichester, New York
- LEGLEITER, L. R., A. M. MUELLER u. M. S. KERLEY (2005):
Level of supplemental protein does not influence the ruminally undegradable protein value.
J. Anim. Sci. 83, 863 - 870
- LENG, R. A., u. J. V. NOLAN (1984):
Symposium: Protein nutrition of the lactating dairy cow.
J. Dairy Sci. 67, 1072 - 1089
- LEWIS, D. (1955):
Amino-acid metabolism in the rumen of the sheep.
Br. J. Nutr. 9, 215 - 230

- LEWIS, D., u. S. R. ELSDEN (1955):
The fermentation of L-threonine, L-serine, L-cysteine and acrylic acid by a gram-negative coccus.
Biochem. J. 60, 683 - 692
- LEWIS, T. R., u. R. S. EMERY (1962):
Intermediate products in the catabolism of amino acids by rumen microorganisms.
J. Dairy Sci. 45, 1363 - 1368
- LICITRA, G., T. M. HERNANDEZ u. P. J. VAN SOEST (1996):
Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds.
Anim. Feed Sci. Technol. 57, 347 - 358
- LIMA, J. R., A. de O. BARROS RIBON, J. B. RUSSELL u. H. C. MANTOVANI (2009):
Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria *in vitro*.
FEMS Microbiol. Lett. 292, 78 - 84
- LING, J. R., u. I. P. ARMSTEAD (1995):
The *in vitro* uptake and metabolism of peptides and amino acids by five species of rumen bacteria.
J. Appl. Bacteriol. 78, 116 - 124
- LÖSCHE, M., H. SALAMA, M. GIERUS, A. HERRMANN u. F. TAUBE (2007):
Der Einfluss pflanzlicher Proteasen auf den Proteinabbau bei zehn verschiedenen diploiden Deutsch Weidelgras Sorten (*Lolium perenne* L.) des mittelfrühen Sortimentes.
in: 51. Jahrestagung der AGGF, 30.08.-01.09.2007 in Göttingen
Mitt. der Arbeitsgemeinschaft Grünland und Futterbau (Hrsg. N. WRAGE u. J. ISSELSTEIN)
Bd. 8, S. 112 - 115
- LOO, J. A. (1997):
Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry.
Mass Spectrom. Rev. 16, 1 - 23
- LOO, J. A., C. G. EDMONDS, R. D. SMITH, M. P. LACEY u. T. KEOUGH (1990):
Comparison of electrospray ionization and plasma desorption mass spectra of peptides and proteins.
Biol. Mass Spectrom. 19, 286 - 294
- LOURENÇO, M., P. W. CARDOZO, S. CALSAMIGLIA u. V. FIEVEZ (2008):
Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters.
J. Anim. Sci. 86, 3045 - 3053
- MABJEESH, S. J., A. ARIELI, I. BRUCKENTAL, S. ZAMWELL u. H. TAGARI (1997):
Effect of ruminal degradability of crude protein and nonstructural carbohydrates on the efficiency of bacterial crude protein synthesis and amino acid flow to the abomasum of dairy cows.
J. Dairy Sci. 80, 2939 - 2949
- MACPHERSON, H. T., u. P. VIOLANTE (1966 a):
Ornithine, putrescine and cadaverine in farm silage.
J. Sci. Food Agric. 17, 124 - 127

- MACPHERSON, H. T., u. P. VIOLANTE (1966 b):
The influence of pH on the metabolism of arginine and lysine in silage.
J. Sci. Food Agric. 17, 128 - 130
- MADEIRA, H. M. F., L. PENG u. M. MORRISON (1997):
Biochemical and mutational analysis of a gingipain-like peptidase activity from *Prevotella ruminicola* B₁₄ and its role in ammonia production by ruminal bacteria.
Appl. Environ. Microbiol. 63, 670 - 675
- MAENG, W. J., H. PARK u. H. J. KIM (1997):
The role of carbohydrate supplementation in microbial protein synthesis in the rumen.
in: R. ONODERA, H. ITABASHI u. K. USHIDA (Hrsg.): Rumen microbes and digestive physiology in ruminants.
Verlag Japan Scientific Societies Press, Tokyo, S.107 - 119
- MAIGA, H. A., D. J. SCHINGOETHE u. J. E. HENSON (1996):
Ruminal degradation, amino acid composition, and intestinal digestibility of the residual components of five protein supplements.
J. Dairy Sci. 79, 1647 - 1653
- MAIWORM, K. (1994):
Wirkung harvarierter Maissilage auf Fermentationsvorgänge im Pansensaft des Rindes (*in vitro*).
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- MAKKAR, H. P. S., u. K. BECKER (1995):
Degradation of condensed tannins by rumen microbes exposed to quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effects of QT on fermentative processes in the RUSITEC.
J. Sci. Food Agric. 69, 495 - 500
- MAKKAR, H. P. S., M. BLÜMMEL u. K. BECKER (1995):
In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen.
J. Sci. Food Agric. 69, 481 - 493
- MAKKAR, H. P. S., S. SEN, M. BLÜMMEL u. K. BECKER (1998):
Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria*, and *Acacia auriculiformis* on rumen fermentation.
J. Agric. Food Chem. 46, 4324 - 4328
- MAKONI, N. F., J. A. SHELFORD u. L. J. FISHER (1994):
Initial rates of degradation of protein fractions from fresh, wilted, and ensiled alfalfa.
J. Dairy Sci. 77, 1598 - 1603
- MANTOVANI, H. C., u. J. B. RUSSELL (2002):
The ability of a bacteriocin of *Streptococcus bovis* HC5 (bovicin HC5) to inhibit *Clostridium aminophilum*, an obligate amino acid fermenting bacterium from the rumen.
Anaerobe 8, 247 - 252

- MARAIS, J. P., u. T. K. EVENWELL (1983):
The use of trichloroacetic acid as precipitant for the determination of 'true protein' in animal feeds.
S.-Afr. J. Anim. Sci. 13, 138 - 139
- MARINI, J. C., J. M. SANDS u. M. E. VAN AMBURGH (2006):
Urea transporters and urea recycling in ruminants.
in: K. SEJRSEN, T. HVELPLUND u. M. O. NIELSEN (Hrsg.): Ruminant physiology. Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. Verlag Wageningen Academic Publishers, Wageningen, S. 155 - 171
- MARTIN, C., L. BERNARD u. B. MICHALET-DOREAU (1996):
Influence of sampling time and diet on amino acid composition of protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents.
J. Anim. Sci. 74, 1157 - 1163
- MATHERON, C., A.-M. DELORT, G. GAUDET, T. LIPTAJ u. E. FORANO (1999):
Interactions between carbon and nitrogen metabolism in *Fibrobacter succinogenes* S85: a ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance and enzymatic study.
Appl. Environ. Microbiol. 65, 1941 - 1948
- MATRAS, J., S. J. BARTLE u. R. L. PRESTON (1991):
Nitrogen utilization in growing lambs: effects of grain (starch) and protein sources with various rates of ruminal degradation.
J. Anim. Sci. 69, 339 - 347.
- MAURUSCHAT, A. (1996):
Untersuchungen zum Einfluss von Roquefortin auf Fermentationsvorgänge im Panseninhalt des Rindes (*in vitro*).
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- MAY, T., M. S. KERLEY u. J. E. WILLIAMS (1993):
Supplemental protein influences on carbohydrate degradation and bacterial 16S ribosomal ribonucleic acid.
J. Dairy Sci. 76, 3479 - 3489
- McALLISTER, T. A., T. MARTINEZ, H. D. BAE, A. D. MUIR, L. J. YANKE, G. A. JONES (2005):
Characterization of condensed tannins purified from legume forages: chromophore production, protein precipitation, and inhibitory effects on cellulose digestion.
J. Chem. Ecol. 31, 2049 - 2068
- McDOUGALL, E. J. (1948):
Studies on ruminant saliva. Mitt. 1. The composition and output of sheep's saliva.
Biochem. J. 43, 99 - 109
- McINTOSH, F. M., P. WILLIAMS, R. LOSA, R. J. WALLACE, D. A. BEEVER u. C. J. NEWBOLD (2003):
Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism.
Appl. Environ. Microbiol. 69, 5011 - 5014

- McKAIN, N., R. J. WALLACE u. N. D. WATT (1992):
Selective isolation of bacteria with dipeptidyl aminopeptidase type I activity from the sheep rumen.
FEMS Microbiol. Lett. 95, 169 - 174
- McLEOD, M. N. (1974):
Plant tannins – Their role in forage quality.
Nutr. Abstr. Rev. 44, 804 - 815
- McNABB, W. C., G. C. WAGHORN, T. N. BARRY u. I. D. SHELTON (1993):
The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the digestion and metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphur in sheep.
Br. J. Nutr. 70, 647 - 661
- McNABB, W. C., G. C. WAGHORN, J. S. PETERS u. T. N. BARRY (1996):
The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the solubilization and degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (*EC* 4.1.1.39; rubisco) protein in the rumen and sites of rubisco digestion.
Br. J. Nutr. 76, 535 - 549
- McNABB, W. C., J. S. PETERS, L. Y. FOO, G. C. WAGHORN u. F. S. JACKSON (1998):
Effect of condensed tannins prepared from several forages on the *in vitro* precipitation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rubisco) protein and its digestion by trypsin (*EC* 2.4.21.4) and chymotrypsin (*EC* 2.4.21.1).
J. Sci. Food Agric. 77, 201 - 212
- McSWEENEY, C. S., B. PALMER, R. BUNCH u. D. O. KRAUSE (1999):
Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*.
Appl. Environ. Microbiol. 65, 3075 - 3083
- McSWEENEY, C. S., B. PALMER, R. BUNCH u. D. O. KRAUSE (2001):
Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen.
J. Appl. Microbiol. 90, 78 - 88
- McSWEENEY, C. S., L. L. BLACKALL, E. COLLINS, L. L. CONLAN, R. I. WEBB, S. E. DENMAN u. D. O. KRAUSE (2005):
Enrichment, isolation and characterization of ruminal bacteria that degrade non-protein amino acids from the tropical legume *Acacia angustissima*.
Anim. Feed Sci. Technol. 121, 191 - 204
- MERRY, R. J., M. R. F. LEE, D. R. DAVIES, R. J. DEWHURST, J. M. MOORBY, N. D. SCOLLAN u. M. K. THEODOROU (2006):
Effects of high-sugar ryegrass silage and mixtures with red clover silage on ruminant digestion. Mitt. 1. *In vitro* and *in vivo* studies of nitrogen utilization.
J. Anim. Sci. 84, 3049 - 3060

- MICHALET-DOREAU, B., I. FERNANDEZ, C. PEYRON, L. MILLET u. G. FONTY (2001):
Fibrolitic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents.
Reprod. Nutr. Dev. 41, 187 - 194
- MIN, B. R., G. T. ATTWOOD, K. REILLY, W. SUN, J. S. PETERS, T. N. BARRY, u. W. C. McNABB (2002):
Lotus corniculatus condensed tannins decrease *in vivo* populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep.
Can. J. Microbiol. 48, 911 - 921
- MIRON, J., R. SOLOMON, I. BRUCKENTAL u. D. BEN-GHEDALIA (1996):
Effect of changing the proportion, wheat:sorghum in dairy cow rations on carbohydrate digestibility and NAN flow to the intestine.
Anim. Feed Sci. Technol. 57, 75 - 86
- MOHAMMED, N., R. ONODERA u. R. I. KHAN (1999 a):
Tryptophan biosynthesis and production of other related compounds from indole and L-serine by mixed ruminal bacteria, protozoa, and their mixture *in vitro*.
Curr. Microbiol. 39, 200 - 204
- MOHAMMED, N., R. ONODERA u. R. I. KHAN (1999 b):
Tryptophan biosynthesis and production of other related compounds from indolepyruvic acid by mixed ruminal bacteria, protozoa, and their mixture *in vitro*.
J. Gen. Appl. Microbiol. 45, 143-147
- MOLAN, A. L., G. T. ATTWOOD, B. R. MIN u. W. C. McNABB (2001):
The effect of condensed tannins from *Lotus pedunculatus* and *Lotus corniculatus* on the growth of proteolytic rumen bacteria *in vitro* and their possible mode of action.
Can. J. Microbiol. 47, 626 - 633
- MOLAN, A. L., G. T. ATTWOOD u. W. C. McNABB (2007):
The impact of condensed tannins from dock (*Rumex obtusifolius*) on the growth of rumen proteolytic bacteria *in vitro*.
J. Anim. Feed Sci. 16, Suppl. 2, 118 - 223
- MOLE, S., L. G. BUTLER u. G. IASON (1990):
Defense against dietary tannin in herbivores: a survey for proline rich salivary proteins in mammals.
Biochem. Syst. Ecol. 18, 287 - 293
- MOON, C. D., D. M. PACHECO, W. J. KELLY, S. C. LEAHY, D. LI, J. KOPEČNEÝ u. G. T. ATTWOOD (2008):
Reclassification of *Clostridium proteoclasticum* as *Butyrivibrio proteoclasticus* comb. nov., a butyrate-producing ruminal bacterium.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 2041 - 2045

- MOTHES, K. (1925):
Ein Beitrag zur Kenntnis des N-Stoffwechsels höherer Pflanzen (unter Ausschluss des Keimlingstadiums und unter besonderer Berücksichtigung der Säureamide.
Planta 1, 472 - 552
- MÜLLER-ÖZKAN, E. (2002):
Untersuchungen zu möglichen Auswirkungen anionischer Futterzusätze auf den Kohlenhydratstoffwechsel im Pansen des Rindes (*in vitro*).
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- MUSCATO, T. V., C. J. SNIFFEN, U. KRISHNAMOORTHY u. P. J. VAN SOEST (1983):
Amino acid content of noncell and cell wall fractions in feedstuffs.
J. Dairy Sci. 66, 2198 - 2207
- NAUMANN, C., u. R. BASSLER (Hrsg.; 2004):
Methodenbuch Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln
3. Aufl., 5. Ergänzungslieferung, VDLUFA, Darmstadt
- NELSON, K. E., A. N. PELL, P. SCHOFIELD u. S. ZINDER (1995):
Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolysable tannins.
Appl. Environ. Microbiol. 61, 3293 - 3298
- NELSON, K. E., M. I. THONEY, T. K. WOOLSTON, S. H. ZINDER u. A. N. PELL (1998):
Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria.
Appl. Environ. Microbiol. 64, 3824 - 3830
- NEWBOLD, J. R., u. S. R. RUST (1992):
Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture.
J. Anim. Sci. 70, 538 - 546
- NEWBOLD, C. J., R. J. WALLACE u. N. D. WATT (1992):
Properties of ionophorer-resistant *Bacteroides ruminicola* enriched by cultivation in the presence of tetronasin.
J. Appl. Bacteriol. 72, 65 - 70
- NEWBOLD, C. J., S. M. EL HASSAN, J. WANG, M. E. ORTEGA u. R. J. WALLACE (1997):
Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria.
Br. J. Nutr. 78, 237 - 249
- NEWBOLD, C. J., F. M. McINTOSH, R. J. WALLACE, P. WILLIAMS u. J. D. SUTTON (1999):
Effects of essential oils on ammonia production by rumen fluid *in vitro*. (Poster)
in: 8th International symposium on protein metabolism and nutrition, 01.-04.09.1999 in Aberdeen
Kongr.-Ber., S. 63

- NEWBOLD, C. J., F. M. McINTOSH, P. WILLIAMS, R. LOSA u. R. J. WALLACE (2004):
Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation.
Anim. Feed Sci. Technol. 114, 105 - 112
- NEWBOLD, C. J., S. M. DUVAL, N. R. McEWAN, D. R. YÁÑEZ-RUIZ u. K. J. HART
(2006):
New feed additives for ruminants - a European perspective.
in: 41st Proc. Pac. NW Anim. Nutr. Conf., Vancouver, Canada
Kongr.-Ber., S. 81 - 90.
- NILI, N., u. J. D. BROOKER (1995):
A defined medium for rumen bacteria and identification of strains impaired in *de novo*
biosynthesis of certain amino acids.
Lett. Appl. Microbiol. 21, 69 - 74
- NOCEK, J. E., u. J. B. RUSSELL (1988):
Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate
availability to microbial synthesis and milk production.
J. Dairy Sci. 71, 2070 - 2107
- NOFTSGER, S. M., N. R. ST-PIERRE, S. K. R. KARNATI u. J. L. FIRKINS (2003):
Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) on microbial growth in continuous
culture.
J. Dairy Sci. 86, 2629 - 2636
- NOFTSGER, S. M., N. R. ST-PIERRE u. J. T. SYLVESTER (2005):
Determination of rumen degradability and ruminal effects of three sources of methionine in
lactating cows.
J. Dairy Sci. 88, 223 - 237
- NOLAN, J. V. (1993):
Nitrogen kinetics.
in: J. M. FORBES u. J. FRANCE (Hrsg.): Quantitative aspects of ruminant digestion and
metabolism.
Verlag CAB International, Wallingford, S. 123 - 143
- NOLAN, J. V., u. R. C. DOBOS (2005):
Nitrogen transactions in ruminants.
in: J. DIJKSTRA, J. M. FORBES u. J. FRANCE (Hrsg.): Quantitative aspects of ruminant
digestion and metabolism.
2. Aufl., Verlag CAB International, Wallingford S. 177 - 206
- NUGENT, J. H. A., u. J. L. MANGAN (1981):
Characteristics of the rumen proteolysis of fraction I (18S) leaf protein from lucerne
(*Medicago sativa* L).
Br. J. Nutr. 46, 39 - 58
- ODENYO, A. A., u. P. O. OSUJI (1998):
Tannin-tolerant ruminal bacteria from East African ruminants.
Can. J. Microbiol. 44, 905 - 909

- ODENYO, A. A., P. O. OSUJI, O. KARANFIL u. K. ADINEW (1997):
Microbial evaluation of *Acacia angustissima* as a protein supplement for sheep.
Anim. Feed. Sci. Technol. 65, 99 - 112
- O'DONOVAN, L., u. J. D. BROOKER (2001):
Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of
Streptococcus gallolyticus (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*.
Microbiology 147, 1025 - 1033
- OHSHIMA, M., P. McDONALD u. T. ACAMOVIC (1979):
Changes during ensilage in the nitrogenous components of fresh and additive treated ryegrass
and lucerne.
J. Sci. Food Agric. 30, 97 - 106
- OLMOS COLMENERO, J. J., u. G. A. BRODERICK (2006):
Effect of dietary crude protein concentration on ruminal nitrogen metabolism in lactating
dairy cows.
J. Dairy Sci. 89, 1694 - 1703
- O'MARA, F. P., J. J. MURPHY u. M. RATH (1997):
The amino acid composition of protein feedstuffs before and after ruminal incubation and
after subsequent passage through the intestines of dairy cows.
J. Anim. Sci. 75, 1941 - 1949
- ONODERA, R. (1990):
Amino acid and protein metabolism by rumen ciliate protozoa.
in: S. HOSHINO, R. ONODERA u. H. MINATO (Hrsg.): The rumen ecosystem. The
microbial metabolism and its regulation: proceedings of a satellite symposium of the 7th
International Symposium on Ruminant Physiology, Hakone, Japan, 1989
Verlag Japan Scientific Societies Press, Tokyo, S. 43 - 50
- ONODERA, R., u. M. KANDATSU (1974):
Formation of lysine from α,ϵ -diaminopimelic acid and negligible synthesis of lysine from
some other precursors by rumen ciliate protozoa.
Agric. Biol. Chem. 38, 913 - 920
- ONODERA, R., T. SHINJO u. M. KANDATSU (1974):
Formation of lysine from α,ϵ -diaminopimelic acid contained in rumen bacterial cell walls by
rumen ciliate protozoa.
Agric. Biol. Chem. 38, 921 - 926
- ONODERA, R., M. R. AMIN u. A. M. EL-WAZIRY (1997):
Essential amino acid metabolism by rumen microorganisms and its application.
in: R. ONODERA, H. ITABASHI u. K. USHIDA (Hrsg.): Rumen microbes and digestive
physiology in ruminants.
Verlag Japan Scientific Societies Press, Tokyo, S. 83 - 94
- OOSTERKAMP, A. J., E. GELPÍ u. J. ABIAN (1998):
Quantitative peptide bioanalysis using column-switching nano liquid chromatography/mass
spectrometry.
J. Mass Spectrom. 33, 976 - 983

- OTAGAKI, K. K., L. A. BLACK, H. GROSS u. M. KLEIBER (1955):
In vitro studies with rumen microorganisms using carbon-14-labeled casein, glutamic acid, leucine, and carbonate.
J. Agric. Food Chem. 3, 948 - 951
- OUWERKERK, D., A. V. KLIEVE u. R. J. FOSTER (2002):
Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay.
J. Appl. Microbiol. 92, 753 - 758
- PACHECO, D., W. C. McNABB, H. S. EASTON u. B. BARRETT (2007):
Contribution of plant mediated proteolysis to total protein degradation of fresh forages in the rumen of dairy cows.
in: Joint Annual Meeting, durchgeführt von der American Dairy Science Association und der American Society of Animal Science, 08.-12.07.2007 in San Antonio, TX
2007 Annual Meeting Abstracts, Abstr.-Nr. 592, J. Anim. Sci. 85, Suppl. 1, 432
[Internet: URL: <http://adsa.asas.org/meetings/2007/abstracts/0430.pdf>]
- PAILLARD, D., N. McKAIN, M. T. RINTON, K. J. SHINGFIELD, D. I. GIVENS u. R. J. WALLACE (2007):
Quantification of ruminal *Clostridium proteoclasticum* by real-time PCR using a molecular beacon approach.
J. Appl. Microbiol. 103, 1251 - 1261
- PALMONARI, A., D. M. STEVENSON, D. R. MERTENS, C. W. CRUYWAGEN u. P. J. WEIMER (2010):
pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows.
J. Dairy Sci. 93, 279 - 287
- PASILIS, S. P., V. KERTESZ, G. J. VAN BERKEL, M. SCHULZ, S. SCHORCHT (2008):
HPTLC/DESI-MS imaging of tryptic protein digests separated in two dimensions.
J. Mass Spectrom. 43, 1627 - 1635
- PASTER, B. J., J. B. RUSSELL, C. M. J. YANG, J. M. CHOW, C. R. WOESE u. R. TANNER (1993):
Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp. nov..
Int. J. Syst. Bacteriol. 43, 107 - 110
- PATRA, A. K., u. J. SAXENA (2009):
Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations.
Antonie van Leeuwenhoek 96, 363 - 375
- PATRA, A. K., D. N. KAMRA u. N. AGARWAL (2006):
Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts in *in vitro* gas production test.
Int. Congr. Ser. 1293, 176 - 179
- PATTERSON, J. A., u. R. B. HESPELL (1985):
Glutamine synthetase activity in the ruminal bacterium *Succinivibrio dextrinosolvens*.
Appl. Environ. Microbiol. 50, 1014 - 1020

- PENG, H., D. REVELL, C. S. McSWEENEY u. J. D. BROOKER (2005):
Effects of different non-protein amino acids on *in vitro* dry matter digestibility of lucerne chaff.
Anim. Feed Sci. Technol. 121, 139 - 146
- PENG, H., D. REVELL u. J. D. BROOKER (2007):
Isolation of a diaminobutyric acid-degrading bacterium from the sheep rumen.
J. Anim. Feed Sci. 16, Suppl. 2, 113 - 117
- PEREZ-MALDONADO, R. A., u. B. W. NORTON (1996):
The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats.
Br. J. Nutr. 76, 515 - 533
- PEREZ-MALDONADO, R. A., B. W. NORTON u. G. L. KERVEN (1995):
Factors affecting *in vitro* formation of tannin-protein complexes.
J. Sci. Food Agric. 69, 291 - 298
- PETIT, H. V., u. G. F. TREMBLAY (1992):
In situ degradability of fresh grass and grass conserved under different harvesting methods.
J. Dairy. Sci. 75, 774 - 781
- PIEPENBRINK, M. S., u. D. J. SCHINGOETHE (1998):
Ruminal degradation, amino acid composition, and estimated intestinal degradabilities of four protein supplements.
J. Dairy Sci. 81, 454 - 461
- PITTMAN, K. A., u. M. P. BRYANT (1964):
Peptides and other nitrogen sources for growth of *Bacteroides ruminicola*.
J. Bacteriol. 88, 401 - 410
- PITTMAN, K. A., S. LAKSHMANAN u. M. P. BRYANT (1967):
Oligopeptide uptake by *Bacteroides ruminicola*.
J. Bacteriol. 93, 1499 - 1508
- PULMAN, D., u. B. JOHNSON (1978):
Amino acid pools in members of the genus *Erwinia* grown in continuous culture.
J. Gen. Microbiol. 108, 349 - 353
- PUSCH, W., M. T. FLOCCO, S.-M. LEUNG, H. THIELE u. M. KOSTRZEWA (2003):
Mass spectrometry-based clinical proteomics.
Pharmacogenomics 4, 463 - 476
- QUIGLEY, J. J., u. T. F. MURASCHI (1945):
Amino acid inhibition of copper proteinate formation.
J. Biol. Chem. 158, 463 - 467
- RASMUSSEN, M. A., M. J. ALLISON u. J. G. FOSTER (1993):
Flatpea intoxication in sheep and identification of ruminal adaption.
Vet. Hum. Toxicol. 35, 123 - 127
zit. nach PENG et al. 2007

- REED, J. D., G. GEBRE-MARIAM, C. J. ROBINSON, J. HANSON, A. ODENYO u. P. M. TREICHEL (2001):
Acetaldiaminobutanoic acid, a potential lathyrogenic amino acid in leaves of *Acacia angustissima*.
J. Sci. Food Agric. 81, 1481 - 1486
- REHM, H., u. T. LETZEL (2010):
Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics.
6. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- REILLY, K., u. G. T. ATTWOOD (1998):
Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR.
Appl. Environ. Microbiol. 64, 907 - 913
- REILLY, K., V. R. CARRUTHERS u. G. T. ATTWOOD (2002):
Design and use of 16S ribosomal DNA-directed primers in competitive PCRs to enumerate proteolytic bacteria in the rumen.
Microbial Ecol. 43, 259 - 270
- RICHARDSON, C. R., u. E. E. HATFIELD (1978):
The limiting amino acids in growing cattle.
J. Anim. Sci. 46, 740 - 745
- RICHARDSON, J. M., R. G. WILKINSON u. L. A. SINCLAIR (2003):
Synchrony of nutrient supply to the rumen and dietary energy source and their effects on the growth and metabolism of lambs.
J. Anim. Sci. 81, 1332 - 1347
- ROBBINS, C. T., T. A. HANLEY, A. E. HAGERMAN, O. HJELJORD, D. L. BAKER, C. C. SCHWARTZ u. W. W. MAUTZ (1987 a):
Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability.
Ecology 68, 98 - 107
- ROBBINS, C. T., S. MOLE, A. E. HAGERMAN u. T. A. HANLEY (1987 b):
Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in dry matter digestion?
Ecology 68, 1606 - 1615
- ROBERTSON McKIE, M. R., D. L. BROWN, A. MELESSE, A. A. ODENYO (2004):
Rumen microbes from African ruminants can degrade *Acacia angustissima* diamino acids.
Anim. Feed Sci. Technol. 117, 179 - 195
- ROBINSON, I. M., u. M. J. ALLISON (1969):
Isoleucine biosynthesis from 2-methylbutyric acid by anaerobic bacteria from the rumen.
J. Bacteriol. 97, 1220 - 1226
- RODRÍGUEZ, C. A., J. GONZÁLEZ, M. R. ALVIR, J. L. REPETTO, C. CENTENO u. F. LAMRANI (2000):
Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake.
Br. J. Nutr. 84, 369 - 376

ROGOSA, M. (1971):

Transfer of *Peptostreptococcus elsdenii* Gutierrez et al. to a new genus, *Megasphaera* [*M. elsdenii* (Gutierrez et al.) comb. nov.].

Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 187 - 189

ROOKE, J. A., u. D. G. ARMSTRONG (1988):

The importance of the form of nitrogen on microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage and continuous intrarumen infusions of sucrose.

Br. J. Nutr. 61, 113 - 121

ROOKE, J. A., I. M. BROOKER u. D. G. ARMSTRONG (1983):

The digestion of untreated and formaldehyde-treated soya-bean and rapeseed meals by cattle fed a basal silage diet.

J. Agric. Sci. (Camb.) 100, 329 - 342

ROOKE, J. A., P. A. BRETT, M. A. OVEREND u. D. G. ARMSTRONG (1985):

The energetic efficiency of rumen microbial protein synthesis in cattle given silage-based diets.

J. Anim. Feed Sci. Technol. 13, 255 - 267

ROOKE, J. A., N. H. LEE u. D. G. ARMSTRONG (1987):

The effects of intraruminal infusions of urea, casein, glucose syrup and a mixture of casein and glucose syrup on nitrogen digestion in the rumen of cattle receiving grass-silage diets.

Br. J. Nutr. 57, 89 - 98

ROSS, Z. M., E. A. O'GARA, D. J. HILL, H. V. SLEIGHTHOLME u. D. J. MASLIN (2001):

Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder.

Appl. Environ. Microbiol. 67, 475 - 480

ROTGER, A., A. FERRET, S. CALSAMIGLIA u. X. MANTECA (2006):

Effects of nonstructural carbohydrates and protein sources on intake, apparent total tract digestibility, and ruminal metabolism *in vivo* and *in vitro* with high-concentrate beef cattle diets.

J. Anim. Sci. 84, 1188 - 1196

RUIZ MORENO, M., A. BACH, M. THRUNE u. M. D. STERN (2007):

Evaluation of the fermentation dynamics of the soluble protein fraction of three protein sources in continuous culture fermenters.

in: Joint Annual Meeting, durchgeführt von der American Dairy Science Association und der American Society of Animal Science, 08.-12.07.2007 in San Antonio, TX

2007 Annual Meeting Abstracts, Abstr.-Nr. M315, J. Anim. Sci. 85, Suppl. 1, 103

[Internet: URL: <http://adsa.asas.org/meetings/2007/abstracts/0096.pdf>]

RUSSELL, J. B. (1993):

Effect of amino acids on the heat production and growth efficiency of *Streptococcus bovis*: balance of anabolic and catabolic rates.

Appl. Environ. Microbiol. 59, 1747 - 1751

- RUSSELL, J. B., u. P. H. ROBINSON (1984):
Compositions and characteristics of strains of *Streptococcus bovis*.
J. Dairy Sci. 67, 1525 - 1531
- RUSSELL, J. B., u. H. J. STROBEL (1987):
Concentration of ammonia across cell membranes of mixed rumen bacteria.
J. Dairy Sci. 70, 970 - 976
- RUSSELL, J. B., H. J. STROBEL u. G. CHEN (1988 a):
Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production.
Appl. Environ. Microbiol. 54, 872 - 877
- RUSSELL, J. B., H. J. STROBEL, A. J. DRIESSEN u. W. L. KONINGS (1988 b):
Sodium-dependent transport of neutral amino acids by whole cells and membrane vesicles of *Streptococcus bovis*, a ruminal bacterium.
J. Bacteriol. 170, 3531 - 3536
- RUSSELL, J. B., R. ONODERA u. T. HINO (1991):
Ruminal protein fermentation: new perspectives on previous contradictions.
in: T. TSUDA, Y. SASAKI u. R. KAWASHIMA (Hrsg.): Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: proceedings of the seventh international symposium on ruminant physiology.
Verlag Academic Press, San Diego, New York, S. 681 - 696
- RUSSELL, J. B., J. D. O'CONNOR, D. G. FOX, P. J. VAN SOEST u. C. J. SNIFFEN (1992):
A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. Mitt. 1. Ruminal fermentation.
J. Anim. Sci. 70, 3551 - 3561
- RUSSELL, J. P., R. J. WALLACE u. C. J. NEWBOLD (2002):
Influence of the pattern of peptide supply on microbial activity in the rumen simulating fermenter (RUSITEC).
Br. J. Nutr. 88, 73 - 80
- RYCHLIK, J. L., u. J. B. RUSSELL (2000):
Mathematical estimations of hyper-ammonia producing ruminal bacteria and evidence for bacterial antagonism that decreases ruminal ammonia production.
FEMS Microbiol. Ecol. 32, 121 - 128
- RYCHLIK, J. L., u. J. B. RUSSELL (2002 a):
Bacteriocin-like activity of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and its effect on other ruminal bacteria and ammonia production.
Appl. Environ. Microbiol. 68, 1040 - 1046
- RYCHLIK, J. L., u. J. B. RUSSELL (2002 b):
The adaptation and resistance of *Clostridium aminophilum* F to the butyrivibriocin-like substance of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and monensin.
FEMS Microbiol. Lett. 209, 93 - 98

- RYCHLIK, J. L., R. LaVERA u. J. B. RUSSELL (2002):
Amino acid deamination by ruminal *Megasphaera elsdenii* strains.
Curr. Microbiol. 45, 340 - 345
- SATTER, L. D., u. L. L. SLYTER (1974):
Effect of ammonia concentration on ruminal microbial protein production *in vitro*.
Br. J. Nutr. 32, 199 - 208
- SATTER, L. D., u. R. E. ROFFLER (1975):
Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle.
J. Dairy Sci. 58, 1219 - 1237
- SAUER, F. D., J. D. ERFLE u. S. MAHADEVAN (1975):
Amino acid biosynthesis in mixed rumen cultures.
Biochem. J. 150, 357 - 372
- SCHIRMER, M. (1990):
Untersuchungen (RUSITEC-System) zum Einfluss von Baquiloprim® auf die
Pansenfermentation beim Rind.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- SEYFARTH, W., O. KNABE u. G. WEISE (1989):
Veränderungen in der N-Fraktion von Grünfütterstoffen während des Welkens und beim
Silieren. Mitt. 2. Veränderungen in der N-Fraktion im Verlaufe der Silierung.
Arch. Anim. Nutr. 39, 763 - 774
- SHABI, Z., H. TAGARI, M. R. MURPHY, I. BRUCKENTAL, S. J. MABJEESH, S.
ZAMWEL, K. CELIK u. A. ARIELI (2000):
Partitioning of amino acids flowing to the abomasum into feed, bacterial, protozoal, and
endogenous fractions.
J. Dairy Sci. 83, 2326 - 2334
- SIDDONS, R. C., J. V. NOLAN, D. E. BEEVER u. J. C. MacRAE (1985):
Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms
and levels of N.
Br. J. Nutr. 54, 175 - 187
- SINCLAIR, L. A., P. C. GARNSWORTHY, J. R. NEWBOLD u. P. J. BUTTERY (1995):
Effects of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release in diets with a similar
carbohydrate composition on rumen fermentation and microbial protein synthesis in sheep.
J. Agric. Sci. (Camb.) 124, 463 - 472
- SINGH, B., T. K. BHAT u. O. P. SHARMA (2001):
Biodegradation of tannic acid in an *in vitro* ruminal system.
Livest. Prod. Sci. 68, 259 - 262
- SIROTNAK, F. M., R. N. DOETSCH, R. E. BROWN u. J. C. SHAW (1953):
Amino acid metabolism of bovine rumen bacteria.
J. Dairy Sci. 36, 1117 - 1123

- SIVARAMAN, T., T. K. S. KUMAR, G. JAYARAMAN u. C. YU (1997):
The mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation.
J. Protein Chem. 16, 291 - 297
- SKENE, I. K., u. J. D. BROOKER (1995):
Characterization of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*.
Anaerobe 1, 321 - 327
- SLY, L. I., M. M. CAHILL, R. OSAWA u. T. FUJISAWA (1997):
The tannin-degrading species *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus caprinus* are subjective synonyms.
Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 893 - 894
- SMITH, R. H., u. A. B. McALLAN (1974):
Some factors influencing the chemical composition of mixed rumen bacteria.
Br. J. Nutr. 31, 27 - 34
zit. nach K. ELIAS (1999)
- SMITH, C. J., R. B. HESPELL u. M. P. BRYANT (1980):
Ammonia assimilation and glutamate formation in the anaerobe *Selenomonas ruminantium*.
J. Bacteriol. 141, 593 - 602
- SMITH, R. D., K. J. LIGHT-WAHL, B. E. WINGER u. J. A. LOO (1992):
Preservation of non-covalent associations in electrospray ionization mass spectrometry: multiply charged polypeptide and protein dimers.
Org. Mass Spectrom. 27, 811 - 821
- SMITH, A. H., E. ZOETENDAL, R. I. MACKIE (2005):
Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins.
Microbial Ecol. 50, 197 - 205
- SNIFFEN, C. J., J. D. O'CONNOR, P. J. VAN SOEST, D. G. FOX, J. B. RUSSELL (1992):
A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. Mitt. 2. Carbohydrate and protein availability.
J. Anim. Sci. 70, 3562 - 3577
- SOMMERVILLE, H. J. (1968):
Enzymic studies on the biosynthesis of amino acids from lactate by *Peptostreptococcus elsdenii*.
Biochem. J. 106, 107 - 119
- SOMMERVILLE, H. J., u. J. L. PEEL (1967):
Tracer studies on the biosynthesis of amino acids from lactate by *Peptostreptococcus elsdenii*.
Biochem. J. 105, 299 - 310
- SOMOGYI, M. (1931):
The use of copper and iron salts for the deproteinization of blood.
J. Biol. Chem. 90, 725 - 729

SOUZA, G. H. M. F., R. R. CATHARINO, D. R. IFA, M. N. EBERLIN, S. HYSLOP (2008): Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification and taxonomy. *J. Mass Spectrom.* 43, 594 - 599

STEVENSON, D. M., u. P. J. WEIMER (2007): Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 165 - 174

STEWART, C. S., H. J. FLINT u. M. P. BRYANT (1997): The rumen bacteria. in: P. N. HOBSON u. C. S. STEWART (Hrsg.): The rumen microbial ecosystem. 2. Aufl., Verlag Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, S. 10 - 72

STOKES, S. R., W. H. HOOVER, T. K. MILLER u. R. P. MANSKI (1991): Impact of carbohydrate and protein levels on bacterial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 74, 860 - 870

STOYE, J., u. S. BÖCKER (2005): Informatische Methoden zur Protein-Identifikation. *LaborPraxis* 2005 (10), 24 - 26

STROBEL, H. J., u. J. B. RUSSELL (1986): Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 69, 2941 - 2947

STROBEL, H. J., u. J. B. RUSSELL (1991): Role of sodium in the growth of a ruminal selenomonad. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1663 - 1668

SÜDEKUM, K.-H., M. PRIES u. E. LEISEN (2005): Charakterisierung des Proteinwertes von siliertem Grünfutter: ein Beitrag zur Verbesserung der Proteinversorgung von Milchkühen im ökologischen Landbau. [Internet: URL: http://www.oekolandbau.nrw.de/pdf/projekte_versuche/leitbetriebe_2005/37_proteinwert_fuetterung.pdf]

SUN, Y., K. LU, L. MA, S. CAO u. Y. ZHAO (2007): Isolation and identification of the mixture of L-hydroxyproline oligo-peptides by reversed-phase high performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chinese J. Chromatogr.* 25, 524 - 527

SUNSET, M. A., J. E. EDWARDS, Y. F. CHENG, R. S. SENOSIAIN, M. N. FRAILE, K. S. NORTHWOOD, K. E. PRÆSTENG, T. GLAD, S. D. MATHIESEN u. A-D. G. WRIGHT (2009): Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microbial Ecol.* 57, 335 - 348

- SUTHERLAND, E. W., C. F. CORI, R. HAYNES u. N. S. OLSEN (1949):
Purification of the hyperglycemic-glycogenolytic factor from insulin and from gastric mucosa.
J. Biol. Chem. 180, 825 - 837
- SWAIN, T. (1979):
Tannins and lignins.
in: G. A. ROSENTHAL u. D. H. JANZEN (Hrsg.): Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites.
Verlag Academic Press, New York, London, S. 657 - 682
- TAGHIZADEH, A., M. DANESH MESGARAN, R. VALIZADEH, F. EFTEKHAR SHAROODI u. K. STANFORD (2005):
Digestion of feed amino acids in the rumen and intestine of steers measured using a mobile nylon bag technique.
J. Dairy Sci. 88, 1807 - 1814
- TAJIMA, K., R. I. AMINOV, T. NAGAMINE, K. OGOTA, M. NAKAMURA, H. MATSUI, Y. BENNO (1999):
Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries.
FEMS Microbiol. Ecol. 29, 159 - 169
- TAJIMA, K., S. ARAI, K. OGOTA, T. NAGAMINE, H. MATSUI, M. NAKAMURA, R. I. AMINOV, Y. BENNO (2000):
Rumen bacterial community transition during adaption to high-grain diet.
Anaerobe 6, 273 - 284
- TAJIMA, K., R. I. AMINOV, T. NAGAMINE, H. MATSUI, M. NAKAMURA u. Y. BENNO (2001):
Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with Real-Time PCR.
Appl. Environ. Microbiol. 67, 2766 - 2774
- TAKATSUKA, Y., M. ONODA, T. SUGIYAMA, K. KURAMOTO, T. TOMITA u. Y. KAMIO (1999):
Novel characteristics of *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase capable of decarboxylating both L-lysine und L-ornithine.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 1063 - 1069
- TAKATSUKA, Y., Y. YAMAGUCHI, M. ONO u. Y. KAMIO (2000):
Gene cloning and molecular characterization of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium* delineate its evolutionary relationship to ornithine decarboxylases from eukaryotes.
J. Bacteriol. 182, 6732 - 6741
- TAMMINGA, S. (1979):
Protein degradation in the forestomachs of ruminants.
J. Anim Sci. 49, 1615 - 1630
- TAMMINGA, S., R. KETELAAR, u. A. M. VAN VUUREN (1991):
Degradation of nitrogenous compounds in conserved forages in the rumen of dairy cows.
Grass Forage Sci. 46, 427 - 435

- TANNER, G. J., A. E. MOORE u. P. J. LARKIN (1994):
Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora *in vitro*.
Br. J. Nutr. 71, 947 - 958
- TAYLOR, E. S. (1947):
The assimilation of amino-acids by bacteria. Mitt. 3. Concentration of free amino-acids in the internal environment of various bacteria and yeasts.
J. Gen. Microbiol. 1, 86 - 90
- TEATHER, R. M., S. MAHADEVAN, J. D. ERFLE u. F. D. SAUER (1984):
Negative correlation between protozoal and bacterial levels in rumen samples and its relation to the determination of dietary effects on the rumen microbial population.
Appl. Environ. Microbiol. 47, 566 - 570
- TEMPEST, D. W., J. L. MEERS u. C. M. BROWN (1970):
Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acid pools.
J. Gen. Microbiol. 64, 171 - 185
- THEODOROU, M. K., u. J. FRANCE (1993):
Rumen microorganisms and their interactions.
in: J. M. FORBES u. J. FRANCE (Hrsg.): Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.
Verlag CAB International, Wallingford, S. 145-163
- THEODOROU, M. K., R. J. MERRY u. H. THOMAS (1996):
Is proteolysis in the rumen of grazing animals mediated by plant enzymes?
Br. J. Nutr. 75, 507 - 510
- TILVI, S., u. C. G. NAIK (2007):
Tandem mass spectrometry of kahalalides: identification of two new cyclic depsipeptides, kahalalide R and S from *Elysia grandifolia*.
J. Mass. Spectrom. 42, 70 - 80
- TOMÁNKOVÁ, O., u. J. KOPEČNÝ (1995):
Prediction of feed protein degradation in the rumen with bromelain.
Anim. Feed Sci. Technol. 53, 71 - 80
- TOYODA, A., W. IIO, M. MITSUMORI, H. MINATO (2009):
Isolation and identification of cellulose-binding proteins from sheep rumen contents.
Appl. Environ. Microbiol. 75, 1667 - 1673
- TROXLER, H., T. KUSTER, J. A. RHYNER, P. GEHRING u. C. W. HEIZMANN (1999):
Electrospray ionization mass spectrometry: analysis of the Ca²⁺-binding properties of human recombinant α -parvalbumin and nine mutant proteins.
Anal. Biochem. 268, 64 - 71
- UDÉN, P. (2000):
Ruminal metabolism of buffer-soluble proteins, peptides and amino acids *in vitro*.
in: J. P. McNAMARA, J. FRANCE u. D. BEEVER (Hrsg.): Modelling nutrient utilization in farm animals.
Verlag CAB International, Wallingford, S. 63-71

- ULTEE, A., E. P. W. KETS u. E. J. SMID (1999):
Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*.
Appl. Environ. Microbiol. 65, 4606 - 4610
- ULTEE, A., M. H. J. BENNIK u. R. MOEZELAAR (2002):
The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*.
Appl. Environ. Microbiol. 68, 1561 - 1568
- UMBARGER, H. E. (1969):
Regulation of amino acid metabolism.
Annu. Rev. Biochem. 38, 323 - 370
- VALKENERS, D., A. THÉWIS, F. PIRON u. Y. BECKERS (2004):
Effect of imbalance between energy and nitrogen supplies on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-muscle Belgian Blue bulls.
J. Anim. Sci. 82, 1818 - 1825
- VAN GYLSWYK, N. O. (1990):
Enumeration and presumptive identification of some functional groups of bacteria in the rumen of dairy cows fed grass silage-based diets.
FEMS Microbiol. Ecol. 73, 243 - 254⁴⁸
- VAN KESSEL, J. S., u. J. B. RUSSELL (1992):
Energetics of arginine and lysine transport by whole cells and membrane vesicles of strain SR, a monensin-sensitive ruminal bacterium.
Appl. Environ. Microbiol. 58, 969 - 975
- VAN KESSEL, J. S., u. J. B. RUSSELL (1996):
The effect of amino nitrogen on the energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling.
J. Dairy Sci. 79, 1237 - 1243
- VAN SOEST, P. J. (1994):
Nitrogen metabolism.
in: P. J. VAN SOEST: Nutritional ecology of the ruminant.
2. Aufl., Verlag Cornell University Press, New York, S. 290 - 311
- VARVIKKO, T. (1986):
Microbially corrected amino acid composition of rumen-undegraded feed protein and amino acid degradability in the rumen of feeds enclosed in nylon bags.
Br. J. Nutr. 56, 131 - 140
- VÁSQUEZ-AÑÓN, M., T. CASSIDY, P. McCULLOUGH u. G. A. VARGA (2001):
Effects of alimet on nutrient digestibility, bacterial protein synthesis, and ruminal disappearance during continuous culture.
J. Dairy Sci. 84, 159 - 166

⁴⁸ tatsächlich erschienen in, bzw. zu finden unter: *FEMS Microbiol. Lett.* 73, 243 - 254

- VELLE, W., Ø. V. SJAASTAD, A. AULIE, D. GRØNSET, K. FEIGENWINTER u. T. FRAMSTAD (1997):
Rumen escape and apparent degradation of amino acids after individual intraruminal administration to cows.
J. Dairy Sci. 80, 3325 - 3332
- VERESEGYHÁZY, S., S. FEKETE u. M. HEGEDÛS (1993):
Factors influencing ruminal bacterial activity. Mitt. 1. Effect of endproduct concentration on proteolytic activity.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 70, 1 - 5
- VOLDEN, H., W. VELLE, O. M. HARSTAD, A. AULIE u. Ø. V. SJAASTAD (1998):
Apparent ruminal degradation and rumen escape of lysine, methionine, and threonine administered intraruminally in mixtures to high-yielding cows.
J. Anim. Sci. 76, 1232 - 1240
- VOLDEN, H., L. T. MYDLAND u. V. OLAISEN (2002):
Apparent ruminal degradation and rumen escape of soluble nitrogen fractions in grass and grass silage administered intraruminally to lactating dairy cows.
J. Anim. Sci. 80, 2704 - 2716
- VON KEYSERLINGK, M. A. G., J. A. SHELFORD, R. PUCHALA, M. L. SWIFT u. L. J. FISHER (1998):
In situ disappearance of amino acids from grass silages in the rumen and intestine of cattle.
J. Dairy Sci. 81, 140 - 149
- VU, H., V. SPICER, A. GOTFRID u. O. V. KROKHIN (2010):
A model for predicting slopes *S* in the basic equation for the linear-solvent-strength theory of peptide separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. A 1217, 489 - 497
- WADUD, S., R. ONODERA, M. M. OR-RASHID, S. OSHIRO (2001 a):
In vitro catabolism of histidine by mixed rumen bacteria and protozoa.
Curr. Microbiol. 42, 12 - 17
- WADUD, S., R. ONODERA u. M. M. OR-RASHID (2001 b):
Studies on the possibility of histidine biosynthesis from histidinol, imidazolepyruvic acid, imidazoleacetic acid, and imidazolelactic acid by mixed ruminal bacteria, protozoa, and their mixture *in vitro*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 55, 219 - 225
- WALKER, N. D., N. R. McEWAN, u. R. J. WALLACE (2003):
Cloning and functional expression of dipeptidyl peptidase IV from the ruminal bacterium *Prevotella albensis* M384[†].
Microbiology 149, 2227 - 2234
- WALLACE, R. J. (1978):
Control of lactate production by *Selenomonas ruminantium*: homotropic activation of lactate dehydrogenase by pyruvate.
J. Gen. Microbiol. 107, 45 - 52.

WALLACE, R. J. (1992 a):

Acetylation of peptides inhibits their degradation by rumen micro-organisms.

Br. J. Nutr. 68, 365 - 372

WALLACE, R. J. (1992 b):

Gel filtration studies of peptide metabolism by rumen microorganisms.

J. Sci. Food Agric. 58, 177 - 184

WALLACE, R. J. (1992 c):

Manipulation of rumen function: ionophores, yeast culture and biotechnology.

in: Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's eighth annual symposium.

Verlag Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY , S. 193 - 203

WALLACE, R. J. (1994):

Amino acid and protein synthesis, turnover, and breakdown by ruminal microorganisms.

in: J. M. ASPLUND (Hrsg.): Principles of protein nutrition of ruminants.

Verlag CRC Press, Boca Raton, FL, S. 71 - 111

WALLACE, R. J. (1996):

Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids.

J. Nutr. 126, Suppl., 1326 - 1334

WALLACE, R. J. (1997)

Peptide metabolism and its efficiency in ruminant production.

in: R. ONODERA, H. ITABASHI u. K. USHIDA (Hrsg.): Rumens microbes and digestive physiology in ruminants.

Verlag Japan Scientific Societies Press, Tokyo, S. 95 - 105

WALLACE, R. J. (2004):

Antimicrobial properties of plant secondary metabolites.

Proc. Nutr. Soc. 63, 621 - 629

WALLACE, R. J., u. N. McKAIN (1989 a):

Analysis of peptide metabolism by ruminal microorganisms.

Appl. Environ. Microbiol. 55, 2372 - 2376

WALLACE, R. J., u. N. McKAIN (1989 b):

Some observations on the susceptibility of peptides to degradation by rumen microorganisms.

Asian-Australas. J. Anim. Sci. 3, 333 - 335

WALLACE, R. J., u. N. McKAIN (1990):

A comparison of methods for determining the concentration of extracellular peptides in rumen fluid of sheep.

J. Agric. Sci. (Camb.) 114, 101 - 105

WALLACE, R. J., u. N. McKAIN (1991):

A survey of peptidase activity in rumen bacteria.

