13. BOKU-SYMPOSIUM TIERERNÄHRUNG

TAGUNGSBAND

Wertvolle Pflanzenstoffe
für die Tierernährung:
Perspektiven und Entwicklungen

29. April 2014 in Wien

TIERERNÄHRUNG
TIERISCHE LEBENSMITTEL
ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGIE

Tagungsband

13. BOKU-Symposium TIERERNÄHRUNG

Wertvolle Pflanzenstoffe für die Tierernährung: Perspektiven und Entwicklungen

29. April 2014, Wien

Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie

Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie

BOKU – University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna

Universität für Bodenkultur Wien

Tagungsband:
13. BOKU-Symposium TIERERNÄHRUNG

Wertvolle Pflanzenstoffe für die Tierernährung: Perspektiven und Entwicklungen
29. April 2014, Wien

Herausgeber:
Christiane Schwarz, Margit Kraft, Martin Gierus

Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie
Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie
Universität für Bodenkultur Wien
Muthgasse 11, A-1190 Wien

www.boku.ac.at/tte-Symposium
tte@boku.ac.at

Eigenverlag:
Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie

ISBN 978-3-900932-16-9

Für den Inhalt der Beiträge sind allein die Autoren verantwortlich.

Inhaltsverzeichnis

Übersichtsvorträge / Keynote speakers

Potentiale zur Steigerung der Stickstoffnutzungseffizienz beim Wiederkäuer – Beitrag sekundärer Pflanzenstoffe
M Gierus 1

Zur Bedeutung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe für die Ernährung von Wiederkäuern
F Leiber 6

Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin nach oraler Applikation
S Wolffram 12

Perspectives of plant breeding to improve the feeding value of vegetable feedstuffs
W Friedt 18

Diet transfer from the base of aquatic food webs to fish – applications for future freshwater aquaculture
MJ Kainz, S Schultz, DS Murray, DR Tocher, HH Hager 24

Herausforderung in der Geflügelfütterung: Aktuelle Erkenntnisse zur Verdaulichkeit von Stärke und Aminosäuren
H Kluth, T Bormann 26

Wenn nicht Übersee-Soja, was dann? Zwischenbilanz und Ausblick der Eiweißstrategie
H Lindermayer 32

Fütterung – Monogastriden / Feeding – monogastrics

Rapsextraktionsschrot, Donau Soja und Ackerbohnen in der Ferkelfütterung, Auswirkungen auf Futteraufnahme und Leistung
W Preißinger, H Lindermayer, G Propstmeier 40

Einsatz von Sojaextraktionsschroten aus Donau Soja und Überseeware beim Ferkel
W Preißinger, H Lindermayer, G Propstmeier 44

The effect of natural feed additive containing an essential oil on growth, mortality and gut flora of piglets
A Jerešiūnas, O Jerešiūnienė, I Sviliuvienė, D Tamašauskienė 48

Das Potenzial von *Agrimonia procera* als phytogener Zusatzstoff in der Ferkelaufzucht
T Gräber, G Horn, C Brandsch, H Kluge, GI Stangl 54

Impact of various probiotic products (*Bacillus spp.*) on growth performance and health of weaning piglets
D Kampf, T Elsen, L Martens, J De Sutter, N Nakamura, D Fremaut 60

The effect of supplemental protease on digestibility of nitrogen and amino acids in piglets
S Nitrayová, M Brestenský, J Heger, P Patráš 65

Step by step improvement of performance of weaned piglets with an intimate combination of a high intensity sweetener and phytonutrients
AL Wagner, C Oguey, C Bruneau, D Bravo, B Viel 72

Comparison between a cost-optimized feed-calculation for fattening pigs based on ME as well as NE at reduced protein content on the performance of pigs
A Winkler, G Dusel, J Bartelt, E Corrent 76

Effect of low protein cereal grains-based diets on growth performance and carcass quality of starter/ grower- finisher pigs
G Dusel, J Trautwein, JK Htoo 80