J. Gen. Microbiol. 137, 2259 - 2264

- WALLACE, R. J., u. N. McKAIN (1996):
Influence of 1,10-phenanthroline and its analogues, other chelators and transition metal ions on dipeptidase activity of the rumen bacterium, *Prevotella ruminicola*.
J. Appl. Bacteriol. 81, 42 - 47
- WALLACE, R. J., G. A. BRODERICK u. M. L. BRAMMALL (19987):
Microbial protein and peptide metabolism in rumen fluid from faunated and ciliate-free sheep.
Br. J. Nutr. 58, 87-93
- WALLACE, R. J., C. J. NEWBOLD u. N. McKAIN (1990 a):
Influence of ionophores and energy inhibitors on peptide metabolism by rumen bacteria.
J. Agric. Sci. (Camb.) 115, 285 - 290
- WALLACE, R. J., N. McKAIN u. C. J. NEWBOLD (1990 b):
Metabolism of small peptides in rumen fluid. Accumulation of intermediates during hydrolysis of alanine oligomeres, and comparison of peptidolytic activities of bacteria and protozoa.
J. Sci. Food Agric. 50, 191 - 199
- WALLACE, R. J., C. J. NEWBOLD u. N. McKAIN, N. (1990 c):
Patterns of peptide metabolism by rumen microorganisms.
in: S. HOSHINO, R. ONODERA u. H. MINATO (Hrsg.): The rumen ecosystem. The microbial metabolism and its regulation.
Verlag Japan Scientific Societies Press, Tokyo, S. 43 - 50
- WALLACE, R. J., N. McKAIN u. G. A. BRODERICK (1993 a):
Breakdown of different peptides by *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* and mixed microorganisms from the sheep rumen.
Curr. Microbiol. 26, 333 - 336
- WALLACE, R. J., P. P. FRUMHOLTZ u. N. D. WALKER (1993 b):
Breakdown of N-terminally modified peptides and an isopeptide by rumen microorganisms.
Appl. Environ. Microbiol. 59, 3147 - 3149
- WALLACE, R. J., L. ARTHUAD u. C. J. NEWBOLD (1994):
Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms.
Appl. Environ. Microbiol. 60, 1762 - 1767
- WALLACE, R. J., J. KOPECNY, G. A. BRODERICK, N. D. WALKER, L. SICHAO, C. J. NEWBOLD u. N. McKAIN (1995):
Cleavage of di- and tripeptides by *Prevotella ruminicola*.
Anaerobe 1, 335 - 343
- WALLACE, R. J., C. J. NEWBOLD u. N. McKAIN (1996):
Inhibition by 1,10-phenanthroline of the breakdown of peptides by rumen bacteria and protozoa.
J. Appl. Bacteriol. 80, 425 - 430

- WALLACE, R. J., R. ONODERA u. M. A. COTTA (1997 a):
Metabolism of nitrogen-containing compounds.
in: P. N. HOBSON u. C. S. STEWART (Hrsg.): The rumen microbial ecosystem.
2. Aufl., Verlag Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, S. 283 - 328
- WALLACE, R. J., N. McKAIN, G. A. BRODERICK, L. M. RODE, N. D. WALKER, C. J. NEWBOLD u. J. KOPECNY (1997 b):
Peptidases of the rumen bacterium, *Prevotella ruminicola*.
Anaerobe 3, 35 - 42
- WALLACE, R. J., W. K. MIN, M. W. WITT, G. GRANT, J. C. MacRAE, W. J. MAENG, C. J. NEWBOLD u. L. M. RODE (1998):
Uptake of acetylated peptides from the small intestine in sheep and their nutritive value in rats.
Br. J. Nutr. 80, 101 - 108
- WALLACE, R. J., C. ATASOGLU u. C. J. NEWBOLD (1999):
Role of peptides in rumen microbial metabolism (a review).
Asian-Australas. J. Anim. Sci. 12, 139 - 147
- WALLACE, R. J., S. J. A. WALLACE u. N. McKAIN (2000):
Proteolytic activity of ruminal digesta during the feeding cycle in sheep receiving grass hay/concentrate or maize silage/concentrate diets.
Lett. Appl. Microbiol. 30, 317 - 319
- WALLACE, R. J., C. J. NEWBOLD, B. J. BEQUETTE, J. C. MacRAE u. G. E. LOBELEY (2001):
Increasing the flow of protein from ruminal fermentation -review-.
Asian-Australas. J. Anim. Sci. 14, 885 - 893
- WALLACE, R. J., N. R. McEWAN, F. M. McINTOSH, B. TEFEREDEGNE u. C. J. NEWBOLD (2002):
Natural products as manipulators of rumen fermentation.
Asian-Australas. J. Anim. Sci. 15, 1458 - 1468
- WALLACE, R. J., N. McKAIN, N. R. McEWAN, E. MIYAGAWA, L. C. CHAUDHARY, T. P. KING, N. D. WALKER, E. APAJALAHTI u. C. J. NEWBOLD (2003):
Eubacterium pyruvativorans sp. nov., a novel non-saccharolytic anaerobe from the rumen that ferments pyruvate and amino acids, forms caproate and utilizes acetate and propionate.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 965 - 970
- WALLACE, R. J., L. C. CHAUDHARY, E. MIYAGAWA, N. McKAIN u. N. D. WALKER (2004):
Metabolic properties of *Eubacterium pyruvativorans*, a ruminal 'hyper-ammonia-producing' anaerobe with metabolic properties analogous to those of *Clostridium kluyveri*.
Microbiology 150, 2921 - 2930
- WALLACE, R. J., L. C. CHAUDHARY, N. McKAIN, N. R. McEWAN, A. J. RICHARDSON, P. E. VERCOE, N. D. WALKER u. D. PAILLARD (2006):
Clostridium proteoclasticum: a ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid.
FEMS Microbiol. Lett. 265, 195 - 201

- WANG, Y., T. A. McALLISTER, C. J. NEWBOLD, L. M. RODE, P. R. CHEEKE u. K.-J. CHENG (1998):
Effect of *Yucca schidigera* on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC).
Anim. Feed Sci. Technol. 74, 143 - 153
- WANG, Y., T. A. McALLISTER, L. J. YANKE u. P. R. CHEEKE (2000):
Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes.
J. Appl. Microbiol. 88, 887 - 896
- WANG, H., N. MCKAIN, N. D. WALKER u. R. J. WALLACE (2004):
Influence of dipeptidyl peptidase inhibitors on growth, peptidase activity, and ammonia production by ruminal microorganisms.
Curr. Microbiol. 49, 115 - 122
- WANG, M., H. WANG, H. CAO, G. LI u. J. ZHANG (2008):
Effects of limiting amino acids on rumen fermentation and microbial community *in vitro*.
Agric. Sci. (China) 7, 1524 - 1531
- WASHBURN, M. R., u. C. F. NIVEN JR. (1948):
Amino acid interrelationships in the nutrition of *Streptococcus bovis*.
J. Bacteriol. 55, 769 - 776
- WATSON, T. G. (1976):
Amino-acid pool composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source.
J. Gen. Microbiol. 96, 263 - 268
- WEGNER, G. H., u. E. M. FOSTER (1963):
Incorporation of isobutyrate and valerate into cellular plasmalogen by *Bacteroides succinogenes*.
J. Bacteriol. 85, 53 - 61
- WELKIE, D. G., D. M. STEVENSON, P. J. WEIMER (2010):
ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle.
Anaerobe 16, 94 - 100
- WELLS, J. E., u. J. B. RUSSELL (1996):
Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly?
J. Dairy Sci. 79; 1487 - 1495
- WEIMER, P. J., G. C. WAGHORN, C. L. ODT u. D. R. MERTENS (1999):
Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows.
J. Dairy Sci. 82, 122 - 134
- WEIMER, P. J., D. M. STEVENSON, D. R. MERTENS u. E. E. THOMAS (2008):
Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 80, 135 - 145

- WEIMER, P. J., D. M. STEVENSON u. D. R. MERTENS (2010):
Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions.
J. Dairy Sci. 93, 265 - 278
- WEN, Z., u. M. MORRISON (1996):
The NAD(P)H-dependent glutamate dehydrogenase activities of *Prevotella ruminicola* B₁₄ can be attributed to one enzyme (GdhA), and GdhA expression is regulated in response to the nitrogen source available for growth.
Appl. Environ. Microbiol. 62, 3826 - 3833
- WEN, Z., u. M. MORRISON, M. (1997):
Glutamate dehydrogenase activity profiles for type strains of ruminal *Prevotella* spp..
Appl. Environ. Microbiol. 63, 3314 - 3317
- WESTHAUSSER, F. (1911):
Beiträge zur Eiweißbestimmung und zur Pepsinverdauung des Eiweißes.
Biol. Chem. (Hoppe-Seyler) 72, 363 - 373
- WESTLAKE, K., u. R. I. MACKIE (1990):
Peptide and amino acid transport in *Streptococcus bovis*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 97 - 102
- WIEDEMANN, S., P. GÜRTLER u. C. ALBRECHT (2007):
Effect of feeding cows genetically modified maize on the bacterial community in the bovine rumen.
Appl. Environ. Microbiol. 73, 8012 - 8017
- WILLIAMS, P. W., u. J. E. COCKBURN (1991):
Effect of slowly and rapidly degraded protein sources on the concentrations of amino acids and peptides in the rumen of steers.
J. Sci. Food Agric. 56, 303 - 314
- WINTERS, A. L., R. FYCHAN u. R. JONES (2001):
Effect of formic acid and a bacterial inoculant on the amino acid composition of grass silage and on animal performance.
Grass Forage Sci. 56, 181 - 192
- WISEMAN, J. M., u. B. C. LAUGHLIN (2007):
Desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry: a brief introduction and overview.
Curr. Sep. 22, 11 - 14
- WITT, M. W., C. J. NEWBOLD u. R. J. WALLACE (1998):
Influence of dietary acetylated peptides on fermentation and peptidase activities in the sheep rumen.
J. Appl. Microbiol. 84, 847 - 851
- WOLIN, M. J., T. L. MILLER u. C. S. STEWARD (1997):
Microbe-microbe interactions.
in: P. N. HOBSON u. C. S. STEWARD (Hrsg.): The rumen microbial ecosystem.
2. Aufl., Verlag Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, S. 467 - 491

- WRIGHT, D. E., u. R. E. HUNGATE (1967 a):
Amino acid concentrations in rumen fluid.
Appl. Microbiol. 15, 148 - 151
- WRIGHT, D. E., u. R. E. HUNGATE (1967 b):
Metabolism of glycine by rumen microorganisms.
Appl. Microbiol. 15, 152 - 157
- WU, Z., M. SADIK, F. T. SLEIMAN, J. M. SIMAS, M. PESSARAKLI u. J. T. HUBER (1994):
Influence of *Yucca* extract on ruminal metabolism in cows.
J. Anim. Sci. 72, 1038 - 1042
- WULFF, C. (2001)
Untersuchungen zum Thiamin- und Thiaminderivatgehalt im Pansensaft des Rindes nach Verfütterung von mit *Mucor racemosus Fresenius* verpilztem Heu (*in vitro*).
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- YAMAGUCHI, Y., Y. TAKATSUKA u. Y. KAMIO (2002):
Identification of a 22-kDa protein required for the degradation of *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase by ATP-dependent protease.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 1431 - 1434
- YANG, C.-M. J., u. J. B. RUSSELL (1992):
Resistance of proline-containing peptides to ruminal degradation *in vitro*.
Appl. Environ. Microbiol. 58, 3954 - 3958
- YANG, C.-M. J., u. J. B. RUSSELL (1993 a):
Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen.
Appl. Environ. Microbiol. 59, 3250 - 3254
- YANG, C.-M. J., u. J. B. RUSSELL (1993 b):
The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation *in vivo* and the numbers of amino acid-fermenting bacteria.
J. Anim. Sci. 71, 3470 - 3476
- YUAN, M., M. NAMIKOSHI, A. OTSUKI, K. L. RINEHART, K. SIVONEN u. M. F. WATANABE (1999):
Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry.
J. Mass Spectrom. 34, 33 - 43
- ZAITSCHKE, A. (1903):
Zur Methodik der Bestimmung des Stickstoff- und Eiweissgehaltes der Fäces.
Pfügers Arch. Eur. J. Physiol. 98, 595 - 613
- ZHANG, N. F., Z. H. WANG, F. C. LI u. Q. Y. DIAO (2007):
The effects of dipeptidase inhibitor on peptide breakdown and VFA concentrations in the rumen of sheep.
J. Anim. Feed Sci. 16, Suppl. 2, 189 - 194

ZHENG, B., Y. LIU, H. LI, Y. YE, X. GAO u. G. YUAN (2009):

Discrimination of cyclic peptide diastereomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry.

J. Mass Spectrom. 44, 1478 - 1481

ZHU, J., u. L. J. FLIPPICH (1995):

Acute intra-abomasal toxicity of tannic acid in sheep.

Vet. Hum. Toxicol. 37, 50 - 54

zit. nach HRISTOV et al. 2003

ZHU, W.-Y., A. H. KINGSTON-SMITH, D. TRONCOSO, R. J. MERRY, D. R. DAVIES, G. PICHARD, H. THOMAS u. M. K. THEODOROU (1999):

Evidence of a role for plant proteases in the degradation of herbage proteins in the rumen of grazing cattle.

J. Dairy Sci. 82, 2651 - 2658

ZIPORI, G. (1989):

Einfluss der oralen Applikation von Baquiloprim-Sulfadimidin® auf die *in-vitro*-Fermentation im Pansensaft vom Rind.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

9

Anhang

9.1

Probenentnahmeplan im Rahmen des gesamten Projekts

Tab. 9.1: Gesamtprobenentnahmeplan und Beladung des RUSITEC während aller 17 Versuchsläufe

| Tag | Fütterung | pH | NH ₃ | FIFS-Ferm. | FIFS-Überst. | Gase | Protein | AS u. Amine | Überstände | Zellulase | Allantoin | Nukleobasen | Peptide | Purine |
|-----|------------------|----|-----------------|------------|--------------|------|---------|-------------|------------|-----------|-----------|-------------|---------|--------|
| 1 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | | | x | | | | | |
| 2 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | | | x | | | | | |
| 3 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | | x | | | | | |
| 4 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | | | x | | | | | |
| 5 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | | | x | | | | | |
| 6 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | | x | | | | | |
| 7 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | x | x |
| 8 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | x | x |
| 9 | Grassilage + KFu | x | x | x | x | x | x | | x | x | x | x | x | x |
| 10 | Grassilage + KFu | x | x | x | x | x | x | | x | x | x | x | x | x |
| 11 | Grassilage + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 12 | Grassilage + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 13 | Grassilage + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 14 | Grassilage + KFu | x | x | x | x | x | x | | x | | | | | |
| 15 | Grassilage + KFu | x | x | x | x | x | x | | x | | | | | |
| 16 | Grassilage + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 17 | Grassilage + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 18 | Grassilage + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 19 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 20 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 21 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 22 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | | x | | | | | |
| 23 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | | x | | | | | |
| 24 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | | x | | | | | |
| 25 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | | x | | | | | |
| 26 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 27 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 28 | Heu + KFu | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| | | GA | GR | L | L | L | GR | GR | L | L | GA | GA | | GA |

GA GAST (2010); GR GRESNER; L LUMPP; Ferm. Fermenter; KFu Kraffutter; Überst. Überstand

9.2 Aminosäuren- und Ammoniakgehalte, Gehalte freier Aminosäuren und Anteile der freien Aminosäuren an den Gesamtaminosäuregehalten in den eingesetzten Grassilagen

Tab 9.2: AS- und Ammoniakgehalte, fAS-Gehalte und fAS-Anteile am Gesamt-AS-Gehalt [%] der Kontrollgrassilage K01. Die Ammoniak-, AS- und fAS-Gehalte sind in g/kg TS bzw. mmol/kg TS angegeben. Die Analyse wurde durch EVONIK DEGUSSA-Amino Lab® (Evonik Industries AG, Essen, Deutschland) erstellt⁴⁹.

| (f)AS/ NH ₃ | K01 | | | | |
|---------------------------|-------------|---------------|-------|-----------------|------------------|
| | AS[g/kg TS] | fAS [g/kg TS] | % fAS | AS [mmol/kg TS] | fAS [mmol/kg TS] |
| Asp | 13,0 | * | - | 97,7 | * |
| Glu | 12,3 | 2,86 | 23 | 83,6 | 19,4 |
| Ser | 5,6 | * | - | 53,3 | * |
| His | 2,3 | * | - | 14,8 | * |
| Gly | 7,1 | 1,97 | 28 | 94,6 | 26,2 |
| Thr | 6,0 | 2,72 | 46 | 50,4 | 22,8 |
| Ala | 9,9 | 5,41 | 55 | 111 | 60,7 |
| Arg | 4,2 | 1,11 | 26 | 24,1 | 6,37 |
| Val | 8,3 | 3,94 | 47 | 70,8 | 33,6 |
| Met | 2,2 | 0,60 | 27 | 14,7 | 4,02 |
| Phe | 6,9 | 3,19 | 46 | 41,8 | 19,3 |
| Ile | 6,3 | 2,91 | 46 | 48,0 | 22,2 |
| Leu | 10,7 | 4,77 | 45 | 81,6 | 36,4 |
| Σ(f)AS | 94,7 | 32,5 | 32 | 787 | 251 |
| NH ₃ | 3,9 | | | 229 | |

* Messung des freien Anteils nicht möglich; - Berechnung nicht möglich

⁴⁹ Herrn Dr. Heimbeck von Evonik Industries AG (Essen, Deutschland) sei an dieser Stelle gedankt für die Erstellung der AS-Analysen der Grassilagen.

Tab. 9.3: AS- und Ammoniakgehalte, fAS-Gehalte und fAS-Anteile am Gesamt-AS-Gehalt [%] der Kontrollgrassilagen K14, K15, K16, K18, K20 und K23. Die Ammoniak-, AS- und fAS-Gehalte sind in g/kg TS angegeben. Die Analysen wurden durch EVONIK DEGUSSA-Amino Lab® (Evonik Industries AG, Essen, Deutschland) erstellt.

| (f)AS/ NH ₃ | K14 | | | K15 | | | K16 | | | K18 | | | K20 | | | K23 | | |
|---------------------------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|----------|
| | AS | fAS | % fAS |
| Asp | 12,9 | * | - | 14,6 | | - | 16,5 | * | - | 11,7 | * | - | 12,3 | * | - | 12,0 | * | - |
| Glu | 11,3 | 2,20 | 19 | 15,9 | 2,77 | 17 | 16,5 | 4,13 | 25 | 12,8 | 2,49 | 19 | 12,7 | 1,32 | 10 | 12,3 | 2,53 | 21 |
| Ser | 5,5 | * | - | 6,4 | | - | 7,2 | * | - | 5,2 | * | - | 5,6 | * | - | 5,7 | * | - |
| His | 2,0 | * | - | 2,6 | | - | 3,4 | * | - | 2,2 | * | - | 2,2 | * | - | 2,6 | * | - |
| Gly | 6,9 | 1,77 | 26 | 8,9 | 1,93 | 22 | 9,4 | 2,42 | 26 | 7,2 | 1,66 | 23 | 7,1 | 1,07 | 15 | 7,2 | 1,68 | 23 |
| Thr | 5,9 | 2,50 | 43 | 7,2 | 2,34 | 33 | 8,1 | 3,55 | 44 | 5,8 | 2,15 | 37 | 6,1 | 1,50 | 24 | 6,0 | 2,30 | 38 |
| Ala | 9,5 | 4,77 | 50 | 12,2 | 5,32 | 44 | 12,7 | 5,95 | 47 | 9,9 | 4,82 | 49 | 9,4 | 3,12 | 33 | 9,7 | 4,57 | 47 |
| Arg | 4,7 | 1,04 | 22 | 6,9 | 1,70 | 25 | 5,8 | 0,68 | 12 | 6,1 | 2,14 | 35 | 6,7 | 1,62 | 24 | 6,6 | 3,06 | 46 |
| Val | 8,2 | 3,40 | 42 | 10,1 | 3,57 | 35 | 10,6 | 4,21 | 40 | 8,2 | 3,30 | 40 | 8,0 | 2,09 | 26 | 7,9 | 3,27 | 42 |
| Met | 2,3 | 0,47 | 21 | 2,8 | 0,53 | 19 | 3,2 | 0,93 | 29 | 2,4 | 0,42 | 18 | 2,4 | 0,23 | 10 | 2,4 | 0,88 | 37 |
| Phe | 6,9 | 2,45 | 35 | 9,0 | 2,65 | 29 | 9,6 | 3,47 | 36 | 7,2 | 2,47 | 34 | 7,3 | 1,48 | 20 | 6,9 | 2,81 | 41 |
| Ile | 6,1 | 2,51 | 41 | 7,8 | 2,64 | 34 | 8,2 | 3,13 | 38 | 6,4 | 2,55 | 40 | 6,3 | 1,63 | 26 | 6,1 | 2,29 | 38 |
| Leu | 10,7 | 4,06 | 38 | 13,8 | 4,39 | 32 | 14,5 | 5,72 | 40 | 11,1 | 4,13 | 37 | 11,1 | 2,52 | 23 | 10,9 | 4,93 | 45 |
| Σ(f)AS | 92,9 | 25,2 | 27 | 118 | 27,8 | 24 | 126 | 34,2 | 27 | 96,2 | 26,1 | 27 | 97,2 | 16,6 | 17 | 96,3 | 28,3 | 29 |
| NH ₃ | 3,5 | | | 3,7 | | | 4,8 | | | 3,0 | | | 2,7 | | | 2,7 | | |

* Bestimmung des freien Anteils nicht möglich; - Berechnung nicht möglich

Tab. 9.4: AS- und Ammoniakgehalte, fAS-Gehalte und fAS-Anteile am Gesamt-AS-Gehalt [%] der Schadgrassilagen S02, S04, S05, S07 und S08. Die Ammoniak-, AS- und fAS-Gehalte sind in g/kg TS angegeben, die Werte für S02 und S05 beziehen sich auf gefriergetrocknetes Material.

Die Analysen wurden durch EVONIK DEGUSSA-Amino Lab® (Evonik Industries AG, Essen, Deutschland) erstellt.

| (f)AS/ NH ₃ | S02 ¹ | | | S04 | | | S05 ¹ | | | S07 | | | S08 | | |
|---------------------------|------------------|------|----------|------|------|----------|------------------|------|----------|------|------|----------|------|------|----------|
| | AS | fAS | % fAS | AS | fAS | % fAS | AS | fAS | % fAS | AS | fAS | % fAS | AS | fAS | % fAS |
| Asp | 10,5 | * | - | 13,7 | * | - | 14,9 | * | - | 10,7 | * | - | 17,9 | * | - |
| Glu | 8,5 | 2,39 | 28 | 11,2 | 3,49 | 31 | 12,7 | 4,72 | 37 | 10,2 | 3,61 | 36 | 16,8 | 5,48 | 32 |
| Ser | 5,2 | * | - | 6,2 | * | - | 6,8 | * | - | 4,3 | * | - | 7,9 | * | - |
| His | 1,4 | * | - | 2,5 | * | - | 2,6 | * | - | 2,0 | * | - | 3,9 | * | - |
| Gly | 6,2 | 2,97 | 48 | 8,0 | 2,83 | 35 | 8,6 | 4,24 | 49 | 6,8 | 2,75 | 40 | 10,5 | 4,39 | 42 |
| Thr | 5,6 | 3,76 | 67 | 6,5 | 3,35 | 51 | 7,7 | 5,16 | 67 | 4,9 | 2,53 | 52 | 8,7 | 4,86 | 56 |
| Ala | 9,8 | 6,84 | 70 | 11,1 | 6,57 | 59 | 13,1 | 9,10 | 69 | 10,0 | 6,38 | 64 | 13,4 | 7,85 | 59 |
| Arg | 1,9 | 0,17 | 9 | 4,5 | 1,52 | 34 | 2,7 | 0,11 | 4 | 3,3 | 0,87 | 27 | 3,5 | 0,15 | 4 |
| Val | 7,8 | 4,92 | 63 | 9,1 | 4,76 | 52 | 10,3 | 6,19 | 60 | 8,0 | 4,51 | 56 | 11,6 | 5,82 | 50 |
| Met | 2,2 | 0,92 | 41 | 2,5 | 0,66 | 26 | 3,1 | 12,3 | 40 | 2,1 | 0,52 | 24 | 3,7 | 1,50 | 41 |
| Phe | 6,1 | 4,57 | 75 | 7,8 | 4,75 | 61 | 8,5 | 5,90 | 69 | 6,2 | 3,11 | 50 | 9,9 | 6,11 | 62 |
| Ile | 5,7 | 3,46 | 61 | 7,0 | 3,73 | 54 | 7,9 | 4,60 | 59 | 6,0 | 3,35 | 55 | 8,3 | 4,25 | 48 |
| Leu | 10,2 | 6,54 | 64 | 12,4 | 6,48 | 52 | 13,4 | 8,44 | 63 | 10,0 | 5,35 | 53 | 15,9 | 9,15 | 58 |
| Σ(f)AS | 81,1 | 36,5 | 45 | 103 | 38,1 | 37 | 112 | 49,7 | 44 | 84,5 | 33,0 | 39 | 132 | 49,6 | 38 |
| NH ₃ | k.A. | | | 3,8 | | | k.A. | | | 4,6 | | | 5,3 | | |

¹ AS- und fAS-Gehaltsangaben auf gefriergetrocknetes Material bezogen; k.A. keine Angabe

* Bestimmung des freien Anteils nicht möglich; - Berechnung nicht möglich

Tab. 9.5: AS- und Ammoniakgehalte, fAS-Gehalte und fAS-Anteile am Gesamt-AS-Gehalt [%] der Schadgrassilagen S09, S10, S11, S13 und S12. Die Ammoniak-, AS- und fAS-Gehalte sind in g/kg TS angegeben. Die Analysen wurden durch EVONIK DEGUSSA-Amino Lab® (Evonik Industries AG, Essen, Deutschland) erstellt.

| (f)AS/ NH ₃ | S09 | | | S10 | | | S11 | | | S13 | | | S12 | | |
|---------------------------|------|--------------------|-----------------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|----------|
| | AS | fAS | % fAS | AS | fAS | % fAS | AS | fAS | % fAS | AS | fAS | % fAS | AS | fAS | % fAS |
| Asp | 5,3 | * | - | 11,4 | * | - | 12,9 | * | - | 15,3 | * | - | 20,8 | * | - |
| Glu | 5,4 | 0,85 | 16 | 10,4 | 4,78 | 46 | 12,3 | 3,99 | 32 | 13,4 | 5,54 | 41 | 20,7 | 4,15 | 20 |
| Ser | 2,1 | * | - | 4,7 | * | - | 6,3 | * | - | 7,3 | * | - | 9,3 | * | - |
| His | 0,9 | * | - | 2,0 | * | - | 2,9 | * | - | 3,0 | * | - | 3,7 | * | - |
| Gly | 4,1 | 0,93 | 23 | 7,4 | 3,36 | 45 | 8,1 | 3,13 | 39 | 9,3 | 4,11 | 44 | 11,7 | 2,56 | 22 |
| Thr | 2,3 | 0,57 | 25 | 5,5 | 3,37 | 61 | 7,1 | 4,13 | 58 | 7,8 | 5,27 | 68 | 10,0 | 3,60 | 37 |
| Ala | 6,4 | 3,39 | 53 | 11,3 | 7,78 | 69 | 11,3 | 6,76 | 60 | 12,8 | 8,34 | 66 | 15,4 | 6,74 | 44 |
| Arg | 1,9 | 0,28 | 15 | 3,3 | 1,13 | 34 | 3,4 | 0,43 | 13 | 3,6 | 0,80 | 23 | 8,1 | 1,02 | 13 |
| Val | 6,1 | 3,19 | 52 | 8,7 | 5,41 | 62 | 9,5 | 4,87 | 51 | 10,5 | 6,23 | 59 | 13,1 | 4,69 | 36 |
| Met | 1,0 | 1,59 ⁵⁰ | 30 ¹ | 2,4 | 0,77 | 31 | 2,8 | 1,19 | 42 | 3,1 | 1,40 | 45 | 3,7 | 0,36 | 10 |
| Phe | 3,8 | 1,57 | 41 | 7,0 | 4,34 | 62 | 7,6 | 4,10 | 54 | 8,5 | 5,08 | 60 | 11,4 | 3,50 | 31 |
| Ile | 9,3 | 1,72 | 45 | 6,6 | 4,19 | 63 | 7,2 | 3,65 | 51 | 8,1 | 4,83 | 60 | 9,9 | 3,45 | 35 |
| Leu | 6,9 | 2,99 | 43 | 11,2 | 6,77 | 60 | 12,3 | 6,95 | 57 | 14,0 | 8,38 | 60 | 17,2 | 5,42 | 31 |
| Σ(f)AS | 55,5 | 17,1 | 31 | 91,9 | 41,9 | 46 | 104 | 39,2 | 38 | 117 | 45,0 | 43 | 155 | 35,5 | 23 |
| NH ₃ | 8,6 | | | 5,4 | | | 0,49 | | | 5,3 | | | 7,0 | | |

¹ Mittelwert⁵⁰; * Bestimmung des freien Anteils nicht möglich; - Berechnung nicht möglich

⁵⁰ Der Gehalt freien Methionins liegt über dem Gesamtmethioningehalt, was per definitionem nicht möglich ist, aber laut persönlicher Mitteilung von Herrn Dr. Heimbeck am 06.04.2009 im Rahmen der üblichen Toleranzen bestätigt wurde. Bei der chromatographischen AS-Analyse von S09 konnte die Co-Elution einer unbekannt Substanz mit Methionin festgestellt werden, die den Methioninpeak vergrößerte. Der freie Methioninanteil [%] wurde als Mittelwert aller untersuchten Grassilagen angenommen (laut persönlicher Mitteilung von Herrn Dr. Heimbeck am 06.04.2009).

Tab. 9.6: Molare AS-Gesamtgehalte in den Kontrollsilagen K14, K15, K16, K18, K20 und K23 sowie den Schadgrassilagen S02, S04, S05, S07, S08, S09, S10, S11, S13 und S12. Die Gehalte sind in mmol/kg TS angegeben. Die Werte wurden mit Hilfe der Tabellen 9.2 bis 9.5 berechnet.

| AS | Grassilage | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------------|-------|-------|------|------|------|------------------|------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | K14 | K15 | K16 | K18 | K20 | K23 | S02 ¹ | S04 | S05 ¹ | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| Asp | 96,9 | 110 | 124 | 87,9 | 92,4 | 90,2 | 79,1 | 103 | 112 | 80,4 | 134 | 39,8 | 85,6 | 96,9 | 115 | 156 |
| Glu | 76,8 | 108 | 112 | 87,0 | 86,3 | 83,6 | 57,7 | 76,1 | 86,1 | 69,3 | 114 | 36,7 | 70,7 | 83,6 | 91,1 | 141 |
| Ser | 52,3 | 60,9 | 68,5 | 49,5 | 53,3 | 54,2 | 49,6 | 59,0 | 64,9 | 40,9 | 75,2 | 20,0 | 44,7 | 59,9 | 69,5 | 88,5 |
| His | 12,9 | 16,8 | 21,9 | 14,2 | 14,2 | 16,8 | 9,21 | 16,1 | 16,7 | 12,9 | 25,1 | 5,80 | 12,9 | 18,7 | 19,3 | 23,8 |
| Gly | 91,9 | 119 | 125 | 95,9 | 94,6 | 95,9 | 82,7 | 107 | 115 | 90,6 | 140 | 54,6 | 98,6 | 108 | 124 | 156 |
| Thr | 49,5 | 60,5 | 68,0 | 48,7 | 51,2 | 50,4 | 47,2 | 54,6 | 64,2 | 41,1 | 73,0 | 19,3 | 46,2 | 59,6 | 65,5 | 84,0 |
| Ala | 107 | 137 | 143 | 111 | 106 | 109 | 110 | 125 | 147 | 112 | 150 | 71,8 | 127 | 127 | 144 | 173 |
| Arg | 27,0 | 39,6 | 33,3 | 35,0 | 38,5 | 37,9 | 10,9 | 25,8 | 15,4 | 18,9 | 20,1 | 10,9 | 18,9 | 19,5 | 20,7 | 46,5 |
| Val | 70,0 | 86,2 | 90,4 | 70,0 | 68,3 | 67,4 | 66,7 | 77,6 | 88,1 | 68,3 | 99,0 | 52,0 | 74,2 | 81,1 | 89,6 | 112 |
| Met | 15,4 | 18,8 | 21,4 | 16,1 | 16,1 | 16,1 | 14,9 | 16,8 | 20,8 | 14,1 | 24,8 | 6,70 | 16,1 | 18,8 | 20,8 | 24,8 |
| Phe | 41,8 | 54,5 | 58,1 | 43,6 | 44,2 | 41,8 | 36,9 | 47,2 | 51,5 | 37,5 | 59,9 | 23,0 | 42,4 | 46,0 | 51,5 | 69,0 |
| Ile | 46,5 | 59,5 | 62,5 | 48,8 | 48,0 | 46,5 | 43,4 | 53,4 | 59,8 | 45,7 | 63,3 | 70,9 | 50,3 | 54,9 | 61,7 | 75,5 |
| Leu | 81,6 | 105,2 | 110,5 | 84,6 | 84,6 | 83,1 | 77,4 | 94,5 | 102 | 76,2 | 121 | 52,6 | 85,4 | 93,8 | 107 | 131 |
| ΣAS | 769 | 975 | 1039 | 792 | 797 | 793 | 686 | 855 | 944 | 708 | 1101 | 464 | 773 | 867 | 979 | 1281 |

¹ AS-Gehaltsangaben auf gefriergetrocknetes Material bezogen

Tab. 9.7: Molare fAS- und Ammoniakgehalte in den Kontrollsilagen K14, K15, K16, K18, K20 und K23 sowie den Schadgrassilagen S02, S04, S05, S07, S08, S09, S10, S11, S13 und S12. Die Gehalte sind in mmol/kg TS angegeben. Die Werte wurden mit Hilfe der Tabellen 9.2 bis 9.5 berechnet.

| fAS/ NH ₃ | Grassilage | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------|------|------|------|------|------|------------------|------|------------------|------|------|-------------------|------|------|------|------|
| | K14 | K15 | K16 | K18 | K20 | K23 | S02 ¹ | S04 | S05 ¹ | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| Glu | 15,0 | 18,8 | 28,1 | 16,9 | 8,97 | 17,2 | 16,3 | 23,7 | 32,1 | 24,5 | 37,3 | 5,78 | 32,5 | 27,1 | 37,7 | 28,2 |
| Gly | 23,6 | 25,7 | 32,2 | 22,1 | 14,3 | 22,4 | 39,6 | 37,7 | 56,5 | 36,6 | 58,5 | 12,4 | 44,8 | 41,7 | 54,8 | 34,1 |
| Thr | 21,0 | 19,6 | 29,8 | 18,1 | 12,6 | 19,3 | 31,6 | 28,1 | 43,3 | 21,2 | 40,8 | 4,79 | 28,3 | 34,7 | 44,3 | 30,2 |
| Ala | 53,5 | 59,7 | 66,8 | 54,1 | 35,0 | 51,3 | 76,8 | 73,8 | 102 | 71,6 | 88,1 | 38,1 | 87,3 | 75,9 | 93,6 | 75,7 |
| Arg | 5,97 | 9,76 | 3,90 | 12,3 | 9,30 | 17,6 | 0,98 | 8,73 | 0,63 | 4,99 | 0,86 | 1,61 | 6,49 | 2,47 | 4,59 | 5,86 |
| Val | 29,0 | 30,5 | 35,9 | 28,2 | 17,8 | 27,9 | 42,0 | 40,6 | 52,8 | 38,5 | 49,7 | 27,2 | 46,2 | 41,6 | 53,2 | 40,0 |
| Met | 3,15 | 3,55 | 6,23 | 2,82 | 1,54 | 5,90 | 6,17 | 4,42 | 8,24 | 3,49 | 10,1 | 10,7 ² | 5,16 | 7,98 | 9,38 | 2,41 |
| Phe | 14,8 | 16,0 | 21,0 | 15,0 | 8,96 | 17,0 | 27,7 | 28,8 | 35,7 | 18,8 | 37,0 | 9,50 | 26,3 | 24,8 | 30,8 | 21,2 |
| Ile | 19,1 | 20,1 | 23,9 | 19,4 | 12,4 | 17,5 | 26,4 | 28,4 | 35,1 | 25,5 | 32,4 | 13,1 | 31,9 | 27,8 | 36,8 | 26,3 |
| Leu | 30,9 | 33,5 | 43,6 | 31,5 | 19,2 | 37,6 | 49,9 | 49,4 | 64,3 | 40,8 | 69,7 | 22,8 | 51,6 | 53,0 | 63,9 | 41,3 |
| ΣfAS | 216 | 237 | 291 | 220 | 140 | 234 | 317 | 324 | 431 | 286 | 424 | 146 | 360 | 337 | 429 | 305 |
| NH ₃ | 206 | 217 | 282 | 176 | 159 | 159 | k.A. | 223 | k.A. | 270 | 311 | 505 | 317 | 288 | 311 | 411 |

¹ fAS-Gehaltsangaben auf gefriergetrocknetes Material bezogen; ² Mittelwert, s. Tab. 9.5; k.A. keine Angabe

9.3 Eichkurve der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Zur Eichkurvenerstellung wurde die Verdünnungsreihe einer Rinderserumalbuminlösung (RSA; hergestellt aus bovinem Serumalbumin der Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Art.-Nr. 2153) verwendet. Mit Hilfe der Trendgeraden und ihrer Geradengleichung konnte die Proteinkonzentration in den Fermenterflüssigkeitsproben errechnet werden.

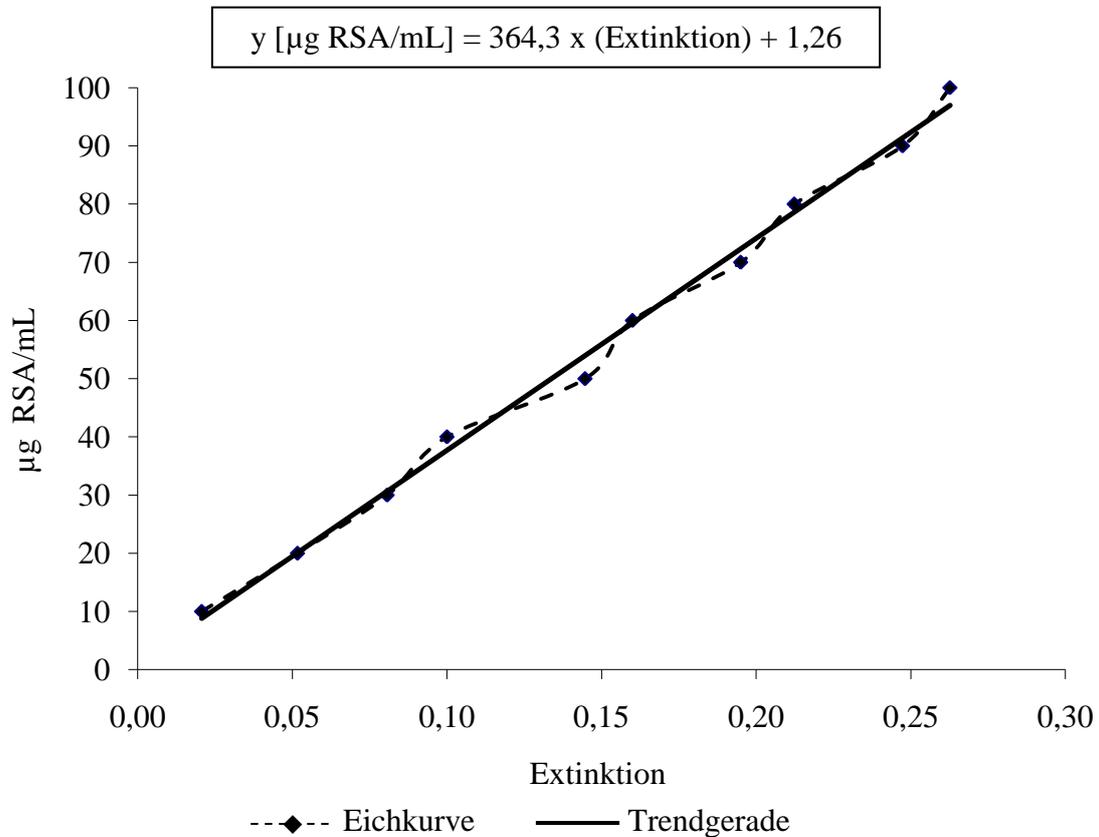


Abb. 9.1: *Eichkurve für die Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976). RSA Rinderserumalbumin*

9.4 Verwendete HPLC-Gradienten für die Aminosäuremessungen in der Fermenterflüssigkeit

Aufgrund des unterschiedlichen analytischen Verhaltens der Hauptsäulen mussten zwei verschiedene Gradienten bei der fAS-Messung genutzt werden. Den Tabellen 9.8 (Gradient 01) und 9.9 (Gradient 05) sind Angaben bezüglich der prozentualen Zusammensetzung der Eluenten, Gesamtflussmenge/Zeiteinheit und Gesamtdauer einer Probenanalyse zu entnehmen.

Tab 9.8: Gradient 01 (Lauf 2, Tag 7 bis Lauf 6, Tag 11 und Lauf 9, Tag 26 bis Lauf 18, Tag 19)

| Zeit [min] | Fluss [mL/min] | % Eluent B (s. Tab. 3.12) |
|------------|----------------|---------------------------|
| 0,01 | 0,7 | 0 |
| 2,0 | 0,7 | 0 |
| 2,01 | 0,7 | 10 |
| 2,5 | 0,7 | 10 |
| 2,51 | 1,2 | 11 |
| 14,0 | 1,2 | 37 |
| 24,0 | 1,2 | 46 |
| 30,0 | 1,2 | 75 |
| 31,0 | 1,2 | 100 |
| 38,0 | 1,2 | 100 |
| 40,0 | 0,7 | 0 |
| 45,0 | 0,0 | 0 |

Tab 9.9: Gradient 05 (Lauf 6, Tag 12 bis Lauf 9, Tag 21)

| Zeit [min] | Fluss [mL/min] | % Eluent B (s. Tab. 3.12) |
|------------|----------------|---------------------------|
| 0,0 | 0,7 | 0 |
| 0,1 | 0,7 | 0 |
| 2,0 | 0,7 | 10 |
| 2,5 | 1,0 | 11 |
| 14,0 | 1,0 | 37 |
| 24,0 | 1,0 | 46 |
| 29,0 | 1,0 | 46 |
| 35,0 | 1,0 | 75 |
| 36,0 | 1,0 | 100 |
| 43,0 | 1,0 | 100 |
| 45,0 | 0,7 | 0 |
| 50,0 | 0,7 | 0 |

9.5 Beispielchromatogramme des Aminosäurestandards und der analysierten Fermenterflüssigkeitsproben

Die Abbildungen 9.2 bis 9.5 zeigen HPLC-Chromatogramme der fAS-Konzentrationsmessung. Alle Chromatogramme wurden mit dem Computerprogramm Class-LC 10 (Vers. 1.6, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland) dargestellt und ausgewertet.

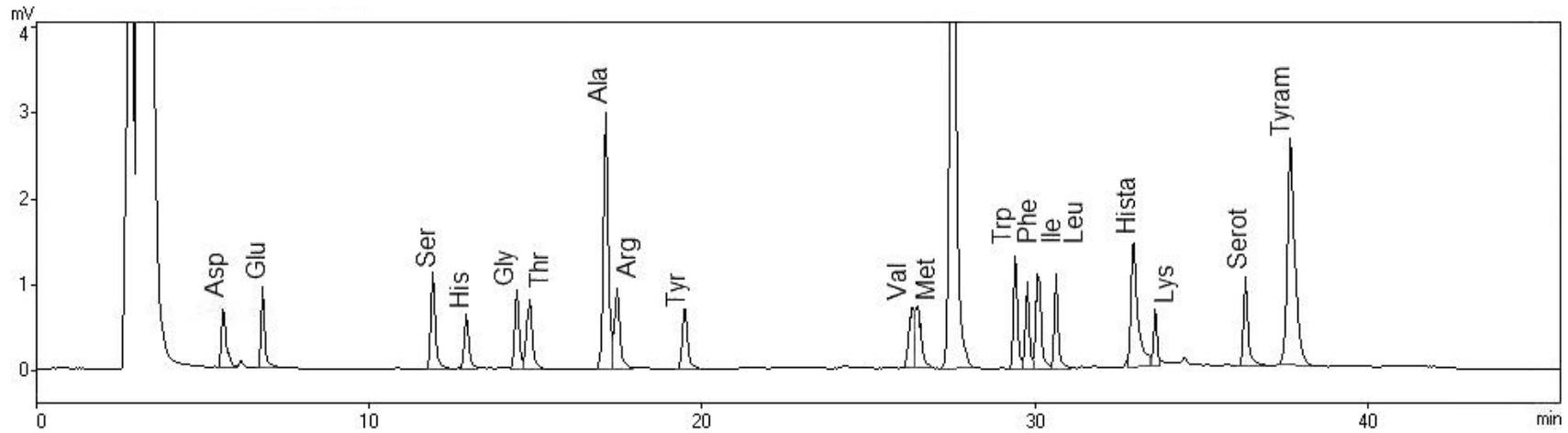


Abb. 9.2: HPLC-Chromatogramm des AS-Standardgemisches (Zusammensetzung s. Kap. 9.6) bei Nutzung des Gradienten 01

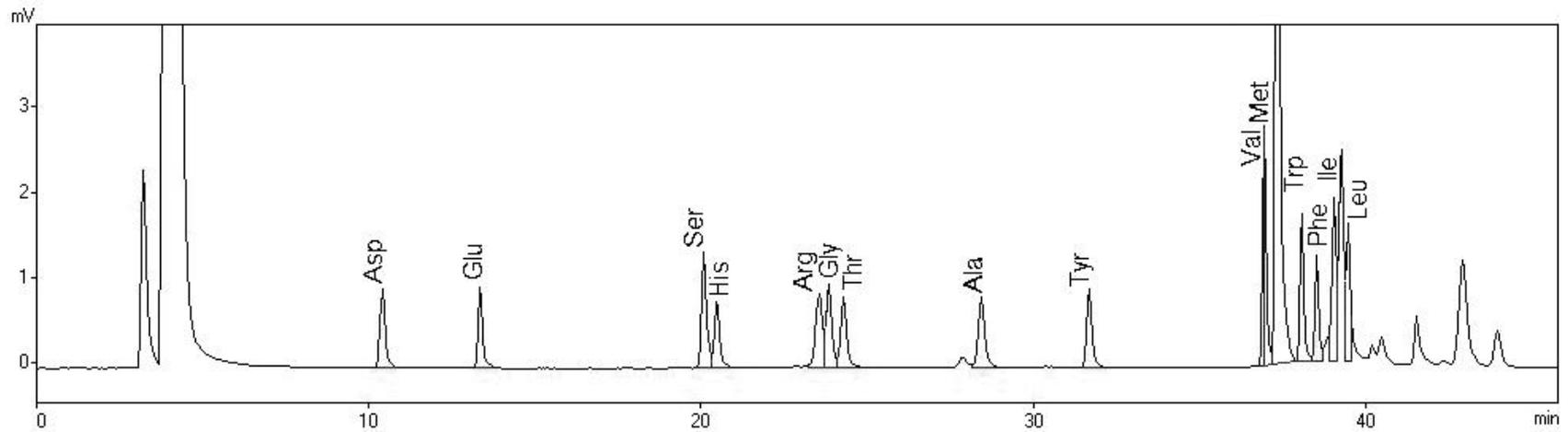


Abb. 9.3: HPLC-Chromatogramm des AS-Standardgemisches (Zusammensetzung s. Kap. 9.6) bei Nutzung des Gradienten 05

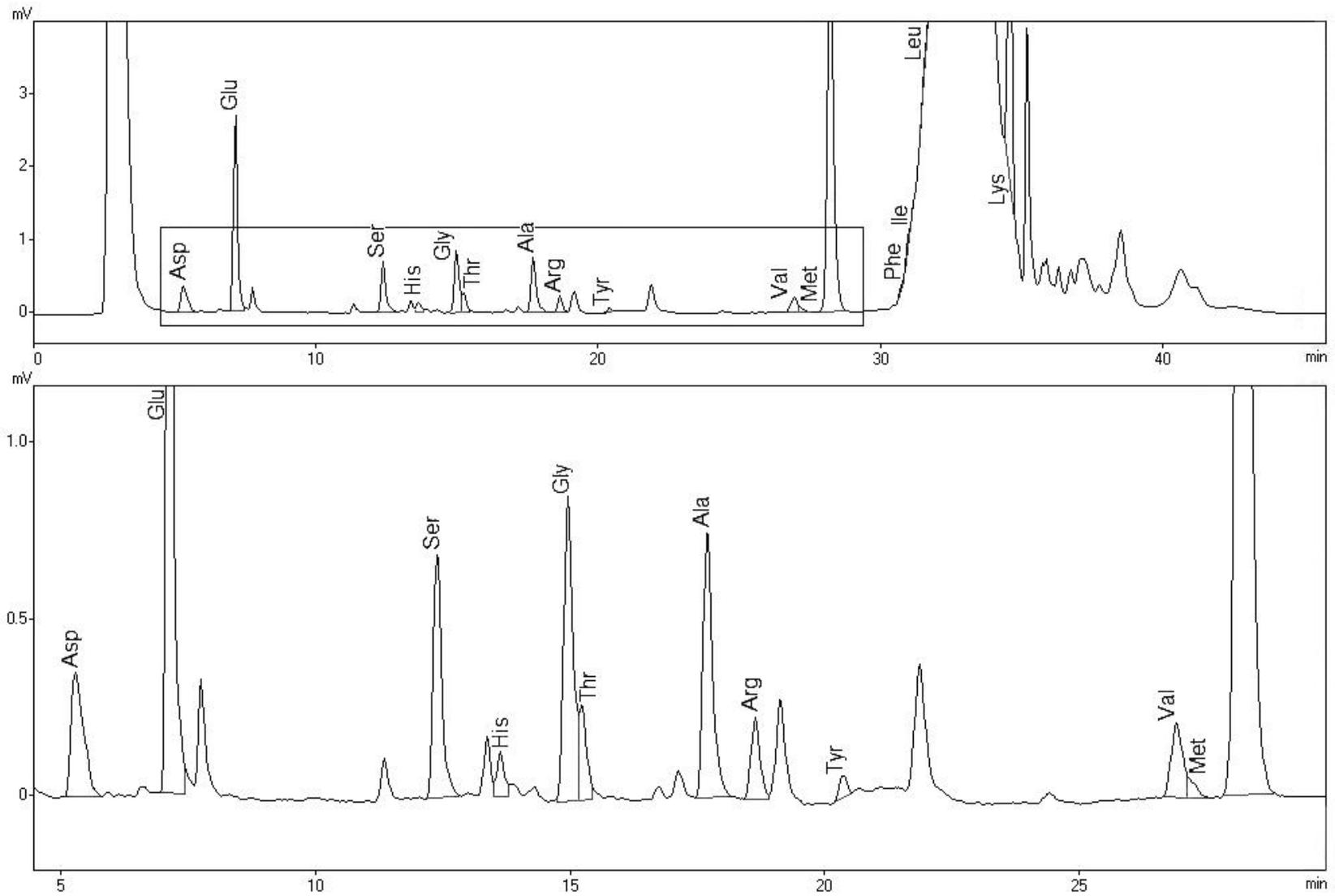


Abb. 9.4 Chromatogramm einer Fermenterflüssigkeitsprobe aus dem RUSITEC bei Nutzung des Gradienten 01. Der auf dem oberen Teil der Abbildung markierte Chromatogrammbereich wird im unteren Teil vergrößert dargestellt.

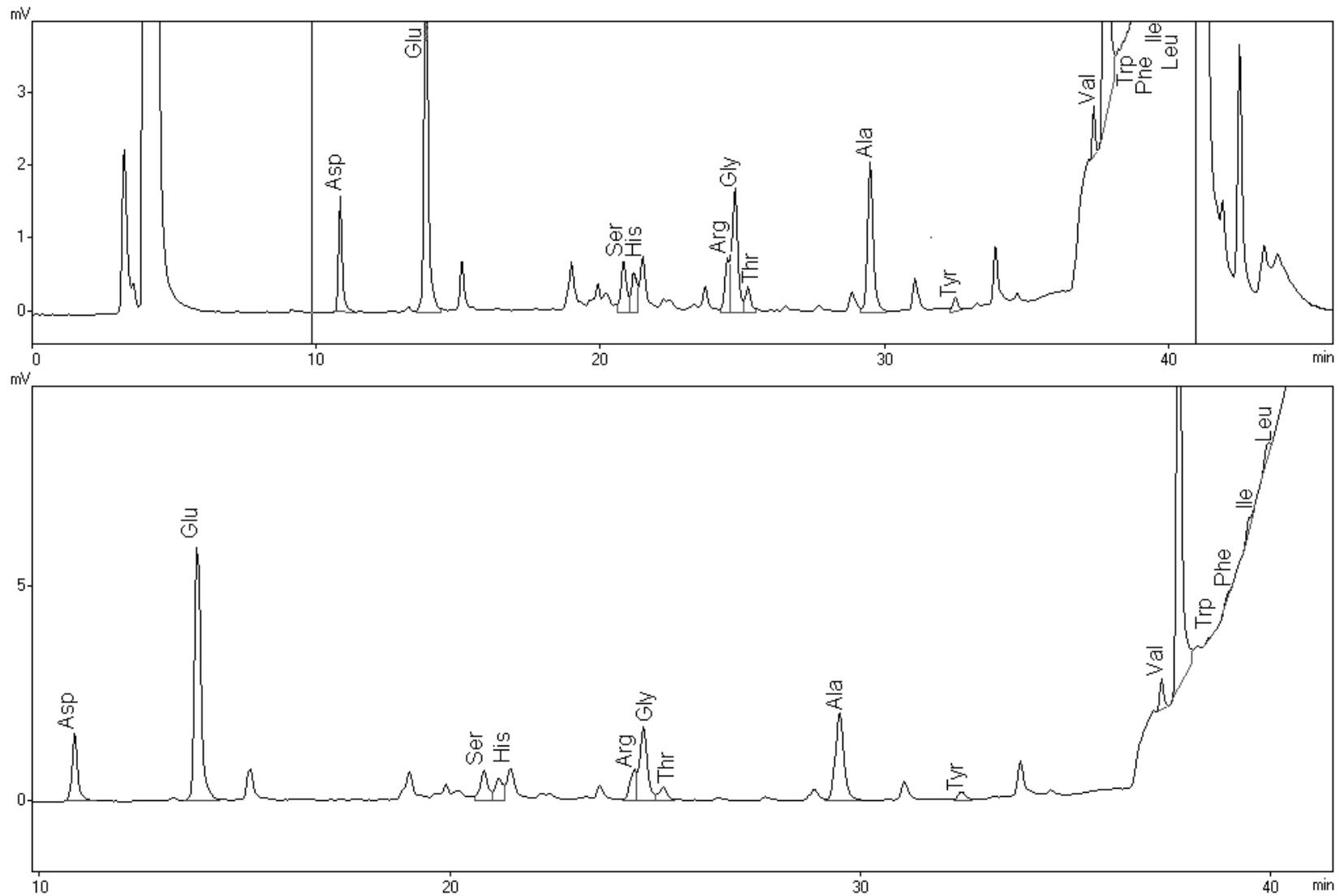


Abb. 9.5 Chromatogramm einer Fermenterflüssigkeitsprobe aus dem RUSITEC bei Nutzung des Gradienten 05. Im unteren Teil der Abbildung wird der markierte Bereich dargestellt (Markierung im oberen Fenster nicht vollständig sichtbar).

9.6 Zusammensetzung des Aminosäurenstandardgemisches zur täglichen Überprüfung der Analysegeräte

940 μL 1 M Kaliumboratpuffer
(pH 11, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 109462)

+ 10 μL AS-Standardgemisch
(hergestellt aus Amino Acid Standard Solution der Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Art.-Nr. AAS18), bestehend aus folgenden AS:

- L-Aspartat 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Glutamat 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Serin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Histidin 5 $\mu\text{mol/L}$
- Glycin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Threonin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Alanin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Arginin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Tyrosin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Valin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Methionin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Phenylalanin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Isoleucin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Leucin 5 $\mu\text{mol/L}$
- L-Lysin 5 $\mu\text{mol/L}$

+ je 10 μL von Standardlösungen biogener Amine und von Tryptophan:

- Tryptophan 8,75 $\mu\text{mol/L}$
(Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 108374)
- Histamin 14,61 $\mu\text{mol/L}$
(Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Art.-Nr. H-7250)
- Tyramin 14,08 $\mu\text{mol/L}$
(Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Art.-Nr. T-2879)
- Serotonin 9,23 $\mu\text{mol/L}$
(Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Art.-Nr. H-9523)
- Tryptamin 14,77 $\mu\text{mol/L}$
(Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Art.-Nr. T-9628)

+ 100 μL Sulfosalicylsäure (30 %ig, hergestellt aus 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat der Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 800691)

9.7 Ergebnisse der Versuche

In den folgenden Tabellen (Tab. 9.10 bis 9.105) sind die Mittelwerte (\bar{x}) der gemessenen Parameter sowie deren Standardabweichungen (s) und Signifikanzen der Differenzen dargestellt (p).

Die Reihenfolge der Tabellen entspricht innerhalb einer Laufgruppe (s. Tab. 4.1) folgender Ordnung:

- Ammoniakkonzentration in der Fermenterflüssigkeit
- Gehalt bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit
- Konzentrationen der fAS in der Fermenterflüssigkeit (Summe der gemessenen Konzentrationen der einzelnen fAS sowie der Konzentrationen der einzelnen fAS Aspartat, Glutamat, Serin, Histidin, Glycin, Threonin, Alanin, Arginin, Tyrosin, Valin, Methionin, Tryptophan, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin)
- Konzentrationen der biogene Amine Serotonin und Tyramin in der Fermenterflüssigkeit (nur Laufgruppen III, IV und V)

Den Tabellen 9.106 und 9.107 können die mittleren prozentualen Konzentrationsabweichungen einzelner fAS von der jeweiligen Kontrolle für Zulage- und Auslaufphase jedes einzelnen RUSITEC-Laufs entnommen werden (Läufe 2 bis 13 und Läufe 16 bis 18).

Die Tabellen 9.108 bis 9.117 zeigen die Ergebnisse der statistischen Analyse der fAS-Poolzusammensetzungen in der Fermenterflüssigkeit (s. Kap. 4.5).

Ferner werden folgende Abkürzungen genutzt:

K = Kontrollgrassilage

S = Schadgrassilage

Tab. 9.10: Ammoniakkonzentrationen in Laufgruppe I [mmol/L]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 1 | 6 | 7,45 | 2,07 | 6 | 6,05 | 1,60 | 6 | 6,04 | 1,35 | 0,141 | 0,207 |
| 2 | 6 | 7,84 | 0,88 | 6 | 7,20 | 0,92 | 6 | 8,01 | 2,80 | 0,282 | 0,881 |
| 3 | 6 | 6,95 | 1,24 | 6 | 6,69 | 0,66 | 6 | 6,99 | 1,13 | 0,600 | 0,956 |
| 4 | 6 | 8,15 | 0,96 | 6 | 7,79 | 1,18 | 6 | 8,83 | 0,81 | 0,468 | 0,168 |
| 5 | 6 | 8,56 | 0,89 | 6 | 8,29 | 0,60 | 6 | 8,78 | 1,25 | 0,404 | 0,739 |
| 6 | 6 | 8,72 | 0,75 | 6 | 8,55 | 1,22 | 6 | 8,07 | 0,90 | 0,754 | 0,310 |
| 7 | 6 | 9,55 | 1,70 | 6 | 8,15 | 1,52 | 6 | 8,25 | 0,78 | 0,043 | 0,066 |
| 8 | 6 | 8,27 | 0,35 | 6 | 7,99 | 0,72 | 6 | 8,14 | 0,48 | 0,306 | 0,713 |
| 9 | 6 | 8,28 | 0,58 | 6 | 8,30 | 1,43 | 6 | 8,85 | 1,25 | 0,968 | 0,295 |
| 10 | 6 | 10,1 | 0,47 | 6 | 10,9 | 0,91 | 6 | 12,3 | 2,24 | 0,198 | 0,094 |
| 11 | 6 | 11,1 | 0,47 | 6 | 12,6 | 0,55 | 6 | 17,1 | 0,73 | 0,008 | 0,000 |
| 12 | 6 | 9,38 | 1,31 | 6 | 11,4 | 1,41 | 6 | 17,1 | 3,08 | 0,000 | 0,002 |
| 13 | 6 | 9,87 | 0,37 | 6 | 12,5 | 2,29 | 5 | 20,3 | 2,92 | 0,053 | 0,002 |
| 14 | 6 | 11,0 | 1,45 | 6 | 14,1 | 0,83 | 6 | 21,4 | 4,18 | 0,001 | 0,001 |
| 15 | 6 | 10,6 | 1,20 | 6 | 14,1 | 1,91 | 6 | 19,9 | 2,42 | 0,028 | 0,000 |
| 16 | 6 | 10,8 | 2,09 | 6 | 14,3 | 1,13 | 6 | 20,5 | 4,94 | 0,009 | 0,007 |
| 17 | 6 | 10,2 | 1,76 | 6 | 15,3 | 1,77 | 6 | 21,7 | 3,40 | 0,001 | 0,000 |
| 18 | 6 | 10,4 | 0,78 | 6 | 14,0 | 1,03 | 6 | 21,3 | 1,51 | 0,000 | 0,000 |
| 19 | 6 | 10,5 | 2,23 | 6 | 14,6 | 4,63 | 6 | 18,2 | 3,80 | 0,040 | 0,003 |
| 20 | 6 | 11,0 | 2,05 | 6 | 12,8 | 2,22 | 6 | 18,6 | 2,70 | 0,177 | 0,000 |
| 21 | 6 | 10,8 | 4,07 | 6 | 12,1 | 4,05 | 6 | 15,9 | 4,31 | 0,257 | 0,009 |
| 22 | 6 | 8,86 | 1,66 | 6 | 9,73 | 2,77 | 6 | 10,9 | 3,06 | 0,367 | 0,157 |
| 23 | 6 | 8,15 | 1,72 | 6 | 7,93 | 0,99 | 6 | 8,06 | 1,15 | 0,799 | 0,913 |
| 24 | 6 | 7,39 | 1,34 | 6 | 7,06 | 1,30 | 6 | 6,67 | 0,75 | 0,664 | 0,196 |
| 25 | 6 | 8,01 | 1,84 | 6 | 6,55 | 1,84 | 6 | 6,62 | 1,74 | 0,087 | 0,181 |
| 26 | 6 | 9,05 | 1,55 | 6 | 8,49 | 1,74 | 6 | 7,60 | 1,43 | 0,402 | 0,102 |
| 27 | 6 | 7,70 | 2,06 | 6 | 6,64 | 1,87 | 6 | 6,55 | 2,66 | 0,071 | 0,221 |
| 28 | 6 | 7,78 | 0,78 | 6 | 7,19 | 0,72 | 6 | 6,41 | 0,82 | 0,157 | 0,000 |

Tab. 9.11: Gehalte bakteriellen Proteins in Laufgruppe I [$\mu\text{g RSA/mL}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 3 | 6 | 85,4 | 20,6 | 6 | 87,3 | 22,0 | 6 | 80,6 | 25,9 | 0,671 | 0,165 |
| 6 | 6 | 77,8 | 18,5 | 6 | 76,3 | 17,0 | 6 | 66,5 | 22,3 | 0,666 | 0,067 |
| 7 | 6 | 75,0 | 17,7 | 6 | 77,0 | 13,2 | 6 | 67,2 | 17,3 | 0,528 | 0,283 |
| 8 | 6 | 74,0 | 8,94 | 6 | 64,3 | 9,29 | 6 | 62,1 | 9,20 | 0,003 | 0,037 |
| 9 | 6 | 80,8 | 18,4 | 6 | 76,9 | 14,7 | 6 | 74,6 | 12,7 | 0,203 | 0,363 |
| 10 | 6 | 74,3 | 4,82 | 6 | 70,6 | 9,53 | 6 | 74,4 | 10,0 | 0,396 | 0,973 |
| 11 | 6 | 70,3 | 4,12 | 6 | 63,8 | 8,25 | 6 | 80,4 | 14,6 | 0,141 | 0,171 |
| 12 | 6 | 63,6 | 7,79 | 6 | 57,9 | 5,82 | 6 | 76,5 | 15,1 | 0,073 | 0,026 |
| 13 | 6 | 76,4 | 6,88 | 6 | 73,0 | 20,0 | 6 | 94,7 | 19,7 | 0,617 | 0,027 |
| 14 | 6 | 84,6 | 7,48 | 6 | 72,5 | 10,6 | 6 | 95,9 | 14,3 | 0,016 | 0,159 |
| 15 | 6 | 94,2 | 24,3 | 6 | 83,7 | 15,6 | 5 | 102 | 21,3 | 0,093 | 0,156 |
| 16 | 6 | 76,0 | 18,7 | 6 | 67,7 | 9,66 | 6 | 94,0 | 21,2 | 0,162 | 0,001 |
| 17 | 6 | 78,5 | 19,5 | 6 | 64,1 | 12,9 | 6 | 97,5 | 26,5 | 0,047 | 0,052 |
| 18 | 6 | 76,9 | 14,1 | 6 | 71,0 | 13,5 | 6 | 95,7 | 25,1 | 0,064 | 0,017 |
| 19 | 5 | 75,7 | 12,8 | 6 | 69,1 | 11,3 | 6 | 94,3 | 32,2 | 0,071 | 0,349 |
| 20 | 6 | 75,9 | 12,3 | 6 | 68,1 | 20,2 | 6 | 82,0 | 27,4 | 0,172 | 0,487 |
| 21 | 6 | 70,4 | 7,33 | 6 | 66,9 | 2,11 | 6 | 69,3 | 8,71 | 0,254 | 0,825 |
| 22 | 6 | 60,1 | 10,6 | 6 | 52,1 | 9,49 | 6 | 52,9 | 5,58 | 0,096 | 0,099 |
| 23 | 6 | 63,4 | 7,22 | 6 | 65,2 | 11,9 | 6 | 64,9 | 9,54 | 0,650 | 0,566 |
| 24 | 6 | 65,3 | 3,56 | 6 | 61,8 | 3,26 | 6 | 58,6 | 7,83 | 0,150 | 0,082 |
| 25 | 6 | 60,5 | 10,3 | 6 | 57,8 | 8,45 | 6 | 54,4 | 18,1 | 0,070 | 0,163 |
| 26 | 6 | 62,3 | 8,34 | 6 | 59,3 | 6,11 | 6 | 53,4 | 8,49 | 0,272 | 0,003 |
| 27 | 6 | 63,9 | 6,00 | 6 | 59,9 | 7,75 | 6 | 57,4 | 6,68 | 0,289 | 0,105 |
| 28 | 6 | 56,5 | 2,65 | 6 | 60,1 | 9,15 | 6 | 58,2 | 9,08 | 0,411 | 0,720 |

Tab. 9.12: Summe der Konzentrationen der messbaren fAS in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 6 | 35,7 | 2,96 | 6 | 34,4 | 6,24 | 6 | 34,0 | 5,09 | 0,680 | 0,487 |
| 8 | 6 | 34,3 | 6,15 | 6 | 30,9 | 3,43 | 6 | 36,9 | 5,37 | 0,397 | 0,581 |
| 11 | 6 | 39,7 | 5,32 | 6 | 43,6 | 3,38 | 6 | 63,1 | 12,3 | 0,119 | 0,002 |
| 12 | 6 | 39,6 | 9,22 | 6 | 38,4 | 8,76 | 6 | 58,4 | 5,40 | 0,521 | 0,002 |
| 13 | 6 | 38,6 | 6,55 | 6 | 37,5 | 4,48 | 6 | 58,4 | 10,4 | 0,775 | 0,002 |
| 16 | 6 | 36,6 | 3,74 | 6 | 45,0 | 10,1 | 6 | 63,2 | 9,98 | 0,084 | 0,001 |
| 17 | 6 | 47,6 | 7,73 | 6 | 46,3 | 9,56 | 6 | 73,9 | 13,9 | 0,821 | 0,002 |
| 18 | 6 | 47,3 | 6,62 | 6 | 44,8 | 10,2 | 6 | 72,3 | 4,41 | 0,567 | 0,001 |
| 19 | 6 | 56,3 | 12,5 | 6 | 51,2 | 11,9 | 6 | 82,7 | 16,2 | 0,247 | 0,045 |
| 20 | 6 | 38,7 | 5,69 | 6 | 57,7 | 19,4 | 6 | 67,7 | 19,6 | 0,040 | 0,005 |
| 21 | 5 | 31,4 | 4,81 | 6 | 33,0 | 4,49 | 6 | 37,6 | 6,43 | 0,869 | 0,128 |
| 26 | 6 | 33,1 | 3,41 | 6 | 34,4 | 5,41 | 6 | 28,3 | 3,85 | 0,703 | 0,142 |
| 27 | 4 | 34,7 | 3,17 | 4 | 36,7 | 4,74 | 4 | 38,8 | 1,96 | 0,629 | 0,016 |
| 28 | 6 | 37,1 | 3,77 | 6 | 39,3 | 8,19 | 6 | 36,0 | 6,41 | 0,527 | 0,733 |

Tab. 9.13: Aspartatkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 6 | 6,30 | 2,46 | 6 | 6,09 | 3,00 | 6 | 6,03 | 3,22 | 0,672 | 0,574 |
| 8 | 6 | 4,92 | 1,08 | 6 | 3,95 | 0,83 | 6 | 6,52 | 3,18 | 0,146 | 0,236 |
| 11 | 6 | 4,96 | 1,69 | 6 | 5,08 | 0,82 | 6 | 10,3 | 3,41 | 0,868 | 0,001 |
| 12 | 6 | 4,70 | 1,63 | 6 | 4,29 | 1,86 | 6 | 10,1 | 3,64 | 0,438 | 0,002 |
| 13 | 6 | 4,65 | 1,91 | 6 | 5,89 | 3,59 | 6 | 15,0 | 6,69 | 0,143 | 0,004 |
| 16 | 6 | 4,20 | 1,20 | 6 | 4,68 | 1,16 | 5 | 8,68 | 2,54 | 0,426 | 0,004 |
| 17 | 6 | 5,19 | 2,01 | 6 | 5,38 | 1,47 | 6 | 14,0 | 6,02 | 0,836 | 0,006 |
| 18 | 6 | 4,68 | 0,94 | 5 | 6,23 | 4,61 | 5 | 12,1 | 4,34 | 0,387 | 0,023 |
| 19 | 6 | 6,17 | 2,33 | 6 | 4,53 | 1,07 | 6 | 12,2 | 2,66 | 0,122 | 0,022 |
| 20 | 6 | 3,95 | 0,51 | 5 | 5,44 | 1,57 | 5 | 9,11 | 3,66 | 0,084 | 0,032 |
| 21 | 5 | 3,64 | 0,90 | 6 | 3,22 | 1,15 | 6 | 4,79 | 2,42 | 0,298 | 0,605 |
| 26 | 6 | 4,62 | 0,73 | 6 | 4,29 | 1,64 | 6 | 3,56 | 0,65 | 0,644 | 0,050 |
| 27 | 6 | 4,46 | 0,90 | 6 | 4,48 | 0,96 | 6 | 4,77 | 0,95 | 0,976 | 0,567 |
| 28 | 6 | 4,25 | 0,33 | 6 | 4,99 | 1,75 | 6 | 4,97 | 1,04 | 0,389 | 0,156 |

Tab. 9.14: Glutamatkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 6 | 14,1 | 2,51 | 6 | 15,1 | 3,64 | 6 | 14,3 | 3,16 | 0,552 | 0,836 |
| 8 | 6 | 14,4 | 1,88 | 6 | 12,7 | 1,75 | 6 | 16,3 | 5,29 | 0,181 | 0,524 |
| 11 | 6 | 17,7 | 5,47 | 6 | 21,5 | 4,27 | 6 | 25,4 | 9,59 | 0,177 | 0,049 |
| 12 | 6 | 19,7 | 6,71 | 6 | 18,4 | 7,42 | 5 | 20,5 | 2,95 | 0,440 | 0,530 |
| 13 | 4 | 18,1 | 2,57 | 4 | 17,6 | 1,19 | 4 | 23,0 | 1,63 | 0,700 | 0,028 |
| 16 | 6 | 17,5 | 2,03 | 6 | 19,5 | 4,39 | 6 | 23,9 | 5,75 | 0,254 | 0,037 |
| 17 | 6 | 21,3 | 3,08 | 6 | 20,8 | 4,67 | 6 | 28,7 | 6,24 | 0,808 | 0,027 |
| 18 | 6 | 21,4 | 3,58 | 6 | 19,6 | 3,56 | 6 | 28,9 | 7,43 | 0,182 | 0,020 |
| 19 | 6 | 25,5 | 5,61 | 6 | 22,3 | 5,92 | 6 | 32,3 | 10,7 | 0,423 | 0,286 |
| 20 | 6 | 17,5 | 5,05 | 6 | 26,0 | 11,0 | 6 | 28,5 | 12,1 | 0,047 | 0,017 |
| 21 | 5 | 14,8 | 2,13 | 6 | 13,6 | 2,49 | 6 | 15,8 | 1,67 | 0,571 | 0,663 |
| 26 | 6 | 15,1 | 1,71 | 6 | 17,0 | 3,88 | 6 | 13,4 | 1,25 | 0,417 | 0,176 |
| 27 | 6 | 18,9 | 3,59 | 6 | 17,5 | 2,13 | 6 | 17,0 | 2,88 | 0,469 | 0,415 |
| 28 | 6 | 17,0 | 1,25 | 6 | 18,7 | 3,82 | 6 | 17,7 | 2,28 | 0,443 | 0,612 |

Tab. 9.15: Serinkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 5 | 2,16 | 0,90 | 6 | 1,72 | 0,50 | 6 | 1,66 | 0,79 | 0,094 | 0,014 |
| 8 | 6 | 2,31 | 0,99 | 6 | 1,91 | 0,31 | 6 | 2,11 | 0,96 | 0,434 | 0,618 |
| 11 | 5 | 1,54 | 0,40 | 6 | 2,24 | 0,64 | 6 | 2,19 | 0,61 | 0,025 | 0,029 |
| 12 | 6 | 1,52 | 0,28 | 6 | 1,83 | 0,51 | 6 | 2,61 | 0,88 | 0,301 | 0,045 |
| 13 | 6 | 2,11 | 0,88 | 6 | 1,85 | 1,02 | 6 | 2,97 | 1,18 | 0,266 | 0,020 |
| 16 | 6 | 1,43 | 0,32 | 6 | 2,16 | 0,70 | 6 | 3,59 | 1,80 | 0,045 | 0,051 |
| 17 | 6 | 2,51 | 0,70 | 6 | 1,99 | 0,23 | 6 | 2,86 | 0,24 | 0,154 | 0,318 |
| 18 | 6 | 2,02 | 0,49 | 6 | 2,29 | 0,88 | 6 | 3,94 | 1,73 | 0,609 | 0,039 |
| 19 | 6 | 1,99 | 0,52 | 6 | 2,60 | 2,27 | 5 | 3,77 | 2,03 | 0,449 | 0,172 |
| 20 | 6 | 1,65 | 0,39 | 6 | 2,85 | 1,89 | 6 | 3,31 | 1,52 | 0,213 | 0,067 |
| 21 | 5 | 1,15 | 0,25 | 6 | 1,72 | 0,62 | 6 | 1,56 | 0,61 | 0,076 | 0,180 |
| 26 | 6 | 1,46 | 1,11 | 6 | 1,04 | 0,42 | 6 | 1,03 | 0,32 | 0,390 | 0,313 |
| 27 | 6 | 1,28 | 0,43 | 6 | 1,52 | 0,52 | 6 | 1,60 | 0,80 | 0,237 | 0,275 |
| 28 | 6 | 1,58 | 0,21 | 6 | 1,79 | 0,62 | 6 | 1,60 | 0,55 | 0,384 | 0,880 |

Tab. 9.16: Histidinkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 6 | 0,93 | 0,21 | 6 | 0,74 | 0,16 | 6 | 0,81 | 0,12 | 0,014 | 0,189 |
| 8 | 6 | 1,11 | 0,36 | 6 | 0,81 | 0,07 | 6 | 0,94 | 0,15 | 0,096 | 0,263 |
| 11 | 6 | 1,67 | 0,83 | 6 | 1,12 | 0,26 | 5 | 4,19 | 1,29 | 0,127 | 0,015 |
| 12 | 6 | 1,55 | 0,62 | 6 | 0,90 | 0,12 | 6 | 5,14 | 1,28 | 0,034 | 0,001 |
| 13 | 6 | 2,57 | 0,84 | 6 | 1,22 | 0,49 | 6 | 4,45 | 1,34 | 0,036 | 0,006 |
| 16 | 6 | 1,51 | 1,07 | 6 | 1,45 | 0,63 | 6 | 4,54 | 1,41 | 0,919 | 0,003 |
| 17 | 6 | 1,59 | 0,80 | 6 | 1,27 | 0,30 | 6 | 3,85 | 2,08 | 0,395 | 0,010 |
| 18 | 6 | 2,27 | 1,26 | 6 | 1,57 | 0,95 | 5 | 5,53 | 1,29 | 0,413 | 0,000 |
| 19 | 6 | 1,85 | 0,48 | 6 | 1,52 | 0,64 | 5 | 4,92 | 1,60 | 0,337 | 0,011 |
| 20 | 6 | 1,12 | 0,27 | 6 | 1,55 | 0,58 | 6 | 3,74 | 1,92 | 0,201 | 0,028 |
| 21 | 5 | 0,95 | 0,22 | 6 | 0,91 | 0,15 | 6 | 1,74 | 0,65 | 0,593 | 0,030 |
| 26 | 6 | 0,79 | 0,08 | 6 | 1,35 | 0,94 | 6 | 0,89 | 0,10 | 0,200 | 0,026 |
| 27 | 6 | 1,12 | 0,23 | 6 | 1,10 | 0,26 | 6 | 1,09 | 0,10 | 0,921 | 0,811 |
| 28 | 6 | 1,03 | 0,16 | 6 | 1,25 | 0,32 | 6 | 1,03 | 0,17 | 0,065 | 0,985 |

Tab. 9.17: Glycinkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 6 | 4,18 | 1,60 | 6 | 3,25 | 0,38 | 6 | 3,26 | 0,66 | 0,211 | 0,159 |
| 8 | 6 | 3,72 | 0,96 | 6 | 3,35 | 0,45 | 6 | 3,24 | 0,96 | 0,529 | 0,094 |
| 11 | 6 | 4,66 | 1,90 | 6 | 4,58 | 0,68 | 6 | 7,62 | 2,20 | 0,913 | 0,023 |
| 12 | 6 | 3,83 | 0,64 | 6 | 4,14 | 0,53 | 6 | 8,45 | 3,25 | 0,107 | 0,022 |
| 13 | 6 | 5,66 | 1,56 | 6 | 5,75 | 3,38 | 4 | 7,58 | 1,48 | 0,920 | 0,016 |
| 16 | 6 | 3,95 | 0,58 | 6 | 6,10 | 2,54 | 6 | 10,96 | 8,62 | 0,069 | 0,106 |
| 17 | 6 | 5,54 | 1,37 | 6 | 5,84 | 1,54 | 6 | 8,32 | 1,78 | 0,742 | 0,025 |
| 18 | 6 | 5,88 | 0,93 | 5 | 6,08 | 2,12 | 5 | 8,34 | 1,44 | 0,866 | 0,006 |
| 19 | 6 | 7,14 | 1,62 | 6 | 6,60 | 2,52 | 6 | 10,66 | 2,55 | 0,483 | 0,061 |
| 20 | 6 | 4,24 | 0,83 | 6 | 7,18 | 2,71 | 6 | 7,30 | 2,70 | 0,058 | 0,043 |
| 21 | 5 | 3,17 | 0,70 | 6 | 3,73 | 0,82 | 6 | 3,91 | 1,34 | 0,181 | 0,272 |
| 26 | 6 | 2,77 | 0,90 | 6 | 2,67 | 0,57 | 6 | 2,50 | 0,48 | 0,834 | 0,548 |
| 27 | 6 | 2,96 | 0,46 | 6 | 3,19 | 0,45 | 6 | 3,21 | 0,52 | 0,125 | 0,492 |
| 28 | 6 | 3,33 | 0,40 | 6 | 3,63 | 0,69 | 6 | 3,57 | 0,66 | 0,236 | 0,422 |

Tab. 9.18: Threoninkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 6 | 1,10 | 0,50 | 6 | 0,83 | 0,09 | 6 | 0,87 | 0,20 | 0,193 | 0,188 |
| 8 | 6 | 0,98 | 0,39 | 6 | 0,96 | 0,09 | 4 | 1,12 | 0,16 | 0,884 | 0,784 |
| 11 | 5 | 1,39 | 0,42 | 4 | 1,45 | 0,16 | 6 | 1,93 | 0,95 | 0,252 | 0,122 |
| 12 | 4 | 1,28 | 0,44 | 4 | 1,19 | 0,25 | 6 | 2,80 | 0,59 | 0,547 | 0,023 |
| 13 | 6 | 1,49 | 0,19 | 6 | 1,77 | 0,84 | 6 | 3,16 | 1,03 | 0,481 | 0,017 |
| 16 | 6 | 1,07 | 0,28 | 6 | 1,39 | 0,26 | 5 | 2,51 | 0,49 | 0,043 | 0,003 |
| 17 | 6 | 1,44 | 0,34 | 5 | 1,22 | 0,08 | 5 | 2,46 | 0,40 | 0,158 | 0,002 |
| 18 | 6 | 1,53 | 0,35 | 6 | 1,57 | 0,49 | 6 | 3,21 | 0,71 | 0,882 | 0,000 |
| 19 | 6 | 1,71 | 0,49 | 6 | 1,84 | 0,95 | 6 | 3,50 | 0,97 | 0,627 | 0,001 |
| 20 | 6 | 1,20 | 0,20 | 6 | 2,08 | 0,91 | 6 | 2,14 | 0,66 | 0,061 | 0,034 |
| 21 | 5 | 0,96 | 0,25 | 6 | 1,10 | 0,21 | 6 | 1,25 | 0,20 | 0,349 | 0,007 |
| 26 | 6 | 1,13 | 0,36 | 6 | 0,92 | 0,16 | 6 | 0,97 | 0,28 | 0,128 | 0,156 |
| 27 | 6 | 1,17 | 0,35 | 6 | 1,09 | 0,12 | 6 | 1,23 | 0,19 | 0,632 | 0,543 |
| 28 | 6 | 1,19 | 0,47 | 6 | 1,58 | 0,62 | 6 | 1,34 | 0,29 | 0,022 | 0,257 |

Tab. 9.19: Alaninkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 6 | 3,82 | 0,97 | 6 | 3,48 | 0,97 | 6 | 3,73 | 1,33 | 0,517 | 0,834 |
| 8 | 5 | 3,97 | 1,24 | 6 | 3,75 | 1,07 | 6 | 3,76 | 0,65 | 0,931 | 0,613 |
| 11 | 6 | 3,77 | 1,32 | 6 | 3,26 | 0,46 | 6 | 5,01 | 1,21 | 0,465 | 0,147 |
| 12 | 6 | 3,14 | 0,99 | 6 | 2,93 | 0,60 | 6 | 4,28 | 1,20 | 0,433 | 0,016 |
| 13 | 6 | 4,39 | 2,97 | 6 | 3,84 | 3,29 | 6 | 4,72 | 0,81 | 0,771 | 0,805 |
| 16 | 6 | 3,13 | 1,44 | 6 | 4,26 | 1,58 | 5 | 4,21 | 0,53 | 0,089 | 0,309 |
| 17 | 6 | 4,43 | 0,80 | 6 | 4,27 | 1,41 | 6 | 4,97 | 0,69 | 0,782 | 0,010 |
| 18 | 6 | 4,04 | 1,98 | 6 | 4,91 | 2,70 | 6 | 4,81 | 1,10 | 0,115 | 0,146 |
| 19 | 6 | 6,29 | 3,48 | 6 | 4,79 | 1,19 | 6 | 6,28 | 2,03 | 0,228 | 0,996 |
| 20 | 6 | 4,38 | 1,58 | 6 | 6,92 | 4,10 | 6 | 6,02 | 3,38 | 0,079 | 0,152 |
| 21 | 5 | 3,42 | 1,06 | 6 | 3,71 | 0,59 | 6 | 3,28 | 0,64 | 0,263 | 0,561 |
| 26 | 6 | 3,68 | 0,88 | 6 | 3,30 | 1,20 | 6 | 2,57 | 0,43 | 0,243 | 0,046 |
| 27 | 6 | 3,44 | 0,47 | 6 | 3,33 | 0,69 | 6 | 2,72 | 0,49 | 0,763 | 0,069 |
| 28 | 6 | 3,21 | 0,69 | 6 | 3,57 | 1,12 | 6 | 2,99 | 0,68 | 0,157 | 0,064 |

Tab. 9.20: Argininkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 6 | 1,88 | 0,48 | 6 | 1,83 | 0,31 | 6 | 1,86 | 0,28 | 0,804 | 0,919 |
| 8 | 6 | 2,05 | 0,64 | 6 | 1,64 | 0,28 | 6 | 2,04 | 0,57 | 0,180 | 0,977 |
| 11 | 6 | 2,53 | 0,64 | 6 | 3,22 | 0,38 | 6 | 4,12 | 0,87 | 0,120 | 0,017 |
| 12 | 6 | 2,30 | 0,53 | 6 | 2,75 | 0,52 | 6 | 4,03 | 0,76 | 0,173 | 0,010 |
| 13 | 6 | 2,79 | 0,54 | 6 | 3,14 | 0,61 | 6 | 4,15 | 0,58 | 0,390 | 0,001 |
| 16 | 6 | 2,09 | 0,54 | 6 | 2,43 | 0,68 | 6 | 3,81 | 0,96 | 0,167 | 0,011 |
| 17 | 6 | 3,02 | 0,26 | 6 | 2,76 | 0,41 | 6 | 5,28 | 1,19 | 0,187 | 0,007 |
| 18 | 6 | 3,46 | 0,31 | 4 | 3,09 | 1,26 | 6 | 5,56 | 0,99 | 0,687 | 0,008 |
| 19 | 6 | 3,92 | 0,98 | 6 | 3,19 | 1,23 | 6 | 5,84 | 1,50 | 0,039 | 0,055 |
| 20 | 6 | 2,13 | 0,47 | 6 | 3,46 | 1,04 | 6 | 5,17 | 0,82 | 0,037 | 0,002 |
| 21 | 5 | 1,83 | 0,59 | 6 | 2,63 | 0,86 | 6 | 2,77 | 0,64 | 0,172 | 0,043 |
| 26 | 6 | 1,97 | 0,52 | 6 | 2,59 | 0,47 | 6 | 2,14 | 0,72 | 0,160 | 0,696 |
| 27 | 6 | 2,56 | 0,63 | 6 | 2,52 | 0,73 | 6 | 2,72 | 0,57 | 0,921 | 0,663 |
| 28 | 6 | 2,27 | 0,73 | 6 | 3,04 | 0,91 | 6 | 3,41 | 0,82 | 0,022 | 0,111 |

Tab. 9.21: Tyrosinkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 5 | 0,36 | 0,13 | 6 | 0,28 | 0,07 | 6 | 0,38 | 0,18 | 0,349 | 0,811 |
| 8 | 6 | 0,37 | 0,07 | 6 | 0,28 | 0,15 | 4 | 0,30 | 0,03 | 0,095 | 0,148 |
| 11 | 5 | 0,39 | 0,18 | 4 | 0,33 | 0,04 | 5 | 0,60 | 0,19 | 0,593 | 0,009 |
| 12 | 6 | 0,34 | 0,12 | 6 | 0,39 | 0,15 | 6 | 0,78 | 0,55 | 0,435 | 0,116 |
| 13 | 6 | 0,42 | 0,17 | 5 | 0,42 | 0,25 | 6 | 1,08 | 0,80 | 0,639 | 0,057 |
| 16 | 5 | 0,38 | 0,21 | 6 | 0,47 | 0,28 | 5 | 1,07 | 1,18 | 0,069 | 0,235 |
| 17 | 6 | 0,47 | 0,14 | 6 | 0,50 | 0,42 | 6 | 0,85 | 0,44 | 0,817 | 0,046 |
| 18 | 4 | 0,40 | 0,10 | 4 | 0,66 | 0,53 | 6 | 0,59 | 0,19 | 0,339 | 0,014 |
| 19 | 5 | 0,48 | 0,19 | 6 | 0,49 | 0,22 | 4 | 0,92 | 0,63 | 0,361 | 0,250 |
| 20 | 5 | 0,35 | 0,10 | 6 | 0,59 | 0,30 | 6 | 0,68 | 0,39 | 0,240 | 0,038 |
| 21 | 3 | 0,25 | 0,04 | 6 | 0,35 | 0,10 | 4 | 0,30 | 0,08 | 0,082 | 0,488 |
| 26 | 5 | 0,26 | 0,09 | 5 | 0,32 | 0,12 | 3 | 0,24 | 0,09 | 0,745 | 0,975 |
| 27 | 6 | 0,33 | 0,18 | 6 | 0,37 | 0,15 | 5 | 0,30 | 0,03 | 0,598 | 0,977 |
| 28 | 4 | 0,27 | 0,06 | 6 | 0,36 | 0,10 | 4 | 0,26 | 0,04 | 0,326 | 0,876 |

Tab. 9.22: Valinkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 5 | 0,99 | 0,21 | 6 | 0,93 | 0,32 | 6 | 0,82 | 0,17 | 0,983 | 0,139 |
| 8 | 6 | 0,93 | 0,19 | 6 | 0,98 | 0,57 | 4 | 0,93 | 0,05 | 0,843 | 0,753 |
| 11 | 5 | 1,35 | 0,78 | 4 | 1,34 | 0,22 | 5 | 1,96 | 0,36 | 0,029 | 0,372 |
| 12 | 6 | 1,04 | 0,51 | 6 | 1,14 | 0,51 | 6 | 2,06 | 0,74 | 0,517 | 0,027 |
| 13 | 6 | 1,66 | 0,82 | 4 | 1,96 | 1,25 | 4 | 2,20 | 0,44 | 0,358 | 0,040 |
| 16 | 6 | 0,94 | 0,24 | 6 | 1,68 | 0,69 | 5 | 1,92 | 0,37 | 0,063 | 0,012 |
| 17 | 6 | 1,26 | 0,23 | 6 | 1,74 | 0,81 | 6 | 1,94 | 0,56 | 0,221 | 0,013 |
| 18 | 6 | 0,98 | 0,46 | 5 | 1,53 | 0,99 | 6 | 2,00 | 0,94 | 0,123 | 0,027 |
| 19 | 5 | 1,15 | 0,62 | 6 | 2,01 | 0,65 | 4 | 2,76 | 0,34 | 0,013 | 0,001 |
| 20 | 6 | 1,09 | 0,51 | 4 | 1,50 | 1,20 | 5 | 1,88 | 1,21 | 0,187 | 0,088 |
| 21 | 5 | 0,64 | 0,24 | 6 | 0,77 | 0,28 | 6 | 0,88 | 0,37 | 0,092 | 0,069 |
| 26 | 6 | 0,47 | 0,15 | 6 | 0,75 | 0,19 | 5 | 0,76 | 0,31 | 0,025 | 0,194 |
| 27 | 6 | 0,71 | 0,13 | 6 | 0,91 | 0,11 | 6 | 0,87 | 0,19 | 0,006 | 0,187 |
| 28 | 6 | 0,69 | 0,16 | 6 | 0,81 | 0,23 | 6 | 0,68 | 0,13 | 0,339 | 0,901 |

Tab. 9.23: Methioninkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 1 | 0,18 | | 1 | 0,16 | | 2 | 0,16 | 0,01 | | |
| 8 | 1 | 0,16 | | | | | 1 | 0,26 | | | |
| 11 | 3 | 0,24 | 0,02 | 4 | 0,28 | 0,05 | 3 | 0,38 | 0,20 | 0,591 | 0,321 |
| 12 | 3 | 0,35 | 0,04 | 4 | 0,36 | 0,12 | 4 | 0,40 | 0,09 | 0,994 | 0,383 |
| 13 | 3 | 0,28 | 0,06 | 4 | 0,41 | 0,25 | 3 | 0,48 | 0,08 | 0,812 | 0,011 |
| 16 | 3 | 0,30 | 0,08 | 4 | 0,38 | 0,09 | 3 | 0,52 | 0,16 | 0,133 | 0,080 |
| 17 | 4 | 0,44 | 0,22 | 4 | 0,45 | 0,13 | 4 | 0,77 | 0,51 | 0,985 | 0,162 |
| 18 | 5 | 0,35 | 0,11 | 4 | 0,41 | 0,14 | 4 | 0,69 | 0,17 | 0,688 | 0,015 |
| 19 | 2 | 0,37 | 0,05 | 5 | 0,38 | 0,14 | 4 | 0,51 | 0,07 | 0,599 | 0,115 |
| 20 | 4 | 0,50 | 0,32 | 4 | 0,52 | 0,18 | 4 | 0,71 | 0,54 | 0,855 | 0,180 |
| 21 | 1 | 0,52 | | 3 | 0,50 | 0,24 | 4 | 0,42 | 0,24 | | |
| 26 | 4 | 0,44 | 0,20 | 1 | 0,21 | | 4 | 0,17 | 0,05 | | 0,046 |
| 27 | 2 | 0,47 | 0,08 | 1 | 0,16 | | 3 | 0,18 | 0,08 | | 0,047 |
| 28 | 2 | 0,58 | 0,01 | 3 | 0,65 | 0,34 | 3 | 0,31 | 0,14 | 0,193 | 0,285 |

Tab. 9.24: Tryptophankonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 1 | 0,37 | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | |
| 11 | 1 | 0,25 | | 1 | 0,21 | | 2 | 0,31 | 0,03 | | |
| 12 | | | | | | | 2 | 0,25 | 0,09 | | |
| 13 | | | | | | | 2 | 0,21 | 0,02 | | |
| 16 | | | | | | | 3 | 0,25 | 0,08 | | |
| 17 | | | | | | | 1 | 0,22 | | | |
| 18 | 1 | 0,33 | | | | | 2 | 0,64 | 0,04 | | |
| 19 | | | | 1 | 0,24 | | 5 | 0,50 | 0,14 | | |
| 20 | 1 | 0,22 | | 3 | 0,19 | 0,08 | 3 | 0,25 | 0,04 | | |
| 21 | 2 | 0,14 | 0,02 | 3 | 0,19 | 0,05 | 4 | 0,19 | 0,03 | | 0,176 |
| 26 | 2 | 0,13 | 0,00 | | | | 1 | 0,12 | | | |
| 27 | 1 | 0,13 | | 2 | 0,28 | 0,23 | 1 | 0,17 | | | |
| 28 | | | | | | | | | | | |

Tab. 9.25: Phenylalaninkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 2 | 0,48 | 0,36 | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | 1 | 0,18 | | | |
| 11 | | | | | | | 4 | 0,24 | 0,01 | | |
| 12 | 1 | 0,20 | | 1 | 0,20 | | 3 | 0,28 | 0,05 | | |
| 13 | | | | | | | 2 | 0,25 | 0,02 | | |
| 16 | | | | 1 | 0,19 | | 2 | 0,29 | 0,04 | | |
| 17 | | | | | | | 2 | 0,33 | 0,02 | | |
| 18 | 1 | 0,30 | | 1 | 0,32 | | 2 | 0,75 | 0,13 | | |
| 19 | | | | 3 | 0,30 | 0,10 | 5 | 0,34 | 0,09 | | |
| 20 | 3 | 0,41 | 0,28 | 3 | 0,36 | 0,09 | 4 | 0,34 | 0,11 | 0,833 | 0,772 |
| 21 | 3 | 0,20 | 0,05 | 4 | 0,33 | 0,21 | 4 | 0,30 | 0,07 | 0,225 | 0,037 |
| 26 | 4 | 0,16 | 0,06 | | | | 2 | 0,16 | 0,06 | | 0,253 |
| 27 | 2 | 0,15 | 0,01 | 1 | 0,11 | | 1 | 0,12 | | | |
| 28 | | | | 2 | 0,25 | 0,04 | | | | | |

Tab. 9.26: Isoleucinkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 3 | 0,35 | 0,20 | 2 | 0,20 | 0,01 | 2 | 0,20 | 0,01 | 0,334 | 0,459 |
| 8 | 3 | 0,20 | 0,03 | 4 | 0,32 | 0,27 | 3 | 0,22 | 0,05 | 0,425 | 0,924 |
| 11 | 3 | 0,26 | 0,05 | 4 | 0,31 | 0,06 | 3 | 0,36 | 0,07 | 0,522 | 0,092 |
| 12 | 2 | 0,38 | 0,12 | 4 | 0,25 | 0,13 | 3 | 0,38 | 0,04 | 0,404 | 0,894 |
| 13 | 4 | 0,30 | 0,03 | 2 | 0,29 | 0,08 | 2 | 0,39 | 0,01 | 0,973 | 0,013 |
| 16 | 3 | 0,22 | 0,08 | 3 | 0,34 | 0,17 | 2 | 0,45 | 0,09 | 0,050 | 0,036 |
| 17 | 4 | 0,28 | 0,10 | 2 | 0,39 | 0,01 | 2 | 0,51 | 0,04 | 0,570 | 0,115 |
| 18 | 3 | 0,29 | 0,11 | 4 | 0,33 | 0,13 | 2 | 0,88 | 0,06 | 0,389 | 0,087 |
| 19 | 2 | 0,36 | 0,03 | 5 | 0,45 | 0,21 | 5 | 0,53 | 0,25 | 0,185 | 0,250 |
| 20 | 4 | 0,42 | 0,16 | 4 | 0,61 | 0,20 | 3 | 0,46 | 0,16 | 0,075 | 0,227 |
| 21 | 3 | 0,33 | 0,12 | 4 | 0,48 | 0,10 | 4 | 0,50 | 0,11 | 0,033 | 0,005 |
| 26 | 4 | 0,34 | 0,11 | 1 | 0,23 | | 3 | 0,28 | 0,04 | | 0,820 |
| 27 | 3 | 0,29 | 0,09 | 3 | 0,22 | 0,09 | 4 | 0,24 | 0,05 | 0,492 | 0,725 |
| 28 | 4 | 0,22 | 0,03 | 4 | 0,32 | 0,11 | 3 | 0,26 | 0,08 | 0,081 | 0,561 |

Tab. 9.27: Leucinkonzentrationen in Laufgruppe I [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S02 | | | Zulage S04 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S02 | K01/S04 |
| 7 | 2 | 0,25 | 0,02 | 2 | 0,26 | 0,00 | 2 | 0,24 | 0,01 | 0,430 | 0,662 |
| 8 | 2 | 0,24 | 0,02 | 4 | 0,59 | 0,34 | 3 | 0,38 | 0,21 | 0,052 | 0,647 |
| 11 | 3 | 0,31 | 0,04 | 2 | 0,45 | 0,03 | 3 | 0,71 | 0,22 | 0,263 | 0,079 |
| 12 | 4 | 0,46 | 0,09 | 4 | 0,52 | 0,06 | 3 | 0,78 | 0,17 | 0,216 | 0,165 |
| 13 | 4 | 0,60 | 0,18 | 4 | 0,35 | 0,08 | 3 | 0,92 | 0,25 | 0,134 | 0,011 |
| 16 | 3 | 0,40 | 0,05 | 4 | 0,58 | 0,23 | 3 | 0,89 | 0,04 | 0,208 | 0,002 |
| 17 | 4 | 0,50 | 0,07 | 3 | 0,62 | 0,04 | 2 | 0,94 | 0,02 | 0,004 | 0,024 |
| 18 | 4 | 0,35 | 0,13 | 4 | 0,47 | 0,11 | 3 | 0,92 | 0,49 | 0,209 | 0,094 |
| 19 | 2 | 0,27 | 0,01 | 5 | 0,57 | 0,24 | 5 | 0,87 | 0,20 | 0,287 | 0,028 |
| 20 | 3 | 0,49 | 0,10 | 4 | 0,71 | 0,25 | 4 | 1,00 | 0,38 | 0,101 | 0,189 |
| 21 | 3 | 0,36 | 0,14 | 4 | 0,53 | 0,12 | 4 | 0,66 | 0,16 | 0,019 | 0,008 |
| 26 | 4 | 0,40 | 0,15 | 2 | 0,42 | 0,23 | 4 | 0,36 | 0,07 | 0,105 | 0,717 |
| 27 | 3 | 0,25 | 0,07 | 4 | 0,21 | 0,08 | 3 | 0,28 | 0,13 | 0,681 | 0,790 |
| 28 | 4 | 0,23 | 0,03 | 4 | 0,32 | 0,10 | 4 | 0,23 | 0,02 | 0,134 | 0,853 |

Tab. 9.28: Ammoniakkonzentrationen in Laufgruppe II [mmol/L]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 1 | 6 | 5,47 | 1,14 | 6 | 5,22 | 1,30 | 6 | 4,97 | 1,31 | 0,537 | 0,179 |
| 2 | 6 | 6,72 | 1,69 | 6 | 5,60 | 1,08 | 6 | 5,33 | 0,82 | 0,039 | 0,034 |
| 3 | 6 | 6,57 | 1,55 | 6 | 6,03 | 1,09 | 6 | 5,99 | 0,47 | 0,406 | 0,311 |
| 4 | 6 | 6,83 | 0,76 | 6 | 5,86 | 1,40 | 6 | 6,58 | 0,95 | 0,205 | 0,664 |
| 5 | 6 | 6,88 | 1,92 | 6 | 8,10 | 2,78 | 6 | 7,83 | 1,71 | 0,380 | 0,174 |
| 6 | 6 | 6,97 | 0,93 | 6 | 7,01 | 0,60 | 6 | 7,41 | 1,59 | 0,917 | 0,543 |
| 7 | 6 | 6,62 | 1,64 | 6 | 6,83 | 1,51 | 6 | 8,26 | 1,52 | 0,873 | 0,053 |
| 8 | 6 | 7,00 | 1,26 | 6 | 6,46 | 0,49 | 6 | 6,72 | 1,25 | 0,359 | 0,774 |
| 9 | 6 | 7,42 | 1,28 | 6 | 7,86 | 0,88 | 6 | 7,66 | 1,23 | 0,477 | 0,811 |
| 10 | 6 | 8,28 | 2,88 | 6 | 10,1 | 1,86 | 6 | 8,70 | 1,25 | 0,273 | 0,739 |
| 11 | 6 | 7,79 | 1,60 | 6 | 10,2 | 1,63 | 6 | 8,10 | 1,11 | 0,065 | 0,545 |
| 12 | 6 | 6,85 | 0,53 | 6 | 10,7 | 2,10 | 6 | 7,34 | 1,15 | 0,011 | 0,370 |
| 13 | 6 | 8,81 | 1,06 | 6 | 12,8 | 0,85 | 6 | 8,81 | 0,94 | 0,001 | 0,998 |
| 14 | 6 | 8,56 | 2,84 | 6 | 13,3 | 4,20 | 6 | 9,41 | 3,37 | 0,001 | 0,197 |
| 15 | 6 | 8,73 | 2,36 | 6 | 13,0 | 3,28 | 6 | 9,05 | 3,61 | 0,002 | 0,816 |
| 16 | 6 | 9,33 | 1,84 | 6 | 13,5 | 2,20 | 6 | 9,21 | 1,75 | 0,000 | 0,925 |
| 17 | 6 | 8,65 | 2,01 | 6 | 13,3 | 2,24 | 6 | 9,08 | 1,19 | 0,000 | 0,547 |
| 18 | 6 | 9,73 | 3,76 | 6 | 13,8 | 1,87 | 6 | 11,1 | 2,48 | 0,008 | 0,354 |
| 19 | 6 | 8,01 | 1,33 | 6 | 11,2 | 3,45 | 6 | 9,21 | 1,33 | 0,021 | 0,172 |
| 20 | 6 | 9,21 | 1,88 | 6 | 11,4 | 3,84 | 6 | 9,69 | 3,16 | 0,073 | 0,618 |
| 21 | 6 | 8,03 | 0,96 | 6 | 8,40 | 2,45 | 6 | 7,83 | 2,23 | 0,749 | 0,850 |
| 22 | 6 | 6,89 | 1,02 | 6 | 7,17 | 1,37 | 6 | 6,16 | 1,58 | 0,624 | 0,192 |
| 23 | 6 | 7,24 | 1,44 | 6 | 7,52 | 1,64 | 6 | 6,97 | 1,21 | 0,666 | 0,716 |
| 24 | 6 | 7,25 | 1,20 | 6 | 6,26 | 1,17 | 6 | 6,52 | 0,99 | 0,074 | 0,302 |
| 25 | 6 | 7,04 | 0,71 | 6 | 6,94 | 1,04 | 6 | 7,77 | 1,48 | 0,877 | 0,291 |
| 26 | 6 | 7,16 | 2,00 | 6 | 6,77 | 2,01 | 6 | 7,08 | 2,10 | 0,429 | 0,672 |
| 27 | 6 | 7,67 | 1,07 | 6 | 7,33 | 1,20 | 6 | 7,85 | 2,04 | 0,508 | 0,767 |
| 28 | 6 | 7,27 | 0,69 | 6 | 6,85 | 1,07 | 6 | 7,56 | 0,37 | 0,485 | 0,365 |

Tab. 9.29: Gehalte bakteriellen Proteins in Laufgruppe II [$\mu\text{g RSA/mL}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 3 | 6 | 50,9 | 13,5 | 6 | 50,9 | 14,8 | 6 | 44,6 | 9,41 | 0,978 | 0,042 |
| 6 | 6 | 46,9 | 2,57 | 6 | 45,5 | 2,19 | 6 | 40,2 | 2,30 | 0,437 | 0,006 |
| 7 | 6 | 50,4 | 5,42 | 6 | 47,2 | 4,61 | 6 | 43,8 | 4,99 | 0,196 | 0,064 |
| 8 | 6 | 46,8 | 5,58 | 6 | 41,8 | 4,81 | 6 | 43,6 | 4,07 | 0,096 | 0,205 |
| 9 | 6 | 50,8 | 5,50 | 6 | 46,8 | 8,40 | 6 | 42,4 | 5,84 | 0,188 | 0,008 |
| 10 | 6 | 50,3 | 18,1 | 6 | 55,3 | 5,79 | 6 | 54,0 | 6,55 | 0,497 | 0,570 |
| 11 | 6 | 71,7 | 12,1 | 6 | 75,8 | 7,51 | 6 | 77,1 | 6,90 | 0,212 | 0,388 |
| 12 | 6 | 72,0 | 11,9 | 6 | 81,7 | 6,94 | 6 | 75,4 | 7,19 | 0,115 | 0,194 |
| 13 | 6 | 81,5 | 16,0 | 6 | 88,0 | 15,8 | 6 | 81,7 | 11,7 | 0,027 | 0,974 |
| 14 | 6 | 87,2 | 21,1 | 6 | 101 | 23,3 | 6 | 79,6 | 14,4 | 0,020 | 0,124 |
| 15 | 6 | 84,2 | 16,9 | 6 | 93,1 | 10,9 | 6 | 87,5 | 8,40 | 0,020 | 0,471 |
| 16 | 6 | 81,6 | 24,0 | 6 | 90,9 | 15,9 | 6 | 84,0 | 13,9 | 0,097 | 0,647 |
| 17 | 6 | 76,5 | 21,6 | 6 | 83,9 | 11,3 | 6 | 83,8 | 17,7 | 0,180 | 0,041 |
| 18 | 6 | 78,9 | 27,5 | 6 | 88,2 | 16,1 | 6 | 85,2 | 20,0 | 0,164 | 0,134 |
| 19 | 6 | 78,5 | 25,8 | 6 | 90,9 | 17,3 | 6 | 92,3 | 25,4 | 0,185 | 0,009 |
| 20 | 6 | 69,6 | 17,7 | 6 | 74,5 | 14,4 | 6 | 73,0 | 13,6 | 0,556 | 0,422 |
| 21 | 6 | 80,7 | 18,9 | 6 | 77,1 | 17,0 | 6 | 74,1 | 16,2 | 0,092 | 0,054 |
| 22 | 6 | 59,1 | 15,8 | 6 | 52,3 | 10,3 | 6 | 49,8 | 6,36 | 0,203 | 0,199 |
| 23 | 6 | 62,0 | 15,6 | 6 | 63,5 | 11,3 | 6 | 66,9 | 17,9 | 0,765 | 0,283 |
| 24 | 6 | 56,1 | 8,74 | 6 | 55,0 | 6,24 | 6 | 47,6 | 9,35 | 0,713 | 0,008 |
| 25 | 6 | 65,0 | 12,7 | 6 | 59,1 | 10,7 | 6 | 54,7 | 10,2 | 0,126 | 0,065 |
| 26 | 6 | 62,2 | 7,87 | 6 | 63,0 | 5,04 | 6 | 59,4 | 7,61 | 0,733 | 0,546 |
| 27 | 6 | 64,3 | 11,4 | 6 | 61,7 | 12,1 | 6 | 54,5 | 11,9 | 0,152 | 0,031 |
| 28 | 6 | 65,4 | 11,5 | 6 | 63,7 | 5,64 | 6 | 56,9 | 2,86 | 0,732 | 0,077 |