Effect of dietary fat sources on reproduction parameters in gilts
E Václavková, M Rozkot, J Bělková, A Lustyková 85

Supplemental valine for sows nursing large litters
H Kluge, J Bartelt, E Corrent, GI Stangl 88

Feeding live *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (SB) to sows increases immunoglobulin content in colostrum and milk
D Guillou, E Chevaux, D Rosener, Y Le Treut, J Le Dividich 92

Phytogenic feed additives improve digestibility and growth performance in broilers
T Steiner, K Männer, J Zentek 96

Einfluss des natürlichen Betains als potenzielle Glycin-Quelle auf die Broiler-Leistung
S Peganova, M Bedford, B Schröder 102

Synergistic effects of citrus extract on performance of young animals
O Clech, A Lepont, S Lé, U Steinruck 108

Synergistic effects of *Melissa officinalis* and magnesium to reduce stress for animal welfare and good performance
A Lepont, A Lamballais, C Pommelet, M Tocha 116

Wirkung von *Papaveraceae*-Präparaten bei wachsenden monogastrischen Nutztieren
K Kozłowski, H Jeroch 121

Genetically modified feeds (maize MON 89034 x NK 603) in rabbit nutrition
Ľ Chrastinová, M Chrenková, A Lauková, M Polačiková, Z Formelová, Ľ Ondruška, J Rafay, I Plachá, V Strompfová, J Imrichová, A Kandričáková, K Čobanová, S Pomikalová 125

Rohfaserkonzentrate (Lignocellulose) in der Karpfenfütterung
A Bosse 130

Fütterung – Wiederkäuer / Feeding – ruminants

Untersuchungen zum Einsatz einer Trocken-TMR in der Aufzucht männlicher Fresserkälber
T Ettle, A Obermaier 134

Evaluation of the effect of a plant alkaloid product in newborn German Holstein calves
M Wirth, J Schmitt, B Fischer 140

Effects of phytogenic feed additives on the growth performance and health of beef calves under commercial conditions
C Schieder, M Friedrichkeit, T Steiner 146

Evaluation of transgenic Bt maize in fattening bulls
S Pomikalová, M Chrenková, Ľ Chrastinová, M Polačiková, Z Formelová, M Rajský 151

Influence of growth stage of grasses and clover on dry matter intake of silages in heifers
O Látal, J Pozdíšek, M Štýbnarová 156

Parameter der ruminalen Fermentation pansenfistulierter Rinder bei Wechsel von energie- und rohfaserreicher Fütterung
C Fahn, D Hörndl, W Windisch 162

A protected blend of phytonutrients is a natural alternative to monensin in beef feedlot diets
C Oguey, FM Hagg, LJ Erasmus, RH van der Veen, E Haasbroek, B Viel 168

Untersuchungen zum Einsatz von Esparsettesilage in der Milchviehfütterung
T Ettle, J Ostertag, A Obermaier 171

Influence of dietary cation-anion balance on pH of rumen fluid in lactating dairy cattle
E Mrázková, E Mrkvicová, L Zeman, Z Jakubcová, M Fröhdeová 175

Effect of selenium supplementation in the diet of cows and heifers at the drought on the content of Ig G in serum
M Fröhdeová, E Mrázková, P Doležal 179

Effect of a patented combination of plant extracts on milk productivity and milk persistency of dairy cows
C Gerard, ML Le Ray, C Quelennec, D Marzin 183

Improving performance of high-yielding cows with live yeast during early lactation
ND Walker, S Peganova, B Keimer 188

Reducing the incidence of Sub-Acute Ruminal Acidosis (SARA) by use of live yeast
ND Walker, S Peganova, B Keimer 194

Untersuchungen zum Einfluss der Brunst auf die Futteraufnahme von Milchkühen
K Halli, C Koch, F-J Romberg, S Hoy 199