Tab. 9.30: Summe der Konzentrationen der messbaren fAS in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 38,4 | 5,37 | 6 | 39,1 | 7,80 | 6 | 38,9 | 7,90 | 0,669 | 0,808 |
| 8 | 6 | 35,9 | 5,55 | 6 | 32,5 | 13,2 | 6 | 36,1 | 11,0 | 0,655 | 0,979 |
| 11 | 6 | 49,3 | 8,29 | 4 | 63,6 | 9,36 | 6 | 78,9 | 7,55 | 0,046 | 0,003 |
| 12 | 6 | 59,5 | 13,7 | 6 | 62,3 | 14,8 | 6 | 59,5 | 18,6 | 0,775 | 0,997 |
| 13 | 6 | 62,6 | 6,52 | 6 | 61,6 | 6,71 | 6 | 64,4 | 17,5 | 0,540 | 0,786 |
| 16 | 6 | 64,9 | 20,8 | 6 | 64,9 | 10,8 | 6 | 70,8 | 17,6 | 1,000 | 0,446 |
| 17 | 6 | 61,6 | 18,1 | 6 | 50,8 | 16,4 | 6 | 59,1 | 10,0 | 0,240 | 0,774 |
| 18 | 6 | 56,8 | 10,0 | 6 | 52,7 | 2,30 | 6 | 65,7 | 11,2 | 0,372 | 0,146 |
| 19 | 6 | 65,2 | 13,8 | 6 | 66,9 | 16,1 | 6 | 68,3 | 17,3 | 0,716 | 0,547 |
| 20 | 6 | 48,1 | 15,6 | 6 | 47,6 | 7,66 | 6 | 54,6 | 11,5 | 0,927 | 0,212 |
| 21 | 6 | 50,6 | 17,9 | 6 | 47,6 | 15,5 | 6 | 54,7 | 14,2 | 0,625 | 0,156 |
| 26 | 6 | 47,5 | 10,1 | 6 | 44,4 | 8,45 | 6 | 51,6 | 8,95 | 0,208 | 0,018 |
| 27 | 6 | 44,5 | 12,5 | 6 | 42,0 | 6,48 | 6 | 45,4 | 8,40 | 0,453 | 0,733 |
| 28 | 6 | 45,4 | 13,2 | 6 | 43,2 | 9,78 | 6 | 46,7 | 9,61 | 0,630 | 0,667 |

Tab. 9.31: Aspartatkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 5,55 | 1,12 | 6 | 6,40 | 1,64 | 6 | 6,26 | 1,07 | 0,201 | 0,032 |
| 8 | 6 | 5,09 | 1,01 | 4 | 6,92 | 1,30 | 6 | 5,27 | 2,33 | 0,038 | 0,889 |
| 11 | 6 | 6,97 | 1,78 | 4 | 9,17 | 2,95 | 6 | 10,1 | 1,82 | 0,255 | 0,076 |
| 12 | 6 | 7,16 | 1,35 | 6 | 7,77 | 1,78 | 6 | 6,88 | 2,59 | 0,536 | 0,827 |
| 13 | 6 | 8,83 | 2,31 | 5 | 8,24 | 1,39 | 5 | 10,3 | 4,27 | 0,989 | 0,501 |
| 16 | 6 | 7,46 | 2,47 | 6 | 8,20 | 1,54 | 6 | 8,22 | 1,67 | 0,408 | 0,328 |
| 17 | 6 | 6,57 | 2,32 | 5 | 6,99 | 1,44 | 6 | 6,46 | 0,87 | 0,680 | 0,933 |
| 18 | 6 | 6,38 | 1,82 | 6 | 6,58 | 0,69 | 6 | 8,28 | 2,86 | 0,838 | 0,222 |
| 19 | 6 | 6,76 | 1,59 | 6 | 8,48 | 2,01 | 6 | 8,09 | 1,94 | 0,096 | 0,137 |
| 20 | 6 | 5,25 | 1,95 | 6 | 6,24 | 1,17 | 6 | 7,83 | 2,42 | 0,320 | 0,018 |
| 21 | 6 | 6,59 | 2,58 | 5 | 7,44 | 1,23 | 6 | 7,03 | 1,71 | 0,577 | 0,432 |
| 26 | 6 | 7,17 | 1,75 | 6 | 6,98 | 1,02 | 5 | 7,81 | 1,65 | 0,763 | 0,193 |
| 27 | 6 | 5,98 | 2,10 | 6 | 5,93 | 1,24 | 6 | 6,54 | 1,66 | 0,929 | 0,282 |
| 28 | 6 | 6,18 | 2,41 | 6 | 6,11 | 1,55 | 6 | 6,50 | 2,17 | 0,923 | 0,576 |

Tab. 9.32: Glutamatkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 15,5 | 1,74 | 6 | 16,4 | 3,50 | 6 | 15,7 | 3,13 | 0,420 | 0,786 |
| 8 | 6 | 14,6 | 1,82 | 6 | 14,1 | 4,54 | 6 | 13,5 | 4,32 | 0,830 | 0,637 |
| 11 | 6 | 19,3 | 3,97 | 5 | 29,9 | 11,7 | 6 | 29,2 | 2,70 | 0,111 | 0,007 |
| 12 | 6 | 22,5 | 3,26 | 6 | 28,3 | 9,06 | 6 | 23,1 | 8,34 | 0,126 | 0,862 |
| 13 | 6 | 24,3 | 5,86 | 6 | 26,5 | 5,72 | 6 | 26,0 | 6,43 | 0,200 | 0,499 |
| 16 | 6 | 25,9 | 8,30 | 6 | 26,3 | 3,88 | 6 | 26,9 | 4,60 | 0,884 | 0,778 |
| 17 | 6 | 24,7 | 6,07 | 6 | 23,6 | 4,10 | 6 | 22,8 | 3,60 | 0,618 | 0,466 |
| 18 | 6 | 25,6 | 4,34 | 6 | 25,0 | 3,22 | 6 | 26,2 | 3,54 | 0,786 | 0,679 |
| 19 | 6 | 25,4 | 4,83 | 6 | 29,1 | 4,28 | 6 | 28,5 | 7,61 | 0,152 | 0,232 |
| 20 | 6 | 20,9 | 4,47 | 6 | 22,7 | 2,93 | 6 | 23,7 | 4,84 | 0,443 | 0,182 |
| 21 | 6 | 21,3 | 5,76 | 6 | 20,3 | 3,01 | 6 | 21,3 | 3,47 | 0,488 | 0,974 |
| 26 | 6 | 21,4 | 4,46 | 6 | 19,2 | 3,76 | 6 | 21,1 | 3,05 | 0,105 | 0,671 |
| 27 | 6 | 19,6 | 6,23 | 6 | 19,8 | 3,68 | 6 | 19,1 | 3,64 | 0,864 | 0,726 |
| 28 | 6 | 19,7 | 5,69 | 6 | 18,6 | 4,47 | 6 | 19,0 | 3,84 | 0,506 | 0,563 |

Tab. 9.33: Serinkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 1,69 | 0,40 | 6 | 1,61 | 0,22 | 6 | 1,53 | 0,50 | 0,699 | 0,579 |
| 8 | 6 | 2,55 | 1,44 | 6 | 1,58 | 0,90 | 6 | 2,40 | 1,78 | 0,263 | 0,891 |
| 11 | 6 | 3,92 | 2,70 | 4 | 4,80 | 2,61 | 6 | 5,20 | 1,43 | 0,931 | 0,320 |
| 12 | 6 | 4,11 | 2,82 | 6 | 2,76 | 1,17 | 6 | 3,31 | 1,26 | 0,337 | 0,497 |
| 13 | 6 | 2,99 | 0,53 | 6 | 3,08 | 0,93 | 5 | 4,08 | 1,86 | 0,747 | 0,190 |
| 16 | 6 | 3,14 | 1,01 | 5 | 3,17 | 1,59 | 6 | 4,31 | 2,68 | 0,940 | 0,349 |
| 17 | 6 | 3,01 | 0,79 | 5 | 3,16 | 1,37 | 6 | 2,83 | 1,05 | 0,963 | 0,790 |
| 18 | 6 | 2,36 | 1,04 | 6 | 2,43 | 1,13 | 5 | 2,63 | 1,13 | 0,826 | 0,459 |
| 19 | 6 | 3,97 | 1,85 | 6 | 4,56 | 3,64 | 6 | 3,49 | 1,41 | 0,769 | 0,682 |
| 20 | 6 | 2,81 | 1,71 | 6 | 1,96 | 0,78 | 6 | 2,28 | 0,75 | 0,223 | 0,358 |
| 21 | 6 | 2,19 | 0,58 | 5 | 3,35 | 2,01 | 6 | 3,16 | 3,10 | 0,236 | 0,409 |
| 26 | 6 | 1,75 | 0,44 | 6 | 2,25 | 1,23 | 5 | 1,84 | 0,48 | 0,297 | 0,473 |
| 27 | 6 | 1,92 | 0,67 | 6 | 1,40 | 0,14 | 6 | 1,66 | 0,39 | 0,084 | 0,269 |
| 28 | 6 | 1,90 | 0,61 | 6 | 2,19 | 0,73 | 6 | 1,81 | 0,57 | 0,424 | 0,809 |

Tab. 9.34: Histidinkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 0,87 | 0,12 | 6 | 0,89 | 0,14 | 6 | 0,77 | 0,20 | 0,630 | 0,213 |
| 8 | 6 | 1,03 | 0,17 | 6 | 0,87 | 0,35 | 6 | 0,89 | 0,33 | 0,341 | 0,423 |
| 11 | 4 | 2,82 | 0,82 | 5 | 2,87 | 0,67 | 6 | 4,69 | 0,75 | 0,308 | 0,028 |
| 12 | 6 | 3,03 | 0,85 | 6 | 2,21 | 0,34 | 6 | 3,45 | 1,58 | 0,115 | 0,501 |
| 13 | 6 | 3,02 | 0,37 | 6 | 2,27 | 0,48 | 5 | 5,30 | 1,53 | 0,044 | 0,024 |
| 16 | 6 | 2,61 | 0,59 | 6 | 2,58 | 0,69 | 6 | 3,88 | 0,49 | 0,921 | 0,003 |
| 17 | 6 | 2,77 | 0,59 | 6 | 2,23 | 0,46 | 6 | 3,71 | 1,42 | 0,096 | 0,274 |
| 18 | 6 | 2,57 | 0,42 | 6 | 2,14 | 0,48 | 6 | 4,44 | 1,48 | 0,174 | 0,033 |
| 19 | 6 | 2,85 | 0,61 | 6 | 2,60 | 0,80 | 6 | 3,58 | 0,54 | 0,369 | 0,133 |
| 20 | 6 | 1,64 | 0,62 | 6 | 1,62 | 0,46 | 6 | 1,87 | 0,35 | 0,912 | 0,449 |
| 21 | 6 | 1,30 | 0,35 | 5 | 1,46 | 0,39 | 6 | 1,50 | 0,42 | 0,300 | 0,149 |
| 26 | 6 | 1,22 | 0,10 | 6 | 1,35 | 0,28 | 6 | 1,60 | 0,95 | 0,218 | 0,334 |
| 27 | 6 | 1,24 | 0,39 | 6 | 1,16 | 0,36 | 6 | 1,26 | 0,28 | 0,578 | 0,837 |
| 28 | 6 | 1,25 | 0,40 | 6 | 1,19 | 0,26 | 6 | 1,11 | 0,26 | 0,686 | 0,338 |

Tab. 9.35: Glycinkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 3,54 | 0,65 | 6 | 3,58 | 0,69 | 6 | 3,55 | 0,55 | 0,759 | 0,965 |
| 8 | 6 | 3,40 | 0,78 | 6 | 2,69 | 0,94 | 6 | 3,56 | 1,27 | 0,315 | 0,827 |
| 11 | 6 | 6,08 | 2,95 | 3 | 7,78 | 2,68 | 6 | 8,74 | 3,33 | 0,019 | 0,006 |
| 12 | 6 | 6,37 | 2,20 | 6 | 6,26 | 1,76 | 6 | 6,81 | 2,82 | 0,936 | 0,780 |
| 13 | 6 | 5,81 | 1,82 | 6 | 5,58 | 1,18 | 5 | 7,53 | 3,04 | 0,654 | 0,166 |
| 16 | 6 | 7,09 | 2,64 | 6 | 6,94 | 1,83 | 6 | 7,41 | 3,23 | 0,873 | 0,793 |
| 17 | 6 | 6,88 | 2,05 | 5 | 5,57 | 1,46 | 6 | 6,82 | 2,05 | 0,045 | 0,885 |
| 18 | 6 | 5,73 | 1,73 | 6 | 4,64 | 0,63 | 6 | 7,37 | 3,73 | 0,147 | 0,441 |
| 19 | 6 | 7,48 | 1,77 | 6 | 6,23 | 2,38 | 6 | 6,55 | 2,46 | 0,302 | 0,513 |
| 20 | 6 | 4,66 | 1,73 | 6 | 3,85 | 1,31 | 6 | 5,40 | 2,11 | 0,169 | 0,150 |
| 21 | 6 | 4,69 | 1,20 | 5 | 4,99 | 1,50 | 6 | 4,85 | 1,21 | 0,802 | 0,753 |
| 26 | 6 | 4,06 | 0,71 | 6 | 4,00 | 0,70 | 6 | 5,14 | 3,04 | 0,873 | 0,362 |
| 27 | 6 | 3,92 | 0,71 | 6 | 3,54 | 0,52 | 6 | 3,70 | 0,87 | 0,276 | 0,425 |
| 28 | 6 | 3,94 | 0,98 | 6 | 3,78 | 0,60 | 6 | 3,91 | 1,06 | 0,761 | 0,918 |

Tab. 9.36: Threoninkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 0,95 | 0,18 | 6 | 1,01 | 0,30 | 6 | 0,95 | 0,31 | 0,583 | 0,944 |
| 8 | 6 | 1,00 | 0,30 | 6 | 0,76 | 0,25 | 6 | 1,07 | 0,42 | 0,303 | 0,787 |
| 11 | 4 | 1,11 | 0,24 | 2 | 1,83 | 0,48 | 4 | 2,27 | 0,56 | 0,070 | 0,053 |
| 12 | 6 | 1,90 | 0,75 | 6 | 1,86 | 0,72 | 5 | 1,91 | 1,13 | 0,949 | 0,953 |
| 13 | 6 | 2,02 | 0,55 | 6 | 2,52 | 0,74 | 5 | 3,35 | 1,10 | 0,066 | 0,044 |
| 16 | 6 | 2,05 | 0,60 | 6 | 2,61 | 0,96 | 6 | 2,93 | 0,89 | 0,364 | 0,103 |
| 17 | 6 | 2,01 | 0,81 | 5 | 2,09 | 0,59 | 6 | 1,97 | 0,84 | 0,633 | 0,909 |
| 18 | 6 | 1,88 | 0,78 | 5 | 1,54 | 0,28 | 5 | 2,38 | 0,64 | 0,694 | 0,124 |
| 19 | 6 | 2,22 | 1,04 | 6 | 2,25 | 0,90 | 6 | 2,27 | 0,64 | 0,949 | 0,874 |
| 20 | 6 | 1,57 | 0,35 | 6 | 1,54 | 0,23 | 6 | 1,52 | 0,23 | 0,887 | 0,771 |
| 21 | 6 | 1,14 | 0,18 | 5 | 1,44 | 0,56 | 6 | 1,40 | 0,44 | 0,230 | 0,141 |
| 26 | 6 | 1,02 | 0,25 | 6 | 1,25 | 0,37 | 6 | 1,56 | 1,36 | 0,219 | 0,323 |
| 27 | 6 | 1,06 | 0,22 | 6 | 1,07 | 0,17 | 6 | 1,31 | 0,26 | 0,934 | 0,026 |
| 28 | 6 | 1,18 | 0,22 | 6 | 1,30 | 0,28 | 6 | 1,27 | 0,32 | 0,449 | 0,580 |

Tab. 9.37: Alaninkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 6,98 | 1,60 | 6 | 5,88 | 1,66 | 6 | 6,80 | 2,74 | 0,098 | 0,875 |
| 8 | 6 | 4,75 | 1,02 | 6 | 5,14 | 2,03 | 6 | 6,06 | 2,16 | 0,715 | 0,256 |
| 11 | 6 | 7,05 | 2,26 | 4 | 7,71 | 2,38 | 6 | 10,40 | 2,50 | 0,812 | 0,032 |
| 12 | 6 | 7,33 | 2,59 | 6 | 5,76 | 1,37 | 6 | 6,74 | 1,62 | 0,310 | 0,699 |
| 13 | 6 | 7,97 | 1,62 | 6 | 6,69 | 1,38 | 4 | 8,79 | 2,21 | 0,058 | 0,652 |
| 16 | 6 | 8,35 | 5,30 | 6 | 6,63 | 3,09 | 6 | 7,79 | 3,47 | 0,231 | 0,702 |
| 17 | 6 | 8,64 | 5,46 | 5 | 4,69 | 2,68 | 6 | 7,12 | 3,11 | 0,092 | 0,494 |
| 18 | 6 | 5,65 | 2,51 | 6 | 3,52 | 1,23 | 6 | 7,75 | 3,31 | 0,029 | 0,166 |
| 19 | 6 | 8,46 | 4,45 | 6 | 6,07 | 3,78 | 6 | 8,27 | 5,37 | 0,029 | 0,873 |
| 20 | 6 | 6,10 | 4,32 | 6 | 3,97 | 1,68 | 6 | 6,01 | 2,40 | 0,119 | 0,959 |
| 21 | 6 | 8,52 | 6,67 | 5 | 7,80 | 4,12 | 6 | 9,75 | 5,17 | 0,271 | 0,245 |
| 26 | 6 | 6,67 | 2,35 | 6 | 4,82 | 1,23 | 6 | 8,47 | 2,76 | 0,064 | 0,057 |
| 27 | 6 | 6,25 | 2,39 | 6 | 4,51 | 0,94 | 6 | 6,98 | 1,71 | 0,140 | 0,267 |
| 28 | 6 | 6,47 | 2,73 | 6 | 5,13 | 2,29 | 6 | 7,92 | 2,88 | 0,317 | 0,060 |

Tab. 9.38: Argininkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 1,43 | 0,34 | 6 | 1,59 | 0,49 | 6 | 1,58 | 0,33 | 0,086 | 0,231 |
| 8 | 6 | 1,59 | 0,23 | 6 | 1,38 | 0,39 | 6 | 1,44 | 0,39 | 0,325 | 0,506 |
| 11 | 4 | 2,54 | 0,78 | 4 | 3,46 | 0,39 | 5 | 4,21 | 0,99 | 0,031 | 0,000 |
| 12 | 6 | 2,56 | 0,55 | 6 | 3,67 | 0,91 | 6 | 3,26 | 1,31 | 0,020 | 0,220 |
| 13 | 6 | 2,99 | 0,44 | 6 | 3,61 | 0,47 | 6 | 3,27 | 0,44 | 0,028 | 0,293 |
| 16 | 6 | 3,61 | 0,86 | 6 | 4,39 | 0,26 | 6 | 3,92 | 0,49 | 0,058 | 0,502 |
| 17 | 6 | 2,82 | 0,65 | 6 | 3,43 | 0,93 | 6 | 3,11 | 0,92 | 0,254 | 0,586 |
| 18 | 6 | 2,86 | 0,61 | 6 | 3,78 | 0,72 | 6 | 3,22 | 0,47 | 0,034 | 0,267 |
| 19 | 6 | 3,37 | 0,45 | 6 | 4,39 | 0,50 | 6 | 2,96 | 0,62 | 0,000 | 0,190 |
| 20 | 6 | 2,33 | 0,98 | 6 | 3,29 | 0,75 | 6 | 2,61 | 0,57 | 0,060 | 0,425 |
| 21 | 6 | 1,97 | 0,41 | 6 | 2,52 | 0,89 | 6 | 2,16 | 0,62 | 0,185 | 0,601 |
| 26 | 6 | 2,10 | 0,38 | 6 | 2,13 | 0,42 | 6 | 2,47 | 0,46 | 0,879 | 0,206 |
| 27 | 6 | 2,41 | 0,61 | 6 | 2,64 | 0,68 | 6 | 2,59 | 0,36 | 0,301 | 0,365 |
| 28 | 6 | 2,49 | 0,61 | 6 | 2,61 | 0,93 | 6 | 2,55 | 0,60 | 0,558 | 0,738 |

Tab. 9.39: Tyrosinkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 0,36 | 0,14 | 5 | 0,34 | 0,16 | 5 | 0,34 | 0,17 | 0,648 | 0,565 |
| 8 | 6 | 0,41 | 0,18 | 5 | 0,36 | 0,17 | 5 | 0,48 | 0,24 | 0,499 | 0,891 |
| 11 | 4 | 0,46 | 0,17 | 3 | 0,83 | 0,21 | 6 | 0,79 | 0,22 | 0,037 | 0,138 |
| 12 | 6 | 0,70 | 0,42 | 6 | 0,65 | 0,23 | 6 | 0,63 | 0,13 | 0,746 | 0,683 |
| 13 | 6 | 0,76 | 0,25 | 6 | 0,76 | 0,31 | 5 | 0,79 | 0,44 | 0,989 | 0,762 |
| 16 | 6 | 0,83 | 0,44 | 6 | 0,91 | 0,47 | 6 | 0,96 | 0,70 | 0,615 | 0,473 |
| 17 | 6 | 0,67 | 0,39 | 5 | 0,63 | 0,45 | 6 | 0,55 | 0,34 | 0,454 | 0,496 |
| 18 | 6 | 0,58 | 0,38 | 4 | 0,76 | 0,20 | 4 | 0,84 | 0,44 | 0,991 | 0,317 |
| 19 | 6 | 0,80 | 0,27 | 5 | 0,61 | 0,26 | 5 | 0,81 | 0,42 | 0,096 | 0,526 |
| 20 | 4 | 0,95 | 0,33 | 5 | 0,71 | 0,41 | 5 | 0,67 | 0,24 | 0,412 | 0,326 |
| 21 | 6 | 0,56 | 0,36 | 5 | 0,70 | 0,40 | 6 | 0,74 | 0,50 | 0,476 | 0,280 |
| 26 | 4 | 0,66 | 0,07 | 5 | 0,62 | 0,35 | 5 | 0,42 | 0,22 | 0,573 | 0,358 |
| 27 | 6 | 0,46 | 0,21 | 6 | 0,44 | 0,21 | 6 | 0,52 | 0,17 | 0,740 | 0,318 |
| 28 | 6 | 0,53 | 0,21 | 6 | 0,50 | 0,19 | 5 | 0,60 | 0,26 | 0,687 | 0,297 |

Tab. 9.40: Valinkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 0,72 | 0,29 | 6 | 0,71 | 0,22 | 6 | 0,81 | 0,33 | 0,944 | 0,429 |
| 8 | 6 | 0,75 | 0,21 | 6 | 0,70 | 0,29 | 6 | 0,86 | 0,45 | 0,787 | 0,588 |
| 11 | 4 | 1,18 | 0,25 | 4 | 2,49 | 1,02 | 6 | 2,79 | 0,44 | 0,306 | 0,020 |
| 12 | 6 | 1,93 | 0,93 | 6 | 1,46 | 0,20 | 6 | 1,82 | 0,36 | 0,317 | 0,823 |
| 13 | 6 | 2,18 | 0,48 | 6 | 2,17 | 0,93 | 4 | 2,47 | 0,42 | 0,962 | 0,351 |
| 16 | 6 | 2,08 | 0,83 | 6 | 2,17 | 0,48 | 6 | 2,65 | 0,71 | 0,811 | 0,150 |
| 17 | 6 | 1,95 | 0,76 | 5 | 1,49 | 0,24 | 6 | 1,96 | 0,74 | 0,148 | 0,977 |
| 18 | 6 | 1,74 | 0,50 | 6 | 1,72 | 0,62 | 5 | 2,00 | 0,25 | 0,965 | 0,566 |
| 19 | 6 | 2,17 | 0,50 | 6 | 1,57 | 0,48 | 6 | 2,14 | 0,44 | 0,068 | 0,942 |
| 20 | 6 | 1,25 | 0,25 | 6 | 1,05 | 0,17 | 6 | 1,74 | 0,33 | 0,131 | 0,031 |
| 21 | 6 | 1,25 | 0,58 | 5 | 1,36 | 0,37 | 6 | 1,57 | 0,42 | 0,779 | 0,189 |
| 26 | 6 | 1,00 | 0,37 | 6 | 1,10 | 0,30 | 6 | 1,71 | 0,86 | 0,553 | 0,026 |
| 27 | 6 | 1,11 | 0,34 | 6 | 1,00 | 0,21 | 6 | 1,25 | 0,38 | 0,265 | 0,202 |
| 28 | 6 | 1,17 | 0,41 | 6 | 1,11 | 0,44 | 6 | 1,29 | 0,41 | 0,773 | 0,232 |

Tab. 9.41: Methioninkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 2 | 0,50 | 0,08 | 3 | 0,37 | 0,27 | 2 | 0,34 | 0,07 | 0,756 | 0,018 |
| 8 | 1 | 0,41 | | 2 | 0,15 | 0,04 | 3 | 0,22 | 0,17 | | |
| 11 | 1 | 0,26 | | 1 | 0,39 | | 3 | 0,50 | 0,09 | | |
| 12 | 2 | 0,34 | 0,09 | 2 | 0,41 | 0,27 | 2 | 0,55 | 0,01 | 0,666 | 0,206 |
| 13 | 1 | 0,35 | | 2 | 0,42 | 0,02 | 2 | 0,49 | 0,12 | | |
| 16 | 2 | 0,30 | 0,02 | 2 | 0,38 | 0,09 | 2 | 0,52 | 0,02 | 0,470 | 0,009 |
| 17 | 2 | 0,40 | 0,05 | 2 | 0,31 | 0,05 | 3 | 0,36 | 0,12 | 0,001 | 0,959 |
| 18 | 2 | 0,63 | 0,07 | 2 | 0,50 | 0,02 | 2 | 0,61 | 0,17 | 0,294 | 0,843 |
| 19 | 1 | 0,42 | | 1 | 0,45 | | 2 | 0,59 | 0,22 | | |
| 20 | 2 | 0,21 | 0,01 | 2 | 0,36 | 0,08 | 2 | 0,34 | 0,04 | 0,273 | |
| 21 | 1 | 0,33 | | 2 | 0,27 | 0,14 | 2 | 0,21 | 0,02 | | |
| 26 | | | | 1 | 0,18 | | | | | | |
| 27 | | | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | 1 | 0,20 | | | |

Tab. 9.42: Tryptophankonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | | | | 1 | 0,26 | | | | | | |
| 8 | | | | | | | 1 | 0,13 | | | |
| 11 | | | | 2 | 0,20 | 0,04 | 1 | 0,15 | | | |
| 12 | 2 | 0,15 | 0,09 | 4 | 0,17 | 0,06 | 3 | 0,13 | 0,07 | | |
| 13 | 3 | 0,29 | 0,11 | 3 | 0,38 | 0,09 | 4 | 0,27 | 0,12 | 0,001 | 0,858 |
| 16 | 3 | 0,21 | 0,01 | 5 | 0,25 | 0,04 | | | | 0,609 | |
| 17 | | | | 1 | 0,17 | | 3 | 0,22 | 0,04 | | |
| 18 | 1 | 0,18 | | 2 | 0,23 | 0,01 | 3 | 0,21 | 0,05 | | |
| 19 | 2 | 0,21 | 0,04 | 2 | 0,21 | 0,03 | 2 | 0,26 | 0,08 | | |
| 20 | | | | | | | 1 | 0,09 | | | |
| 21 | | | | 1 | 0,43 | | | | | | |
| 26 | | | | 1 | 0,17 | | 1 | 0,24 | | | |
| 27 | | | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | | | |

Tab. 9.43: Phenylalaninkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 2 | 0,45 | 0,12 | 2 | 0,17 | 0,07 | 2 | 0,15 | 0,01 | | |
| 8 | 4 | 0,17 | 0,05 | 2 | 0,26 | 0,04 | 4 | 0,24 | 0,02 | 0,263 | 0,072 |
| 11 | 1 | 0,25 | | 3 | 0,23 | 0,06 | 5 | 0,41 | 0,15 | | |
| 12 | 5 | 0,49 | 0,19 | 4 | 0,38 | 0,10 | 6 | 0,37 | 0,12 | 0,130 | 0,209 |
| 13 | 6 | 0,36 | 0,14 | 6 | 0,46 | 0,29 | 4 | 0,52 | 0,10 | 0,257 | 0,021 |
| 16 | 3 | 0,54 | 0,06 | 2 | 0,61 | 0,29 | 6 | 0,43 | 0,10 | 0,792 | 0,408 |
| 17 | 6 | 0,39 | 0,13 | 5 | 0,35 | 0,08 | 6 | 0,45 | 0,18 | 0,473 | 0,588 |
| 18 | 4 | 0,43 | 0,16 | 4 | 0,48 | 0,16 | 4 | 0,69 | 0,24 | 0,494 | 0,204 |
| 19 | 6 | 0,49 | 0,11 | 4 | 0,40 | 0,09 | 4 | 0,59 | 0,17 | 0,546 | 0,073 |
| 20 | 4 | 0,36 | 0,05 | 4 | 0,29 | 0,06 | 4 | 0,35 | 0,16 | 0,335 | 0,959 |
| 21 | 4 | 0,37 | 0,10 | 3 | 0,29 | 0,11 | 4 | 0,42 | 0,12 | 0,420 | 0,356 |
| 26 | 4 | 0,27 | 0,10 | 4 | 0,24 | 0,08 | 3 | 0,28 | 0,09 | 0,306 | 0,596 |
| 27 | 2 | 0,22 | 0,09 | 1 | 0,21 | | 2 | 0,23 | 0,09 | | 0,196 |
| 28 | 3 | 0,19 | 0,05 | 2 | 0,22 | 0,09 | 2 | 0,29 | 0,12 | 0,891 | 0,555 |

Tab. 9.44: Isoleucinkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 5 | 0,30 | 0,11 | 4 | 0,28 | 0,15 | 6 | 0,23 | 0,06 | 0,646 | 0,083 |
| 8 | 5 | 0,23 | 0,06 | 4 | 0,21 | 0,10 | 4 | 0,27 | 0,13 | 0,583 | 0,649 |
| 11 | 4 | 0,46 | 0,13 | 3 | 0,54 | 0,12 | 6 | 0,68 | 0,21 | 0,391 | 0,047 |
| 12 | 6 | 0,73 | 0,33 | 6 | 0,64 | 0,20 | 6 | 0,64 | 0,13 | 0,586 | 0,641 |
| 13 | 6 | 0,63 | 0,16 | 6 | 0,51 | 0,15 | 4 | 0,60 | 0,17 | 0,155 | 0,639 |
| 16 | 6 | 0,52 | 0,26 | 6 | 0,59 | 0,39 | 6 | 0,73 | 0,25 | 0,654 | 0,112 |
| 17 | 6 | 0,57 | 0,17 | 5 | 0,42 | 0,14 | 6 | 0,58 | 0,14 | 0,105 | 0,948 |
| 18 | 6 | 0,44 | 0,16 | 5 | 0,36 | 0,13 | 6 | 0,69 | 0,53 | 0,138 | 0,306 |
| 19 | 6 | 0,60 | 0,22 | 4 | 0,64 | 0,22 | 6 | 0,64 | 0,37 | 0,901 | 0,762 |
| 20 | 4 | 0,58 | 0,14 | 4 | 0,42 | 0,07 | 5 | 0,56 | 0,11 | 0,171 | 0,890 |
| 21 | 6 | 0,46 | 0,19 | 5 | 0,35 | 0,13 | 6 | 0,52 | 0,33 | 0,358 | 0,661 |
| 26 | 4 | 0,45 | 0,14 | 4 | 0,44 | 0,08 | 5 | 0,69 | 0,45 | 0,881 | 0,113 |
| 27 | 5 | 0,38 | 0,14 | 4 | 0,32 | 0,04 | 6 | 0,29 | 0,13 | 0,122 | 0,127 |
| 28 | 6 | 0,34 | 0,15 | 6 | 0,33 | 0,15 | 6 | 0,37 | 0,15 | 0,798 | 0,568 |

Tab. 9.45: Leucinkonzentrationen in Laufgruppe II [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S05 | | | Zulage S07 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S05 | K01/S07 |
| 7 | 6 | 0,25 | 0,06 | 6 | 0,25 | 0,10 | 5 | 0,27 | 0,06 | 0,947 | 0,705 |
| 8 | 5 | 0,38 | 0,50 | 4 | 0,15 | 0,03 | 4 | 0,22 | 0,10 | 0,413 | 0,512 |
| 11 | 4 | 0,26 | 0,12 | 3 | 0,42 | 0,08 | 6 | 0,70 | 0,26 | 0,661 | 0,070 |
| 12 | 6 | 0,55 | 0,33 | 6 | 0,43 | 0,34 | 6 | 0,69 | 0,63 | 0,567 | 0,679 |
| 13 | 6 | 0,52 | 0,44 | 3 | 0,45 | 0,25 | 5 | 0,59 | 0,40 | 0,351 | 0,953 |
| 16 | 6 | 0,79 | 0,38 | 6 | 0,39 | 0,15 | 6 | 0,55 | 0,43 | 0,022 | 0,309 |
| 17 | 6 | 0,45 | 0,21 | 3 | 0,36 | 0,26 | 6 | 0,46 | 0,24 | 0,165 | 0,872 |
| 18 | 5 | 0,58 | 0,30 | 4 | 0,40 | 0,20 | 5 | 0,67 | 0,36 | 0,147 | 0,515 |
| 19 | 6 | 0,50 | 0,35 | 4 | 0,45 | 0,21 | 6 | 0,45 | 0,19 | 0,125 | 0,578 |
| 20 | 4 | 0,37 | 0,15 | 4 | 0,24 | 0,08 | 5 | 0,34 | 0,09 | 0,188 | 0,775 |
| 21 | 4 | 0,41 | 0,22 | 6 | 0,46 | 0,45 | 6 | 0,31 | 0,12 | 0,768 | 0,571 |
| 26 | 6 | 0,27 | 0,07 | 6 | 0,33 | 0,15 | 6 | 0,41 | 0,23 | 0,399 | 0,177 |
| 27 | 5 | 0,21 | 0,07 | 4 | 0,43 | 0,41 | 4 | 0,26 | 0,06 | 0,417 | 0,083 |
| 28 | 5 | 0,24 | 0,07 | 6 | 0,28 | 0,07 | 6 | 0,28 | 0,06 | 0,401 | 0,315 |

Tab. 9.46: Ammoniakkonzentrationen Laufgruppe III [mmol/L]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 1 | 6 | 4,13 | 1,10 | 6 | 3,97 | 0,70 | 6 | 4,53 | 0,97 | 0,592 | 0,169 |
| 2 | 6 | 4,74 | 0,73 | 6 | 4,78 | 0,51 | 6 | 5,53 | 0,92 | 0,675 | 0,060 |
| 3 | 6 | 5,07 | 0,89 | 6 | 5,11 | 0,33 | 6 | 7,01 | 2,18 | 0,893 | 0,099 |
| 4 | 6 | 5,70 | 0,83 | 6 | 5,70 | 1,59 | 4 | 6,24 | 2,08 | 0,998 | 0,626 |
| 5 | 6 | 5,02 | 1,06 | 6 | 5,48 | 1,01 | 6 | 5,75 | 1,55 | 0,315 | 0,398 |
| 6 | 4 | 4,84 | 0,97 | 4 | 5,78 | 0,38 | 4 | 5,90 | 0,54 | 0,093 | 0,034 |
| 7 | 6 | 5,43 | 0,93 | 6 | 6,10 | 1,09 | 5 | 7,13 | 1,35 | 0,298 | 0,172 |
| 8 | 6 | 5,68 | 1,19 | 6 | 5,89 | 0,55 | 6 | 5,96 | 0,77 | 0,563 | 0,543 |
| 9 | 6 | 6,42 | 1,39 | 6 | 5,60 | 0,72 | 6 | 6,29 | 0,98 | 0,291 | 0,892 |
| 10 | 6 | 6,75 | 0,64 | 6 | 9,07 | 1,00 | 6 | 9,61 | 2,36 | 0,004 | 0,043 |
| 11 | 4 | 6,73 | 1,07 | 5 | 11,2 | 1,42 | 4 | 12,9 | 1,80 | 0,001 | 0,004 |
| 12 | 6 | 9,89 | 4,11 | 6 | 13,6 | 4,61 | 6 | 15,8 | 4,65 | 0,162 | 0,041 |
| 13 | 4 | 6,41 | 1,32 | 4 | 10,4 | 4,21 | 4 | 10,0 | 4,90 | 0,083 | 0,151 |
| 14 | 6 | 7,69 | 1,51 | 6 | 13,1 | 3,42 | 6 | 15,0 | 5,90 | 0,001 | 0,012 |
| 15 | 6 | 7,53 | 0,87 | 6 | 14,2 | 1,65 | 6 | 15,2 | 1,95 | 0,000 | 0,001 |
| 16 | 6 | 6,94 | 0,48 | 6 | 10,7 | 0,63 | 6 | 12,6 | 2,06 | 0,000 | 0,002 |
| 17 | 6 | 7,91 | 0,80 | 6 | 13,5 | 2,53 | 6 | 14,7 | 3,04 | 0,001 | 0,002 |
| 18 | 6 | 6,99 | 0,98 | 6 | 10,7 | 2,46 | 6 | 12,1 | 4,05 | 0,006 | 0,019 |
| 19 | 6 | 7,46 | 1,21 | 6 | 12,8 | 2,26 | 6 | 13,5 | 2,95 | 0,001 | 0,004 |
| 20 | 6 | 7,46 | 2,74 | 6 | 10,6 | 4,35 | 6 | 10,6 | 4,41 | 0,006 | 0,011 |
| 21 | 6 | 6,53 | 1,23 | 6 | 7,75 | 1,22 | 6 | 7,14 | 0,95 | 0,067 | 0,397 |
| 22 | 6 | 5,98 | 1,74 | 6 | 6,90 | 2,34 | 6 | 6,99 | 1,64 | 0,052 | 0,025 |
| 23 | 6 | 4,95 | 0,66 | 6 | 5,31 | 1,00 | 6 | 4,95 | 0,94 | 0,274 | 0,990 |
| 24 | 6 | 5,12 | 1,04 | 6 | 5,98 | 1,37 | 6 | 5,09 | 0,54 | 0,209 | 0,957 |
| 25 | 6 | 4,25 | 1,44 | 6 | 4,66 | 1,62 | 6 | 4,17 | 1,47 | 0,273 | 0,849 |
| 26 | 6 | 4,46 | 1,34 | 6 | 4,62 | 1,34 | 6 | 4,07 | 1,41 | 0,669 | 0,424 |
| 27 | 6 | 4,30 | 1,29 | 6 | 4,88 | 1,54 | 6 | 4,33 | 1,54 | 0,032 | 0,900 |
| 28 | 6 | 3,96 | 0,55 | 6 | 5,76 | 1,75 | 6 | 5,25 | 1,48 | 0,065 | 0,122 |

Tab. 9.47: Gehalte bakteriellen Proteins in Laufgruppe III [$\mu\text{g RSA/mL}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 3 | 6 | 62,8 | 7,42 | 6 | 61,3 | 5,98 | 6 | 54,1 | 2,19 | 0,695 | 0,033 |
| 6 | 6 | 65,4 | 4,29 | 6 | 58,8 | 5,44 | 6 | 50,8 | 7,29 | 0,068 | 0,001 |
| 7 | 6 | 64,3 | 8,62 | 6 | 58,0 | 2,51 | 6 | 51,1 | 5,66 | 0,123 | 0,012 |
| 8 | 6 | 63,9 | 7,50 | 6 | 57,8 | 5,66 | 6 | 54,1 | 10,3 | 0,045 | 0,010 |
| 9 | 6 | 67,7 | 9,85 | 6 | 60,7 | 5,75 | 6 | 61,3 | 7,83 | 0,021 | 0,043 |
| 10 | 6 | 76,0 | 10,6 | 6 | 71,3 | 8,37 | 6 | 71,6 | 5,09 | 0,437 | 0,507 |
| 11 | 6 | 80,6 | 7,88 | 6 | 84,2 | 7,14 | 6 | 81,9 | 9,69 | 0,517 | 0,757 |
| 12 | 6 | 76,4 | 17,3 | 6 | 81,3 | 23,9 | 5 | 81,5 | 27,2 | 0,285 | 0,184 |
| 13 | 6 | 80,7 | 15,5 | 6 | 95,8 | 9,85 | 6 | 103 | 13,3 | 0,004 | 0,001 |
| 14 | 6 | 72,1 | 9,12 | 5 | 76,7 | 12,1 | 6 | 84,5 | 9,89 | 0,719 | 0,085 |
| 15 | 6 | 74,1 | 7,52 | 6 | 93,4 | 14,1 | 6 | 96,3 | 13,4 | 0,008 | 0,002 |
| 16 | 6 | 71,6 | 12,9 | 6 | 84,0 | 11,1 | 6 | 90,9 | 8,18 | 0,062 | 0,006 |
| 17 | 6 | 73,8 | 8,80 | 6 | 81,6 | 7,08 | 6 | 90,5 | 9,19 | 0,031 | 0,000 |
| 18 | 6 | 75,6 | 14,7 | 6 | 87,5 | 19,3 | 5 | 88,4 | 17,1 | 0,115 | 0,315 |
| 19 | 6 | 91,6 | 4,77 | 5 | 99,4 | 6,93 | 5 | 109 | 11,8 | 0,134 | 0,046 |
| 20 | 6 | 88,1 | 4,57 | 6 | 91,7 | 14,6 | 6 | 97,1 | 16,0 | 0,597 | 0,240 |
| 21 | 6 | 72,7 | 8,34 | 6 | 78,8 | 9,80 | 6 | 82,4 | 14,9 | 0,173 | 0,151 |
| 22 | 6 | 75,8 | 14,5 | 6 | 64,9 | 14,8 | 5 | 75,3 | 17,7 | 0,235 | 0,987 |
| 23 | 6 | 79,3 | 5,15 | 6 | 68,4 | 5,65 | 6 | 70,7 | 8,85 | 0,006 | 0,030 |
| 24 | 6 | 74,8 | 7,49 | 6 | 58,9 | 7,08 | 6 | 56,4 | 9,79 | 0,001 | 0,001 |
| 25 | 6 | 74,0 | 8,44 | 6 | 60,7 | 8,73 | 6 | 58,1 | 9,59 | 0,077 | 0,056 |
| 26 | 6 | 79,2 | 7,14 | 6 | 74,1 | 11,8 | 6 | 69,7 | 10,6 | 0,492 | 0,218 |
| 27 | 6 | 85,1 | 20,5 | 4 | 81,2 | 9,39 | 6 | 80,4 | 3,56 | 0,168 | 0,592 |
| 28 | 6 | 86,8 | 12,1 | 4 | 70,2 | 2,75 | 6 | 71,0 | 13,4 | 0,018 | 0,000 |

Tab. 9.48: Summe der Konzentrationen der messbaren fAS in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 6 | 33,5 | 4,59 | 6 | 38,3 | 7,54 | 6 | 42,0 | 11,2 | 0,144 | 0,167 |
| 8 | 6 | 34,9 | 7,00 | 6 | 37,8 | 6,95 | 6 | 43,3 | 8,12 | 0,549 | 0,180 |
| 11 | 6 | 52,9 | 5,91 | 6 | 57,9 | 8,61 | 6 | 56,8 | 11,6 | 0,225 | 0,208 |
| 12 | 6 | 54,4 | 10,4 | 6 | 64,9 | 8,98 | 6 | 55,9 | 9,50 | 0,091 | 0,819 |
| 13 | 6 | 58,5 | 8,42 | 6 | 59,9 | 10,5 | 6 | 55,9 | 7,66 | 0,686 | 0,602 |
| 16 | 6 | 59,8 | 9,85 | 6 | 61,4 | 10,4 | 6 | 58,1 | 8,87 | 0,759 | 0,779 |
| 17 | 6 | 59,1 | 13,6 | 6 | 62,2 | 18,3 | 6 | 50,6 | 7,03 | 0,699 | 0,135 |
| 18 | 6 | 50,9 | 8,22 | 6 | 54,6 | 7,36 | 6 | 47,9 | 6,27 | 0,034 | 0,092 |
| 19 | 6 | 55,4 | 14,7 | 6 | 42,8 | 27,0 | 6 | 51,9 | 12,1 | 0,078 | 0,553 |
| 20 | 6 | 46,3 | 6,61 | 6 | 46,3 | 13,5 | 6 | 40,9 | 10,2 | 0,995 | 0,188 |
| 21 | 6 | 47,3 | 5,07 | 6 | 39,1 | 6,58 | 6 | 36,3 | 2,55 | 0,062 | 0,007 |
| 26 | 6 | 39,4 | 13,4 | 6 | 41,7 | 20,1 | 6 | 47,7 | 7,74 | 0,629 | 0,101 |
| 27 | 6 | 39,0 | 11,7 | 6 | 44,6 | 11,2 | 6 | 43,2 | 7,93 | 0,088 | 0,146 |
| 28 | 6 | 37,9 | 8,79 | 6 | 43,1 | 10,6 | 6 | 44,3 | 6,02 | 0,202 | 0,024 |

Tab. 9.49: Aspartatkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 6 | 5,05 | 1,07 | 6 | 5,67 | 1,31 | 6 | 5,57 | 1,86 | 0,232 | 0,571 |
| 8 | 6 | 5,31 | 1,44 | 6 | 5,60 | 1,50 | 6 | 6,00 | 1,39 | 0,705 | 0,382 |
| 11 | 6 | 6,58 | 1,42 | 6 | 8,45 | 2,50 | 6 | 5,90 | 1,41 | 0,122 | 0,111 |
| 12 | 6 | 6,66 | 1,72 | 6 | 9,07 | 1,59 | 6 | 6,04 | 1,22 | 0,040 | 0,561 |
| 13 | 6 | 7,62 | 2,12 | 6 | 9,18 | 3,21 | 6 | 5,75 | 1,57 | 0,266 | 0,152 |
| 16 | 6 | 7,39 | 1,87 | 6 | 8,27 | 2,04 | 6 | 6,19 | 1,44 | 0,467 | 0,263 |
| 17 | 6 | 7,61 | 2,47 | 6 | 8,58 | 3,39 | 6 | 5,40 | 1,36 | 0,527 | 0,107 |
| 18 | 6 | 6,45 | 1,28 | 6 | 7,07 | 2,13 | 6 | 5,57 | 1,06 | 0,283 | 0,056 |
| 19 | 4 | 8,62 | 2,79 | 5 | 6,17 | 2,91 | 5 | 5,95 | 1,95 | 0,069 | 0,105 |
| 20 | 6 | 6,15 | 1,77 | 6 | 5,30 | 2,08 | 5 | 4,44 | 1,31 | 0,049 | 0,073 |
| 21 | 6 | 6,67 | 1,44 | 6 | 4,81 | 1,32 | 6 | 4,35 | 0,58 | 0,011 | 0,005 |
| 26 | 6 | 5,83 | 2,38 | 5 | 7,34 | 0,61 | 6 | 6,29 | 0,99 | 0,351 | 0,588 |
| 27 | 6 | 5,58 | 2,21 | 6 | 6,44 | 1,17 | 6 | 6,21 | 0,99 | 0,243 | 0,312 |
| 28 | 6 | 5,32 | 1,59 | 6 | 5,90 | 1,44 | 6 | 6,52 | 0,84 | 0,267 | 0,090 |

Tab. 9.50: Glutamatkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 6 | 14,8 | 2,73 | 6 | 15,6 | 3,50 | 6 | 16,9 | 5,12 | 0,385 | 0,300 |
| 8 | 6 | 14,3 | 2,89 | 6 | 14,7 | 3,55 | 6 | 16,5 | 2,71 | 0,714 | 0,223 |
| 11 | 6 | 22,3 | 3,46 | 6 | 26,0 | 4,44 | 6 | 22,1 | 4,00 | 0,043 | 0,859 |
| 12 | 6 | 21,4 | 4,85 | 6 | 29,3 | 5,02 | 6 | 21,1 | 2,11 | 0,009 | 0,894 |
| 13 | 6 | 23,3 | 5,23 | 6 | 28,7 | 7,68 | 6 | 20,4 | 5,05 | 0,069 | 0,299 |
| 16 | 6 | 24,5 | 3,48 | 6 | 27,2 | 5,25 | 6 | 21,8 | 4,85 | 0,206 | 0,250 |
| 17 | 6 | 24,2 | 5,16 | 6 | 26,1 | 9,66 | 6 | 18,8 | 3,48 | 0,661 | 0,092 |
| 18 | 6 | 21,1 | 3,50 | 6 | 23,7 | 4,15 | 6 | 18,8 | 1,86 | 0,068 | 0,106 |
| 19 | 5 | 26,9 | 5,00 | 4 | 23,2 | 8,69 | 6 | 21,4 | 5,54 | 0,183 | 0,045 |
| 20 | 6 | 21,4 | 3,27 | 6 | 20,2 | 6,17 | 6 | 16,7 | 2,88 | 0,467 | 0,023 |
| 21 | 6 | 21,9 | 1,62 | 6 | 17,4 | 3,10 | 6 | 15,7 | 1,30 | 0,031 | 0,001 |
| 26 | 5 | 19,7 | 2,83 | 4 | 23,2 | 4,29 | 6 | 21,0 | 1,97 | 0,307 | 0,315 |
| 27 | 6 | 15,9 | 6,03 | 6 | 18,9 | 4,49 | 6 | 19,2 | 3,66 | 0,274 | 0,146 |
| 28 | 6 | 17,5 | 4,45 | 6 | 20,0 | 4,12 | 6 | 20,2 | 3,06 | 0,121 | 0,017 |

Tab. 9.51: Serinkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 5 | 1,03 | 0,24 | 6 | 1,60 | 0,79 | 6 | 1,39 | 0,25 | 0,207 | 0,138 |
| 8 | 6 | 1,80 | 1,47 | 5 | 1,85 | 1,07 | 5 | 2,00 | 1,08 | 0,891 | 0,995 |
| 11 | 6 | 2,50 | 1,29 | 6 | 1,82 | 0,41 | 6 | 3,17 | 1,25 | 0,284 | 0,415 |
| 12 | 6 | 2,93 | 0,43 | 6 | 2,54 | 0,70 | 6 | 3,67 | 1,19 | 0,282 | 0,248 |
| 13 | 6 | 2,73 | 0,62 | 6 | 1,96 | 0,41 | 6 | 3,51 | 1,27 | 0,026 | 0,191 |
| 16 | 6 | 2,46 | 0,57 | 4 | 1,88 | 0,43 | 6 | 3,70 | 0,65 | 0,126 | 0,038 |
| 17 | 5 | 2,23 | 0,67 | 6 | 2,06 | 0,48 | 6 | 2,35 | 1,01 | 0,533 | 0,818 |
| 18 | 6 | 1,85 | 0,52 | 5 | 1,77 | 1,00 | 6 | 2,84 | 1,54 | 0,978 | 0,090 |
| 19 | 6 | 3,50 | 2,93 | 5 | 1,99 | 1,19 | 6 | 3,04 | 2,07 | 0,252 | 0,730 |
| 20 | 6 | 1,34 | 0,22 | 6 | 1,99 | 1,05 | 5 | 2,23 | 1,70 | 0,149 | 0,280 |
| 21 | 6 | 1,52 | 0,76 | 6 | 1,47 | 0,36 | 6 | 1,56 | 0,43 | 0,894 | 0,860 |
| 26 | 4 | 1,52 | 0,26 | 6 | 1,86 | 0,85 | 6 | 2,22 | 1,90 | 0,451 | 0,309 |
| 27 | 6 | 2,09 | 1,30 | 4 | 1,78 | 0,88 | 6 | 1,97 | 0,68 | 0,902 | 0,861 |
| 28 | 6 | 1,35 | 0,43 | 6 | 1,31 | 0,45 | 5 | 1,74 | 0,38 | 0,865 | 0,153 |

Tab. 9.52: Histidinkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 6 | 0,89 | 0,17 | 6 | 0,96 | 0,23 | 6 | 0,97 | 0,17 | 0,406 | 0,267 |
| 8 | 6 | 0,89 | 0,48 | 6 | 0,94 | 0,36 | 6 | 1,04 | 0,42 | 0,776 | 0,603 |
| 11 | 5 | 2,18 | 0,80 | 6 | 1,58 | 0,38 | 6 | 3,51 | 1,86 | 0,073 | 0,175 |
| 12 | 6 | 2,86 | 0,90 | 6 | 1,84 | 0,34 | 6 | 3,83 | 0,76 | 0,009 | 0,014 |
| 13 | 6 | 2,63 | 0,49 | 6 | 1,64 | 0,27 | 5 | 3,35 | 0,94 | 0,010 | 0,207 |
| 16 | 6 | 2,30 | 0,45 | 6 | 1,63 | 0,37 | 6 | 3,72 | 1,00 | 0,010 | 0,011 |
| 17 | 6 | 2,24 | 0,52 | 6 | 1,54 | 0,41 | 6 | 2,55 | 0,71 | 0,016 | 0,217 |
| 18 | 5 | 2,29 | 0,47 | 6 | 1,81 | 0,84 | 6 | 2,42 | 1,07 | 0,074 | 0,636 |
| 19 | 6 | 2,49 | 0,67 | 6 | 1,46 | 0,61 | 6 | 2,35 | 1,44 | 0,014 | 0,860 |
| 20 | 6 | 1,32 | 0,42 | 6 | 1,03 | 0,11 | 6 | 1,53 | 0,61 | 0,142 | 0,631 |
| 21 | 6 | 1,11 | 0,33 | 6 | 0,90 | 0,23 | 6 | 0,95 | 0,44 | 0,171 | 0,418 |
| 26 | 6 | 1,24 | 0,73 | 6 | 0,92 | 0,29 | 6 | 0,82 | 0,26 | 0,290 | 0,214 |
| 27 | 6 | 0,69 | 0,26 | 6 | 0,89 | 0,25 | 6 | 0,61 | 0,17 | 0,182 | 0,134 |
| 28 | 6 | 0,65 | 0,25 | 6 | 0,80 | 0,38 | 6 | 0,85 | 0,23 | 0,172 | 0,091 |

Tab. 9.53: Glycinkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 6 | 2,76 | 0,57 | 6 | 3,52 | 1,12 | 6 | 4,06 | 1,70 | 0,122 | 0,140 |
| 8 | 6 | 2,50 | 0,39 | 6 | 3,32 | 1,82 | 6 | 4,44 | 2,52 | 0,349 | 0,123 |
| 11 | 6 | 4,93 | 1,86 | 6 | 4,85 | 1,06 | 6 | 5,59 | 3,04 | 0,880 | 0,272 |
| 12 | 6 | 5,10 | 1,83 | 5 | 4,96 | 0,74 | 6 | 5,01 | 1,13 | 0,580 | 0,919 |
| 13 | 6 | 5,03 | 1,29 | 6 | 5,65 | 1,33 | 6 | 6,12 | 1,92 | 0,255 | 0,039 |
| 16 | 6 | 5,24 | 1,39 | 6 | 6,15 | 1,02 | 6 | 5,68 | 2,11 | 0,224 | 0,580 |
| 17 | 6 | 5,64 | 1,61 | 6 | 6,28 | 1,92 | 6 | 6,02 | 1,49 | 0,448 | 0,668 |
| 18 | 6 | 4,18 | 0,40 | 6 | 6,02 | 0,58 | 6 | 4,38 | 0,71 | 0,001 | 0,574 |
| 19 | 5 | 5,61 | 1,39 | 5 | 6,46 | 2,16 | 6 | 5,23 | 0,61 | 0,633 | 0,686 |
| 20 | 6 | 3,50 | 0,64 | 6 | 5,05 | 2,35 | 6 | 5,74 | 2,18 | 0,093 | 0,053 |
| 21 | 6 | 3,57 | 0,99 | 6 | 3,78 | 0,64 | 6 | 3,81 | 0,67 | 0,672 | 0,564 |
| 26 | 6 | 4,07 | 1,78 | 6 | 4,03 | 1,72 | 6 | 4,10 | 1,58 | 0,971 | 0,975 |
| 27 | 6 | 3,07 | 0,88 | 6 | 4,31 | 1,97 | 6 | 3,76 | 0,94 | 0,069 | 0,006 |
| 28 | 6 | 2,93 | 0,72 | 6 | 3,18 | 1,14 | 6 | 3,87 | 1,05 | 0,552 | 0,041 |

Tab. 9.54: Threoninkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 6 | 0,85 | 0,22 | 6 | 1,01 | 0,23 | 6 | 1,12 | 0,51 | 0,287 | 0,319 |
| 8 | 6 | 0,89 | 0,23 | 6 | 1,11 | 0,48 | 5 | 1,28 | 0,50 | 0,417 | 0,304 |
| 11 | 6 | 1,51 | 0,58 | 6 | 1,68 | 0,33 | 6 | 1,57 | 0,50 | 0,529 | 0,691 |
| 12 | 6 | 1,57 | 0,30 | 6 | 1,98 | 0,58 | 6 | 1,53 | 0,53 | 0,133 | 0,889 |
| 13 | 6 | 1,62 | 0,22 | 6 | 1,90 | 0,21 | 6 | 1,93 | 0,35 | 0,123 | 0,037 |
| 16 | 6 | 1,43 | 0,40 | 6 | 1,73 | 0,45 | 6 | 1,64 | 0,37 | 0,233 | 0,254 |
| 17 | 5 | 1,32 | 0,38 | 6 | 1,67 | 0,39 | 6 | 1,39 | 0,30 | 0,249 | 0,956 |
| 18 | 6 | 1,21 | 0,33 | 6 | 1,51 | 0,58 | 6 | 1,38 | 0,38 | 0,110 | 0,208 |
| 19 | 4 | 1,49 | 0,19 | 5 | 1,59 | 0,71 | 6 | 1,34 | 0,60 | 0,663 | 0,560 |
| 20 | 6 | 0,94 | 0,16 | 6 | 1,18 | 0,33 | 5 | 1,30 | 0,63 | 0,162 | 0,260 |
| 21 | 6 | 0,95 | 0,33 | 6 | 0,98 | 0,19 | 6 | 1,01 | 0,25 | 0,815 | 0,701 |
| 26 | 5 | 1,03 | 0,34 | 6 | 1,29 | 0,47 | 6 | 1,23 | 0,56 | 0,546 | 0,831 |
| 27 | 6 | 1,03 | 0,42 | 6 | 1,49 | 0,74 | 6 | 1,16 | 0,44 | 0,050 | 0,036 |
| 28 | 6 | 0,92 | 0,39 | 6 | 1,15 | 0,55 | 5 | 1,43 | 0,35 | 0,194 | 0,028 |

Tab. 9.55: Alaninkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 6 | 4,90 | 1,13 | 6 | 5,90 | 2,15 | 6 | 8,07 | 2,96 | 0,241 | 0,086 |
| 8 | 6 | 5,47 | 0,73 | 6 | 6,17 | 1,74 | 5 | 9,36 | 3,86 | 0,439 | 0,098 |
| 11 | 6 | 6,64 | 1,10 | 6 | 6,55 | 3,03 | 6 | 7,77 | 2,39 | 0,935 | 0,162 |
| 12 | 6 | 6,87 | 1,63 | 6 | 7,84 | 3,03 | 6 | 7,41 | 3,32 | 0,489 | 0,665 |
| 13 | 6 | 7,68 | 1,71 | 4 | 4,75 | 1,11 | 6 | 8,30 | 1,50 | 0,002 | 0,494 |
| 16 | 6 | 8,75 | 2,67 | 6 | 6,49 | 1,01 | 6 | 7,01 | 1,47 | 0,058 | 0,304 |
| 17 | 6 | 9,08 | 3,15 | 6 | 6,86 | 3,18 | 6 | 6,18 | 1,26 | 0,080 | 0,021 |
| 18 | 6 | 7,18 | 2,20 | 6 | 5,14 | 0,91 | 6 | 5,19 | 0,48 | 0,066 | 0,067 |
| 19 | 6 | 7,88 | 2,03 | 5 | 6,20 | 1,39 | 6 | 5,74 | 0,68 | 0,120 | 0,061 |
| 20 | 6 | 6,42 | 1,47 | 6 | 5,46 | 1,40 | 5 | 5,38 | 0,81 | 0,093 | 0,104 |
| 21 | 6 | 6,45 | 0,61 | 6 | 4,95 | 1,46 | 6 | 4,16 | 0,83 | 0,034 | 0,006 |
| 26 | 6 | 5,82 | 2,03 | 6 | 6,39 | 2,34 | 6 | 6,08 | 1,51 | 0,054 | 0,697 |
| 27 | 6 | 6,18 | 2,14 | 6 | 5,97 | 1,95 | 6 | 5,45 | 1,44 | 0,459 | 0,187 |
| 28 | 6 | 4,98 | 0,91 | 6 | 6,04 | 2,18 | 6 | 4,97 | 0,67 | 0,237 | 0,973 |

Tab. 9.56: Argininkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 6 | 1,93 | 0,46 | 6 | 2,18 | 0,36 | 5 | 2,01 | 0,42 | 0,011 | 0,891 |
| 8 | 6 | 2,07 | 0,57 | 6 | 2,20 | 0,51 | 4 | 2,85 | 0,37 | 0,512 | 0,083 |
| 11 | 6 | 3,63 | 0,38 | 6 | 4,05 | 1,32 | 6 | 3,22 | 0,37 | 0,408 | 0,199 |
| 12 | 6 | 3,54 | 0,49 | 6 | 4,60 | 1,05 | 6 | 3,24 | 1,22 | 0,061 | 0,575 |
| 13 | 6 | 3,67 | 0,69 | 6 | 3,59 | 0,25 | 5 | 3,17 | 0,44 | 0,809 | 0,016 |
| 16 | 6 | 3,62 | 0,86 | 6 | 4,62 | 1,65 | 6 | 3,54 | 0,83 | 0,182 | 0,784 |
| 17 | 6 | 3,90 | 1,48 | 6 | 4,50 | 1,30 | 6 | 3,18 | 0,89 | 0,064 | 0,124 |
| 18 | 6 | 3,43 | 0,68 | 5 | 4,71 | 1,69 | 6 | 3,60 | 0,73 | 0,057 | 0,379 |
| 19 | 6 | 3,72 | 1,01 | 5 | 3,88 | 2,33 | 6 | 3,40 | 1,31 | 0,655 | 0,619 |
| 20 | 6 | 2,77 | 0,36 | 6 | 3,34 | 1,09 | 5 | 3,17 | 0,86 | 0,159 | 0,236 |
| 21 | 6 | 2,46 | 0,63 | 6 | 2,45 | 0,58 | 6 | 2,25 | 0,23 | 0,974 | 0,450 |
| 26 | 5 | 2,42 | 0,36 | 6 | 3,17 | 0,32 | 6 | 3,41 | 0,28 | 0,033 | 0,019 |
| 27 | 6 | 2,43 | 0,75 | 6 | 3,16 | 0,60 | 6 | 2,64 | 0,42 | 0,184 | 0,466 |
| 28 | 6 | 2,52 | 0,50 | 6 | 2,92 | 0,57 | 6 | 2,89 | 0,46 | 0,326 | 0,114 |

Tab. 9.57: Tyrosinkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 6 | 0,35 | 0,13 | 6 | 0,41 | 0,08 | 6 | 0,54 | 0,30 | 0,376 | 0,219 |
| 8 | 6 | 0,51 | 0,22 | 5 | 0,56 | 0,25 | 5 | 0,58 | 0,19 | 0,980 | 0,491 |
| 11 | 6 | 0,58 | 0,19 | 6 | 0,74 | 0,38 | 6 | 0,61 | 0,31 | 0,122 | 0,829 |
| 12 | 6 | 0,46 | 0,08 | 5 | 0,83 | 0,45 | 6 | 0,62 | 0,34 | 0,154 | 0,329 |
| 13 | 6 | 0,77 | 0,33 | 6 | 0,77 | 0,20 | 6 | 0,65 | 0,23 | 0,989 | 0,549 |
| 16 | 6 | 0,68 | 0,30 | 6 | 0,78 | 0,36 | 6 | 0,58 | 0,18 | 0,329 | 0,536 |
| 17 | 5 | 0,55 | 0,18 | 6 | 0,76 | 0,30 | 6 | 0,62 | 0,28 | 0,260 | 0,719 |
| 18 | 6 | 0,59 | 0,23 | 6 | 0,62 | 0,23 | 6 | 0,57 | 0,24 | 0,664 | 0,696 |
| 19 | 6 | 0,70 | 0,30 | 5 | 0,57 | 0,24 | 6 | 0,61 | 0,26 | 0,216 | 0,489 |
| 20 | 6 | 0,42 | 0,15 | 6 | 0,50 | 0,21 | 5 | 0,56 | 0,31 | 0,143 | 0,102 |
| 21 | 6 | 0,47 | 0,17 | 6 | 0,39 | 0,15 | 6 | 0,42 | 0,17 | 0,155 | 0,156 |
| 26 | 4 | 0,40 | 0,18 | 6 | 0,53 | 0,26 | 6 | 0,51 | 0,25 | 0,628 | 0,627 |
| 27 | 6 | 0,39 | 0,21 | 5 | 0,47 | 0,25 | 6 | 0,44 | 0,13 | 0,230 | 0,229 |
| 28 | 6 | 0,33 | 0,11 | 6 | 0,41 | 0,21 | 6 | 0,50 | 0,17 | 0,194 | 0,053 |

Tab. 9.58: Valinkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 6 | 0,86 | 0,32 | 6 | 1,06 | 0,08 | 6 | 1,18 | 0,28 | 0,164 | 0,226 |
| 8 | 6 | 0,94 | 0,26 | 6 | 1,11 | 0,40 | 6 | 1,50 | 0,40 | 0,513 | 0,087 |
| 11 | 5 | 1,44 | 0,30 | 6 | 1,27 | 0,27 | 6 | 1,83 | 0,39 | 0,402 | 0,196 |
| 12 | 6 | 1,57 | 0,40 | 6 | 1,59 | 0,47 | 6 | 1,84 | 0,34 | 0,909 | 0,204 |
| 13 | 6 | 1,78 | 0,31 | 6 | 2,03 | 0,48 | 5 | 2,12 | 0,19 | 0,411 | 0,065 |
| 16 | 6 | 1,92 | 0,66 | 6 | 2,30 | 0,73 | 6 | 2,15 | 0,36 | 0,516 | 0,485 |
| 17 | 5 | 1,95 | 0,65 | 6 | 2,84 | 0,96 | 6 | 2,11 | 0,52 | 0,311 | 0,743 |
| 18 | 6 | 1,56 | 0,30 | 6 | 2,17 | 0,47 | 6 | 1,65 | 0,47 | 0,055 | 0,534 |
| 19 | 5 | 2,01 | 0,46 | 5 | 2,59 | 1,18 | 6 | 1,93 | 0,60 | 0,437 | 0,697 |
| 20 | 6 | 1,20 | 0,26 | 6 | 1,31 | 0,42 | 5 | 1,62 | 0,64 | 0,520 | 0,107 |
| 21 | 6 | 1,30 | 0,22 | 6 | 1,10 | 0,20 | 6 | 1,16 | 0,19 | 0,204 | 0,170 |
| 26 | 6 | 1,24 | 0,88 | 6 | 1,11 | 0,50 | 6 | 1,24 | 0,59 | 0,614 | 0,999 |
| 27 | 6 | 0,96 | 0,49 | 6 | 1,09 | 0,55 | 6 | 1,06 | 0,44 | 0,355 | 0,212 |
| 28 | 6 | 0,83 | 0,33 | 6 | 0,90 | 0,47 | 6 | 1,12 | 0,29 | 0,624 | 0,029 |

Tab. 9.59: Methioninkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | | | | | | | | 1 | 0,19 | . | |
| 8 | | | | | | | | 2 | 0,34 | 0,10 | |
| 11 | 2 | 0,35 | 0,21 | 2 | 0,23 | 0,03 | 2 | 0,31 | 0,03 | 0,525 | 0,802 |
| 12 | 2 | 0,26 | 0,11 | 2 | 0,33 | 0,13 | 2 | 0,27 | 0,02 | 0,111 | 0,973 |
| 13 | 2 | 0,26 | 0,07 | 2 | 0,42 | 0,05 | 2 | 0,37 | 0,09 | 0,066 | 0,080 |
| 16 | 2 | 0,28 | 0,10 | | | | | 2 | 0,36 | 0,07 | 0,203 |
| 17 | 2 | 0,31 | 0,22 | | | | | 2 | 0,31 | 0,03 | 0,975 |
| 18 | 2 | 0,27 | 0,10 | 2 | 0,39 | 0,13 | 2 | 0,17 | 0,01 | 0,119 | 0,374 |
| 19 | 2 | 0,29 | 0,12 | 2 | 0,57 | 0,21 | 2 | 0,23 | 0,02 | 0,434 | 0,654 |
| 20 | 2 | 0,22 | 0,07 | 2 | 0,19 | 0,03 | 2 | 0,23 | 0,06 | 0,390 | 0,683 |
| 21 | 2 | 0,19 | 0,03 | 1 | 0,27 | | | 2 | 0,21 | 0,02 | 0,261 |
| 26 | 2 | 0,13 | 0,10 | | | | | 1 | 0,16 | | |
| 27 | | | | | | | | 1 | 0,15 | | |
| 28 | | | | | | | | 1 | 0,20 | | |

Tab. 9.60: Tryptophankonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | 1 | 0,63 | | | |
| 12 | 2 | 0,30 | 0,23 | 2 | 0,31 | 0,04 | 2 | 0,32 | 0,02 | 0,963 | 0,910 |
| 13 | 2 | 0,55 | 0,09 | 2 | 0,51 | 0,01 | 2 | 0,43 | 0,20 | 0,697 | 0,371 |
| 16 | 2 | 0,53 | 0,10 | 2 | 0,46 | 0,13 | 2 | 0,50 | 0,11 | 0,732 | 0,213 |
| 17 | 2 | 0,55 | 0,11 | 2 | 0,52 | 0,13 | 2 | 0,41 | 0,24 | 0,868 | 0,352 |
| 18 | 2 | 0,63 | 0,12 | 2 | 0,51 | 0,02 | 2 | 0,61 | 0,12 | 0,354 | 0,940 |
| 19 | 2 | 0,49 | 0,22 | 2 | 0,59 | 0,64 | 2 | 0,60 | 0,36 | 0,805 | 0,833 |
| 20 | 2 | 0,57 | 0,09 | 2 | 0,70 | 0,18 | 2 | 0,38 | 0,20 | 0,287 | 0,264 |
| 21 | 2 | 0,57 | 0,08 | 2 | 0,69 | 0,08 | 2 | 0,59 | 0,20 | 0,000 | 0,807 |
| 26 | | | | | | | | | | | |
| 27 | | | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | | | |

Tab. 9.61: Phenylalaninkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 1 | 0,19 | | 2 | 0,16 | 0,06 | | | | | |
| 8 | | | | 4 | 0,20 | 0,09 | 3 | 0,21 | 0,06 | | |
| 11 | 4 | 0,23 | 0,01 | 4 | 0,26 | 0,07 | 6 | 0,30 | 0,11 | 0,356 | 0,057 |
| 12 | 6 | 0,26 | 0,08 | 4 | 0,29 | 0,05 | 6 | 0,33 | 0,14 | 0,804 | 0,238 |
| 13 | 6 | 0,30 | 0,12 | 3 | 0,29 | 0,12 | 6 | 0,39 | 0,14 | 0,832 | 0,053 |
| 16 | 4 | 0,30 | 0,10 | 6 | 0,25 | 0,05 | 6 | 0,44 | 0,11 | 0,782 | 0,140 |
| 17 | 4 | 0,26 | 0,08 | 6 | 0,24 | 0,08 | 6 | 0,41 | 0,13 | 0,394 | 0,218 |
| 18 | 4 | 0,25 | 0,06 | 6 | 0,22 | 0,08 | 5 | 0,28 | 0,03 | 0,758 | 0,483 |
| 19 | 5 | 0,28 | 0,09 | 5 | 0,32 | 0,07 | 5 | 0,38 | 0,09 | 0,281 | 0,398 |
| 20 | 2 | 0,16 | 0,01 | 1 | 0,16 | | 4 | 0,41 | 0,24 | | 0,312 |
| 21 | 1 | 0,19 | | | | | 1 | 0,15 | | | |
| 26 | 3 | 0,18 | 0,10 | 3 | 0,23 | 0,04 | 2 | 0,22 | 0,01 | | |
| 27 | 1 | 0,24 | | 2 | 0,22 | 0,06 | 1 | 0,25 | | | |
| 28 | 1 | 0,14 | | 2 | 0,14 | 0,01 | 2 | 0,20 | 0,03 | | |

Tab. 9.62: Isoleucinkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 3 | 0,29 | 0,19 | 6 | 0,24 | 0,08 | 6 | 0,21 | 0,06 | 0,836 | 0,521 |
| 8 | 4 | 0,19 | 0,07 | 6 | 0,23 | 0,12 | 5 | 0,32 | 0,23 | 0,745 | 0,391 |
| 11 | 6 | 0,43 | 0,34 | 6 | 0,25 | 0,08 | 6 | 0,41 | 0,15 | 0,242 | 0,873 |
| 12 | 6 | 0,43 | 0,15 | 6 | 0,35 | 0,12 | 6 | 0,51 | 0,15 | 0,090 | 0,271 |
| 13 | 6 | 0,49 | 0,14 | 6 | 0,53 | 0,29 | 6 | 0,65 | 0,24 | 0,574 | 0,033 |
| 16 | 6 | 0,50 | 0,20 | 4 | 0,43 | 0,07 | 6 | 0,54 | 0,12 | 0,313 | 0,719 |
| 17 | 5 | 0,51 | 0,20 | 4 | 0,46 | 0,16 | 6 | 0,64 | 0,19 | 0,536 | 0,433 |
| 18 | 6 | 0,48 | 0,10 | 4 | 0,49 | 0,24 | 5 | 0,43 | 0,08 | 0,786 | 0,686 |
| 19 | 5 | 0,63 | 0,17 | 4 | 0,63 | 0,24 | 6 | 0,55 | 0,25 | 0,832 | 0,347 |
| 20 | 6 | 0,29 | 0,07 | 6 | 0,35 | 0,08 | 5 | 0,47 | 0,22 | 0,127 | 0,144 |
| 21 | 6 | 0,34 | 0,12 | 5 | 0,36 | 0,19 | 6 | 0,34 | 0,09 | 0,875 | 0,999 |
| 26 | 5 | 0,23 | 0,09 | 6 | 0,34 | 0,14 | 6 | 0,37 | 0,20 | 0,312 | 0,191 |
| 27 | 6 | 0,29 | 0,11 | 5 | 0,34 | 0,12 | 5 | 0,35 | 0,06 | 0,670 | 0,396 |
| 28 | 6 | 0,22 | 0,08 | 5 | 0,25 | 0,06 | 6 | 0,32 | 0,12 | 0,427 | 0,054 |

Tab. 9.63: Leucinkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 4 | 0,17 | 0,06 | 5 | 0,19 | 0,04 | 6 | 0,31 | 0,25 | 0,824 | 0,374 |
| 8 | 4 | 0,27 | 0,07 | 6 | 0,24 | 0,09 | 6 | 0,35 | 0,25 | 0,408 | 0,074 |
| 11 | 6 | 0,52 | 0,43 | 6 | 0,43 | 0,11 | 6 | 0,56 | 0,27 | 0,656 | 0,550 |
| 12 | 6 | 0,52 | 0,12 | 6 | 0,49 | 0,23 | 6 | 0,61 | 0,19 | 0,696 | 0,133 |
| 13 | 6 | 0,62 | 0,28 | 4 | 0,45 | 0,13 | 6 | 0,74 | 0,29 | 0,999 | 0,144 |
| 16 | 6 | 0,51 | 0,28 | 4 | 0,44 | 0,12 | 6 | 0,80 | 0,46 | 0,342 | 0,051 |
| 17 | 6 | 0,50 | 0,26 | 4 | 0,46 | 0,15 | 5 | 0,88 | 0,27 | 0,362 | 0,129 |
| 18 | 6 | 0,47 | 0,20 | 4 | 0,40 | 0,15 | 6 | 0,70 | 0,20 | 0,372 | 0,004 |
| 19 | 5 | 0,66 | 0,37 | 3 | 0,61 | 0,07 | 6 | 0,72 | 0,27 | 0,355 | 0,592 |
| 20 | 6 | 0,24 | 0,05 | 6 | 0,26 | 0,06 | 5 | 0,57 | 0,37 | 0,655 | 0,091 |
| 21 | 6 | 0,29 | 0,12 | 6 | 0,27 | 0,12 | 6 | 0,31 | 0,07 | 0,800 | 0,565 |
| 26 | 6 | 0,36 | 0,20 | 6 | 0,33 | 0,10 | 6 | 0,33 | 0,12 | 0,661 | 0,780 |
| 27 | 6 | 0,36 | 0,12 | 6 | 0,41 | 0,15 | 6 | 0,36 | 0,12 | 0,509 | 0,962 |
| 28 | 6 | 0,27 | 0,12 | 6 | 0,25 | 0,09 | 6 | 0,36 | 0,13 | 0,269 | 0,066 |

Tab. 9.64: Serotoninkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|---|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | |
| 11 | | | | 1 | 0,73 | | 2 | 1,68 | 0,28 | | |
| 12 | 1 | 1,52 | | 2 | 1,47 | 0,22 | | | | | |
| 13 | 1 | 1,55 | | 1 | 0,54 | | 2 | 0,84 | 0,07 | | |
| 16 | 1 | 2,19 | | 2 | 1,63 | 0,53 | 2 | 1,32 | 0,17 | | |
| 17 | 1 | 2,02 | | 2 | 1,69 | 0,71 | 2 | 1,37 | 0,57 | | |
| 18 | 1 | 3,30 | | 2 | 2,23 | 0,74 | 2 | 1,60 | 0,07 | | |
| 19 | 1 | 2,89 | | 2 | 1,61 | 0,00 | 2 | 1,66 | 0,08 | | |
| 20 | 1 | 1,04 | | 2 | 0,75 | 0,34 | 1 | 0,50 | | | |
| 21 | 1 | 0,51 | | 2 | 0,85 | 0,19 | 1 | 0,33 | | | |
| 26 | 1 | 0,10 | | 1 | 0,45 | | | | | | |
| 27 | | | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | | | |

Tab. 9.65: Tyraminkonzentrationen in Laufgruppe III [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S08 | | | Zulage S09 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S08 | K01/S09 |
| 7 | 2 | 1,00 | 0,20 | 2 | 1,33 | 0,22 | 3 | 1,16 | 0,20 | 0,462 | 0,761 |
| 8 | 2 | 0,67 | 0,18 | 2 | 0,88 | 0,20 | 2 | 0,86 | 0,07 | 0,576 | 0,475 |
| 11 | 2 | 51,9 | 13,9 | 2 | 126 | 0,95 | 2 | 96,7 | 2,77 | 0,079 | 0,111 |
| 12 | 2 | 33,6 | 7,60 | 2 | 148 | 41,0 | 2 | 112 | 2,70 | | |
| 13 | 2 | 2,58 | 1,19 | 2 | 81,1 | 85,1 | 2 | 59,3 | 4,47 | 0,412 | 0,026 |
| 16 | 2 | 9,02 | 0,60 | 2 | 21,5 | 7,02 | 2 | 3,47 | 0,84 | 0,222 | 0,019 |
| 17 | 2 | 4,01 | 3,31 | 2 | 1,60 | 0,09 | 2 | 1,22 | 0,12 | 0,500 | 0,433 |
| 18 | 2 | 3,02 | 3,20 | 2 | 3,81 | 3,82 | 2 | 0,78 | 0,12 | 0,323 | 0,490 |
| 19 | 2 | 2,95 | 3,15 | 2 | 0,76 | 0,01 | 2 | 0,85 | 0,06 | 0,504 | 0,527 |
| 20 | 2 | 0,51 | 0,19 | 2 | 0,51 | 0,07 | 2 | 0,49 | 0,02 | 0,933 | 0,892 |
| 21 | 2 | 0,35 | 0,12 | 1 | 0,26 | | 1 | 0,35 | | | |
| 26 | 2 | 0,31 | 0,05 | 2 | 0,47 | 0,16 | 1 | 0,26 | | 0,490 | |
| 27 | | | | 1 | 0,48 | | 1 | 0,26 | | | |
| 28 | 2 | 0,34 | 0,02 | 2 | 0,34 | 0,06 | 2 | 0,31 | 0,05 | 0,917 | 0,454 |

Tab. 9.66: Ammoniakkonzentrationen in Laufgruppe IV [mmol/L]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 1 | 6 | 5,94 | 0,98 | 6 | 4,96 | 1,16 | 6 | 5,32 | 1,12 | 0,027 | 0,301 |
| 2 | 6 | 5,76 | 1,08 | 6 | 4,98 | 0,81 | 6 | 5,50 | 1,41 | 0,160 | 0,786 |
| 3 | 6 | 5,83 | 1,72 | 6 | 5,30 | 1,59 | 6 | 5,39 | 2,79 | 0,037 | 0,431 |
| 4 | 6 | 4,70 | 0,90 | 6 | 4,42 | 0,64 | 6 | 4,71 | 1,24 | 0,456 | 0,989 |
| 5 | 6 | 4,93 | 1,11 | 6 | 5,22 | 0,66 | 6 | 5,32 | 0,86 | 0,494 | 0,555 |
| 6 | 6 | 4,62 | 1,27 | 6 | 3,84 | 0,58 | 6 | 3,63 | 1,17 | 0,057 | 0,066 |
| 7 | 6 | 4,33 | 1,57 | 6 | 3,85 | 0,66 | 6 | 3,60 | 1,04 | 0,468 | 0,496 |
| 8 | 6 | 4,67 | 1,38 | 6 | 4,41 | 1,67 | 6 | 4,53 | 1,88 | 0,495 | 0,861 |
| 9 | 6 | 5,83 | 0,95 | 6 | 5,58 | 1,90 | 6 | 4,78 | 1,83 | 0,685 | 0,118 |
| 10 | 6 | 4,51 | 1,95 | 6 | 7,08 | 1,08 | 6 | 7,31 | 1,07 | 0,021 | 0,026 |
| 11 | 6 | 5,74 | 2,60 | 6 | 8,79 | 2,85 | 6 | 8,61 | 3,12 | 0,026 | 0,120 |
| 12 | 6 | 6,79 | 2,21 | 6 | 6,80 | 1,76 | 6 | 6,41 | 1,91 | 0,998 | 0,687 |
| 13 | 6 | 7,00 | 1,55 | 6 | 8,75 | 0,93 | 6 | 7,71 | 1,03 | 0,100 | 0,411 |
| 14 | 6 | 7,09 | 1,00 | 6 | 9,43 | 1,12 | 6 | 9,62 | 0,81 | 0,011 | 0,010 |
| 15 | 6 | 8,22 | 0,87 | 6 | 8,82 | 2,31 | 6 | 7,79 | 2,42 | 0,561 | 0,700 |
| 16 | 6 | 8,97 | 1,28 | 6 | 11,0 | 2,85 | 6 | 10,2 | 2,87 | 0,060 | 0,189 |
| 17 | 6 | 9,35 | 0,81 | 6 | 11,3 | 1,71 | 6 | 12,2 | 4,59 | 0,010 | 0,221 |
| 18 | 6 | 9,06 | 0,76 | 6 | 11,2 | 1,98 | 6 | 11,9 | 1,98 | 0,046 | 0,021 |
| 19 | 6 | 8,73 | 1,28 | 6 | 9,42 | 0,81 | 6 | 9,44 | 1,82 | 0,116 | 0,388 |
| 20 | 6 | 7,95 | 1,31 | 6 | 7,19 | 1,21 | 6 | 8,71 | 1,73 | 0,061 | 0,244 |
| 21 | 6 | 6,10 | 1,11 | 6 | 5,42 | 1,51 | 6 | 5,64 | 1,56 | 0,242 | 0,509 |
| 22 | 6 | 5,55 | 0,82 | 6 | 4,61 | 0,66 | 6 | 4,78 | 0,71 | 0,124 | 0,167 |
| 23 | 6 | 5,84 | 0,92 | 6 | 5,02 | 0,60 | 6 | 5,35 | 0,78 | 0,227 | 0,414 |
| 24 | 6 | 5,82 | 0,80 | 6 | 4,91 | 1,15 | 6 | 4,58 | 0,55 | 0,129 | 0,014 |
| 25 | 6 | 4,85 | 0,39 | 6 | 3,75 | 1,25 | 6 | 3,49 | 1,22 | 0,143 | 0,083 |
| 26 | 6 | 4,88 | 0,40 | 6 | 3,78 | 1,03 | 6 | 3,30 | 0,79 | 0,059 | 0,005 |
| 27 | 6 | 4,84 | 0,82 | 6 | 3,55 | 0,50 | 6 | 3,25 | 1,25 | 0,020 | 0,021 |
| 28 | 6 | 5,84 | 0,93 | 6 | 5,59 | 1,65 | 6 | 5,56 | 1,78 | 0,666 | 0,660 |

Tab. 9.67: Gehalte bakteriellen Proteins in Laufgruppe IV [$\mu\text{g RSA/mL}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 3 | 6 | 76,7 | 11,9 | 6 | 74,0 | 5,58 | 6 | 80,8 | 8,56 | 0,574 | 0,533 |
| 6 | 6 | 75,3 | 8,22 | 6 | 71,7 | 9,21 | 6 | 63,7 | 12,9 | 0,282 | 0,103 |
| 7 | 6 | 80,7 | 15,3 | 6 | 72,7 | 14,3 | 6 | 69,5 | 18,8 | 0,117 | 0,088 |
| 8 | 6 | 78,0 | 11,1 | 6 | 64,0 | 10,5 | 6 | 52,3 | 5,72 | 0,005 | 0,007 |
| 9 | 6 | 87,4 | 14,7 | 6 | 75,2 | 21,3 | 5 | 79,2 | 18,3 | 0,036 | 0,010 |
| 10 | 6 | 96,3 | 12,2 | 6 | 95,6 | 21,8 | 6 | 79,7 | 13,8 | 0,914 | 0,007 |
| 11 | 6 | 87,5 | 13,0 | 6 | 94,9 | 7,66 | 6 | 84,2 | 12,1 | 0,220 | 0,271 |
| 12 | 6 | 101 | 9,06 | 6 | 108 | 9,95 | 6 | 97,0 | 6,23 | 0,059 | 0,327 |
| 13 | 6 | 86,2 | 9,21 | 6 | 95,1 | 10,6 | 6 | 83,2 | 9,17 | 0,021 | 0,011 |
| 14 | 6 | 98,4 | 7,46 | 6 | 109 | 14,0 | 6 | 96,3 | 18,0 | 0,019 | 0,700 |
| 15 | 6 | 101 | 15,9 | 6 | 106 | 20,3 | 6 | 91,1 | 7,55 | 0,188 | 0,054 |
| 16 | 6 | 90,9 | 20,7 | 6 | 97,3 | 19,9 | 6 | 85,4 | 17,0 | 0,323 | 0,573 |
| 17 | 6 | 86,3 | 6,73 | 6 | 87,6 | 7,06 | 6 | 82,8 | 12,2 | 0,725 | 0,566 |
| 18 | 6 | 106 | 10,9 | 6 | 105 | 12,2 | 6 | 96,8 | 4,73 | 0,840 | 0,138 |
| 19 | 6 | 80,9 | 11,7 | 6 | 84,0 | 10,2 | 6 | 73,3 | 12,3 | 0,554 | 0,256 |
| 20 | 6 | 91,0 | 11,8 | 6 | 84,5 | 4,72 | 6 | 82,9 | 11,5 | 0,222 | 0,213 |
| 21 | 6 | 85,4 | 21,1 | 6 | 76,8 | 13,5 | 6 | 79,9 | 14,7 | 0,098 | 0,518 |
| 22 | 6 | 88,0 | 13,8 | 6 | 84,1 | 15,1 | 6 | 80,8 | 10,4 | 0,332 | 0,172 |
| 23 | 6 | 84,2 | 8,64 | 6 | 80,0 | 18,5 | 6 | 79,2 | 12,0 | 0,410 | 0,184 |
| 24 | 6 | 91,1 | 11,2 | 6 | 84,8 | 20,7 | 6 | 88,0 | 15,4 | 0,209 | 0,515 |
| 25 | 6 | 91,3 | 19,9 | 6 | 82,4 | 28,9 | 6 | 79,8 | 19,5 | 0,103 | 0,004 |
| 26 | 6 | 76,6 | 12,0 | 6 | 77,0 | 11,6 | 6 | 72,1 | 7,99 | 0,874 | 0,182 |
| 27 | 6 | 77,5 | 12,5 | 4 | 67,9 | 1,46 | 4 | 68,4 | 8,61 | 0,064 | 0,219 |
| 28 | 6 | 85,4 | 11,7 | 6 | 78,0 | 16,0 | 6 | 83,7 | 16,0 | 0,016 | 0,668 |

Tab. 9.68: Summe der Konzentrationen der messbaren fAS in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 36,9 | 4,88 | 6 | 37,2 | 5,03 | 6 | 37,8 | 3,63 | 0,937 | 0,641 |
| 8 | 6 | 31,7 | 3,57 | 6 | 34,2 | 7,60 | 6 | 34,2 | 6,81 | 0,367 | 0,205 |
| 11 | 6 | 44,8 | 9,92 | 6 | 41,2 | 13,5 | 6 | 42,0 | 14,3 | 0,300 | 0,620 |
| 12 | 6 | 49,5 | 5,58 | 6 | 47,6 | 16,3 | 6 | 40,1 | 10,6 | 0,709 | 0,031 |
| 13 | 6 | 48,7 | 9,83 | 6 | 45,8 | 9,42 | 6 | 39,6 | 10,9 | 0,588 | 0,109 |
| 16 | 6 | 38,8 | 7,81 | 6 | 42,6 | 14,8 | 6 | 41,7 | 11,0 | 0,325 | 0,578 |
| 17 | 6 | 43,4 | 9,54 | 6 | 43,3 | 6,96 | 6 | 41,5 | 6,22 | 0,994 | 0,746 |
| 18 | 6 | 47,7 | 8,50 | 6 | 43,6 | 15,2 | 6 | 40,9 | 11,6 | 0,317 | 0,034 |
| 19 | 6 | 44,6 | 10,3 | 6 | 42,6 | 15,0 | 6 | 38,1 | 12,0 | 0,757 | 0,339 |
| 20 | 6 | 39,5 | 5,47 | 6 | 35,2 | 10,7 | 6 | 39,9 | 8,30 | 0,211 | 0,918 |
| 21 | 6 | 42,0 | 5,44 | 6 | 34,2 | 7,60 | 6 | 37,9 | 7,99 | 0,050 | 0,213 |
| 26 | 6 | 40,6 | 7,91 | 6 | 38,0 | 3,95 | 6 | 31,6 | 3,71 | 0,450 | 0,022 |
| 27 | 6 | 37,9 | 6,03 | 6 | 33,0 | 5,91 | 6 | 34,1 | 2,32 | 0,103 | 0,216 |
| 28 | 6 | 38,9 | 3,98 | 6 | 36,6 | 4,41 | 6 | 39,0 | 4,46 | 0,211 | 0,950 |

Tab. 9.69: Aspartatkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 5,48 | 1,54 | 6 | 5,07 | 1,49 | 6 | 5,46 | 1,29 | 0,383 | 0,951 |
| 8 | 6 | 4,05 | 0,95 | 6 | 4,43 | 1,10 | 6 | 4,44 | 1,01 | 0,331 | 0,238 |
| 11 | 6 | 5,94 | 2,20 | 6 | 4,69 | 2,48 | 6 | 5,12 | 2,75 | 0,156 | 0,388 |
| 12 | 6 | 6,14 | 1,29 | 6 | 5,14 | 2,65 | 5 | 4,65 | 1,96 | 0,200 | 0,046 |
| 13 | 6 | 6,23 | 1,63 | 6 | 5,17 | 2,22 | 6 | 4,61 | 1,96 | 0,234 | 0,041 |
| 16 | 6 | 4,06 | 1,37 | 6 | 4,79 | 2,25 | 6 | 4,69 | 1,89 | 0,155 | 0,300 |
| 17 | 6 | 4,79 | 1,64 | 6 | 4,93 | 1,56 | 6 | 5,00 | 1,01 | 0,886 | 0,818 |
| 18 | 6 | 5,34 | 1,98 | 6 | 5,07 | 2,62 | 6 | 4,46 | 1,80 | 0,489 | 0,048 |
| 19 | 6 | 5,16 | 1,76 | 6 | 4,76 | 2,48 | 6 | 4,12 | 1,72 | 0,604 | 0,149 |
| 20 | 6 | 4,84 | 1,07 | 6 | 4,08 | 1,56 | 5 | 4,37 | 1,15 | 0,142 | 0,211 |
| 21 | 6 | 5,72 | 1,77 | 6 | 4,35 | 1,27 | 6 | 4,91 | 1,56 | 0,156 | 0,341 |
| 26 | 6 | 5,97 | 1,65 | 6 | 4,95 | 0,80 | 6 | 4,24 | 0,88 | 0,194 | 0,023 |
| 27 | 6 | 5,52 | 0,91 | 6 | 4,41 | 1,04 | 6 | 4,86 | 0,81 | 0,012 | 0,336 |
| 28 | 6 | 5,20 | 0,82 | 6 | 4,74 | 1,16 | 6 | 5,41 | 0,89 | 0,125 | 0,298 |

Tab. 9.70: Glutamatkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 15,0 | 1,88 | 6 | 15,1 | 1,75 | 6 | 15,2 | 1,74 | 0,971 | 0,791 |
| 8 | 6 | 13,1 | 1,29 | 6 | 13,3 | 1,35 | 6 | 14,5 | 2,50 | 0,797 | 0,093 |
| 11 | 6 | 16,6 | 3,13 | 6 | 16,3 | 4,96 | 6 | 17,3 | 5,45 | 0,830 | 0,702 |
| 12 | 6 | 18,9 | 1,87 | 6 | 18,7 | 5,22 | 6 | 18,2 | 6,40 | 0,898 | 0,736 |
| 13 | 6 | 18,9 | 4,59 | 6 | 17,4 | 3,75 | 6 | 16,5 | 5,14 | 0,489 | 0,315 |
| 16 | 6 | 14,7 | 3,17 | 6 | 15,9 | 6,62 | 6 | 17,5 | 4,85 | 0,512 | 0,110 |
| 17 | 6 | 17,1 | 3,29 | 6 | 16,4 | 3,47 | 6 | 17,6 | 4,26 | 0,778 | 0,848 |
| 18 | 6 | 19,4 | 5,52 | 6 | 17,7 | 6,80 | 6 | 18,3 | 6,08 | 0,184 | 0,183 |
| 19 | 6 | 18,6 | 5,29 | 6 | 17,0 | 6,66 | 6 | 16,7 | 5,96 | 0,535 | 0,487 |
| 20 | 6 | 16,4 | 2,60 | 6 | 14,4 | 4,95 | 6 | 17,5 | 5,24 | 0,191 | 0,671 |
| 21 | 6 | 17,8 | 1,49 | 6 | 14,3 | 3,75 | 6 | 16,0 | 3,02 | 0,067 | 0,194 |
| 26 | 6 | 18,0 | 3,56 | 6 | 15,9 | 1,88 | 6 | 13,4 | 2,00 | 0,230 | 0,017 |
| 27 | 6 | 16,1 | 2,18 | 6 | 13,7 | 2,35 | 6 | 14,0 | 1,63 | 0,040 | 0,147 |
| 28 | 6 | 15,7 | 2,36 | 6 | 14,6 | 0,91 | 6 | 15,1 | 0,65 | 0,261 | 0,593 |

Tab. 9.71: Serinkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 1,38 | 0,73 | 6 | 1,43 | 0,46 | 6 | 1,44 | 0,43 | 0,897 | 0,814 |
| 8 | 6 | 1,17 | 0,32 | 5 | 1,16 | 0,45 | 6 | 1,05 | 0,36 | 0,976 | 0,518 |
| 11 | 6 | 2,05 | 0,67 | 5 | 1,28 | 0,45 | 4 | 1,33 | 0,84 | 0,015 | 0,071 |
| 12 | 6 | 1,87 | 0,44 | 6 | 1,64 | 0,62 | 5 | 2,20 | 1,35 | 0,295 | 0,769 |
| 13 | 6 | 1,62 | 0,47 | 6 | 1,70 | 0,37 | 6 | 1,22 | 0,49 | 0,806 | 0,285 |
| 16 | 5 | 1,56 | 0,56 | 6 | 1,44 | 0,57 | 6 | 1,46 | 0,93 | 0,718 | 0,961 |
| 17 | 6 | 2,03 | 1,12 | 6 | 1,50 | 0,24 | 6 | 1,32 | 0,23 | 0,363 | 0,207 |
| 18 | 6 | 1,84 | 0,55 | 6 | 1,46 | 0,70 | 6 | 1,20 | 0,39 | 0,452 | 0,121 |
| 19 | 6 | 1,72 | 0,67 | 6 | 1,38 | 0,70 | 6 | 1,17 | 0,30 | 0,489 | 0,154 |
| 20 | 6 | 1,24 | 0,18 | 6 | 1,11 | 0,32 | 6 | 1,63 | 0,65 | 0,181 | 0,237 |
| 21 | 6 | 1,61 | 0,56 | 6 | 1,03 | 0,17 | 6 | 1,23 | 0,48 | 0,073 | 0,166 |
| 26 | 5 | 1,29 | 0,31 | 6 | 1,59 | 0,83 | 6 | 1,09 | 0,10 | 0,372 | 0,199 |
| 27 | 6 | 1,26 | 0,61 | 6 | 1,20 | 0,41 | 6 | 1,41 | 0,52 | 0,827 | 0,538 |
| 28 | 5 | 1,51 | 0,49 | 6 | 1,73 | 0,81 | 5 | 2,23 | 1,29 | 0,808 | 0,154 |

Tab. 9.72: Histidinkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 0,71 | 0,27 | 6 | 0,79 | 0,18 | 6 | 0,64 | 0,21 | 0,536 | 0,464 |
| 8 | 6 | 0,59 | 0,19 | 6 | 0,70 | 0,23 | 6 | 0,55 | 0,11 | 0,116 | 0,430 |
| 11 | 6 | 2,46 | 1,41 | 6 | 1,57 | 0,84 | 6 | 1,01 | 0,46 | 0,033 | 0,031 |
| 12 | 6 | 2,31 | 1,17 | 6 | 1,47 | 0,88 | 6 | 1,05 | 0,63 | 0,025 | 0,005 |
| 13 | 6 | 2,23 | 0,56 | 6 | 1,58 | 0,80 | 6 | 0,90 | 0,57 | 0,152 | 0,002 |
| 16 | 6 | 1,52 | 0,83 | 6 | 1,54 | 1,07 | 6 | 0,82 | 0,32 | 0,934 | 0,050 |
| 17 | 6 | 1,60 | 0,49 | 6 | 1,33 | 0,71 | 6 | 0,68 | 0,31 | 0,572 | 0,025 |
| 18 | 6 | 1,93 | 0,61 | 6 | 1,23 | 0,60 | 6 | 0,75 | 0,21 | 0,197 | 0,016 |
| 19 | 6 | 1,37 | 0,31 | 6 | 0,94 | 0,43 | 6 | 0,70 | 0,22 | 0,189 | 0,013 |
| 20 | 6 | 1,12 | 0,21 | 6 | 0,78 | 0,05 | 6 | 0,80 | 0,28 | 0,013 | 0,073 |
| 21 | 6 | 1,17 | 0,20 | 6 | 0,88 | 0,22 | 6 | 0,87 | 0,16 | 0,040 | 0,016 |
| 26 | 6 | 0,97 | 0,41 | 6 | 0,72 | 0,11 | 6 | 0,62 | 0,10 | 0,251 | 0,117 |
| 27 | 6 | 0,70 | 0,14 | 6 | 0,72 | 0,11 | 6 | 0,77 | 0,25 | 0,780 | 0,657 |
| 28 | 6 | 1,14 | 0,32 | 6 | 0,94 | 0,24 | 6 | 0,96 | 0,26 | 0,009 | 0,031 |

Tab. 9.73: Glycinkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 3,36 | 0,82 | 6 | 3,71 | 1,51 | 6 | 3,72 | 0,84 | 0,700 | 0,351 |
| 8 | 6 | 2,90 | 0,49 | 6 | 3,85 | 2,59 | 6 | 2,84 | 0,78 | 0,349 | 0,847 |
| 11 | 6 | 5,38 | 1,35 | 6 | 5,60 | 2,49 | 6 | 5,41 | 2,62 | 0,808 | 0,987 |
| 12 | 6 | 5,98 | 0,97 | 6 | 6,65 | 2,12 | 5 | 5,40 | 1,00 | 0,338 | 0,430 |
| 13 | 6 | 6,11 | 1,33 | 6 | 6,55 | 1,10 | 6 | 4,95 | 1,51 | 0,525 | 0,198 |
| 16 | 6 | 5,20 | 1,55 | 6 | 5,94 | 1,63 | 6 | 5,41 | 1,67 | 0,371 | 0,866 |
| 17 | 6 | 5,63 | 2,41 | 6 | 5,96 | 0,61 | 6 | 5,55 | 1,20 | 0,712 | 0,911 |
| 18 | 6 | 5,67 | 0,86 | 6 | 5,24 | 1,51 | 6 | 4,83 | 1,31 | 0,599 | 0,145 |
| 19 | 6 | 5,11 | 1,56 | 6 | 5,91 | 2,20 | 6 | 4,49 | 1,84 | 0,536 | 0,627 |
| 20 | 6 | 4,05 | 0,55 | 6 | 3,75 | 1,14 | 6 | 4,60 | 1,55 | 0,548 | 0,497 |
| 21 | 6 | 4,21 | 0,70 | 6 | 3,51 | 1,05 | 6 | 4,23 | 1,78 | 0,116 | 0,975 |
| 26 | 5 | 3,77 | 1,29 | 6 | 3,73 | 0,66 | 6 | 2,83 | 0,63 | 0,831 | 0,100 |
| 27 | 6 | 3,59 | 1,10 | 6 | 3,06 | 0,81 | 6 | 3,33 | 0,58 | 0,285 | 0,586 |
| 28 | 6 | 4,07 | 1,41 | 6 | 3,52 | 0,86 | 6 | 4,33 | 1,87 | 0,125 | 0,759 |

Tab. 9.74: Threoninkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 1,08 | 0,50 | 6 | 1,18 | 0,36 | 6 | 1,07 | 0,47 | 0,613 | 0,983 |
| 8 | 6 | 0,73 | 0,12 | 6 | 1,20 | 0,75 | 6 | 0,83 | 0,12 | 0,162 | 0,005 |
| 11 | 6 | 1,61 | 0,21 | 6 | 1,36 | 0,66 | 6 | 1,36 | 0,63 | 0,415 | 0,409 |
| 12 | 6 | 1,15 | 0,45 | 6 | 1,37 | 0,75 | 5 | 1,18 | 0,45 | 0,195 | 0,922 |
| 13 | 6 | 1,15 | 0,46 | 6 | 1,35 | 0,57 | 6 | 1,21 | 0,38 | 0,308 | 0,568 |
| 16 | 6 | 1,17 | 0,62 | 6 | 1,17 | 0,59 | 6 | 1,30 | 0,59 | 0,953 | 0,711 |
| 17 | 6 | 1,18 | 0,27 | 6 | 1,29 | 0,22 | 6 | 1,32 | 0,34 | 0,441 | 0,350 |
| 18 | 6 | 1,43 | 0,60 | 6 | 1,18 | 0,57 | 6 | 1,19 | 0,62 | 0,191 | 0,053 |
| 19 | 6 | 1,17 | 0,49 | 6 | 1,24 | 0,64 | 6 | 1,17 | 0,55 | 0,715 | 0,981 |
| 20 | 6 | 1,18 | 0,22 | 6 | 1,07 | 0,32 | 5 | 1,21 | 0,19 | 0,198 | 0,988 |
| 21 | 6 | 1,19 | 0,20 | 6 | 1,03 | 0,25 | 6 | 1,20 | 0,35 | 0,239 | 0,922 |
| 26 | 5 | 1,07 | 0,29 | 6 | 1,20 | 0,22 | 6 | 0,97 | 0,09 | 0,241 | 0,429 |
| 27 | 6 | 1,11 | 0,25 | 6 | 0,99 | 0,21 | 6 | 1,11 | 0,23 | 0,370 | 0,991 |
| 28 | 6 | 1,39 | 0,71 | 6 | 1,31 | 0,53 | 6 | 1,44 | 0,53 | 0,525 | 0,866 |

Tab. 9.75: Alaninkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 6,12 | 0,92 | 6 | 5,92 | 0,77 | 6 | 6,54 | 1,46 | 0,698 | 0,202 |
| 8 | 6 | 5,28 | 0,49 | 6 | 5,23 | 1,00 | 6 | 6,01 | 1,49 | 0,892 | 0,333 |
| 11 | 6 | 5,70 | 0,99 | 6 | 5,29 | 1,21 | 6 | 5,62 | 1,42 | 0,549 | 0,919 |
| 12 | 6 | 6,60 | 1,16 | 6 | 5,86 | 1,39 | 5 | 5,58 | 0,63 | 0,317 | 0,274 |
| 13 | 6 | 6,65 | 1,71 | 6 | 5,51 | 0,47 | 6 | 5,38 | 0,42 | 0,162 | 0,146 |
| 16 | 6 | 5,75 | 1,00 | 6 | 5,31 | 1,19 | 6 | 4,99 | 0,47 | 0,116 | 0,222 |
| 17 | 6 | 5,64 | 1,36 | 6 | 5,52 | 0,53 | 6 | 5,13 | 0,70 | 0,816 | 0,240 |
| 18 | 6 | 6,09 | 1,01 | 6 | 5,38 | 0,67 | 6 | 5,11 | 0,70 | 0,212 | 0,005 |
| 19 | 6 | 5,59 | 0,93 | 6 | 5,46 | 0,72 | 6 | 4,91 | 0,74 | 0,705 | 0,268 |
| 20 | 6 | 5,64 | 0,76 | 6 | 5,10 | 0,81 | 6 | 5,24 | 0,80 | 0,293 | 0,488 |
| 21 | 6 | 5,91 | 0,75 | 6 | 5,10 | 0,66 | 6 | 5,05 | 0,62 | 0,045 | 0,039 |
| 26 | 6 | 5,99 | 1,16 | 6 | 5,32 | 0,24 | 6 | 4,78 | 0,45 | 0,216 | 0,055 |
| 27 | 6 | 5,23 | 1,10 | 6 | 4,81 | 0,79 | 6 | 4,77 | 0,46 | 0,157 | 0,259 |
| 28 | 6 | 5,32 | 0,62 | 6 | 4,99 | 0,27 | 6 | 4,95 | 0,31 | 0,161 | 0,152 |

Tab. 9.76: Argininkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 2,07 | 0,64 | 6 | 2,08 | 0,46 | 6 | 2,12 | 0,65 | 0,949 | 0,631 |
| 8 | 6 | 2,15 | 0,55 | 6 | 2,13 | 0,76 | 6 | 2,21 | 0,81 | 0,874 | 0,728 |
| 11 | 5 | 2,46 | 0,88 | 6 | 2,15 | 0,66 | 6 | 2,64 | 1,20 | 0,319 | 0,485 |
| 12 | 6 | 2,70 | 0,72 | 6 | 2,33 | 0,90 | 6 | 2,25 | 0,76 | 0,075 | 0,310 |
| 13 | 6 | 2,29 | 0,49 | 6 | 2,14 | 0,76 | 6 | 2,16 | 0,69 | 0,455 | 0,389 |
| 16 | 6 | 1,97 | 0,49 | 6 | 2,63 | 1,00 | 6 | 2,65 | 1,11 | 0,048 | 0,103 |
| 17 | 6 | 2,09 | 0,36 | 6 | 2,20 | 0,73 | 6 | 2,07 | 0,52 | 0,642 | 0,916 |
| 18 | 6 | 2,36 | 0,36 | 6 | 2,21 | 0,65 | 6 | 2,26 | 0,53 | 0,575 | 0,626 |
| 19 | 6 | 2,20 | 0,30 | 6 | 2,13 | 0,77 | 6 | 2,23 | 0,76 | 0,819 | 0,933 |
| 20 | 6 | 2,16 | 0,23 | 6 | 2,05 | 0,48 | 6 | 2,55 | 0,57 | 0,399 | 0,200 |
| 21 | 6 | 1,99 | 0,26 | 6 | 2,05 | 0,50 | 6 | 2,30 | 0,24 | 0,770 | 0,024 |
| 26 | 6 | 2,16 | 0,34 | 6 | 2,27 | 0,44 | 6 | 2,09 | 0,21 | 0,634 | 0,659 |
| 27 | 6 | 2,41 | 0,65 | 6 | 2,30 | 0,76 | 5 | 2,28 | 0,45 | 0,603 | 0,968 |
| 28 | 6 | 2,42 | 0,66 | 6 | 2,47 | 0,54 | 6 | 2,38 | 0,70 | 0,731 | 0,863 |