Ausnutzung der Abfallbiomasse aus Bäumen in der granulierten Futtermischung für Rotwild
M Vodnansky, M Rajský, M Chrenková, Z Formelová, Z Mlyneková 204

Futtermittelbewertung / Feed evaluation

Der Gehalt an resistenter Stärke verschiedener Gerstensorten und seine Beeinflussung durch organische Säuren und Pullulanase
H Harder, A Khol-Parisini, J Werner, L Schmidt, P Weinmann, Q Zebeli 208

The nutritional analysis of different wheat genotypes grown in Lithuania
V Kliseviciute, R Gruzauskas, A Raceviciute-Stupeliene, S Bliznikas, C Relandeau 212

Effect of fermented and extruded wheat bran on *in-vitro* enzymatic digestibility of dry mass in pigs
M Kraler, K Schedle, KJ Domig, D Heine, H Michlmayr, W Kneifel 219

Nitrogen fractions and RUP according to CNCPS in selected feedstuffs
M Chrenková, Z Čerešňáková, Z Formelová, MR Weisbjerg 222

Stabilität von Flavonoiden in Traubentrestern
M Würzbach, M Korzekwa, E Holl, B Eckel 226

Differences between grape extract, grape pomace and grape seeds
N Tessier, R Pallissé, P Engler, S Chamorro, A Brenes Payá, F Daubner 232

In vitro Studie zur Eignung von getrockneten Mangoschalen (*Mangifera indica* L.) als Futtermittelzusatzstoff
L Brucker, CH Geerkens, R Carle, J Zentek 235

Kultivierung von *Agrimonia procera* als Gerbstoffdroge
G Horn, A Kupfer, T Gräber, H Kluge 240

Cotyledons of fenugreek in comparison to "normal" fenugreek seeds and improved feed intake in ruminants
T Tredan, A Budan, F Daubner, R Pallissé 246

Positive effects of a new phytogenic additive on challenged broiler chicks
M Korzekwa, M Lohölter, M Würzbach 249

Plant-derived antimycotics in silage
T Höger, K Schöndorfer, R Labuda, J Zwielehner, S Pasteiner, G Schatzmayr 253

The use of fermentation to improve the digestibility and safety of lupine and soybean
E Bartkiene, V Krungleviciute, G Juodeikiene, D Vidmantiene, Z Maknickiene, P Matusevicius 257

Silage fermentation quality in whole plant maize inoculated with a novel formulation of a biological inoculant with the recently EU-authorized *Lactobacillus kefiri*
J Zwielehner, J Jatkauskas, V Vrotnikiene 259

Influence of *Ustilago Maydis* on the nutritive and hygienic value and fermentation characteristics of maize silage
P Doležal, L Kalhotka, M Fröhdeová, L Zeman, K Szwedziak, M Tukiendorf 264

Darmgesundheit / Gut health

Einfluss des Zusatzes von Braunalgen (*Laminaria saccharina*) zum Ferkelfutter auf die intestinale Genexpression wichtiger Faktoren der Proliferation und Immunantwort
C Becker, J Zhao, W Windisch 268

Einfluss eubiotischer Lignocellulose auf die Durchfallhäufigkeit und Produktion flüchtiger Fettsäuren im Colon von Absetzferkeln
A Kroismayr, A van Enckevort, L Baarslag, K Neufeld 274

Effects of a phytogenic feed additive on growth performance, nutrient digestibility, caecal microflora composition and intestinal histomorphology of broilers
S Haldar, B Syed, T Steiner 277

Effect of chamomille extract on gut microflora in broiler chickens
Z Jakubcová, L Kalhotka, L Dostalova, L Detvanová, O Šťastník, E Mrkvicová, E Mrázková, L Zeman 284

Influence of the acidifier compound on counts of fecal resistant *E. coli* and growth performance of weaning pigs
N Roth, R Breitsma, A Kovacs, R Berrios, B Doupovec, F Goelss, G Wegl, V Klose 287