Tab. 9.77: Tyrosinkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 0,42 | 0,21 | 6 | 0,47 | 0,17 | 6 | 0,39 | 0,16 | 0,449 | 0,453 |
| 8 | 5 | 0,27 | 0,07 | 6 | 0,37 | 0,23 | 6 | 0,29 | 0,08 | 0,382 | 0,168 |
| 11 | 6 | 0,40 | 0,07 | 6 | 0,43 | 0,18 | 4 | 0,39 | 0,22 | 0,589 | 0,820 |
| 12 | 6 | 0,39 | 0,11 | 6 | 0,52 | 0,20 | 5 | 0,43 | 0,15 | 0,068 | 0,754 |
| 13 | 6 | 0,41 | 0,14 | 6 | 0,47 | 0,16 | 6 | 0,35 | 0,19 | 0,314 | 0,231 |
| 16 | 6 | 0,36 | 0,13 | 6 | 0,40 | 0,15 | 6 | 0,34 | 0,12 | 0,286 | 0,792 |
| 17 | 5 | 0,38 | 0,09 | 6 | 0,45 | 0,09 | 6 | 0,33 | 0,07 | 0,410 | 0,088 |
| 18 | 6 | 0,38 | 0,06 | 6 | 0,39 | 0,12 | 6 | 0,28 | 0,05 | 0,864 | 0,030 |
| 19 | 6 | 0,37 | 0,11 | 6 | 0,36 | 0,11 | 6 | 0,29 | 0,11 | 0,898 | 0,381 |
| 20 | 6 | 0,34 | 0,11 | 6 | 0,38 | 0,17 | 6 | 0,38 | 0,10 | 0,406 | 0,495 |
| 21 | 6 | 0,34 | 0,05 | 6 | 0,26 | 0,07 | 6 | 0,31 | 0,11 | 0,027 | 0,532 |
| 26 | 5 | 0,29 | 0,08 | 6 | 0,35 | 0,11 | 5 | 0,28 | 0,03 | 0,087 | 0,326 |
| 27 | 6 | 0,27 | 0,15 | 6 | 0,27 | 0,08 | 6 | 0,32 | 0,02 | 0,903 | 0,399 |
| 28 | 6 | 0,41 | 0,15 | 6 | 0,33 | 0,08 | 6 | 0,42 | 0,14 | 0,079 | 0,914 |

Tab. 9.78: Valinkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 4 | 0,95 | 0,33 | 4 | 1,03 | 0,32 | 4 | 0,80 | 0,18 | 0,827 | 0,418 |
| 8 | 6 | 0,70 | 0,17 | 6 | 0,91 | 0,47 | 6 | 0,78 | 0,26 | 0,301 | 0,377 |
| 11 | 6 | 1,28 | 0,37 | 5 | 1,39 | 0,70 | 4 | 1,18 | 0,49 | 0,574 | 0,311 |
| 12 | 6 | 1,46 | 0,24 | 6 | 1,74 | 0,93 | 5 | 1,24 | 0,53 | 0,414 | 0,225 |
| 13 | 6 | 1,35 | 0,58 | 6 | 1,73 | 0,30 | 6 | 1,16 | 0,59 | 0,108 | 0,460 |
| 16 | 6 | 1,22 | 0,54 | 6 | 1,53 | 0,41 | 6 | 1,26 | 0,49 | 0,035 | 0,906 |
| 17 | 6 | 1,31 | 0,29 | 6 | 1,68 | 0,25 | 6 | 1,14 | 0,16 | 0,035 | 0,273 |
| 18 | 5 | 1,60 | 0,45 | 6 | 1,62 | 0,55 | 6 | 1,20 | 0,50 | 0,603 | 0,017 |
| 19 | 6 | 1,46 | 0,54 | 6 | 1,53 | 0,50 | 6 | 1,14 | 0,50 | 0,812 | 0,439 |
| 20 | 6 | 1,24 | 0,41 | 6 | 1,31 | 0,58 | 6 | 1,22 | 0,40 | 0,623 | 0,913 |
| 21 | 6 | 1,13 | 0,27 | 6 | 0,96 | 0,34 | 6 | 0,95 | 0,42 | 0,086 | 0,226 |
| 26 | 6 | 1,15 | 0,53 | 6 | 0,95 | 0,18 | 6 | 0,64 | 0,12 | 0,439 | 0,040 |
| 27 | 6 | 0,91 | 0,37 | 6 | 0,82 | 0,38 | 6 | 0,81 | 0,14 | 0,515 | 0,476 |
| 28 | 6 | 1,04 | 0,27 | 6 | 0,93 | 0,18 | 6 | 1,04 | 0,45 | 0,131 | 0,995 |

Tab. 9.79: Methioninkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 3 | 0,34 | 0,14 | 4 | 0,32 | 0,09 | 4 | 0,31 | 0,13 | 0,095 | 0,907 |
| 8 | 2 | 0,11 | 0,04 | 2 | 0,24 | 0,03 | 3 | 0,17 | 0,02 | | |
| 11 | 4 | 0,30 | 0,06 | 5 | 0,34 | 0,08 | 5 | 0,34 | 0,17 | 0,567 | 0,927 |
| 12 | 6 | 0,28 | 0,08 | 4 | 0,34 | 0,02 | 3 | 0,25 | 0,03 | 0,673 | 0,172 |
| 13 | 6 | 0,30 | 0,13 | 6 | 0,32 | 0,05 | 5 | 0,26 | 0,07 | 0,658 | 0,424 |
| 16 | 6 | 0,24 | 0,10 | 5 | 0,35 | 0,12 | 6 | 0,24 | 0,03 | 0,006 | 1,000 |
| 17 | 6 | 0,26 | 0,05 | 6 | 0,38 | 0,12 | 6 | 0,23 | 0,06 | 0,068 | 0,525 |
| 18 | 5 | 0,32 | 0,09 | 6 | 0,35 | 0,13 | 6 | 0,25 | 0,08 | 0,358 | 0,102 |
| 19 | 6 | 0,31 | 0,12 | 6 | 0,31 | 0,08 | 4 | 0,25 | 0,03 | 0,955 | 0,455 |
| 20 | 6 | 0,21 | 0,06 | 4 | 0,27 | 0,03 | 6 | 0,25 | 0,11 | 0,072 | 0,589 |
| 21 | 5 | 0,23 | 0,02 | 5 | 0,17 | 0,11 | 6 | 0,22 | 0,06 | 0,205 | 0,860 |
| 26 | 5 | 0,19 | 0,05 | 5 | 0,17 | 0,02 | 3 | 0,15 | 0,04 | 0,394 | 0,331 |
| 27 | 3 | 0,19 | 0,03 | 1 | 0,19 | . | 4 | 0,16 | 0,02 | | 0,503 |
| 28 | 5 | 0,19 | 0,03 | 6 | 0,18 | 0,04 | 5 | 0,22 | 0,05 | 0,875 | 0,401 |

Tab. 9.80: Tryptophankonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | | | | 1 | 0,14 | | 1 | 0,11 | | | |
| 8 | 1 | 0,08 | | 1 | 0,15 | | | | | | |
| 11 | 2 | 0,26 | 0,06 | 1 | 0,28 | | | | | | |
| 12 | | | | 4 | 0,29 | 0,02 | 1 | 0,29 | | | |
| 13 | 1 | 0,20 | | 4 | 0,29 | 0,01 | | | | | |
| 16 | | | | 3 | 0,28 | 0,06 | 1 | 0,11 | | | |
| 17 | | | | 2 | 0,30 | 0,02 | | | | | |
| 18 | 1 | 0,25 | | 3 | 0,28 | 0,03 | | | | | |
| 19 | | | | 2 | 0,22 | 0,04 | 2 | 0,06 | 0,09 | | |
| 20 | | | | | | | 1 | 0,19 | | | |
| 21 | | | | | | | | | | | |
| 26 | | | | 2 | 0,12 | 0,03 | 1 | 0,12 | | | |
| 27 | | | | | | | | | | | |
| 28 | 2 | 0,14 | 0,05 | 2 | 0,12 | 0,03 | 2 | 0,11 | 0,02 | 0,451 | 0,634 |

Tab. 9.81: Phenylalaninkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 1 | 0,20 | . | | | | 1 | 0,12 | | | |
| 8 | 2 | 0,13 | 0,07 | 1 | 0,36 | | | | | | |
| 11 | 4 | 0,23 | 0,06 | 4 | 0,32 | 0,07 | 3 | 0,40 | 0,11 | 0,245 | 0,154 |
| 12 | 5 | 0,29 | 0,06 | 4 | 0,48 | 0,15 | 4 | 0,28 | 0,09 | 0,026 | 0,749 |
| 13 | 5 | 0,23 | 0,06 | 5 | 0,33 | 0,09 | 2 | 0,32 | 0,04 | 0,023 | 0,211 |
| 16 | 4 | 0,25 | 0,04 | 4 | 0,33 | 0,08 | 2 | 0,18 | 0,04 | 0,088 | 0,184 |
| 17 | 4 | 0,24 | 0,05 | 5 | 0,31 | 0,07 | 3 | 0,25 | 0,06 | 0,206 | 0,343 |
| 18 | 5 | 0,24 | 0,07 | 5 | 0,25 | 0,07 | 2 | 0,21 | 0,01 | 0,362 | 0,686 |
| 19 | 4 | 0,23 | 0,04 | 5 | 0,24 | 0,04 | 3 | 0,11 | 0,11 | 0,754 | 0,552 |
| 20 | 2 | 0,21 | 0,02 | 2 | 0,25 | 0,01 | 3 | 0,20 | 0,02 | 0,091 | 0,636 |
| 21 | | | | | | | 1 | 0,16 | | | |
| 26 | 1 | 0,36 | | 2 | 0,16 | 0,07 | 1 | 0,08 | | | |
| 27 | | | | | | | 1 | 0,15 | | | |
| 28 | 2 | 0,13 | 0,08 | 2 | 0,14 | 0,08 | 4 | 0,18 | 0,12 | 0,283 | 0,552 |

Tab. 9.82: Isoleucinkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 4 | 0,33 | 0,13 | 4 | 0,39 | 0,03 | 4 | 0,28 | 0,06 | 0,407 | 0,503 |
| 8 | 6 | 0,28 | 0,07 | 6 | 0,36 | 0,27 | 5 | 0,23 | 0,04 | 0,442 | 0,224 |
| 11 | 6 | 0,44 | 0,06 | 6 | 0,48 | 0,16 | 6 | 0,40 | 0,21 | 0,573 | 0,568 |
| 12 | 6 | 0,57 | 0,03 | 5 | 0,66 | 0,24 | 5 | 0,40 | 0,13 | 0,399 | 0,021 |
| 13 | 6 | 0,51 | 0,17 | 6 | 0,60 | 0,08 | 5 | 0,31 | 0,13 | 0,210 | 0,093 |
| 16 | 6 | 0,47 | 0,13 | 6 | 0,45 | 0,13 | 6 | 0,32 | 0,06 | 0,670 | 0,077 |
| 17 | 6 | 0,50 | 0,16 | 6 | 0,54 | 0,10 | 5 | 0,40 | 0,12 | 0,685 | 0,440 |
| 18 | 6 | 0,59 | 0,13 | 6 | 0,48 | 0,14 | 6 | 0,34 | 0,13 | 0,266 | 0,002 |
| 19 | 6 | 0,56 | 0,17 | 6 | 0,46 | 0,12 | 6 | 0,34 | 0,07 | 0,338 | 0,048 |
| 20 | 6 | 0,47 | 0,08 | 6 | 0,41 | 0,18 | 6 | 0,37 | 0,06 | 0,257 | 0,034 |
| 21 | 6 | 0,37 | 0,09 | 6 | 0,29 | 0,06 | 6 | 0,30 | 0,11 | 0,081 | 0,167 |
| 26 | 5 | 0,33 | 0,10 | 6 | 0,30 | 0,06 | 6 | 0,26 | 0,08 | 0,910 | 0,216 |
| 27 | 4 | 0,38 | 0,08 | 5 | 0,30 | 0,12 | 5 | 0,27 | 0,07 | 0,608 | 0,059 |
| 28 | 6 | 0,32 | 0,11 | 6 | 0,31 | 0,10 | 6 | 0,33 | 0,22 | 0,617 | 0,860 |

Tab. 9.83: Leucinkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 3 | 0,37 | 0,09 | 4 | 0,43 | 0,23 | 4 | 0,35 | 0,06 | 0,513 | 0,949 |
| 8 | 5 | 0,54 | 0,31 | 6 | 0,56 | 0,35 | 5 | 0,54 | 0,25 | 0,719 | 0,964 |
| 11 | 4 | 0,75 | 0,34 | 4 | 0,97 | 0,43 | 6 | 0,75 | 0,55 | 0,234 | 0,713 |
| 12 | 6 | 0,85 | 0,31 | 5 | 1,09 | 0,50 | 5 | 0,82 | 0,37 | 0,055 | 0,262 |
| 13 | 6 | 0,77 | 0,23 | 6 | 0,88 | 0,38 | 6 | 0,54 | 0,27 | 0,512 | 0,024 |
| 16 | 6 | 0,71 | 0,18 | 6 | 0,89 | 0,46 | 6 | 0,60 | 0,14 | 0,267 | 0,070 |
| 17 | 6 | 0,83 | 0,23 | 6 | 0,79 | 0,20 | 6 | 0,72 | 0,19 | 0,739 | 0,189 |
| 18 | 5 | 0,94 | 0,26 | 6 | 0,88 | 0,36 | 6 | 0,65 | 0,24 | 0,770 | 0,110 |
| 19 | 6 | 0,86 | 0,16 | 6 | 0,86 | 0,39 | 6 | 0,58 | 0,20 | 0,967 | 0,045 |
| 20 | 6 | 0,51 | 0,31 | 6 | 0,56 | 0,37 | 6 | 0,60 | 0,29 | 0,558 | 0,397 |
| 21 | 6 | 0,42 | 0,14 | 6 | 0,31 | 0,08 | 6 | 0,31 | 0,11 | 0,106 | 0,172 |
| 26 | 6 | 0,51 | 0,28 | 6 | 0,48 | 0,20 | 6 | 0,30 | 0,15 | 0,790 | 0,117 |
| 27 | 6 | 0,44 | 0,05 | 6 | 0,38 | 0,12 | 6 | 0,44 | 0,16 | 0,277 | 0,997 |
| 28 | 6 | 0,40 | 0,11 | 6 | 0,48 | 0,16 | 6 | 0,43 | 0,21 | 0,112 | 0,804 |

Tab. 9.84: Serotoninkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 3 | 0,98 | 1,24 | 3 | 0,90 | 0,50 | 3 | 0,76 | 0,64 | 0,486 | 0,857 |
| 8 | 2 | 0,26 | 0,36 | 3 | 0,45 | 0,06 | 2 | 1,64 | 0,26 | 0,496 | |
| 11 | 1 | 0,17 | | 1 | 0,30 | | 3 | 0,57 | 0,20 | | |
| 12 | 1 | 0,51 | | 1 | 0,51 | | 2 | 0,17 | 0,24 | | |
| 13 | 2 | 3,15 | 3,24 | 3 | 0,71 | 0,13 | 3 | 0,60 | 0,19 | 0,489 | 0,480 |
| 16 | 3 | 2,31 | 2,88 | 3 | 0,42 | 0,15 | 5 | 0,58 | 0,36 | 0,467 | 0,393 |
| 17 | 4 | 2,06 | 2,21 | 3 | 0,41 | 0,22 | | | | 0,252 | |
| 18 | 2 | 1,18 | 0,02 | 4 | 0,67 | 0,20 | 3 | 0,47 | 0,13 | 0,014 | 0,102 |
| 19 | 1 | 0,79 | | 2 | 0,72 | 0,14 | 2 | 0,37 | 0,05 | | |
| 20 | 1 | 1,08 | | 2 | 0,43 | 0,20 | | | | | |
| 21 | | | | | | | | | | | |
| 26 | 1 | 0,31 | | 1 | 1,16 | | 1 | 0,02 | | | |
| 27 | | | | | | | | | | | |
| 28 | 2 | 0,34 | 0,33 | 4 | 0,44 | 0,06 | 4 | 0,42 | 0,11 | | |

Tab. 9.85: Tyraminkonzentrationen in Laufgruppe IV [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S10 | | | Zulage S11 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S10 | K01/S11 |
| 7 | 6 | 1,67 | 0,94 | 5 | 1,55 | 0,53 | 6 | 0,93 | 0,51 | 0,390 | 0,026 |
| 8 | 6 | 1,39 | 0,38 | 6 | 1,33 | 0,47 | 6 | 1,21 | 0,58 | 0,771 | 0,502 |
| 11 | 4 | 37,4 | 1,84 | 4 | 48,3 | 10,1 | 4 | 56,3 | 7,92 | 0,149 | 0,019 |
| 12 | 4 | 27,5 | 16,5 | 4 | 50,8 | 14,1 | 4 | 59,7 | 25,0 | 0,068 | 0,171 |
| 13 | 6 | 23,1 | 15,7 | 6 | 33,9 | 27,2 | 6 | 41,0 | 18,1 | 0,241 | 0,076 |
| 16 | 6 | 5,73 | 4,73 | 6 | 3,67 | 2,10 | 6 | 15,7 | 16,2 | 0,235 | 0,168 |
| 17 | 6 | 2,54 | 2,05 | 6 | 5,50 | 4,06 | 5 | 7,63 | 6,50 | 0,142 | 0,164 |
| 18 | 6 | 1,51 | 1,32 | 6 | 1,76 | 0,55 | 6 | 2,62 | 1,07 | 0,675 | 0,101 |
| 19 | 5 | 0,90 | 0,47 | 6 | 1,83 | 1,03 | 6 | 1,20 | 0,40 | 0,161 | 0,220 |
| 20 | 5 | 0,98 | 1,17 | 6 | 0,91 | 0,61 | 6 | 0,81 | 0,56 | 0,491 | 0,555 |
| 21 | 4 | 0,94 | 0,95 | 6 | 0,80 | 0,58 | 6 | 0,77 | 0,50 | 0,332 | 0,284 |
| 26 | 6 | 0,91 | 0,76 | 6 | 1,01 | 0,81 | 6 | 0,38 | 0,07 | 0,663 | 0,157 |
| 27 | 6 | 1,21 | 0,92 | 6 | 1,14 | 0,45 | 6 | 1,04 | 0,49 | 0,832 | 0,565 |
| 28 | 6 | 0,91 | 0,86 | 6 | 0,79 | 0,30 | 6 | 0,66 | 0,36 | 0,701 | 0,364 |

Tab. 9.86: Ammoniakkonzentrationen in Laufgruppe V [mmol/L]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 1 | 6 | 5,61 | 1,20 | 6 | 4,29 | 1,35 | 6 | 3,68 | 1,35 | 0,014 | 0,004 |
| 2 | 6 | 6,33 | 0,92 | 6 | 5,92 | 1,61 | 6 | 5,42 | 1,33 | 0,400 | 0,061 |
| 3 | 6 | 6,71 | 1,29 | 6 | 6,06 | 1,24 | 6 | 6,06 | 1,58 | 0,043 | 0,209 |
| 4 | 6 | 6,28 | 1,29 | 6 | 6,46 | 1,18 | 6 | 5,71 | 1,40 | 0,807 | 0,393 |
| 5 | 6 | 6,42 | 1,17 | 6 | 6,13 | 1,17 | 6 | 5,76 | 1,19 | 0,081 | 0,167 |
| 6 | 6 | 5,90 | 0,81 | 6 | 5,20 | 1,12 | 6 | 4,86 | 0,98 | 0,147 | 0,032 |
| 7 | 6 | 5,93 | 0,88 | 6 | 5,56 | 0,46 | 6 | 5,51 | 0,79 | 0,423 | 0,265 |
| 8 | 6 | 6,05 | 0,82 | 6 | 5,11 | 0,75 | 6 | 5,28 | 0,88 | 0,003 | 0,068 |
| 9 | 6 | 5,99 | 0,71 | 6 | 5,54 | 0,56 | 6 | 4,67 | 0,87 | 0,011 | 0,006 |
| 10 | 6 | 7,26 | 1,00 | 6 | 7,94 | 2,06 | 6 | 7,87 | 1,83 | 0,396 | 0,224 |
| 11 | 6 | 8,81 | 1,40 | 6 | 9,94 | 1,16 | 6 | 11,4 | 1,57 | 0,012 | 0,006 |
| 12 | 6 | 9,59 | 1,24 | 6 | 11,2 | 2,61 | 6 | 12,8 | 2,65 | 0,073 | 0,003 |
| 13 | 6 | 8,32 | 1,63 | 6 | 10,0 | 1,71 | 6 | 11,5 | 1,53 | 0,018 | 0,008 |
| 14 | 6 | 7,57 | 0,94 | 6 | 7,87 | 1,28 | 6 | 10,1 | 1,40 | 0,426 | 0,003 |
| 15 | 6 | 8,16 | 1,05 | 6 | 9,78 | 0,97 | 6 | 12,4 | 1,45 | 0,016 | 0,004 |
| 16 | 6 | 7,61 | 2,03 | 6 | 8,96 | 1,53 | 6 | 9,38 | 2,51 | 0,112 | 0,085 |
| 17 | 6 | 8,50 | 1,59 | 6 | 9,16 | 1,22 | 6 | 11,6 | 3,01 | 0,273 | 0,005 |
| 18 | 6 | 9,30 | 1,70 | 6 | 9,55 | 1,41 | 6 | 10,1 | 3,27 | 0,654 | 0,473 |
| 19 | 6 | 9,06 | 1,07 | 6 | 8,88 | 1,80 | 6 | 12,5 | 2,39 | 0,658 | 0,006 |

Tab. 9.87: Gehalte bakteriellen Proteins in Laufgruppe V [$\mu\text{g RSA/mL}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 3 | 6 | 99,6 | 7,44 | 6 | 95,0 | 4,12 | 6 | 88,3 | 5,84 | 0,145 | 0,044 |
| 6 | 6 | 87,8 | 6,42 | 6 | 81,5 | 6,98 | 6 | 80,4 | 10,5 | 0,210 | 0,185 |
| 7 | 6 | 82,9 | 9,88 | 6 | 78,4 | 7,48 | 6 | 76,1 | 6,69 | 0,134 | 0,201 |
| 8 | 6 | 90,7 | 15,2 | 6 | 84,4 | 12,4 | 6 | 81,3 | 18,0 | 0,475 | 0,360 |
| 9 | 6 | 82,6 | 10,2 | 5 | 71,1 | 10,1 | 4 | 66,3 | 6,32 | 0,059 | 0,007 |
| 10 | 6 | 99,3 | 17,7 | 6 | 81,6 | 22,4 | 6 | 82,6 | 23,1 | 0,020 | 0,012 |
| 11 | 6 | 99,7 | 11,0 | 6 | 83,5 | 7,18 | 6 | 95,4 | 14,4 | 0,001 | 0,541 |
| 12 | 6 | 125 | 20,5 | 6 | 113 | 21,4 | 6 | 126 | 42,5 | 0,006 | 0,945 |
| 13 | 6 | 107 | 9,49 | 6 | 94,2 | 16,4 | 6 | 107 | 20,7 | 0,101 | 0,993 |
| 14 | 6 | 113 | 14,0 | 6 | 95,1 | 11,4 | 6 | 125 | 7,74 | 0,016 | 0,033 |
| 15 | 6 | 113 | 10,5 | 6 | 89,3 | 8,55 | 6 | 116 | 19,1 | 0,006 | 0,713 |
| 16 | 6 | 120 | 9,68 | 6 | 94,0 | 11,7 | 6 | 118 | 14,6 | 0,007 | 0,818 |
| 17 | 6 | 113 | 17,4 | 6 | 84,7 | 6,28 | 6 | 112 | 9,11 | 0,003 | 0,836 |
| 18 | 6 | 117 | 16,3 | 6 | 88,5 | 4,15 | 6 | 117 | 4,27 | 0,007 | 0,976 |
| 19 | 6 | 111 | 18,2 | 6 | 94,0 | 8,69 | 6 | 116 | 16,2 | 0,145 | 0,506 |

Tab. 9.88: Summe der Konzentrationen der messbaren fAS in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 40,8 | 5,43 | 6 | 37,2 | 9,03 | 6 | 41,1 | 3,66 | 0,405 | 0,858 |
| 8 | 6 | 60,8 | 34,2 | 6 | 55,2 | 29,9 | 6 | 59,4 | 32,0 | 0,246 | 0,648 |
| 11 | 6 | 54,2 | 9,38 | 6 | 54,6 | 14,7 | 5 | 65,1 | 16,6 | 0,912 | 0,281 |
| 12 | 5 | 57,6 | 15,9 | 6 | 55,3 | 11,4 | 6 | 69,6 | 22,5 | 0,256 | 0,094 |
| 13 | 6 | 61,7 | 13,9 | 6 | 50,5 | 6,75 | 6 | 67,6 | 18,6 | 0,038 | 0,271 |
| 16 | 6 | 62,5 | 19,0 | 6 | 55,9 | 11,6 | 6 | 72,9 | 18,2 | 0,287 | 0,031 |
| 17 | 6 | 57,4 | 20,7 | 6 | 47,3 | 13,6 | 6 | 62,4 | 21,8 | 0,066 | 0,067 |
| 18 | 6 | 59,2 | 25,8 | 6 | 48,8 | 13,6 | 6 | 61,9 | 22,7 | 0,137 | 0,489 |
| 19 | 6 | 54,9 | 26,8 | 6 | 50,5 | 13,3 | 6 | 60,7 | 18,2 | 0,566 | 0,456 |

Tab. 9.89: Aspartatkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 6,60 | 1,36 | 6 | 6,05 | 1,84 | 6 | 6,30 | 1,10 | 0,522 | 0,418 |
| 8 | 6 | 7,04 | 2,39 | 6 | 6,45 | 2,29 | 6 | 6,83 | 2,55 | 0,332 | 0,776 |
| 11 | 6 | 7,30 | 1,25 | 6 | 8,24 | 3,22 | 5 | 8,56 | 3,24 | 0,372 | 0,526 |
| 12 | 6 | 8,10 | 3,10 | 6 | 7,51 | 2,33 | 6 | 9,50 | 3,96 | 0,601 | 0,390 |
| 13 | 6 | 7,55 | 2,25 | 6 | 6,38 | 1,98 | 6 | 8,80 | 3,64 | 0,168 | 0,219 |
| 16 | 6 | 7,15 | 3,32 | 6 | 6,47 | 2,41 | 5 | 9,85 | 4,99 | 0,608 | 0,113 |
| 17 | 6 | 7,02 | 3,77 | 6 | 5,85 | 2,49 | 6 | 8,54 | 4,14 | 0,168 | 0,031 |
| 18 | 6 | 6,35 | 4,38 | 6 | 6,32 | 2,64 | 6 | 8,39 | 3,88 | 0,981 | 0,042 |
| 19 | 6 | 6,55 | 4,71 | 6 | 6,73 | 3,10 | 6 | 8,81 | 3,56 | 0,828 | 0,145 |

Tab. 9.90: Glutamatkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 17,6 | 4,33 | 6 | 14,2 | 4,74 | 6 | 16,5 | 2,82 | 0,218 | 0,357 |
| 8 | 6 | 20,1 | 6,03 | 6 | 18,3 | 4,94 | 6 | 18,1 | 4,79 | 0,188 | 0,219 |
| 11 | 6 | 22,0 | 5,90 | 6 | 23,8 | 8,18 | 5 | 26,3 | 7,75 | 0,341 | 0,333 |
| 12 | 6 | 22,8 | 7,80 | 6 | 23,4 | 7,52 | 6 | 27,5 | 11,3 | 0,635 | 0,035 |
| 13 | 6 | 23,6 | 6,00 | 6 | 22,0 | 5,18 | 6 | 27,3 | 9,69 | 0,367 | 0,188 |
| 16 | 6 | 25,7 | 8,57 | 6 | 22,8 | 7,18 | 6 | 30,8 | 11,7 | 0,126 | 0,036 |
| 17 | 6 | 21,3 | 8,44 | 6 | 19,5 | 6,86 | 6 | 25,5 | 10,1 | 0,303 | 0,032 |
| 18 | 6 | 20,2 | 10,9 | 6 | 18,6 | 6,51 | 6 | 23,4 | 11,7 | 0,438 | 0,193 |
| 19 | 6 | 21,0 | 11,0 | 6 | 20,8 | 7,73 | 6 | 23,4 | 8,64 | 0,910 | 0,411 |

Tab. 9.91: Serinkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 1,72 | 0,54 | 5 | 1,71 | 0,61 | 6 | 1,91 | 0,95 | 0,804 | 0,725 |
| 8 | 6 | 1,76 | 0,63 | 6 | 1,96 | 0,76 | 5 | 2,36 | 1,43 | 0,673 | 0,176 |
| 11 | 6 | 2,25 | 0,74 | 6 | 1,86 | 0,47 | 5 | 2,66 | 0,44 | 0,057 | 0,560 |
| 12 | 5 | 2,42 | 0,59 | 6 | 2,52 | 0,64 | 6 | 3,06 | 1,02 | 0,774 | 0,305 |
| 13 | 6 | 4,18 | 2,17 | 6 | 1,88 | 0,12 | 6 | 3,33 | 1,04 | 0,047 | 0,260 |
| 16 | 6 | 2,56 | 1,37 | 6 | 2,48 | 0,98 | 6 | 3,51 | 0,48 | 0,911 | 0,159 |
| 17 | 5 | 2,63 | 1,12 | 6 | 1,80 | 0,52 | 6 | 3,19 | 0,88 | 0,132 | 0,132 |
| 18 | 6 | 4,10 | 2,01 | 6 | 2,12 | 0,97 | 6 | 3,42 | 1,19 | 0,079 | 0,134 |
| 19 | 6 | 2,40 | 1,38 | 6 | 1,94 | 0,64 | 6 | 3,00 | 1,33 | 0,429 | 0,459 |

Tab. 9.92: Histidinkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 0,85 | 0,23 | 6 | 0,75 | 0,25 | 6 | 0,63 | 0,22 | 0,410 | 0,030 |
| 8 | 6 | 1,04 | 0,35 | 6 | 0,84 | 0,12 | 6 | 0,87 | 0,28 | 0,145 | 0,226 |
| 11 | 6 | 2,22 | 0,76 | 6 | 1,34 | 0,76 | 6 | 2,86 | 1,57 | 0,018 | 0,397 |
| 12 | 6 | 3,77 | 2,35 | 6 | 1,47 | 0,75 | 6 | 2,84 | 1,87 | 0,047 | 0,407 |
| 13 | 6 | 3,58 | 1,52 | 6 | 1,15 | 0,26 | 6 | 2,90 | 1,04 | 0,010 | 0,344 |
| 16 | 6 | 4,13 | 3,73 | 5 | 1,47 | 0,14 | 6 | 3,49 | 1,27 | 0,127 | 0,636 |
| 17 | 6 | 3,93 | 3,47 | 6 | 1,17 | 0,22 | 6 | 2,76 | 1,36 | 0,097 | 0,243 |
| 18 | 6 | 4,86 | 4,23 | 6 | 1,25 | 0,47 | 6 | 3,00 | 1,37 | 0,093 | 0,236 |
| 19 | 6 | 4,25 | 5,18 | 6 | 1,17 | 0,43 | 6 | 2,49 | 1,49 | 0,178 | 0,313 |

Tab. 9.93: Glycinkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 3,22 | 0,36 | 6 | 3,56 | 1,22 | 6 | 3,85 | 0,57 | 0,509 | 0,030 |
| 8 | 6 | 3,85 | 1,37 | 5 | 4,51 | 1,06 | 6 | 5,04 | 1,74 | 0,187 | 0,049 |
| 11 | 6 | 5,46 | 0,89 | 6 | 5,27 | 1,38 | 5 | 6,86 | 1,50 | 0,792 | 0,098 |
| 12 | 5 | 6,42 | 2,02 | 6 | 6,24 | 1,42 | 6 | 7,53 | 1,76 | 0,841 | 0,040 |
| 13 | 6 | 7,20 | 1,87 | 6 | 5,60 | 0,69 | 6 | 7,67 | 1,23 | 0,101 | 0,547 |
| 16 | 6 | 6,81 | 1,39 | 6 | 6,70 | 0,45 | 6 | 9,00 | 1,18 | 0,862 | 0,008 |
| 17 | 6 | 6,67 | 1,92 | 6 | 4,98 | 1,63 | 6 | 7,06 | 2,16 | 0,134 | 0,677 |
| 18 | 6 | 7,37 | 2,06 | 6 | 5,69 | 1,00 | 6 | 7,75 | 1,75 | 0,044 | 0,357 |
| 19 | 6 | 6,37 | 2,17 | 6 | 5,68 | 1,11 | 6 | 7,36 | 1,55 | 0,430 | 0,158 |

Tab. 9.94: Threoninkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 1,27 | 0,17 | 6 | 1,32 | 0,61 | 6 | 1,40 | 0,33 | 0,855 | 0,434 |
| 8 | 6 | 1,29 | 0,34 | 6 | 1,34 | 0,33 | 6 | 1,59 | 0,57 | 0,713 | 0,101 |
| 11 | 6 | 1,65 | 0,33 | 6 | 1,64 | 0,31 | 5 | 2,28 | 0,66 | 0,919 | 0,107 |
| 12 | 5 | 2,02 | 0,46 | 6 | 2,16 | 0,48 | 6 | 2,43 | 0,75 | 0,402 | 0,079 |
| 13 | 6 | 2,10 | 0,60 | 6 | 1,71 | 0,22 | 6 | 2,33 | 0,78 | 0,083 | 0,362 |
| 16 | 6 | 1,71 | 0,41 | 6 | 1,88 | 0,34 | 6 | 2,40 | 0,71 | 0,168 | 0,004 |
| 17 | 6 | 1,81 | 0,50 | 6 | 1,43 | 0,38 | 6 | 2,14 | 0,69 | 0,141 | 0,136 |
| 18 | 6 | 1,96 | 0,88 | 6 | 1,55 | 0,57 | 6 | 1,93 | 0,90 | 0,250 | 0,889 |
| 19 | 6 | 1,63 | 0,72 | 6 | 1,51 | 0,50 | 6 | 2,14 | 0,95 | 0,591 | 0,202 |

Tab. 9.95: Alaninkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 4,97 | 0,46 | 6 | 5,52 | 0,37 | 6 | 5,93 | 0,69 | 0,004 | 0,049 |
| 8 | 6 | 5,34 | 1,04 | 6 | 5,77 | 1,35 | 5 | 5,91 | 1,01 | 0,335 | 0,353 |
| 11 | 6 | 5,42 | 0,37 | 6 | 6,18 | 1,34 | 5 | 5,93 | 0,77 | 0,288 | 0,217 |
| 12 | 5 | 5,67 | 0,88 | 6 | 5,38 | 0,42 | 6 | 6,32 | 0,72 | 0,633 | 0,435 |
| 13 | 6 | 5,86 | 0,65 | 6 | 5,38 | 0,44 | 6 | 6,30 | 0,58 | 0,160 | 0,376 |
| 16 | 6 | 5,96 | 0,47 | 6 | 5,89 | 0,52 | 6 | 6,38 | 0,63 | 0,736 | 0,301 |
| 17 | 6 | 6,53 | 0,91 | 6 | 5,30 | 0,70 | 5 | 5,98 | 0,65 | 0,034 | 0,195 |
| 18 | 6 | 6,36 | 1,05 | 6 | 5,78 | 0,48 | 6 | 6,10 | 0,47 | 0,084 | 0,382 |
| 19 | 6 | 5,36 | 0,39 | 6 | 5,31 | 0,88 | 6 | 5,51 | 0,53 | 0,888 | 0,557 |

Tab. 9.96: Argininkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 2,45 | 0,25 | 6 | 1,98 | 0,69 | 6 | 2,15 | 0,23 | 0,160 | 0,083 |
| 8 | 6 | 2,48 | 0,40 | 6 | 2,56 | 0,70 | 6 | 2,36 | 0,41 | 0,680 | 0,117 |
| 11 | 6 | 3,79 | 0,77 | 6 | 3,42 | 0,66 | 5 | 4,59 | 2,01 | 0,403 | 0,534 |
| 12 | 6 | 3,99 | 1,53 | 6 | 3,27 | 0,94 | 6 | 4,57 | 2,58 | 0,190 | 0,567 |
| 13 | 5 | 3,67 | 0,99 | 6 | 3,07 | 0,61 | 6 | 3,89 | 1,42 | 0,021 | 0,752 |
| 16 | 6 | 3,90 | 1,05 | 6 | 3,34 | 0,80 | 6 | 3,33 | 0,65 | 0,213 | 0,100 |
| 17 | 6 | 3,38 | 1,27 | 6 | 2,97 | 0,42 | 6 | 3,19 | 1,04 | 0,335 | 0,577 |
| 18 | 6 | 3,26 | 1,08 | 6 | 3,06 | 0,79 | 5 | 3,01 | 1,25 | 0,178 | 0,039 |
| 19 | 6 | 3,37 | 1,03 | 6 | 3,54 | 1,12 | 6 | 3,26 | 1,22 | 0,542 | 0,650 |

Tab. 9.97: Tyrosinkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 0,34 | 0,11 | 6 | 0,36 | 0,20 | 6 | 0,35 | 0,13 | 0,671 | 0,743 |
| 8 | 5 | 0,36 | 0,04 | 6 | 0,38 | 0,08 | 6 | 0,47 | 0,16 | 0,403 | 0,095 |
| 11 | 6 | 0,44 | 0,04 | 6 | 0,42 | 0,08 | 6 | 0,64 | 0,19 | 0,683 | 0,052 |
| 12 | 5 | 0,54 | 0,08 | 5 | 0,51 | 0,11 | 6 | 0,63 | 0,09 | 0,697 | 0,134 |
| 13 | 6 | 0,52 | 0,10 | 6 | 0,39 | 0,03 | 6 | 0,53 | 0,13 | 0,032 | 0,742 |
| 16 | 6 | 0,50 | 0,11 | 6 | 0,47 | 0,08 | 6 | 0,58 | 0,11 | 0,523 | 0,151 |
| 17 | 6 | 0,51 | 0,08 | 6 | 0,37 | 0,09 | 6 | 0,50 | 0,15 | 0,006 | 0,792 |
| 18 | 5 | 0,52 | 0,18 | 6 | 0,42 | 0,12 | 6 | 0,50 | 0,14 | 0,044 | 0,121 |
| 19 | 6 | 0,50 | 0,11 | 6 | 0,46 | 0,18 | 5 | 0,50 | 0,15 | 0,550 | 0,696 |

Tab. 9.98: Valinkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 0,94 | 0,20 | 6 | 1,12 | 0,49 | 6 | 1,14 | 0,25 | 0,323 | 0,001 |
| 8 | 6 | 0,99 | 0,29 | 6 | 1,15 | 0,33 | 6 | 1,41 | 0,43 | 0,048 | 0,047 |
| 11 | 6 | 1,80 | 0,36 | 3 | 1,87 | 0,59 | 5 | 2,06 | 0,44 | 0,987 | 0,357 |
| 12 | 5 | 2,10 | 0,38 | 3 | 1,89 | 0,05 | 6 | 2,44 | 0,53 | 0,322 | 0,232 |
| 13 | 6 | 2,04 | 0,49 | 4 | 1,67 | 0,17 | 6 | 2,19 | 0,73 | 0,228 | 0,583 |
| 16 | 6 | 1,95 | 0,52 | 6 | 2,22 | 0,59 | 6 | 2,49 | 0,68 | 0,226 | 0,017 |
| 17 | 6 | 1,89 | 0,57 | 6 | 1,69 | 0,67 | 6 | 1,90 | 0,88 | 0,467 | 0,982 |
| 18 | 6 | 2,04 | 0,78 | 6 | 1,72 | 0,64 | 6 | 2,08 | 0,92 | 0,068 | 0,784 |
| 19 | 6 | 1,53 | 0,65 | 6 | 1,53 | 0,51 | 6 | 1,80 | 0,65 | 0,994 | 0,169 |

Tab. 9.99: Methioninkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 0,14 | 0,04 | 6 | 0,15 | 0,03 | 6 | 0,18 | 0,05 | 0,525 | 0,258 |
| 8 | 6 | 0,20 | 0,09 | 6 | 0,19 | 0,04 | 6 | 0,26 | 0,06 | 0,756 | 0,279 |
| 11 | 6 | 0,37 | 0,12 | 5 | 0,55 | 0,17 | 6 | 0,48 | 0,09 | 0,269 | 0,077 |
| 12 | 6 | 0,46 | 0,06 | 5 | 0,50 | 0,09 | 6 | 0,54 | 0,11 | 0,469 | 0,029 |
| 13 | 6 | 0,40 | 0,10 | 6 | 0,45 | 0,17 | 6 | 0,44 | 0,15 | 0,430 | 0,508 |
| 16 | 6 | 0,46 | 0,05 | 6 | 0,51 | 0,09 | 6 | 0,52 | 0,18 | 0,346 | 0,334 |
| 17 | 6 | 0,53 | 0,18 | 6 | 0,43 | 0,11 | 6 | 0,63 | 0,33 | 0,116 | 0,298 |
| 18 | 6 | 0,49 | 0,25 | 6 | 0,45 | 0,16 | 6 | 0,47 | 0,18 | 0,568 | 0,679 |
| 19 | 6 | 0,41 | 0,16 | 6 | 0,56 | 0,27 | 6 | 0,68 | 0,37 | 0,151 | 0,056 |

Tab. 9.100: Tryptophankonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 5 | 0,06 | 0,04 | 6 | 0,06 | 0,04 | 6 | 0,08 | 0,05 | 0,841 | 0,029 |
| 8 | 6 | 0,11 | 0,02 | 5 | 0,13 | 0,03 | 6 | 0,11 | 0,03 | 0,166 | 0,736 |
| 11 | 6 | 0,22 | 0,02 | 5 | 0,24 | 0,06 | 6 | 0,25 | 0,05 | 0,663 | 0,271 |
| 12 | 5 | 0,24 | 0,02 | 6 | 0,28 | 0,03 | 6 | 0,31 | 0,04 | 0,080 | 0,028 |
| 13 | 6 | 0,20 | 0,05 | 6 | 0,24 | 0,06 | 6 | 0,26 | 0,06 | 0,374 | 0,021 |
| 16 | 6 | 0,18 | 0,05 | 6 | 0,23 | 0,06 | 6 | 0,26 | 0,05 | 0,048 | 0,020 |
| 17 | 4 | 0,16 | 0,04 | 6 | 0,21 | 0,04 | 6 | 0,26 | 0,05 | 0,007 | 0,118 |
| 18 | 6 | 0,22 | 0,08 | 6 | 0,26 | 0,06 | 6 | 0,28 | 0,08 | 0,109 | 0,055 |
| 19 | 6 | 0,19 | 0,05 | 6 | 0,17 | 0,04 | 6 | 0,25 | 0,06 | 0,581 | 0,060 |

Tab. 9.101: Phenylalaninkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 5 | 0,08 | 0,05 | 6 | 0,10 | 0,09 | 6 | 0,08 | 0,07 | 0,278 | 0,400 |
| 8 | 6 | 0,10 | 0,06 | 5 | 0,08 | 0,03 | 6 | 0,13 | 0,06 | 0,530 | 0,639 |
| 11 | 6 | 0,19 | 0,03 | 5 | 0,24 | 0,05 | 6 | 0,33 | 0,12 | 0,189 | 0,032 |
| 12 | 5 | 0,25 | 0,07 | 6 | 0,31 | 0,11 | 6 | 0,33 | 0,09 | 0,166 | 0,090 |
| 13 | 6 | 0,24 | 0,09 | 6 | 0,24 | 0,04 | 6 | 0,29 | 0,09 | 0,883 | 0,230 |
| 16 | 6 | 0,22 | 0,06 | 6 | 0,24 | 0,08 | 6 | 0,32 | 0,08 | 0,583 | 0,042 |
| 17 | 6 | 0,22 | 0,05 | 6 | 0,18 | 0,05 | 6 | 0,28 | 0,05 | 0,046 | 0,072 |
| 18 | 5 | 0,26 | 0,14 | 6 | 0,25 | 0,14 | 6 | 0,35 | 0,18 | 0,665 | 0,272 |
| 19 | 6 | 0,17 | 0,08 | 4 | 0,15 | 0,02 | 6 | 0,26 | 0,07 | 0,149 | 0,109 |

Tab. 9.102: Isoleucinkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 0,26 | 0,11 | 6 | 0,33 | 0,18 | 6 | 0,27 | 0,14 | 0,362 | 0,804 |
| 8 | 6 | 0,29 | 0,09 | 6 | 0,27 | 0,09 | 6 | 0,33 | 0,13 | 0,755 | 0,616 |
| 11 | 6 | 0,52 | 0,10 | 3 | 0,52 | 0,14 | 6 | 0,63 | 0,19 | 0,989 | 0,094 |
| 12 | 5 | 0,68 | 0,14 | 3 | 0,62 | 0,17 | 6 | 0,68 | 0,13 | 0,051 | 0,333 |
| 13 | 6 | 0,65 | 0,18 | 4 | 0,52 | 0,11 | 6 | 0,60 | 0,22 | 0,247 | 0,371 |
| 16 | 6 | 0,52 | 0,09 | 6 | 0,64 | 0,15 | 6 | 0,65 | 0,15 | 0,045 | 0,086 |
| 17 | 5 | 0,63 | 0,09 | 6 | 0,57 | 0,08 | 6 | 0,61 | 0,10 | 0,023 | 0,577 |
| 18 | 6 | 0,66 | 0,30 | 6 | 0,59 | 0,18 | 6 | 0,64 | 0,16 | 0,350 | 0,737 |
| 19 | 6 | 0,44 | 0,23 | 6 | 0,37 | 0,17 | 6 | 0,47 | 0,20 | 0,215 | 0,657 |

Tab. 9.103: Leucinkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 0,36 | 0,19 | 5 | 0,38 | 0,27 | 6 | 0,32 | 0,19 | 0,478 | 0,656 |
| 8 | 6 | 0,31 | 0,07 | 4 | 0,37 | 0,04 | 6 | 0,37 | 0,12 | 0,126 | 0,443 |
| 11 | 6 | 0,54 | 0,13 | 4 | 0,58 | 0,12 | 6 | 0,84 | 0,34 | 0,533 | 0,027 |
| 12 | 5 | 0,66 | 0,14 | 5 | 0,76 | 0,31 | 6 | 0,90 | 0,18 | 0,351 | 0,015 |
| 13 | 5 | 0,64 | 0,28 | 5 | 0,63 | 0,15 | 6 | 0,77 | 0,16 | 0,889 | 0,260 |
| 16 | 6 | 0,78 | 0,34 | 6 | 0,76 | 0,20 | 6 | 0,93 | 0,26 | 0,944 | 0,388 |
| 17 | 5 | 0,90 | 0,46 | 6 | 0,82 | 0,40 | 6 | 0,89 | 0,28 | 0,514 | 0,723 |
| 18 | 4 | 0,95 | 0,30 | 6 | 0,78 | 0,40 | 6 | 1,01 | 0,23 | 0,239 | 0,997 |
| 19 | 6 | 0,72 | 0,23 | 6 | 0,66 | 0,06 | 6 | 0,88 | 0,25 | 0,539 | 0,038 |

Tab. 9.104: Serotoninkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 3 | 3,30 | 3,80 | 4 | 0,70 | 0,44 | 4 | 1,55 | 0,62 | 0,397 | 0,557 |
| 8 | 3 | 0,59 | 0,59 | 3 | 0,79 | 0,62 | 3 | 0,88 | 0,56 | | 0,069 |
| 11 | 4 | 0,25 | 0,21 | 3 | 0,46 | 0,26 | 4 | 0,92 | 0,73 | 0,330 | 0,231 |
| 12 | 2 | 1,15 | 1,55 | 1 | 0,09 | | 5 | 0,78 | 0,69 | | |
| 13 | 1 | 0,04 | | | | | 1 | 1,09 | | | |
| 16 | 3 | 0,09 | 0,11 | 2 | 0,30 | 0,23 | 1 | 0,01 | | 0,618 | |
| 17 | 1 | 0,01 | | | | | 2 | 0,02 | 0,00 | | |
| 18 | 3 | 0,69 | 1,13 | 3 | 1,40 | 1,17 | 4 | 0,74 | 0,83 | 0,446 | 0,554 |
| 19 | 3 | 0,47 | 0,76 | 2 | 1,32 | 0,06 | 2 | 0,87 | 0,52 | 0,495 | 0,639 |

Tab. 9.105: Tyraminkonzentrationen in Laufgruppe V [$\mu\text{mol/L}$]

| Tag | Kontrolle K01 | | | Zulage S13 | | | Zulage S12 | | | p | |
|-----|---------------|-----------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|---------|---------|
| | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | n | \bar{x} | s | K01/S13 | K01/S12 |
| 7 | 6 | 0,84 | 0,52 | 6 | 0,77 | 0,55 | 6 | 1,11 | 0,49 | 0,581 | 0,000 |
| 8 | 6 | 0,92 | 0,54 | 6 | 1,01 | 0,51 | 6 | 1,09 | 0,54 | 0,341 | 0,145 |
| 11 | 6 | 30,2 | 10,3 | 6 | 43,1 | 24,3 | 6 | 18,2 | 5,10 | 0,104 | 0,086 |
| 12 | 6 | 14,6 | 20,9 | 6 | 11,9 | 10,4 | 6 | 10,9 | 8,71 | 0,658 | 0,658 |
| 13 | 6 | 1,02 | 0,48 | 6 | 0,86 | 0,26 | 6 | 6,81 | 7,17 | 0,577 | 0,101 |
| 16 | 6 | 1,45 | 1,78 | 6 | 1,60 | 2,26 | 6 | 1,16 | 1,07 | 0,910 | 0,781 |
| 17 | 2 | 0,55 | 0,00 | 4 | 0,95 | 0,61 | 4 | 0,57 | 0,65 | 0,189 | 0,029 |
| 18 | 6 | 1,48 | 1,23 | 6 | 0,87 | 0,81 | 6 | 0,92 | 1,09 | 0,330 | 0,422 |
| 19 | 4 | 0,41 | 0,17 | 4 | 0,92 | 0,82 | 4 | 0,73 | 0,66 | 0,255 | 0,335 |