Synergistic effect of acid mixtures with phytochemicals against gut pathogens
D Bachinger, C Schauerhuber, N Roth, G Schatzmayr 293

Unerwünschte Stoffe / Undesired substances

Salmonellen im Staub – Ein Hinweis für Salmonellen im Futter und Mischfutterbetrieb
EV Reiter, V Kolar, A Adler, I Kopacka 297

Maskierte Mykotoxine in fermentierten Pflanzenmaterialien: mikrobiologische, biochemische und analytische Aspekte
G Strauß, C Koch 302

Feeding low protein diets magnified the deoxynivalenol toxicity in broiler chickens
W Awad, K Ghareeb, M Hess, J Böhm 307

Deoxynivalenol in chicken feed induces lipid peroxidation and oxidiative stress of jejunal cells
K Ghareeb, WA Awad, J Böhm 309

Fumonisin und Fumonisin-Derivate bei Ratten: Einfluss auf die Darmarchitektur, Becherzellenhäufigkeit und Apoptoseneigung
C Steindl, V Nagl, I Hahn, F Berthiller, C Schwarz 312

Emissionen / Emissions

Reduction of ammonia and greenhouse gas emissions from egg production by using a phytogenic feed additive
SJ Hörtenhuber, L Jungbauer, KR Wendler, WJ Zollitsch 318

Effect of a phytogenic feed additive on performance and ammonia emissions of growing-finishing pigs
M Goerke, K Holub, KR Wendler 324

Emissionsbewertung von Fütterungsstrategien in der Schweineproduktion mit Hilfe eines praxistauglichen Kalkulationsmodells
C Duden, H-P Pecher 328

Assessment of greenhouse gas emissions from milk and feed
K Reckmann, A Lasar 333

Produktqualität / Product quality

Gehalte an Vitamin A und E in Tankmilch von Weide- und TMR-Betrieben
U Roser, T Jilg, H Kienberger, W Pelletier, A Tröscher 337

Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci isolated from Montenegrin dairy products made of raw bovine milk
S Mayrhofer, S Aigner, K Dürr, MAA Ochome, KJ Domig 343

Einfluss der Lysinversorgung auf die Schlachtkörperzusammensetzung und die Nährstoffzusammensetzung wertvoller Teilstücke von Pekingenten
W Wetscherek, C Neumann, K Schedle 347

Autorenverzeichnis 352

Sponsoren 356

Potentiale zur Steigerung der Stickstoffnutzungseffizienz beim Wiederkäuer – Beitrag sekundärer Pflanzenstoffe

Martin Gierus

Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien, AT

Einleitung

Sekundäre Pflanzenstoffe bilden eine breite Quelle an biochemischer Diversität und erfüllen physiologische Funktionen, die für die Interaktionen zwischen Pflanzen und ihrer Umwelt unentbehrlich sind. Dabei zu nennen sind Abwehrmechanismen (Tannine, Alkaloide), visuelle Signalvermittlung zwischen Pflanze und Tier (Flavonoide, Carotinoide), mechanische Festigung des pflanzlichen Gewebes (Lignin), Photosynthese (Chlorophyll) und die Aromabildung (Terpenoide). Historisch betrachtet werden viele dieser Sekundärmetaboliten vom Menschen seit langem genutzt und gelangen u.a. in Form von Gewürzen, Getränken (Tee, Kakao, Kaffee) und natürlichen Farbstoffen in die Nahrungskette. Die biochemischen Prozesse, die diesen Wechselwirkungen zum Schutz des Pflanzen-Individuums zu Grunde liegen, sind für vielfältige Anwendungen entlang der Wertschöpfungskette der landwirtschaftlichen Produktion von Interesse. Nicht wenige der Sekundärmetaboliten gehen Wechselwirkungen mit Nährstoffen ein, die für die Ernährung des Menschen und des Nutztieres essentiell sind. Viele sekundäre Pflanzenstoffe werden in Produkte wie Milch, Ei, Fleisch und Fisch übertragen, und haben einen unmittelbaren Einfluss auf die Produktqualität von Lebensmitteln sowie auf die Gesundheit des Menschen, der diese Produkte verzehrt. Aus dieser Perspektive nimmt ein prozessorientierter Einsatz von Sekundärmetaboliten an Bedeutung zu. Neben der Optimierung der Nährstoffverwertung im intermediären Stoffwechsel von Nutztieren und der Bereitstellung hochqualitativer Lebensmittel tierischer Herkunft kann zudem ein Beitrag zur Minderung von Emissionen klimarelevanter Gase, wie Methan, Lachgas und Kohlendioxid aus der landwirtschaftlichen Produktion geleistet werden (Beauchemin et al., 2007).