Tab. 9.106: Mittlere prozentuale fAS-Konzentrationsabweichungen [%] von der jeweiligen Kontrolle während der Schadgrassilagezulagen (Versuchsphase)

| fAS | S02 | | | S04 | | | S05 | | | S07 | | | S08 | | |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | Lauf 2 | Lauf 3 | Lauf 4 | Lauf 2 | Lauf 3 | Lauf 4 | Lauf 5 | Lauf 6 | Lauf 7 | Lauf 5 | Lauf 6 | Lauf 7 | Lauf 8 | Lauf 9 | Lauf 10 |
| Asp | +20,4 | -3,53 | +6,44 | +131 | +182 | +114 | +9,40 | +18,0 | +4,96 | +14,5 | +31,1 | +12,4 | +21,6 | +20,9 | -14,4 |
| Glu | -19,9 | +21,2 | +8,77 | -22,9 | +10,8 | +8,61 | +26,5 | +16,1 | -3,02 | +9,72 | +16,7 | +4,01 | +13,1 | +16,5 | +4,36 |
| Ser | +27,3 | +8,02 | +23,7 | +95,8 | +74,3 | +31,4 | -33,5 | -5,59 | +15,9 | -0,79 | -0,91 | +22,1 | -22,9 | +2,40 | -30,7 |
| His | +33,7 | -27,7 | -51,1 | +191 | +191 | +110 | -30,2 | +2,61 | -10,7 | +60,3 | +58,6 | +19,7 | -25,7 | -31,3 | -37,2 |
| Gly | +34,1 | -2,94 | +7,33 | +79,3 | +74,2 | +60,5 | -8,39 | -10,4 | -7,03 | -2,96 | +20,7 | +20,7 | +28,6 | +25,6 | -1,14 |
| Thr | +41,7 | +4,03 | +6,16 | +121 | +107 | +64,8 | +10,7 | +12,8 | +10,1 | +31,6 | +5,47 | +25,5 | +26,6 | +34,3 | -1,09 |
| Ala | +8,96 | -4,80 | +7,17 | +2,93 | +24,7 | +44,4 | -20,4 | -19,1 | -30,2 | +15,0 | +14,2 | -4,35 | -14,1 | -24,4 | -14,0 |
| Arg | +19,6 | +2,86 | +2,99 | +77,5 | +73,9 | +61,1 | +41,0 | +37,6 | +14,1 | +26,4 | +12,8 | +4,35 | +25,8 | +20,4 | +3,54 |
| Tyr | +38,5 | -12,2 | +17,8 | +138 | +58,6 | +67,6 | -15,3 | +1,44 | +3,62 | -3,81 | -1,15 | +9,09 | +22,6 | +27,3 | -3,76 |
| Val | +56,2 | +24,6 | +36,3 | +54,3 | +93,3 | +86,5 | -11,9 | +10,1 | -13,2 | +25,0 | +19,3 | +14,2 | -3,90 | +11,9 | +56,1 |
| Met | +118 | -6,14 | +23,6 | +33,0 | +81,0 | +45,1 | +9,54 | | | +40,1 | | | | | +26,0 |
| Trp | -16,2 | -26,4 | | +142 | +45,8 | | +136 | +10,7 | -9,61 | +126 | -3,72 | -16,1 | | | -0,53 |
| Phe | | -40,2 | +17,4 | | -39,5 | +50,7 | -8,45 | +4,01 | -22,0 | +9,71 | +13,6 | +6,06 | +8,14 | -2,13 | -14,1 |
| Ile | | +6,06 | +24,6 | | +38,9 | +61,8 | -14,7 | -6,32 | -14,4 | +11,4 | +22,4 | +7,48 | -9,03 | +7,57 | -13,3 |
| Leu | | -4,43 | +46,2 | | +123 | +99,3 | +19,8 | -46,2 | -20,2 | +29,0 | -12,1 | +16,3 | +2,64 | +31,0 | -43,2 |
| ΣfAS | +15,9 | -4,58 | +4,90 | +49,4 | +66,9 | +54,9 | +5,59 | +6,85 | -8,78 | +13,3 | +16,0 | +6,71 | +10,1 | +3,18 | -5,06 |

| fAS | S09 | | | S10 | | | S11 | | | S13 | | | S12 | | |
|------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Lauf 8 | Lauf 9 | Lauf 10 | Lauf 11 | Lauf 12 | Lauf 13 | Lauf 11 | Lauf 12 | Lauf 13 | Lauf 16 | Lauf 17 | Lauf 18 | Lauf 16 | Lauf 17 | Lauf 18 |
| Asp | -5,99 | -24,4 | -28,6 | -41,3 | -3,20 | +7,69 | -32,7 | -6,10 | -4,74 | -5,82 | 14,8 | -17,9 | +14,9 | +59,8 | +3,85 |
| Glu | -13,5 | -12,3 | -13,1 | -25,7 | -1,03 | +7,58 | -21,2 | +6,42 | +8,21 | -2,92 | -2,72 | -4,76 | +3,93 | +30,6 | +10,9 |
| Ser | +30,4 | +36,8 | +7,23 | -52,0 | -2,95 | +11,4 | -41,9 | -0,19 | -4,97 | -11,6 | -18,0 | -45,3 | +27,5 | +33,2 | -19,3 |
| His | +46,3 | +30,3 | +3,74 | -68,0 | -20,0 | -2,38 | -69,6 | -51,2 | -42,8 | -36,4 | -42,3 | -82,0 | +28,8 | +30,7 | -55,7 |
| Gly | +21,4 | +4,82 | +11,5 | -14,7 | +6,85 | +25,7 | -12,9 | -18,2 | +13,6 | +3,73 | -23,2 | -17,0 | +23,6 | +9,79 | +12,3 |
| Thr | +20,8 | +17,6 | -9,44 | -25,0 | +7,67 | +8,35 | -5,31 | -8,90 | +10,2 | +3,22 | -7,85 | -15,0 | +5,99 | +32,8 | +16,7 |
| Ala | -8,72 | -19,1 | -6,39 | -15,5 | -13,2 | +3,86 | -16,3 | -22,3 | +5,18 | +1,05 | -7,85 | -7,35 | +11,8 | -1,18 | -0,29 |
| Arg | -2,69 | -3,01 | -14,8 | -22,8 | -3,45 | +14,2 | -5,30 | +0,17 | +12,3 | -6,66 | -1,59 | -21,5 | -11,3 | +28,4 | -14,7 |
| Tyr | +0,56 | +14,3 | -10,5 | -11,4 | +17,3 | +25,7 | -12,4 | -15,6 | +3,02 | -5,92 | -18,9 | -16,6 | +13,7 | +14,0 | +3,58 |
| Val | 12,3 | +26,2 | +1,63 | -4,04 | +16,8 | +26,2 | -22,9 | -17,0 | -0,96 | -7,74 | -2,35 | -7,98 | -0,33 | +12,8 | +17,4 |
| Met | | | -0,22 | +23,1 | +24,9 | +14,4 | 15,2 | -15,4 | -13,0 | +11,4 | +21,3 | +0,16 | -0,12 | +20,2 | +35,3 |
| Trp | | -7,84 | | | +16,4 | | | -1,46 | | +13,6 | -6,96 | +47,3 | +10,4 | +27,3 | +63,9 |
| Phe | +77,1 | +40,6 | +7,57 | -19,9 | +36,4 | +37,1 | -24,1 | -0,25 | +7,84 | +14,9 | +42,5 | -22,4 | +37,9 | +82,5 | +9,31 |
| Ile | +30,7 | +24,7 | -6,47 | -25,4 | +3,26 | +16,2 | -36,5 | -29,8 | -22,6 | -8,94 | +1,77 | -9,87 | +0,32 | +5,25 | +8,49 |
| Leu | +45,9 | +70,8 | +21,6 | -29,7 | +19,7 | +30,7 | -33,6 | -6,47 | -6,64 | +8,84 | +1,43 | -11,9 | +42,0 | +16,1 | +9,34 |
| ΣfAS | -1,69 | -2,68 | -9,19 | -26,8 | -0,60 | +11,3 | -23,1 | -10,2 | +2,95 | -3,95 | -8,00 | -18,5 | +10,2 | +25,3 | +0,91 |

Tab. 9.107: Mittlere prozentuale fAS-Konzentrationsabweichungen [%] von der jeweiligen Kontrolle nach den Schadgrassilagezulagen (Auslaufphase)

| fAS | S02 | | | S04 | | | S05 | | | S07 | | |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Lauf 2 | Lauf 3 | Lauf 4 | Lauf 2 | Lauf 3 | Lauf 4 | Lauf 5 | Lauf 6 | Lauf 7 | Lauf 5 | Lauf 6 | Lauf 7 |
| Asp | -31,8 | +13,9 | +19,7 | -20,2 | +20,7 | +19,5 | +38,7 | -10,3 | -8,66 | +29,0 | +5,24 | -2,38 |
| Glu | +14,8 | -8,34 | +6,35 | +36,8 | +36,3 | +29,6 | +15,8 | -11,4 | -11,0 | +15,6 | -5,68 | -7,95 |
| Ser | +2,77 | +2,82 | +22,8 | -10,9 | +3,12 | +17,9 | +22,8 | -9,04 | -39,7 | +4,37 | -13,7 | +41,7 |
| His | -3,24 | +53,9 | +11,4 | +21,2 | +31,2 | +16,6 | +8,61 | -5,31 | +8,30 | +16,9 | +16,3 | -4,51 |
| Gly | +0,72 | +6,10 | +19,2 | +4,60 | +10,6 | +7,30 | +4,38 | -18,1 | +6,93 | +3,19 | +23,1 | -10,2 |
| Thr | +2,47 | +16,2 | -0,68 | +9,46 | +15,6 | +0,19 | +9,60 | -3,47 | +40,0 | +11,2 | +49,5 | +13,4 |
| Ala | -3,23 | -0,80 | +9,40 | -27,2 | -10,3 | -7,49 | +21,8 | -42,4 | -27,0 | +44,3 | +24,8 | +5,61 |
| Arg | -1,16 | +39,4 | +45,4 | -8,21 | +26,1 | +84,5 | +6,06 | +14,0 | +10,1 | +24,5 | +12,5 | -5,25 |
| Tyr | -2,14 | +9,31 | +30,3 | -25,6 | +19,9 | +5,56 | +11,8 | +0,53 | +9,22 | +6,71 | +18,0 | +2,42 |
| Val | +5,81 | +43,2 | +47,2 | +15,8 | +40,5 | +30,7 | +28,1 | -18,5 | +2,93 | +43,5 | +38,7 | +9,93 |
| Met | | -12,2 | +4,14 | | -37,4 | -51,3 | -17,2 | | | -36,8 | | |
| Trp | | +70,2 | +73,9 | | +37,3 | +29,2 | | | | | | |
| Phe | | +124 | +34,3 | | +65,8 | +26,2 | | -4,53 | -8,86 | | +0,33 | +51,7 |
| Ile | | +18,6 | +16,1 | | +16,4 | +10,6 | +25,2 | -26,1 | -8,17 | +1,48 | +16,5 | +24,7 |
| Leu | | +11,6 | +19,2 | | +35,2 | +17,2 | +35,3 | +12,6 | +64,2 | +30,0 | -4,10 | +32,4 |
| ΣfAS | -13,7 | +17,2 | +13,6 | -17,0 | +11,9 | +12,4 | +18,4 | -19,3 | -7,46 | +20,5 | +4,23 | -1,67 |

| fAS | S08 | | | S09 | | | S10 | | | S11 | | |
|------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Lauf 8 | Lauf 9 | Lauf 10 | Lauf 8 | Lauf 9 | Lauf 10 | Lauf 11 | Lauf 12 | Lauf 13 | Lauf 11 | Lauf 12 | Lauf 13 |
| Asp | +6,14 | +0,42 | +23,5 | -13,4 | -4,23 | +31,7 | -31,7 | -5,87 | -9,80 | -28,4 | -2,66 | -3,20 |
| Glu | +7,71 | +0,93 | +2,60 | -5,16 | +4,37 | +10,8 | -21,4 | -8,32 | -9,18 | -22,4 | -7,10 | -8,91 |
| Ser | -5,43 | +0,32 | +5,15 | +19,5 | -2,65 | +36,1 | -17,5 | +20,4 | -3,63 | -1,36 | +26,4 | +12,5 |
| His | -4,70 | +13,0 | -18,5 | -10,6 | -5,54 | -21,2 | -33,5 | -9,81 | -7,08 | -32,1 | +0,63 | -22,1 |
| Gly | +16,2 | +34,0 | -19,2 | +8,84 | +26,6 | +0,83 | -19,2 | -7,06 | -9,03 | -0,11 | -9,06 | -13,0 |
| Thr | +46,7 | +32,2 | -15,8 | +41,2 | +12,9 | +6,40 | -13,0 | -2,05 | -0,83 | +4,88 | -6,70 | -4,70 |
| Ala | +13,4 | -12,6 | -4,97 | -20,7 | -9,37 | -1,69 | -18,6 | -3,08 | -5,84 | -19,8 | -7,94 | -9,28 |
| Arg | +50,3 | +8,73 | +1,44 | +28,9 | +11,0 | +3,44 | -12,9 | +8,81 | +4,99 | +1,71 | 2,21 | -0,26 |
| Tyr | +23,2 | +16,6 | -13,9 | +15,5 | +23,2 | +12,4 | -14,8 | -4,67 | -4,97 | +5,43 | -3,18 | -2,13 |
| Val | -8,06 | +16,5 | -23,1 | -3,99 | +20,8 | +3,32 | -23,1 | -2,54 | -9,67 | -15,2 | -15,3 | -26,2 |
| Met | | | +65,8 | | | +16,2 | -8,84 | -33,3 | -3,00 | -2,28 | -13,7 | +4,81 |
| Trp | | +22,2 | | | +5,01 | | | -11,6 | | | -23,7 | |
| Phe | +12,4 | +15,3 | | +65,1 | -8,46 | +21,7 | -54,8 | +5,35 | | -45,3 | -18,8 | |
| Ile | +19,6 | +27,5 | +1,49 | +28,9 | +30,6 | +14,8 | -22,7 | -13,0 | -0,87 | -8,48 | -24,9 | -18,4 |
| Leu | -8,51 | +15,7 | -12,8 | +1,10 | +20,9 | -3,38 | -13,3 | +11,4 | +14,1 | -7,60 | -3,40 | -33,1 |
| ΣfAS | +10,7 | +2,74 | -8,11 | -1,87 | +4,11 | +15,9 | -19,7 | -3,99 | -7,58 | -15,6 | -5,58 | -9,16 |

Tab. 9.108: fAS-Konzentrationen in den fAS-Pools der Kontrollphasen [$\mu\text{mol/L}$]

| fAS | Laufgruppe/Läufe | | | | | |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| | I | II | III | IV | 14, 15 | V |
| Asp | 5,64 | 5,86 | 5,53 | 4,82 ^b | 4,88 ^a | 6,55 ^{ab} |
| Glu | 14,5 ^a | 15,0 | 15,5 | 14,4 ^b | 15,2 | 17,4 ^{ab} |
| Ser | 1,97 ^{ab} | 1,89 | 1,61 | 1,28 ^b | 1,03 ^a | 1,89 |
| His | 0,89 ^{ab} | 0,89 ^{cd} | 0,95 ^{ef} | 0,66 ^{bdf} | 0,58 ^{aceg} | 0,83 ^g |
| Gly | 3,50 | 3,39 | 3,43 | 3,40 | 2,90 ^a | 3,99 ^a |
| Thr | 0,97 ^a | 0,96 ^b | 1,04 ^c | 1,01 ^d | 0,87 ^e | 1,37 ^{abcde} |
| Ala | 3,75 ^{abcde} | 5,93 ^a | 6,57 ^b | 5,85 ^c | 5,96 ^d | 5,56 ^e |
| Arg | 1,88 ^{ab} | 1,50 ^{acdef} | 2,17 ^c | 2,13 ^d | 1,94 ^e | 2,33 ^{bf} |
| Tyr | 0,33 ^a | 0,38 | 0,49 ^{ab} | 0,37 | 0,30 ^b | 0,38 |
| Val | 0,93 | 0,76 ^{ab} | 1,11 ^a | 0,85 ^c | 0,92 | 1,13 ^{bc} |
| Met | 0,18 | 0,32 ^{ab} | 0,29 | 0,26 | 0,17 ^a | 0,19 ^b |
| Trp ⁵¹ | 0,37 | 0,20 | | 0,12 | 0,05 | 0,09 |
| Phe | 0,38 ^{ab} | 0,23 ^{cd} | 0,20 | 0,19 | 0,13 ^{ac} | 0,10 ^{bd} |
| Ile | 0,26 | 0,25 | 0,24 | 0,31 | 0,21 | 0,29 |
| Leu | 0,37 | 0,26 ^{ab} | 0,26 ^{cd} | 0,48 ^{ac} | 0,47 ^{bd} | 0,35 |

^{a, b, c, d, e, f, g} Für Mittelwerte in einer Zeile mit unterschiedlichen Exponenten gilt: $p < 0,05$

⁵¹ Die univariate einfaktorielle Varianzanalyse ermittelte zwar signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen den Werten in den einzelnen Läufen, mittels Post hoc-Test nach Scheffé konnte der abweichende Wert aber nicht ermittelt werden.

Tab. 9.109: Prozentuale Zusammensetzung der fAS-Pools der Kontrollphasen [%]

| fAS | Laufgruppe/Läufe | | | | | |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| | I | II | III | IV | 14, 15 | V |
| Asp | 16,1 ^a | 15,3 | 14,4 | 13,5 ^a | 13,7 | 14,2 |
| Glu ⁵² | 41,9 | 41,3 | 40,5 | 41,0 | 42,7 | 38,1 |
| Ser | 5,89 ^{abcd} | 5,12 ^e | 4,26 ^a | 3,64 ^c | 2,90 ^{be} | 4,17 ^d |
| His | 2,61 ^{abc} | 2,43 ^{def} | 2,52 ^{ghi} | 1,86 ^{beh} | 1,63 ^{adg} | 1,83 ^{cfi} |
| Gly | 10,4 ^a | 9,29 | 8,87 | 9,43 | 8,11 ^a | 8,62 |
| Thr ⁵¹ | 2,89 | 2,63 | 2,68 | 2,81 | 2,46 | 3,02 |
| Ala | 11,0 ^{abcd} | 16,0 ^{ae} | 16,8 ^{bf} | 16,6 ^{cg} | 16,7 ^{dh} | 13,0 ^{efgh} |
| Arg | 5,49 ^a | 4,15 ^{abcde} | 5,92 ^b | 6,02 ^c | 5,50 ^d | 5,20 ^e |
| Tyr | 0,97 ^a | 0,99 ^b | 1,32 ^{abcd} | 1,02 | 0,84 ^c | 0,87 ^d |
| Val | 2,73 ^a | 2,06 ^{ab} | 2,89 ^b | 2,41 | 2,56 | 2,50 |
| Met | 0,48 ^a | 0,94 ^{abc} | 0,60 | 0,67 ^d | 0,46 ^b | 0,42 ^d |
| Trp ⁵¹ | 1,05 | 0,53 | | 0,32 | 0,15 | 0,22 |
| Phe | 1,08 ^{abcde} | 0,58 ^{afg} | 0,49 ^b | 0,50 ^c | 0,36 ^{df} | 0,23 ^{eg} |
| Ile | 0,75 | 0,64 | 0,63 | 0,89 ^a | 0,58 ^a | 0,68 |
| Leu | 1,10 | 0,68 ^{ab} | 0,65 ^{cd} | 1,35 ^{ac} | 1,34 ^{bd} | 0,90 |

^{a, b, c, d, e, f, g, h} Für Mittelwerte in einer Zeile mit unterschiedlichen Exponenten gilt: $p < 0,05$

Tab. 9.110: fAS-Konzentrationen in den fAS-Pools der Zulagephasen bei Zulagen von K01 [$\mu\text{mol/L}$]

| fAS | Laufgruppe | | | | |
|-----|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | I | II | III | IV | V |
| Asp | 4,81 ^{abc} | 6,92 ^{ad} | 7,09 ^{be} | 5,31 ^{def} | 7,15 ^{cf} |
| Glu | 19,9 ^a | 23,6 ^{ab} | 23,1 ^c | 17,6 ^{bcd} | 22,4 ^d |
| Ser | 1,85 ^{ab} | 3,29 ^{acd} | 2,45 ^c | 1,75 ^{de} | 2,95 ^{be} |
| His | 1,77 ^a | 2,66 ^b | 2,29 ^c | 1,82 ^d | 3,82 ^{abcd} |
| Gly | 5,11 ^{ab} | 6,26 ^{ac} | 4,89 ^{cd} | 5,39 ^e | 6,62 ^{bde} |
| Thr | 1,39 ^{ab} | 1,88 ^{acd} | 1,38 ^{ce} | 1,26 ^{df} | 1,84 ^{bef} |
| Ala | 4,20 ^{abcd} | 7,44 ^{aef} | 7,56 ^{bgh} | 5,96 ^{ceg} | 5,89 ^{dfh} |
| Arg | 2,78 ^{ab} | 2,90 ^{cde} | 3,54 ^{acf} | 2,28 ^{dfg} | 3,62 ^{beg} |
| Tyr | 0,40 ^{ab} | 0,72 ^{acd} | 0,60 ^{be} | 0,38 ^{ce} | 0,50 ^d |
| Val | 1,18 ^{abc} | 1,84 ^{ad} | 1,67 ^b | 1,36 ^{de} | 1,90 ^{ce} |
| Met | 0,36 | 0,37 | 0,28 ^a | 0,28 ^b | 0,45 ^{ab} |
| Trp | 0,27 ^a | 0,22 ^b | 0,52 ^{abcd} | 0,24 ^c | 0,20 ^d |
| Phe | 0,34 | 0,43 ^{abc} | 0,26 ^a | 0,24 ^b | 0,22 ^c |
| Ile | 0,31 ^{abcd} | 0,57 ^a | 0,46 ^{be} | 0,51 ^c | 0,58 ^{de} |
| Leu | 0,44 ^{ab} | 0,52 ^{cd} | 0,50 ^{ef} | 0,77 ^{ace} | 0,73 ^{bd} |

a, b, c, d, e, f, g, h Für Mittelwerte in einer Zeile mit unterschiedlichen Exponenten gilt: $p < 0,05$

Tab. 9.111: Prozentuale Zusammensetzung der fAS-Pools der Zulagephasen bei Zulagen von K01 [%]

| fAS | Laufgruppe | | | | |
|-----|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | I | II | III | IV | V |
| Asp | 4,81 ^{abc} | 6,92 ^{ad} | 7,09 ^{be} | 5,31 ^{def} | 7,15 ^{cf} |
| Glu | 45,8 ^{abcd} | 40,8 ^a | 41,9 ^{be} | 39,3 ^c | 37,9 ^{de} |
| Ser | 4,43 | 5,72 ^a | 4,54 | 3,96 ^a | 5,08 |
| His | 4,22 ^a | 4,56 | 4,22 ^b | 4,04 ^c | 5,61 ^{abc} |
| Gly | 11,9 ^a | 10,7 | 9,11 ^{abc} | 12,1 ^b | 11,7 ^c |
| Thr | 3,30 ^a | 3,20 ^b | 2,55 ^{abc} | 2,80 | 3,19 ^c |
| Ala | 9,62 ^{abc} | 12,2 ^a | 13,8 ^{bd} | 13,6 ^{ce} | 10,9 ^{de} |
| Arg | 6,52 ^{ab} | 5,00 ^{acd} | 6,62 ^{ce} | 5,15 ^{bef} | 6,27 ^{df} |
| Tyr | 0,97 | 1,18 ^{ab} | 1,10 ^c | 0,84 ^{ac} | 0,92 ^b |
| Val | 2,84 | 3,08 | 3,14 | 3,03 | 3,33 |
| Met | 0,88 ^{ab} | 0,68 | 0,54 ^{ac} | 0,61 ^{bd} | 0,79 ^{cd} |
| Trp | 0,57 | 0,32 ^a | 0,95 ^{abc} | 0,52 ^b | 0,38 ^c |
| Phe | 0,85 ^{abc} | 0,71 ^{def} | 0,49 ^{ad} | 0,52 ^{be} | 0,39 ^{cf} |
| Ile | 0,76 ^{ab} | 0,96 | 0,87 ^c | 1,16 ^{ac} | 1,08 ^b |
| Leu | 1,08 ^a | 0,85 ^{bc} | 0,94 ^{de} | 1,74 ^{abdf} | 1,35 ^{cef} |

a, b, c, d, e, f Für Mittelwerte in einer Zeile mit unterschiedlichen Exponenten gilt: $p < 0,05$

Tab. 9.112: fAS-Konzentrationen in den fAS-Pools der Zulagephasen bei Zulagen der Schadgrassilagen [$\mu\text{mol/L}$]

| fAS | Zugelegte Schadgrassilage | | | | | | | | | |
|-----|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| Asp | 5,16 | 11,5 | 7,65 | 8,22 | 7,79 | 5,67 | 4,83 | 4,63 | 6,79 | 8,91 |
| Glu | 20,8 | 26,7 | 26,4 | 25,8 | 25,7 | 20,1 | 16,7 | 17,4 | 21,6 | 26,3 |
| Ser | 2,23 | 3,14 | 3,17 | 3,52 | 2,01 | 3,08 | 1,44 | 1,43 | 2,09 | 3,18 |
| His | 1,33 | 4,52 | 2,30 | 3,83 | 1,57 | 2,90 | 1,30 | 0,84 | 1,29 | 2,90 |
| Gly | 5,78 | 8,71 | 5,73 | 7,07 | 5,67 | 5,47 | 5,70 | 5,07 | 5,74 | 7,62 |
| Thr | 1,60 | 2,72 | 2,06 | 2,31 | 1,66 | 1,51 | 1,26 | 1,24 | 1,70 | 2,24 |
| Ala | 4,40 | 5,05 | 5,56 | 7,82 | 6,23 | 6,65 | 5,43 | 5,24 | 5,60 | 6,08 |
| Arg | 3,00 | 4,74 | 3,76 | 3,30 | 4,16 | 3,32 | 2,23 | 2,35 | 3,24 | 3,69 |
| Tyr | 0,48 | 0,82 | 0,73 | 0,75 | 0,70 | 0,61 | 0,42 | 0,35 | 0,43 | 0,56 |
| Val | 1,62 | 2,07 | 1,74 | 2,19 | 2,00 | 1,91 | 1,57 | 1,19 | 1,79 | 2,14 |
| Met | 0,40 | 0,57 | 0,40 | 0,49 | 0,36 | 0,28 | 0,33 | 0,26 | 0,49 | 0,54 |
| Trp | 0,20 | 0,35 | 0,40 | 0,21 | 0,51 | 0,48 | 0,28 | 0,18 | 0,23 | 0,27 |
| Phe | 0,30 | 0,34 | 0,39 | 0,47 | 0,26 | 0,37 | 0,31 | 0,26 | 0,23 | 0,31 |
| Ile | 0,38 | 0,48 | 0,52 | 0,64 | 0,43 | 0,53 | 0,51 | 0,36 | 1,55 | 0,61 |
| Leu | 0,54 | 1,88 | 0,39 | 0,56 | 0,43 | 0,70 | 0,85 | 0,65 | 0,72 | 0,89 |

Tab. 9.113: Prozentuale Zusammensetzung der fAS-Pools der Zulagephasen bei Zulagen der Schadgrassilagen [%]

| fAS | Zugelegte Schadgrassilage | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| Asp | 11,6 | 17,6 | 12,9 | 12,5 | 13,4 | 10,8 | 10,9 | 11,2 | 12,7 | 13,2 |
| Glu | 45,5 | 38,3 | 45,1 | 40,1 | 44,0 | 38,9 | 39,0 | 42,9 | 40,8 | 39,2 |
| Ser | 4,90 | 4,71 | 5,33 | 5,29 | 3,61 | 5,64 | 3,36 | 3,55 | 4,06 | 5,02 |
| His | 2,94 | 6,94 | 3,99 | 6,04 | 3,74 | 5,41 | 2,86 | 2,06 | 2,45 | 4,28 |
| Gly | 12,6 | 12,8 | 9,60 | 10,6 | 10,2 | 10,8 | 13,5 | 12,7 | 11,4 | 12,0 |
| Thr | 3,59 | 4,20 | 3,45 | 3,59 | 2,91 | 2,84 | 2,86 | 3,00 | 3,28 | 3,37 |
| Ala | 9,38 | 7,51 | 9,04 | 11,7 | 11,1 | 12,6 | 13,5 | 13,5 | 11,3 | 9,96 |
| Arg | 6,80 | 7,11 | 6,57 | 5,22 | 7,25 | 6,31 | 5,28 | 5,81 | 6,31 | 5,49 |
| Tyr | 0,99 | 1,28 | 1,23 | 1,12 | 1,23 | 1,14 | 0,99 | 0,87 | 0,86 | 0,86 |
| Val | 3,52 | 3,16 | 2,97 | 3,37 | 3,63 | 3,60 | 3,61 | 2,89 | 3,49 | 3,25 |
| Met | 0,99 | 0,85 | 0,68 | 0,76 | 0,75 | 0,61 | 0,77 | 0,63 | 0,97 | 0,82 |
| Trp | 0,39 | 0,52 | 0,40 | 0,34 | 2,22 | 0,85 | 0,54 | 0,41 | 0,47 | 0,43 |
| Phe | 0,61 | 0,53 | 0,69 | 0,72 | 0,47 | 0,71 | 0,64 | 0,54 | 0,47 | 0,48 |
| Ile ⁵¹ | 0,89 | 0,76 | 0,87 | 0,99 | 1,15 | 1,01 | 1,18 | 0,90 | 1,12 | 0,97 |
| Leu | 1,29 | 1,38 | 0,64 | 0,84 | 1,02 | 1,37 | 1,91 | 1,59 | 1,46 | 1,43 |

Tab. 9.114: fAS-Konzentrationen in den fAS-Pools der Auslaufphasen nach Zulagen von K01 [$\mu\text{mol/L}$]

| fAS | Laufgruppe | | | |
|-----|------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| | I | II | III | IV |
| Asp | 4,27 ^{ab**} | 6,48 ^a | 5,85 ^b | 5,60 [*] |
| Glu | 16,5 ^{a*} | 20,5 ^{ab***} | 18,7 ^{**} | 16,9 ^{b***} |
| Ser | 1,38 ^{a**} | 1,94 ^a | 1,63 | 1,42 |
| His | 0,97 | 1,25 ^{a***} | 0,92 ^a | 0,99 ^{***} |
| Gly | 3,06 ^{ab*} | 4,16 ^{a**} | 3,41 | 3,92 ^b |
| Thr | 1,12 | 1,10 | 0,98 | 1,20 |
| Ala | 3,44 ^{abc} | 6,98 ^a | 5,86 ^b | 5,61 ^c |
| Arg | 2,17 | 2,24 ^{***} | 2,46 [*] | 2,25 |
| Tyr | 0,28 ^a | 0,54 ^{abc} | 0,40 ^b | 0,34 ^c |
| Val | 0,63 ^{abc***} | 1,14 ^{a***} | 1,08 ^b | 1,06 ^{c*} |
| Met | 0,49 ^{ab***} | 0,33 | 0,16 ^a | 0,20 ^{b*} |
| Trp | 0,13 ^a | | 0,57 ^{ab} | 0,14 ^b |
| Phe | 0,17 | 0,27 | 0,18 | 0,21 |
| Ile | 0,29 ^a | 0,41 ^{ab***} | 0,27 ^b | 0,35 |
| Leu | 0,31 | 0,28 ^a | 0,32 ^b | 0,44 ^{ab} |

^{a, b, c} Für Mittelwerte in einer Zeile mit unterschiedlichen Exponenten gilt:
 $p < 0,05$

* schwach signifikanter ($p < 0,05$); ** signifikanter ($p < 0,01$);

*** hoch signifikanter ($p < 0,001$) Konzentrationsunterschied zur
Konzentration in der jeweiligen Kontrollphase

Tab. 9.115: Prozentuale Zusammensetzung der fAS-Pools der Auslaufphasen nach Zulagen von K01 [%]

| fAS | Laufgruppe | | | |
|-----|------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| | I | II | III | IV |
| Asp | 12,4 ^{a**} | 13,6 ^{**} | 14,2 ^a | 14,0 |
| Glu | 47,9 ^{abc***} | 43,8 ^{a*} | 44,3 ^{b**} | 42,5 ^c |
| Ser | 4,02 ^{**} | 4,30 | 4,19 | 3,56 |
| His | 2,82 | 2,73 [*] | 2,31 | 2,47 ^{***} |
| Gly | 8,89 [*] | 9,13 | 8,53 | 9,74 |
| Thr | 3,25 ^{ab} | 2,49 ^a | 2,47 ^b | 3,00 |
| Ala | 9,98 ^{abc} | 14,1 ^{a*} | 14,8 ^b | 14,1 ^{c***} |
| Arg | 6,27 | 4,96 ^{a**} | 6,61 ^a | 5,79 |
| Tyr | 0,82 ^a | 1,10 ^{ab} | 0,97 ^{**} | 0,85 ^{b*} |
| Val | 1,83 ^{abc***} | 2,38 ^{a*} | 2,56 ^b | 2,60 ^c |
| Met | 1,40 ^{ab***} | 0,89 | 0,45 ^a | 0,49 ^{b*} |
| Trp | 0,41 ^a | | 1,19 ^{ab} | 0,34 ^b |
| Phe | 0,53 | 0,51 | 0,53 | 0,49 |
| Ile | 0,88 | 0,83 [*] | 0,67 | 0,85 |
| Leu | 0,94 | 0,59 ^a | 0,82 | 1,11 ^a |

^{a, b, c} Für Mittelwerte in einer Zeile mit unterschiedlichen Exponenten gilt:
 $p < 0,05$

* schwach signifikanter ($p < 0,05$); ** signifikanter ($p < 0,01$);

*** hoch signifikanter ($p < 0,001$) prozentualer Anteilsunterschied zum
Anteil in der jeweiligen Kontrollphase

Tab. 9.116: fAS-Konzentrationen in den fAS-Pools der Auslaufphasen nach Schadgrassilagezulagen [$\mu\text{mol/L}$]

| fAS | Zugelegte Schadgrassilage | | | | | | | |
|-----|---------------------------|--------|--------|--------|---------|-------|--------|--------|
| | S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 |
| Asp | 4,24 | 4,52 | 6,58 | 6,93* | 6,07 | 5,84 | 4,61** | 4,86* |
| Glu | 16,7 | 16,0 | 19,5 | 20,1 | 19,6 | 19,0 | 14,6** | 14,6** |
| Ser | 1,52 | 1,45 | 2,25 | 2,13 | 1,59 | 1,88 | 1,37 | 1,46 |
| His | 1,15 | 1,19* | 1,28 | 1,37 | 0,88 | 0,80 | 0,82** | 0,81* |
| Gly | 3,30 | 3,29 | 4,04 | 4,40 | 3,83 | 3,87 | 3,46* | 3,68 |
| Thr | 1,17 | 1,20 | 1,25 | 1,39* | 1,23* | 1,20* | 1,13 | 1,18 |
| Ala | 3,48 | 2,89** | 5,47** | 8,28** | 5,84 | 5,17* | 5,06* | 4,89* |
| Arg | 2,70** | 2,76* | 2,48 | 2,44 | 2,92* | 2,80* | 2,27 | 2,26 |
| Tyr | 0,35 | 0,28 | 0,56 | 0,58 | 0,45 | 0,47 | 0,30 | 0,34 |
| Val | 0,81*** | 0,80* | 1,13 | 1,46** | 1,05 | 1,15 | 0,91 | 0,86* |
| Met | 0,48 | 0,27 | 0,24 | 0,21 | 0,27 | 0,19 | 0,18 | 0,20 |
| Trp | 0,23 | 0,18 | 0,30 | 0,24 | 0,69*** | 0,59 | 0,12 | 0,11 |
| Phe | 0,28 | 0,24 | 0,25 | 0,32 | 0,20 | 0,21 | 0,15 | 0,16 |
| Ile | 0,34 | 0,33 | 0,36 | 0,46 | 0,32 | 0,34* | 0,30 | 0,29 |
| Leu | 0,36 | 0,39 | 0,37 | 0,32 | 0,31 | 0,34 | 0,41 | 0,37 |

* schwach signifikanter ($p < 0,05$); ** signifikanter ($p < 0,01$);

*** hoch signifikanter ($p < 0,001$) Konzentrationsunterschied zur jeweiligen Kontrolle in der Auslaufphase

Tab. 9.117: Prozentuale Zusammensetzung der fAS-Pools der Auslaufphasen nach Schadgrassilagezulagen [%]

| fAS | Zugelegte Schadgrassilage | | | | | | | |
|-----|---------------------------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 |
| Asp | 11,6 | 12,8 | 14,6* | 14,1 | 14,4 | 13,6 | 12,9* | 13,5 |
| Glu | 46,2 | 46,1 | 44,8 | 41,0*** | 44,4 | 44,5 | 41,3 | 41,3 |
| Ser | 4,23 | 4,07 | 4,86 | 4,19 | 4,00 | 4,36 | 3,83 | 4,05 |
| His | 3,15 | 3,41* | 2,85 | 2,76 | 2,21 | 1,91 | 2,32 | 2,25 |
| Gly | 9,26 | 9,37 | 8,98 | 8,87 | 9,28 | 9,04 | 9,68 | 10,1 |
| Thr | 3,23 | 3,43 | 2,79 | 2,82 | 2,90** | 2,78 | 3,16 | 3,27 |
| Ala | 9,83 | 8,33*** | 11,9** | 16,2** | 14,5 | 12,0** | 14,4 | 13,9 |
| Arg | 7,56** | 7,86** | 5,84 | 5,11 | 7,73* | 6,56 | 6,52** | 6,48** |
| Tyr | 0,99 | 0,77 | 1,19 | 1,11 | 1,07 | 1,08 | 0,85 | 0,92 |
| Val | 2,29*** | 2,30** | 2,49 | 2,90** | 2,46 | 2,63 | 2,55 | 2,36 |
| Met | 1,14 | 0,71 | 0,51 | 0,48 | 0,64 | 0,50 | 0,51 | 0,53 |
| Trp | 0,69 | 0,47 | 1,02 | 0,38 | 1,82 | 1,61 | 0,31 | 0,30 |
| Phe | 0,73 | 0,64 | 0,53 | 0,58 | 0,39 | 0,43 | 0,38 | 0,39 |
| Ile | 0,91 | 0,88 | 0,76 | 0,87 | 0,77 | 0,79* | 0,84 | 0,82 |
| Leu | 0,96 | 1,08 | 0,94 | 0,63 | 0,80 | 0,80 | 1,16 | 1,03 |

* schwach signifikanter ($p < 0,05$); ** signifikanter ($p < 0,01$);

*** hoch signifikanter ($p < 0,001$) prozentualer Anteilsunterschied zur jeweiligen Kontrolle in der Auslaufphase

9.8 Informationen zu den Grassilagen der Vergleichsstudien aus Kapitel 5.2

Tab. 9.118: Siliergut und -dauer der in den Kapiteln 5.2.2.2 bis 5.2.2.4 erwähnten Studien

| Autor, Jahr | Siliergut | Silierdauer |
|--------------------------------|---|--------------------|
| OHSHIMA et al. 1979 | <i>Lolium multiflorum</i> | 90 Tage |
| HERON et al. 1986 | <i>Lolium perenne</i> | 153 Tage |
| SEYFARTH et al. 1989 | <i>Festuca arundinacea</i> und <i>Poa pratensis</i> bzw. <i>Dactylis glomerata</i> | Mindestens 90 Tage |
| VON KEYSERLINGK et al. 1998 | Keine Angabe | Keine Angabe |
| WINTERS et al. 2001 | <i>Lolium multiflorum</i> und Weidelgras- Hybrid; Protein-N umfasst 72 % des Gesamt-N-Gehalts | 191 bzw. 290 Tage |
| ARRIGO 2006 | u.a. Weidelgrassorten, Wiesenrispe, Klee; siliert mit 30 bzw. 50 % TS | ca. 200 Tage |

9.9 Aminosäurenkonzentrationen in Pansensaft in der Literatur

Tab. 9.119: Vergleich der Konzentrationen einzelner fAS im Pansensaft in der vorliegenden Studie mit den Studien ALLISON et al. (1962), WRIGHT und HUNGATE (1967 a), BRÖCKER (1996), VELLE et al. (1997) und VOLDEN et al. (1998)

| fAS | Konzentrationsbereiche [$\mu\text{mol/L}$] | | Autor, Jahr |
|-----|--|--|--|
| | Vorliegende Studie | Literatur | |
| Asp | 3,22 bis 14,0 | 45 bis 90/ 9 bis 50 1,88 bis 3,92 19 bis 57 | WRIGHT u. HUNGATE 1967 a ¹ BRÖCKER 1996 VELLE et al. 1997 |
| Glu | 13,1 bis 32,3 | 100 bis 270/5 bis 42 18,2 bis 25,8 38 bis 80 | WRIGHT u. HUNGATE 1967 a ¹ BRÖCKER 1996 VELLE et al. 1997 |
| Ser | 1,03 bis 5,20 | Spuren 0 bis 13 | WRIGHT u. HUNGATE 1967 a ¹ VELLE et al. 1997 |
| His | 0,55 bis 5,53 | 3 bis 16 | VELLE et al. 1997 |
| Gly | 2,50 bis 11,0 | 4 bis 60/4 bis 42 3,99 bis 6,00 10 bis 61 | WRIGHT u. HUNGATE 1967 a ¹ BRÖCKER 1996 VELLE et al. 1997 |
| Thr | 0,73 bis 3,50 | 8 bis 28 9 bis 41 (190) | VELLE et al. 1997 VOLDEN et al. 1998 |

Tab. 9.119: Fortsetzung

| fAS | Konzentrationsbereiche [$\mu\text{mol/L}$] | | Autor, Jahr |
|-----|--|---|---|
| | Vorliegende Studie | Literatur | |
| Ala | 2,57 bis 10,4 | 70 bis 390/0 bis 290 30 bis 452 | WRIGHT u. HUNGATE 1967 a ¹ VELLE et al. 1997 |
| Arg | 1,43 bis 5,84 | 9 bis 26 | VELLE et al. 1997 |
| Tyr | 0,24 bis 1,08 | 6 bis 17 | VELLE et al. 1997 |
| Val | 0,64 bis 2,84 | 15 bis 170/0 bis 170 7 bis 100 | WRIGHT u. HUNGATE 1967 a ¹ VELLE et al. 1997 |
| Met | 0,11 bis 0,77 | Spuren 7 bis 23 5 bis 28 (61) | WRIGHT u. HUNGATE 1967 a ¹ VELLE et al. 1997 VOLDEN et al. 1998 |
| Trp | 0,06 bis 0,70 | 5 bis 29 | VELLE et al. 1997 |
| Ile | 0,08 bis 0,88 | 4 bis 31 | VELLE et al. 1997 |
| Leu | 0,15 bis 0,94 | 11 bis 54 4 bis 60/4 bis 6 5 bis 49 | ALLISON et al. 1962 WRIGHT u. HUNGATE 1967 a ¹ VELLE et al. 1997 |

¹ Angaben für angesäuerten Pansensaft bzw. Ultrafiltrate. Im Gegensatz zu den angesäuerten Proben beinhalten Ultrafiltrate vermutlich nur extrazelluläre fAS (WRIGHT u. HUNGATE 1967 a) und zeigen daher niedrigere Konzentrationen.

Tab. 9.120: Substrate der fAS-Messungen in Tabelle 9.119 und ihre Analyseverfahren

| Autor, Jahr | Substrat | Analyseverfahren |
|-----------------------------|--|--|
| ALLISON et al. 1962 | Boviner PAS (filtriert, zentrifugiert, sterilisiert) | Papierchromatographisch nach Proteinhydrolyse, Gehalt freien Leucins berechnet |
| WRIGHT u. HUNGATE 1967 a | Angesäuertes (H_2SO_4)/ ultrafiltrierter boviner PAS | Trennung elektrophoretisch und chromatographisch |
| BRÖCKER 1996 | RUSITEC-Fermenterflüssigkeit (Aufbereitung wie in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben) | Flüssigkeitschromato- graphisch mit OPA |
| VELLE et al. 1997 | Boviner PAS (eine Stunde vor bis eine Stunde nach Fütterung; filtriert, deproteinisiert mit TCA, zentrifugiert Lagerung bei $-15\text{ }^\circ\text{C}$) | Flüssigkeitschromato- graphisch mit Phenylthiocarbamyl |
| VOLDEN et al. 1998 | Boviner Pansensaft (vor bis zwei Stunden nach Fütterung; Aufbereitung s. VELLE et al. 1997) | |

9.10 Konzentrationen freier Aminosäuren und biogener Amine in den Pansen-saftinokulaten des Spendertiers

Tab. 9.121: fAS- und biogene Aminekonzentrationen im Pansen-saftinokulat des Spendertiers [$\mu\text{mol/L}$]

| fAS | Läufe | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 2 | 3 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| Asp | 11,5 | 6,67 | 11,8 | 6,91 | 13,2 | 16,5 | 6,61 | 12,1 | 8,51 | 15,4 | 10,6 | 8,29 | 15,3 | 8,36 | 26,6 | 11,3 |
| Glu | 21,2 | 15,2 | 40,3 | 24,3 | 46,0 | 29,8 | 18,2 | 38,4 | 21,7 | 37,4 | 24,7 | 19,5 | 21,5 | 14,3 | 49,8 | 27,7 |
| Ser | 3,03 | 7,36 | 5,68 | 3,08 | 3,93 | 4,49 | 2,91 | 3,69 | 2,81 | 3,18 | 2,70 | 2,91 | 4,29 | 2,44 | 7,02 | 3,47 |
| His | 0,79 | 4,10 | 5,06 | 2,85 | 3,70 | 2,75 | 1,80 | 11,7 | 4,16 | 1,81 | 2,41 | 1,21 | 1,99 | 3,17 | 4,47 | 2,23 |
| Gly | 6,43 | 9,63 | 12,6 | 5,62 | 17,0 | 10,9 | 4,12 | 15,9 | 6,70 | 8,51 | 5,35 | 6,22 | 13,0 | 4,92 | 17,1 | 7,22 |
| Thr | 2,25 | 4,84 | 7,14 | 3,41 | 4,02 | 11,8 | 2,53 | 3,86 | 1,53 | 3,39 | 3,10 | 1,68 | 5,68 | 2,98 | 6,64 | 4,12 |
| Ala | 5,34 | 9,64 | 12,9 | 10,6 | 71,8 | 4,72 | 4,20 | 17,3 | 8,70 | 8,35 | 6,06 | 6,19 | 10,7 | 5,84 | 16,9 | 6,62 |
| Arg | 5,00 | 4,06 | 12,8 | 3,64 | 5,42 | 115 | 3,11 | 3,94 | 2,52 | 4,29 | 3,37 | 3,27 | 5,91 | 3,92 | 6,50 | 7,07 |
| Tyr | 0,52 | 0,99 | 1,88 | 1,25 | 2,62 | 1,50 | 1,11 | 1,41 | 0,68 | 0,99 | 1,15 | 0,74 | 1,07 | 0,75 | 1,37 | 0,87 |
| Val | 2,37 | 4,98 | 3,49 | 3,03 | 11,7 | 10,6 | 1,76 | 6,22 | 2,45 | 2,83 | 3,37 | 1,75 | 9,16 | 1,75 | 6,37 | 2,34 |
| Met | | | 2,62 | 0,60 | | 6,39 | | 0,76 | 0,43 | 0,42 | 0,54 | 0,29 | 0,92 | 0,35 | 1,17 | 0,55 |
| Trp | | 0,47 | 0,85 | 0,40 | 1,22 | 0,38 | 0,28 | 0,31 | 0,55 | 0,43 | 0,33 | 0,51 | 0,72 | 0,53 | 0,57 | 1,87 |
| Phe | | 0,60 | 0,52 | 0,47 | 1,01 | 0,54 | 0,36 | 1,75 | 0,85 | 0,42 | 5,60 | 1,51 | 1,85 | 0,36 | 0,66 | 0,30 |
| Ile | | 1,76 | 2,05 | 0,83 | 2,76 | 1,33 | 0,53 | 0,99 | 1,01 | 1,66 | 1,26 | 0,66 | 0,70 | 5,00 | 0,79 | 0,61 |
| Leu | | 1,82 | 1,11 | 0,66 | 1,08 | 1,29 | 0,29 | 0,64 | 1,14 | 0,80 | 2,60 | 1,11 | | 0,69 | 0,92 | 0,61 |
| Serot | | | | | | | | | | | | | 0,37 | | 0,03 | |
| Tyram | | | | | | | | 0,65 | 0,31 | | 0,24 | 0,37 | 1,72 | 3,32 | 1,06 | 0,30 |

Serot Serotonin; Tyram Tyramin

9.11 Ermittlung der Stickstoffnutzungseffizienz der flüssigkeitsassoziierten Bakterien

Nach CZERKASWIKI (1984) und CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE (1985) kann die mikrobielle Proteinsyntheseeffizienz bzw. N-Nutzungseffizienz mit Hilfe folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Effizienz} = \frac{\text{mikrobielles Protein}}{\text{Protein im Futter} + \text{NPN}}$$

Es wurden eingesetzt:

- mikrobielles Protein: Mittelwerte der Messungen der Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit von Tag 10 bis 20 bzw. 19 (Läufe 16, 17 und 18)
Dimension: $\mu\text{g RSA/mL}$ (Proteine aus FAB_1)
- Protein im Futter + NPN: tägliche Rp-Zulage
Dimension: g

Da die Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit in $\mu\text{g RSA/mL}$ angegeben wird, ist die Effizienz keine dimensionslose Größe, sondern muss in RSA/mL ausgedrückt werden. Umrechnung in die Einheit $[\text{g N in bakteriellem Protein/g N-Input}]$ ist möglich, wenn ein Flüssigkeitsvolumen von 800 mL je Fermenter und ein N-Gehalt im bakteriellen Protein von 16 % angenommen werden (RSA enthält 16 % N). Tabelle 9.122 zeigt die berechneten Nutzungseffizienzen.

Tab.9.122: Effizienz der bakteriellen Proteinsynthese bzw. N-Nutzungseffizienz durch FAB_1 $[\text{g N in bakteriellem Protein/g N-Input}]$ bei Zulagen von Kontroll- und Schadgrassilagen

| Kontrollgrassilagen | | | | | | | | | |
|---------------------|---------------|----------------|------------------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| K01 ¹ | K14 | K15 | K16 | K18 | K20 | K23 | | | |
| 0,0293 | 0,0364 | 0,0304 | 0,0275 | 0,0371 | 0,0343 | 0,0334 | | | |
| K01 | | | | | | | | | |
| Läufe 2, 3, 4 | Läufe 5, 6, 7 | Läufe 8, 9, 10 | Läufe 11, 12, 13 | Läufe 16, 17, 18 | | | | | |
| 0,0259 | 0,0255 | 0,0264 | 0,0314 | 0,0377 | | | | | |
| Schadgrassilagen | | | | | | | | | |
| S02 | S04 | S05 | S07 | S08 | S09 | S10 | S11 | S13 | S12 |
| 0,0222 | 0,0280 | 0,0215 | 0,0248 | 0,0230 | 0,0313 | 0,0303 | 0,0264 | 0,0255 | 0,0250 |

¹ Mittelwert aus allen Läufen mit K01-Zulagen

Die mittlere mikrobielle Proteinsyntheseeffizienz von FAB_1 lag bei Heufütterung mit 0,0346 g N in bakteriellem Protein/g N-Input in der Kontrollphase im oberen Bereich der Zulagephasen bei Kontrollgrassilagegaben.

Abbildung 9.6 zeigt entsprechend BACH et al. (2005) die negative Korrelation der N-Nutzungseffizienz mit der Ammoniakkonzentration in der Fermenterflüssigkeit.

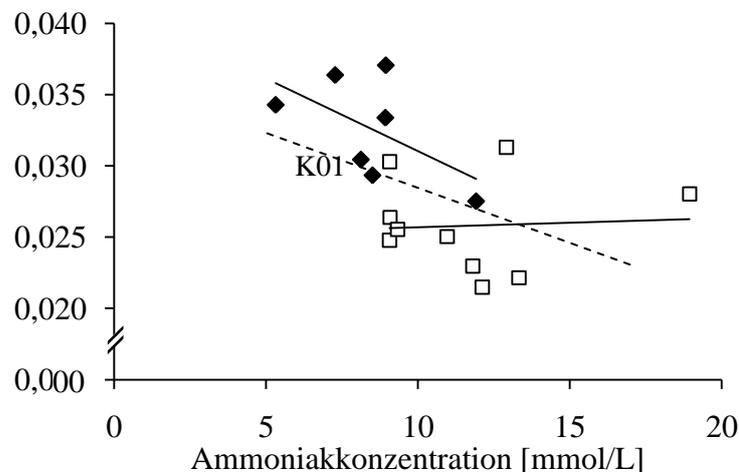


Abb. 9.6: Nach CZERKAWSKI (1984) und CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE (1985) berechnete N-Nutzungseffizienz der FAB_1 in Abhängigkeit von den mittleren Ammoniakkonzentrationen (Zulagephasen) in den RUSITEC-Fermentern.

◆ Kontrollgrassilagen; □ Schadgrassilagen;

— Trendgeraden für Kontroll- bzw. Schadgrassilagen; ---- für alle Silagen

9.12 Flüssigkeitsverdrängung durch die eingesetzten Grassilagen

In Fermentern mit Grassilagezulagen wurden gegenüber solchen mit Heuzulagen größere Überstandsvolumina gemessen⁵². Der folgende Versuch zeigte, dass die Grassilagen auf Grund ihres per se höheren Feuchtigkeitsgehalts mehr Wasser verdrängten als Heu.

Material und Methode

Auf den Trockensubstanzgehalt bezogen wurden gleiche Mengen an Heu und der Kontrollsilage K01 mit jeweils 100 mL Pufferlösung (s. Tab. 3.2) in Bechergläsern für 24 Stunden inkubiert (n = 3). Abdecken mit Alufolie verhinderte Feuchtigkeitsverluste durch Verdunsten.

Ergebnis

Eine Menge von 12,5 g Heu nahm bis zu 30 mL Flüssigkeit auf, während 17,0 g von K01 maximal 5 mL Flüssigkeit aufnehmen konnten. Tabelle 9.123 zeigt die Werte der sechs einzelnen Ansätze.

Tab. 9.123: *Tägliche Einwaagen an Heu und K01 [g] sowie Flüssigkeitsaufnahme [mL] durch die Einwaagen an Heu und K01*

| Einwaage [g] | 12,5 g Heu $\hat{=}$ 10,5 g TS | | | 17,0 g K01 $\hat{=}$ 10,5 g TS | | |
|--|--------------------------------|----|----|--------------------------------|---|---|
| Aufgenommenes Flüssigkeitsvolumen [mL] | 30 | 25 | 25 | 0 | 5 | 0 |

Folgerung

Da K01 gemessen an der Ursprungssubstanz geringere TS-Gehalte als Heu aufweist, müssen größere Mengen Grassilage als Heu in das System eingebracht werden, um mit gleichen TS-Gehalten arbeiten zu können. Flüssigkeit, die so bereits mit der Silage eingebracht wird, führt in den Fermentern zu größerer Flüssigkeitsverdrängung als trockenes Heu. Es gilt: je niedriger der TS-Gehalt einer Silage, desto größer ist die Flüssigkeitsverdrängung im RUSITEC-Fermenter und in der Folge das Überstandsvolumen. Zwischen einzelnen Silagen bedingte die unterschiedliche Flüssigkeitsverdrängung aber nur kleine Unterschiede (maximal 30 mL/Tag⁵²), die sich nicht wesentlich auf die Konzentrationen einzelner Stoffe in der Fermenterflüssigkeit ausgewirkt haben können.

⁵² laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lumpp, Hannover am 12.03.2010

9.13 **Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch die Schadgrassilagen 07, 08, 10, 11, 12 und 13 (Flussdiagramme)**

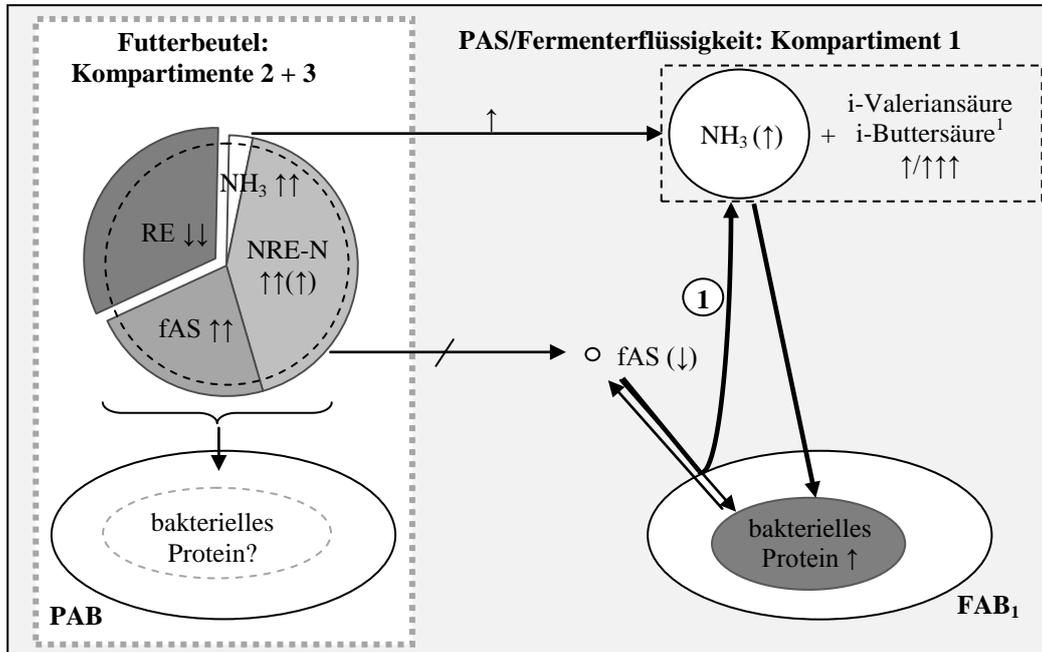


Abb. 9.7: *Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch S10 (Gruppe 1).
Legende s. Abb. 5.10*

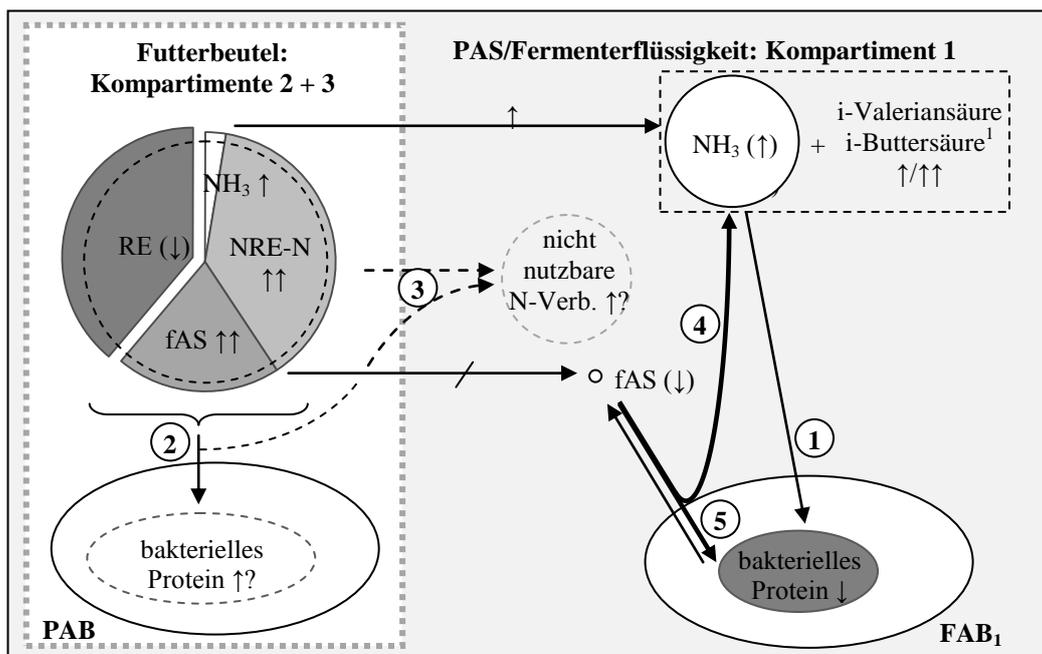


Abb. 9.8: *Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch S11 (Gruppe 2).
Legende s. Abb. 5.10*

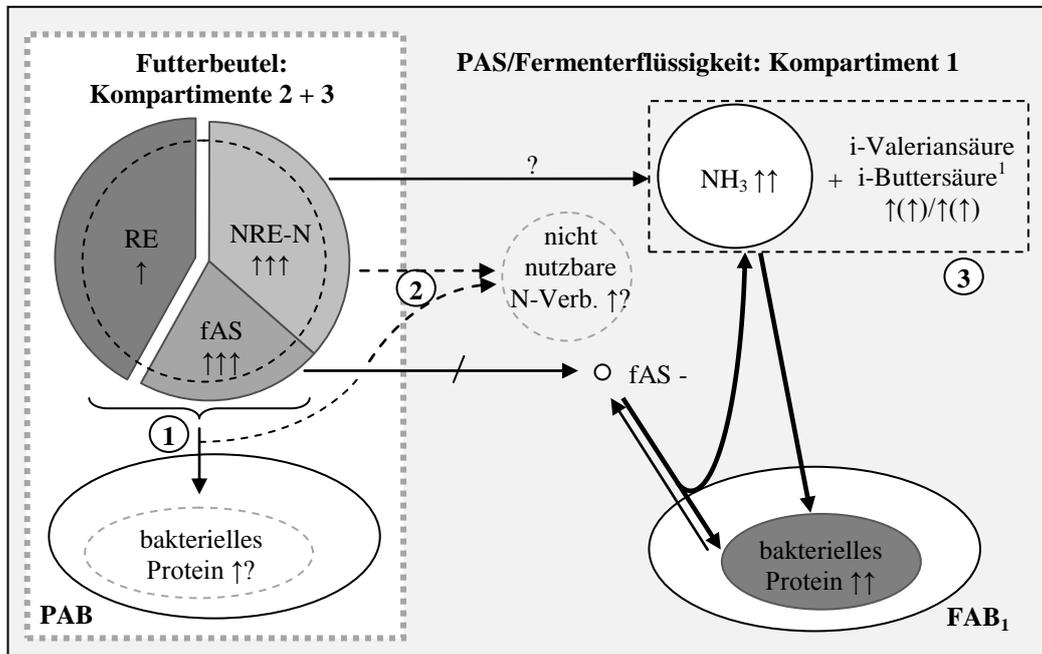


Abb. 9.9: Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch S05 (Gruppe 3).
Legende s. Abb. 5.10

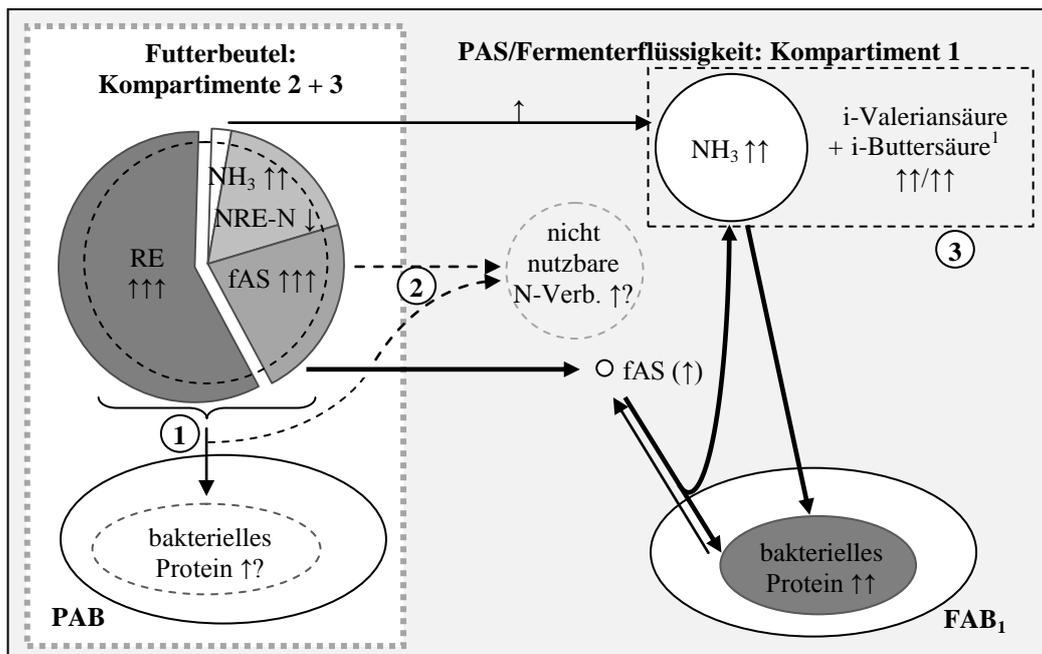


Abb. 9.10: Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch S08 (Gruppe 3).
Legende s. Abb. 5.10

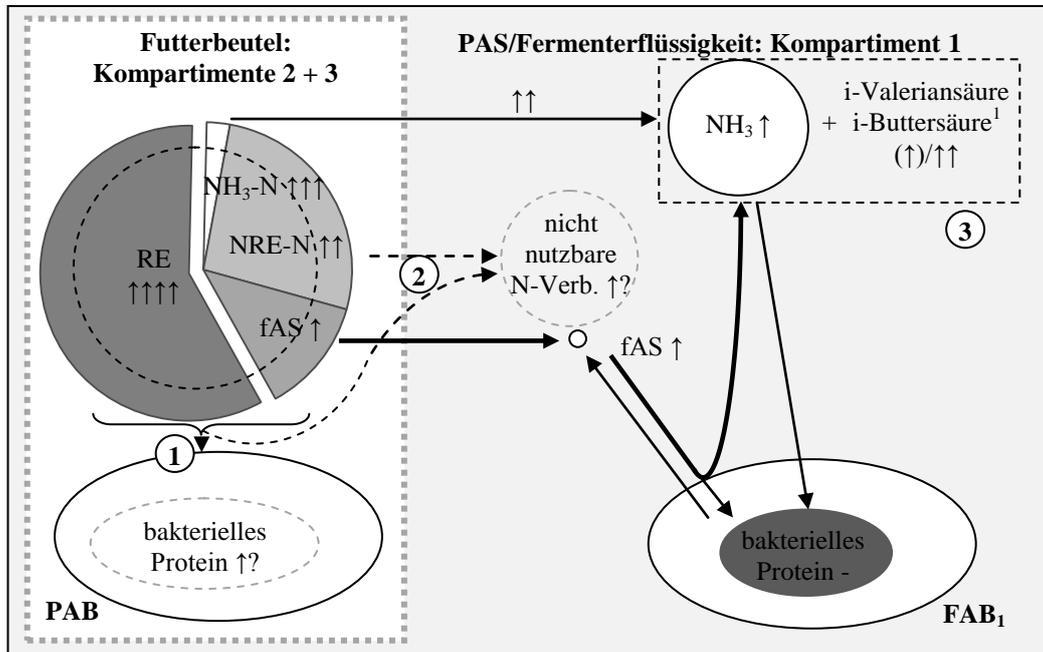


Abb. 9.11: *Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Pansensaft durch S12 (Gruppe 3).
Legende s. Abb. 5.10*

9.14 Ergänzende Kontrollgrassilagen: Auswirkungen von Zulagen der Kontrollgrassilagen auf die Parameter Ammoniakkonzentration, Gehalt bakteriellen Proteins und Konzentrationen an freien Aminosäuren und biogenen Aminen in der Fermenterflüssigkeit

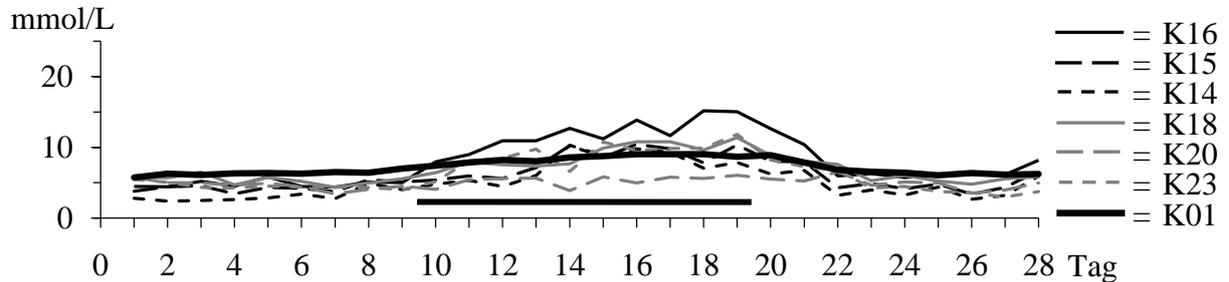


Abb. 9.12: Ammoniakkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

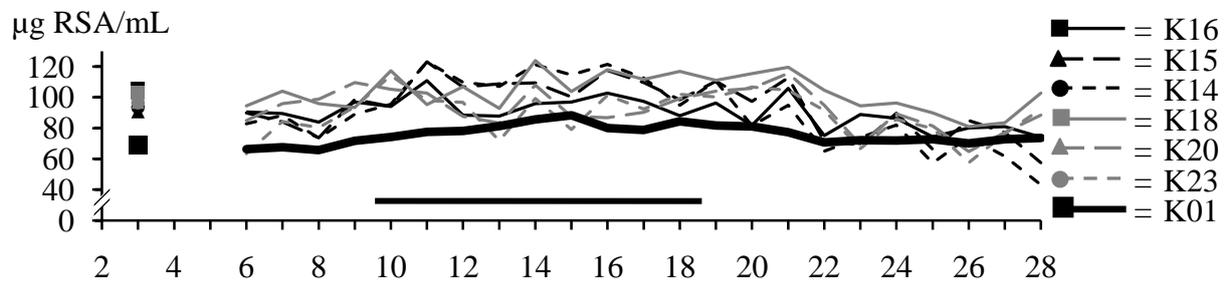


Abb. 9.13: Gehalte bakteriellen Proteins in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

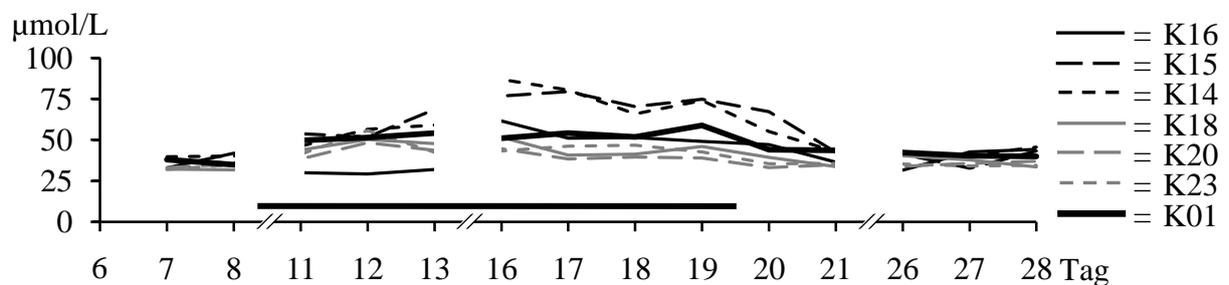


Abb. 9.14: fAS-Gesamtkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

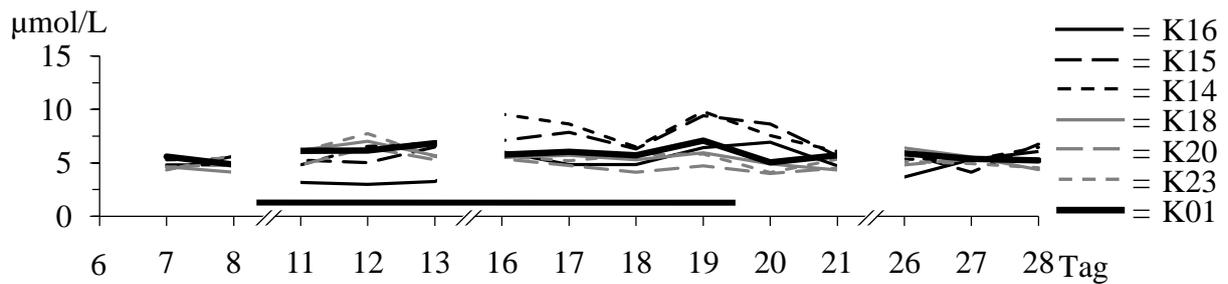


Abb. 9.15: Aspartatkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). **—** = Zulagephase

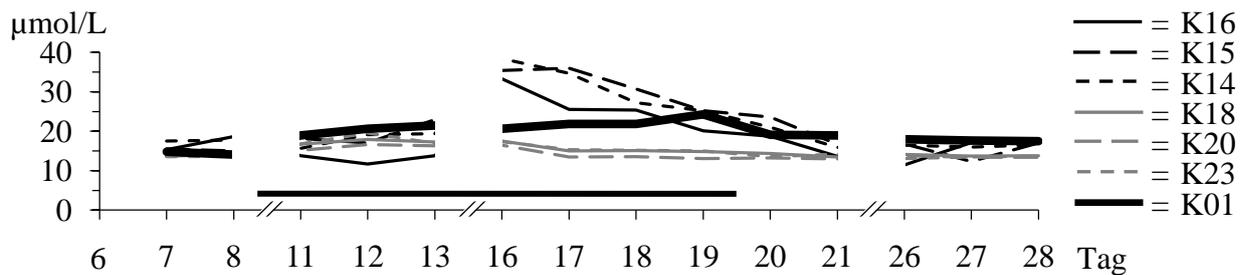


Abb. 9.16: Glutamatkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). **—** = Zulagephase

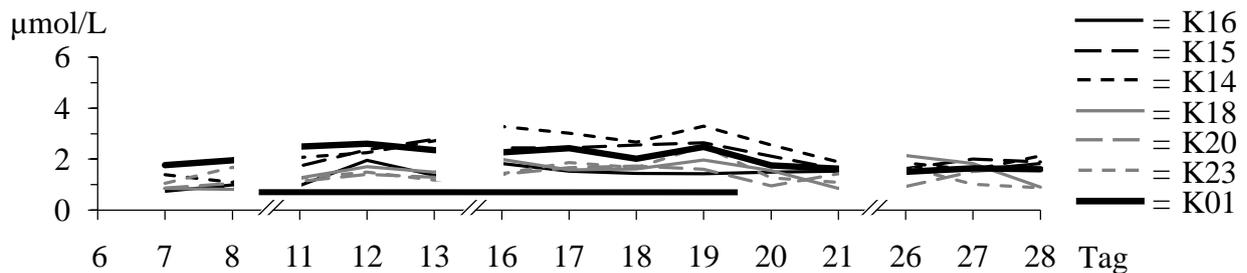


Abb. 9.17: Serinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). **—** = Zulagephase

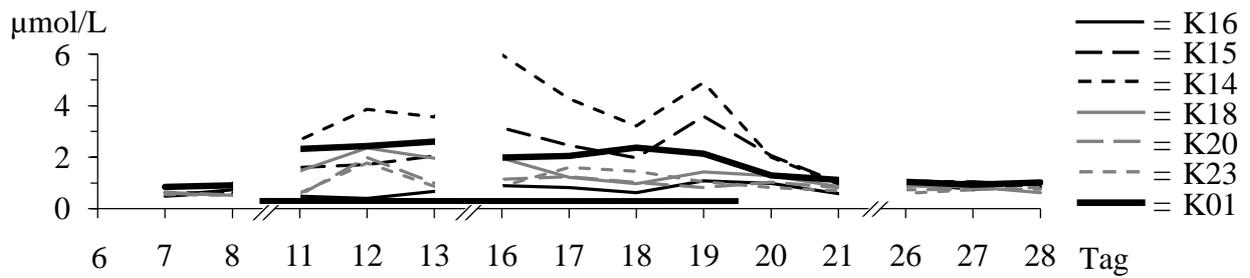


Abb. 9.18: Histidinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

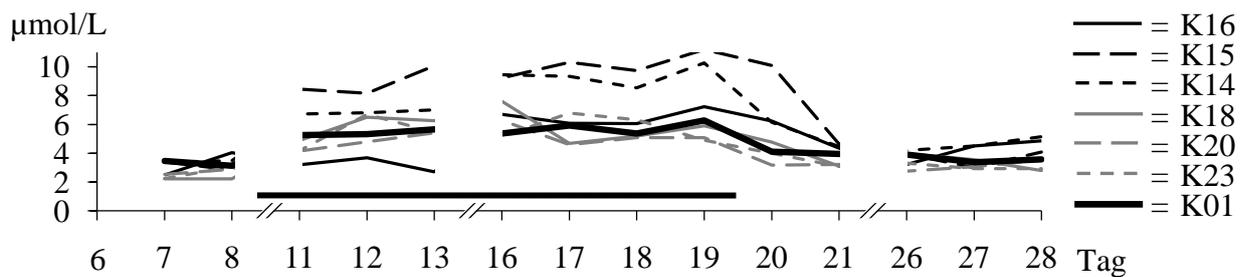


Abb. 9.19: Glycinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

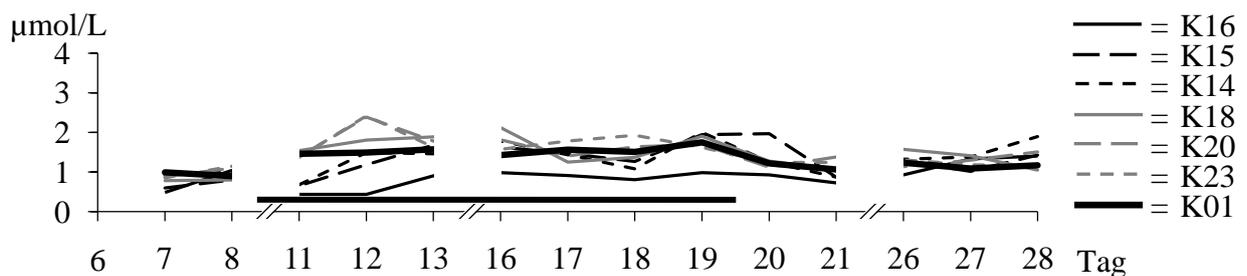


Abb. 9.20: Threoninkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

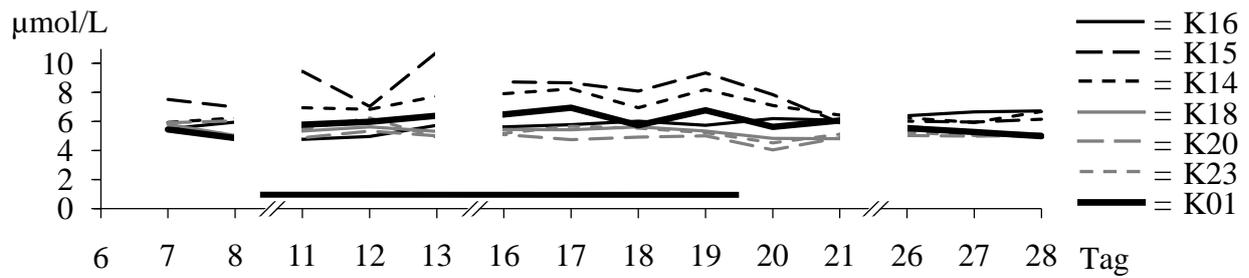


Abb. 9.21: Alaninkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

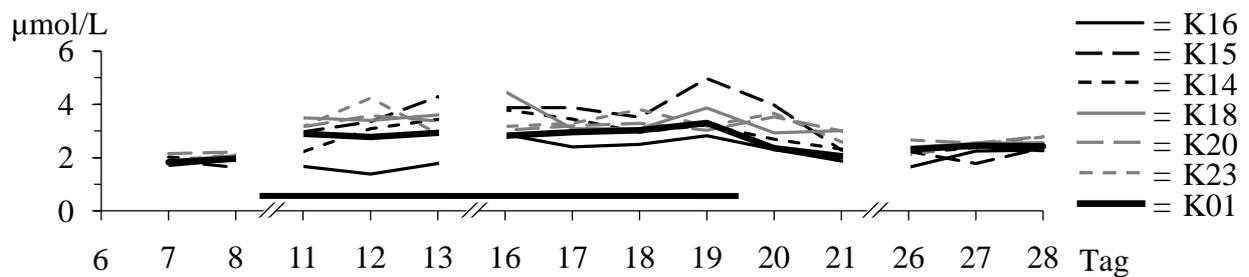


Abb. 9.22: Argininkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

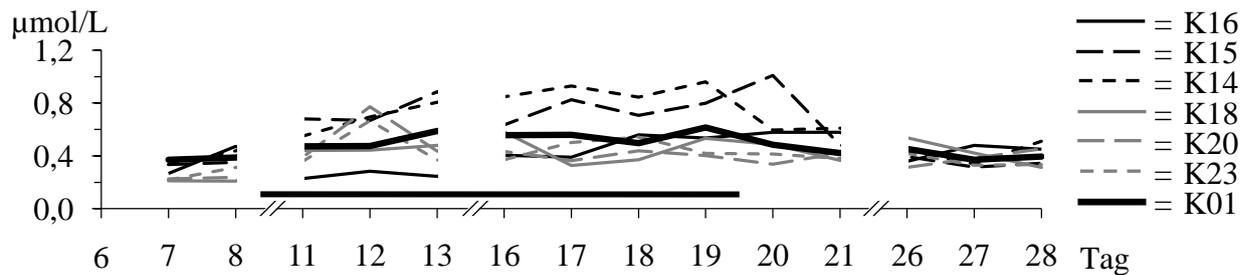


Abb. 9.23: Tyrosinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

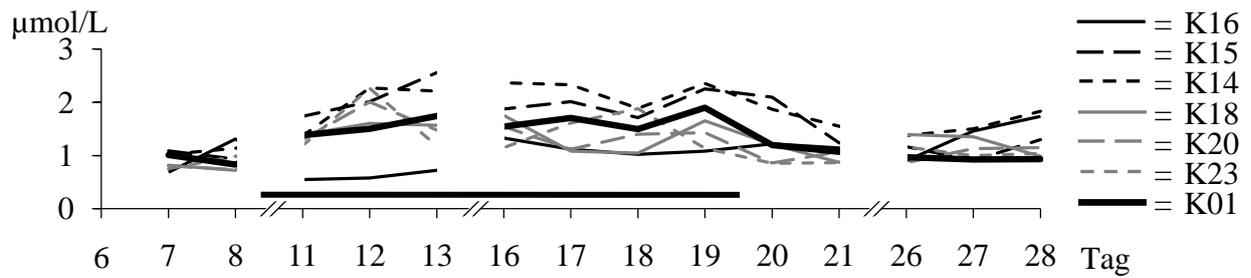


Abb. 9.24: Valinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

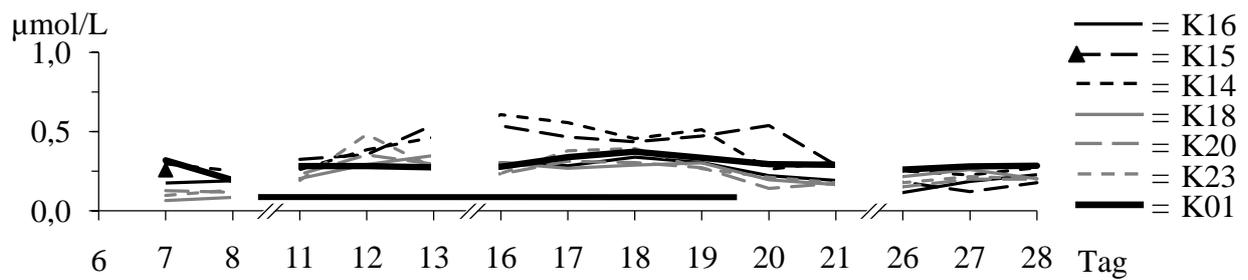


Abb. 9.25: Methioninkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

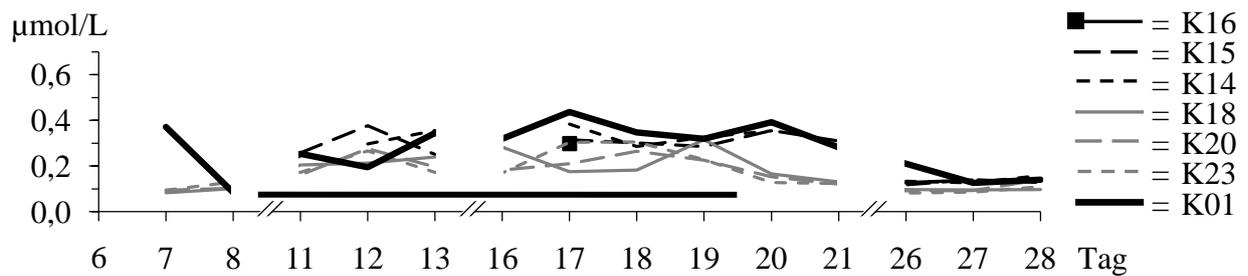


Abb. 9.26: Tryptophankonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

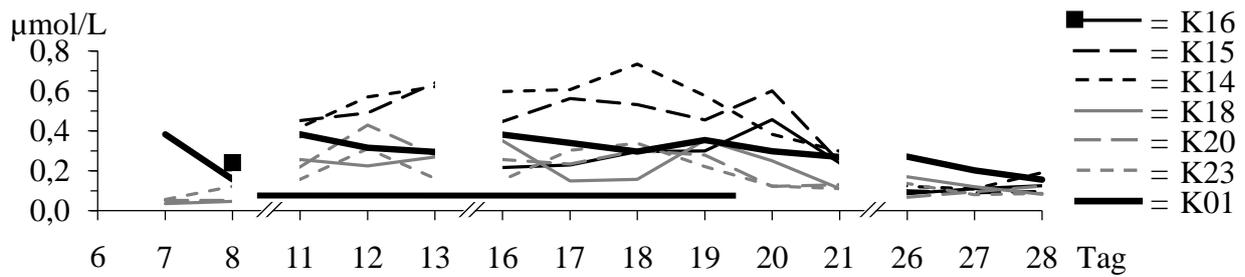


Abb. 9.27: Phenylalaninkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

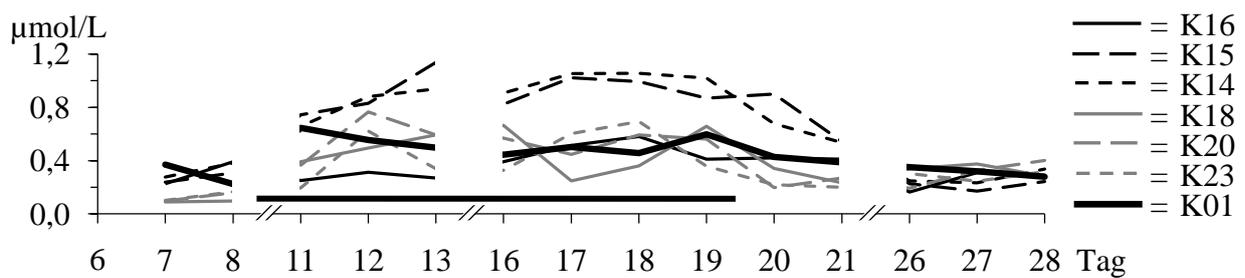


Abb. 9.28: Isoleucinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

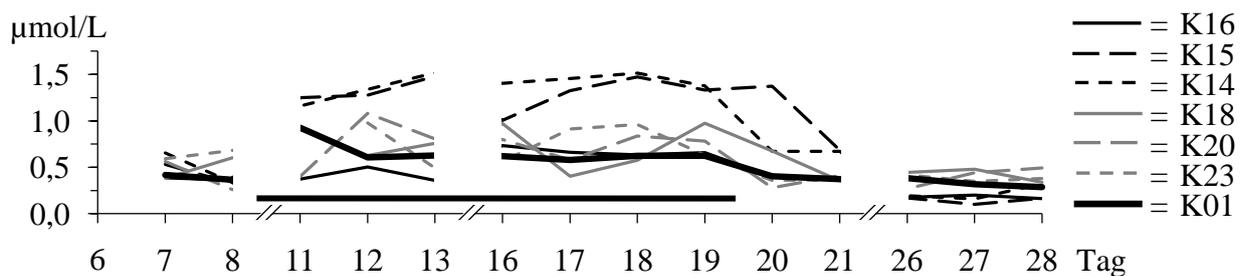


Abb. 9.29: Leucinkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

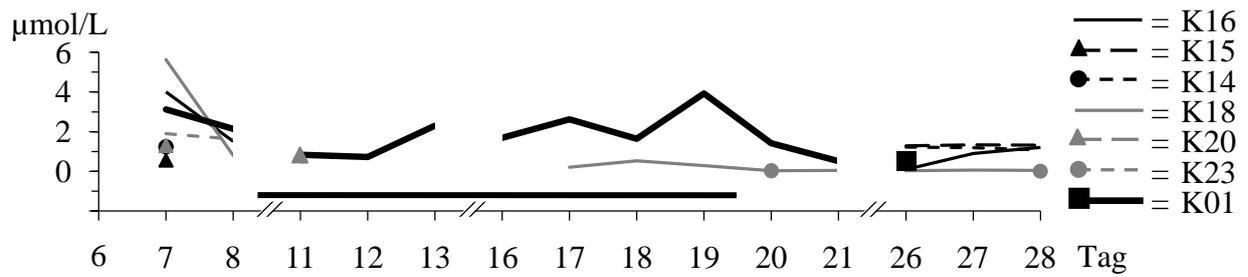


Abb. 9.30: Serotoninkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

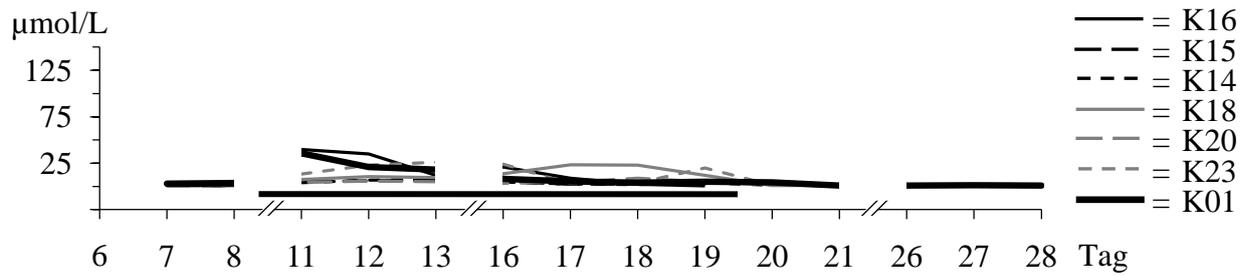


Abb. 9.31: Tyraminkonzentrationen in der Fermenterflüssigkeit unter Zulagen der ergänzenden Kontrollgrassilagen (Läufe 14 und 15; $n = 2$) und der Kontrollgrassilage K01 (Mittelwerte aus 15 RUSITEC-Läufen; $n = 15$ bzw. 12). — = Zulagephase

9.15 Täglicher Stickstoffinput in den RUSITEC und Stickstoffwiederfindung im Kompartiment 1 (Pansensaft bzw. Fermenterflüssigkeit)

Gehalte an Rohprotein in den Grassilagen und dem Kraftfutter und täglicher Input an Stickstoff während der Versuchsphase:

Tabelle 9.124 zeigt die Rohproteingehalte der in den Versuchen eingesetzten Grassilagen [g/kg TS]. Der Rohproteingehalt des Kraftfutters betrug 180 g/kg uS. Täglich wurden 10,5 g der zu testenden Grassilage (bezogen auf TS) und 3,4 g Kraftfutter (bezogen auf uS) in die RUSITEC-Fermenter verbracht. In der Folge konnte der tägliche Input an Rohprotein berechnet, und mit seiner Hilfe die täglich eingebrachte Stickstoffmenge ermittelt werden [g/Tag]. Die vierte Spalte der Tabelle 9.124 zeigt dementsprechend die Gesamtmengen an Stickstoff, die bei jeder Beladung mit einer entsprechenden Grassilage und 3,4 g Kraftfutter in die Fermenter gelangten.

Tab. 9.124: Rohproteingehalte (Rp-Gehalte) der eingesetzten Grassilagen

| Eingesetzte Grassilage | Rp [g/kg TS] | Gesamt-Rp [g/Tag] (Grassilage + Kraftfutter) | Gesamt-N aus Rp [g/Tag] |
|------------------------|--------------|---|----------------------------|
| K01 | 165 | 2,40 | 0,38 |
| K14 | 164 | 2,39 | 0,38 |
| K15 | 203 | 2,80 | 0,45 |
| K16 | 198 | 2,75 | 0,44 |
| K18 | 164 | 2,39 | 0,38 |
| K20 | 150 | 2,25 | 0,36 |
| K23 | 155 | 2,30 | 0,37 |
| S02 | 174 | 2,50 | 0,40 |
| S04 | 180 | 2,56 | 0,41 |
| S05 | 231 | 3,10 | 0,50 |
| S07 | 178 | 2,54 | 0,41 |
| S08 | 221 | 2,99 | 0,48 |
| S09 | 156 | 2,31 | 0,37 |
| S10 | 180 | 2,56 | 0,41 |
| S11 | 188 | 2,65 | 0,42 |
| S13 | 207 | 2,85 | 0,46 |
| S12 | 277 | 3,58 | 0,57 |

K Kontrollgrassilage; S Schadgrassilage

Wiederfindung von Stickstoff im bakteriellen Protein in der Fermenterflüssigkeit, freien Aminosäuren und Ammoniak:

Zur Ermittlung des Stickstoffgehalts im **bakteriellen Protein** in der Fermenterflüssigkeit wurden zunächst die mittleren Gehalte bakteriellen Proteins im Pansensaft (Kompartiment 1) während der Versuchsphase bei Beladung mit den jeweiligen Grassilagen bestimmt [$\mu\text{g RSA/mL}$]. Anschließend wurde die erhaltene Konzentration genutzt, um den

Gesamtgehalt an bakteriellem Protein in den entsprechenden Fermentern mit einem Flüssigkeitsvolumen von 800 mL zu berechnen [mg RSA/Fermenter]. Im letzten Schritt wurde ermittelt, wie groß die Stickstoffmenge im Gesamtgehalt an bakteriellem Protein in jedem Fermenter war [s. Tabelle 9.125, (g N aus RSA)]⁵².

Aus der gemessenen Gesamtkonzentration an freien Aminosäuren im Kompartiment 1 wurde die Gesamtmenge an Stickstoff in **freien Aminosäuren** in den RUSITEC-Fermentern berechnet (s. Tab. 9.125). Bei der Umrechnung von $\mu\text{mol N/L}$ in g N/Fermenter wurde angenommen, dass die Aminosäuren lediglich ein N-Atom/AS-Molekül enthalten. Tatsächlich sind in einem Argininmolekül aber drei, und in einem Tryptophan- bzw. Histidinmolekül jeweils zwei N-Atome enthalten. Da diese Aminosäuren aber im Vergleich mit den übrigen erfassten Aminosäuren (v.a. Aspartat und Glutamat) nur in geringen Konzentrationen zu messen waren, konnte durch die Vereinfachung lediglich ein geringfügiger Rechenfehler entstehen.

Aus den Ammoniakkonzentrationen in den Fermentern wurden die Gesamtgehalte an in Form von **Ammoniak** vorliegendem Stickstoff bestimmt (s. Tab. 9.125).

Tab. 9.125: *Gehalte an bakteriellem Protein sowie Konzentrationen von freien Aminosäuren (fAS) und Ammoniak im Pansensaft sowie berechnete Gesamtstickstoffgehalte im bakteriellen Protein, fAS und Ammoniak in der RUSITEC-Fermenterflüssigkeit bei Beladung mit den Kontrollsilagen 01, 14, 15, 16, 18, 20 und 23 sowie den Schadsilagen 02, 04, 05, 07 08, 09, 10, 11, 13 und 12*

| Eingesetzte Silage | Bakterielles Protein | | Freie Aminosäuren | | Ammoniak | |
|--------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| | $\mu\text{g RSA/mL}$ | Gesamtgehalt an N [g/Fermenter] | fAS-N [$\mu\text{mol/L}$] | fAS-N [g/Fermenter] | $\text{NH}_3\text{-N}$ [mmol/L] | $\text{NH}_3\text{-N}$ [g/Fermenter] |
| K01 | 87,1 | 0,01115 | 51,8 | 0,0058 | 8,49 | 0,10 |
| K14 | 108 | 0,01382 | 65,5 | 0,0073 | 7,70 | 0,09 |
| K15 | 107 | 0,01370 | 67,8 | 0,0076 | 8,12 | 0,09 |
| K16 | 94,6 | 0,01211 | 43,9 | 0,0049 | 11,9 | 0,13 |
| K18 | 110 | 0,01408 | 45,1 | 0,0051 | 8,94 | 0,10 |
| K20 | 96,4 | 0,01234 | 40,6 | 0,0045 | 5,31 | 0,06 |
| K23 | 96,5 | 0,01235 | 44,2 | 0,0050 | 8,93 | 0,10 |
| S02 | 69,2 | 0,00886 | 45,6 | 0,0051 | 13,3 | 0,15 |
| S04 | 89,8 | 0,01149 | 67,5 | 0,0076 | 18,9 | 0,21 |
| S05 | 83,9 | 0,01074 | 58,8 | 0,0066 | 12,1 | 0,14 |
| S07 | 79,4 | 0,01016 | 65,2 | 0,0073 | 9,06 | 0,10 |
| S08 | 86,1 | 0,01102 | 56,3 | 0,0063 | 11,8 | 0,13 |
| S09 | 90,5 | 0,01158 | 52,3 | 0,0059 | 12,9 | 0,14 |
| S10 | 97,0 | 0,01242 | 42,7 | 0,0048 | 9,07 | 0,10 |
| S11 | 86,6 | 0,01108 | 40,5 | 0,0045 | 9,08 | 0,10 |
| S13 | 91,8 | 0,01175 | 51,8 | 0,0058 | 9,23 | 0,10 |
| S12 | 112 | 0,01427 | 65,7 | 0,0074 | 11,0 | 0,12 |

K Kontrollgrassilage; S Schadsilage

⁵² Rinderserumalbumin hat einen Stickstoffgehalt von 16 %.

Ermittlung der Stickstoffwiederfindungsraten ohne Berücksichtigung des Stickstoffgehalts in der Überstandsflüssigkeit des RUSITEC:

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate an Stickstoff wurden die Mengen an Stickstoff, die in Form von bakteriellem Protein, freien Aminosäuren und Ammoniak im Kompartiment 1 erfasst worden waren, summiert (s. Tab. 9.125 und 9.126) und mit der täglichen Einwaage verglichen. Die Wiederfindungsrate wurde aus der Wiederfindung an Stickstoff und der täglichen Einwaage berechnet (s. Tab. 9.126, Spalte 5, unterlegt)

Tab. 9.126: Stickstoffwiederfindung und Ermittlung der Wiederfindungsrate ohne Berücksichtigung des Stickstoffgehalts in der Überstandsflüssigkeit des RUSITEC bei Beladung mit den Kontrollsilagen 01, 14, 15, 16, 18, 20 und 23 sowie den Schadsilagen 02, 04, 05, 07 08, 09, 10, 11, 13 und 12

| Eingesetzte Grassilage | N-Wiederfindung [g] | Tägliche Einwaage an N [g/Tag] | Differenz zur täglichen Einwaage [g] | Wiederfindungsrate [%] |
|------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| K01 | 0,11 | 0,38 | 0,28 | 28,0 |
| K14 | 0,11 | 0,38 | 0,28 | 28,0 |
| K15 | 0,11 | 0,45 | 0,34 | 25,0 |
| K16 | 0,15 | 0,44 | 0,29 | 34,1 |
| K18 | 0,12 | 0,38 | 0,26 | 31,1 |
| K20 | 0,08 | 0,36 | 0,28 | 21,2 |
| K23 | 0,12 | 0,37 | 0,25 | 31,9 |
| S02 | 0,16 | 0,40 | 0,24 | 39,9 |
| S04 | 0,23 | 0,41 | 0,18 | 55,2 |
| S05 | 0,15 | 0,50 | 0,35 | 30,0 |
| S07 | 0,12 | 0,41 | 0,29 | 28,3 |
| S08 | 0,15 | 0,48 | 0,33 | 30,4 |
| S09 | 0,16 | 0,37 | 0,21 | 42,6 |
| S10 | 0,12 | 0,41 | 0,30 | 27,8 |
| S11 | 0,12 | 0,42 | 0,31 | 26,7 |
| S13 | 0,12 | 0,46 | 0,34 | 25,6 |
| S12 | 0,14 | 0,57 | 0,43 | 24,3 |

Stickstoffwiederfindung mit Berücksichtigung eines Näherungswertes für den Stickstoffgehalt in der Überstandsflüssigkeit des RUSITEC:

Da es sich bei dem RUSITEC-System um ein Durchflusssystem handelt, bei dem kontinuierlich Flüssigkeit aus den Fermentern in einen Überlauf entweicht, sollte der Gehalt an Stickstoff im Überstand bei der Berechnung seiner Wiederfindung ebenfalls berücksichtigt werden. Da der Gesamtgehalt an Stickstoff im Überlauf nicht bestimmt wurde, wird näherungsweise angenommen, die Flüssigkeit im Überlauf habe den gleichen Gehalt an Stickstoff wie die Fermenterflüssigkeit gehabt. Aus dieser Annahme ergeben sich bei Einsatz der einzelnen Grassilagen die in Tabelle 9.127 aufgelisteten Mengen an Stickstoff im Überstand (s. Tab. 9.127). Unter Berücksichtigung dieser Stickstoffmengen werden erwar-

tungsgemäß geringgradig höhere Werte für die Stickstoffwiederfindung und die Wiederfindungsraten erzielt:

Tab. 9.127: Menge an Stickstoff im Überstand bei Beladung mit den Kontrollsilagen 01, 14, 15, 16, 18, 20 und 23 sowie den Schadsilagen 02, 04, 05, 07 08, 09, 10, 11, 13 und 12 sowie N-Wiederfindung und N-Wiederfindungsrate unter Berücksichtigung des Stickstoffgehalts in der Überstandsflüssigkeit des RUSITEC bei Beladung mit den Kontrollsilagen 01, 14, 15, 16, 18, 20 und 23 sowie den Schadsilagen 02, 04, 05, 07 08, 09, 10, 11, 13 und 12

| Eingesetzte Grassilage | Mittleres Volumen des Überstandes [mL] ⁵³ | N-Gehalt im RUSITEC-Überstand [g] | N-Wiederfindung [g] | Tägliche Einwaage an N [g/Tag] | Differenz zur täglichen Einwaage [g] | Wiederfindungsrate [%] |
|------------------------|--|-----------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| K01 | 416 | 0,06 | 0,17 | 0,38 | 0,21 | 44,3 |
| K14 | 409 | 0,05 | 0,16 | 0,38 | 0,22 | 42,4 |
| K15 | 415 | 0,06 | 0,17 | 0,45 | 0,28 | 38,0 |
| K16 | 418 | 0,08 | 0,23 | 0,44 | 0,21 | 52,0 |
| K18 | 389 | 0,06 | 0,18 | 0,38 | 0,21 | 46,3 |
| K20 | 390 | 0,04 | 0,11 | 0,36 | 0,25 | 31,6 |
| K23 | 391 | 0,06 | 0,17 | 0,37 | 0,19 | 47,5 |
| S02 | 418 | 0,09 | 0,25 | 0,40 | 0,15 | 62,0 |
| S04 | 403 | 0,12 | 0,35 | 0,41 | 0,06 | 84,6 |
| S05 | 417 | 0,08 | 0,23 | 0,50 | 0,26 | 46,9 |
| S07 | 402 | 0,06 | 0,18 | 0,41 | 0,23 | 44,0 |
| S08 | 434 | 0,08 | 0,23 | 0,48 | 0,25 | 48,2 |
| S09 | 426 | 0,09 | 0,25 | 0,37 | 0,12 | 67,1 |
| S10 | 413 | 0,06 | 0,18 | 0,41 | 0,23 | 43,9 |
| S11 | 415 | 0,06 | 0,18 | 0,42 | 0,25 | 42,1 |
| S13 | 408 | 0,06 | 0,18 | 0,46 | 0,27 | 40,1 |
| S12 | 393 | 0,07 | 0,22 | 0,57 | 0,36 | 37,7 |

Bewertung der N-Wiederfindungsraten:

Die Stickstoffwiederfindungsraten liegen, auch unter Berücksichtigung des im Überlauf befindlichen Stickstoffs bei maximal 84,6 % (S04). Die verbleibende Menge an eingebrachtem Stickstoff muss folglich

- in Form nicht abgebauten Futterproteins in den Futterbeuteln (1)
- als mikrobiell gebundener Stickstoff in den Kompartimenten 2 und 3 (2)
- oder den Protozoen (3)

vorliegen.

⁵³ laut persönlicher Mitteilung von Frau L. Lumpp, Hannover am 12.03.2010

Messungen des Rohproteingehalts [g/kg TS] in den Futterrückständen erfolgten in gepoolten Proben für die Silagen K01, S02, S04, S10 und S11 im Institut für Tierernährung. Aussagen über den Gesamtgehalt an Stickstoff in den Futterrückständen lassen sich jedoch nicht treffen (Angaben in g/kg TS). Sehr hohe Reineiweißanteile am Rohprotein in den Futterrückständen lassen aber vermuten, dass es sich größtenteils um mikrobielles Eiweiß aus Bakterien handelte, die das Futter besiedelt hatten. Da die partikelassoziierten Mikroorganismen der Kompartimente 2 und 3 aber nicht erfasst wurden, ist keine Aussage möglich, welche Menge an Stickstoff in von ihnen gebildeten Stickstoffverbindungen verblieb.

Ein kleiner Anteil des eingebrachten Stickstoffs ist vermutlich auch in messtechnisch nicht erfassbaren Aminosäuren des Kompartiments 1 verblieben. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Stickstoff in Form von Peptiden (keine Erfassung möglich) bzw. bislang nicht identifizierten Stickstoffverbindungen vorlag (s. auch Hinweise auf den Seiten 177, 185, 186, 187 und 192).

Die relativ hohen Wiederfindungsraten für Stickstoff im Kompartiment 1 bei Beladung der RUSITEC-Fermenter mit S04 stehen in Einklang mit der Annahme, dass es zur Abnahme des Proteins der partikelassoziierten Bakterien kam (s. auch Seite 188). Bei Beladung mit S09 zeigt sich ebenfalls eine relative hohe Stickstoffwiederfindungsrate in der Fermenterflüssigkeit (s. Tab. 9.126 und 9.127), auf mögliche Lysis und somit einen Populationsrückgang der partikelassoziierten Bakterien wurde bereits verwiesen (s. Seite 190).

Bei den Silagen S05, S08, S12 und S13, deren Einsatz eher niedrige Stickstoffwiederfindungsraten in der Fermenterflüssigkeit bedingte, wurde auf eine mögliche Bindung von Stickstoff durch partikelassoziierte Bakterien in den Kompartimenten 2 und 3 hingewiesen (s. auch Seite 186).

Schlussfolgerung:

Anhand der erhobenen Parameter kann die Wiederfindung des eingebrachten Stickstoffs nur lückenhaft nachvollzogen werden.

In Versuchen, die sich neben qualitativen Einflüssen auf die Parameter Ammoniakkonzentration, Konzentrationen freier Aminosäuren und Gehalt bakteriellen Proteins im Kompartiment 1 auch mit quantitativen Veränderungen des Eiweißstoffwechsels im Pansensaft beschäftigen, sollten auch die folgenden Parameter erhoben werden (s. auch Seiten 176 und 177, Verbleib des eingebrachten Stickstoffes):

- Bestimmung des Stickstoffgehalts im Überstand
- Bestimmung des Gehalts an bakteriellen Protein in den Kompartimenten 2 und 3 (partikelassoziierte Bakterien)
- Bestimmung des nicht abgebauten Stickstoffs in den Futterrückständen, bzw. gemeinsame Bestimmung mit dem Gehalt an bakteriellem Protein in den Kompartimenten 2 und 3
- Zur sicheren Erfassung aller Stickstoffverbindungen im Kompartiment 1: Bestimmung des Gesamtgehalts an Stickstoff in der Fermenterflüssigkeit (zur Bestätigung bzw. dem Ausschluss der Akkumulation nicht nutzbarer bzw. nicht erfasster Stickstoffverbindungen)

Entscheidend für eine umfassende quantitative Untersuchung des Stickstoffverbleibs ist somit die Untersuchung der Stickstoffverbindungen in den Kompartimenten 2 und 3. In den im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen lag der Focus zunächst auf dem ruminalen Kompartiment 1 (Pansensaft bzw. Fermenterflüssigkeit).

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und wissenschaftliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit danke ich herzlich Herrn Univ.-Prof. Dr. H. Bollwein.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Höltershinken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und zu jeder Tages- und Nachtzeit erreichbar war, bedanken.

Herrn Geerlings sei gedankt für die intensive und geduldige Betreuung bei der Auswertung der statistischen Berechnungen.

Vielen Dank an Evelin Cyrol und Kathrin Koslowski für die technische Unterstützung bei der Durchführung der HPLC-Analysen.

Herrn Dr. Heimbeck und den Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover sei für die Erstellung der Futtermittelanalysen gedankt.

Der Niedersächsischen Tierseuchenkasse vielen Dank für die Gewährung eines Stipendiums.

Meinen Kolleginnen Dr. Anne Gast, Annika Irle, Lisbeth Lumpp, Sarah Theermann und Anika Wichern danke ich für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Lutz, der tapfer durchgehalten und alle kleinen und großen Katastrophen mit ertragen hat.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders für ihre Unterstützung und Aufmunterung in jeder Lebenslage bedanken.

Vielen herzlichen Dank an Tina für ihre Hilfe.

Schließlich danke ich meinen Freunden für unsere schöne gemeinsame Zeit in Hannover.