Ziel der vorliegenden Übersicht ist es, einen Beitrag zur Frage der Zulagenmenge von Polyphenolen in Form kondensierter Tannine in der Ration von hochleistenden Milchkühen zu leisten, um eine hohe N-Nutzungseffizienz ohne negative Effekte auf die Verdaulichkeit der organischen Masse und Abbaubarkeit des Proteins zu erzielen.

Kondensierte Tannine und ihre Wirkungsweise

Kondensierte Tannine bilden keine einheitliche Stoffgruppe in Pflanzen. Sie weisen eine Vielzahl an Strukturen auf. In höheren Pflanzen leiten sich die Phenole zum Teil von Phenylalanin ab, einem Produkt des Shikimisäurewegs. Grundsteine für die Bildung kondensierter Tannine in Futterpflanzen sind Flavan-3-ole, davon sind Catechin und Epicatechin die wichtigsten. Kondensierte Tannine sind Gerbstoffe, welche die Eigenschaft besitzen, Komplexe mit Proteinen einzugehen. Mit dieser Komplexierung wird die Abbaugeschwindigkeit des Rohproteins durch Mikroorganismen im Pansen reduziert, wodurch mehr Futterprotein unabgebaut den Pansen passieren kann (Grabber, 2009). Das pansenbeständige Protein (UDP) erhöht sich dadurch. Die rasche Abbaubarkeit der Proteine im Pansen kann gehemmt und die Verfügbarkeit von Aminosäuren im Dünndarm erhöht werden (Waghorn et al. 1987).

Der nutzbringende Einsatz von tanninhaltigen Pflanzen oder -extrakten (z.B. Quebracho, Mimosen) zur Verbesserung der N-Nutzungseffizienz ist in der Wiederkäuerernährung belegt. Ein hoher Anteil an NPN-Verbindungen am Gesamtproteingehalt bzw. ein rascher Abbau des Proteins bei zeitgleicher unzureichender Menge an fermentierbarer organischer Masse im Pansen führt zu hohen N-Verlusten. Diese Verluste können u.U. als Nitratfrachten im Sickerwasser besonders unter Beweidung zur Umweltbelastung beitragen. Versuche mit Milchkühen zeigten eine höhere Stickstoffausscheidung in Milch und Harn, wenn Luzernesilage (kein Tannin) im Vergleich zu Rotkleesilage verfüttert wurde (Broderick et al. 2000; Broderick et al. 2001). Auch bei der Fütterung von Hornklee sind vergleichbare positive Ergebnisse zu finden (Waghorn und Shelton, 1997). Auch in den Vakuolen lokalisierte pflanzeneigene Proteasen, die nach Beschädigung des Pflanzengewebes freigesetzt werden und somit einen raschen Abbau des Proteins sowohl bei Beweidung als auch während des Siliervorgangs induzieren, werden durch Tannine gehemmt (Zhu et al. 1999).

Tabelle 1: Mikrobielle Proteinsynthese und scheinbare Verdaulichkeit nach Zugabe von kondensierten Tanninen in Form von Quebracho (Ahnert et al., 2012)

	Quebracho-Zulage, % TS der Ration				
	0	1	2	4	6
Mikrobielles Protein, g/d	316[ab]	334[a]	291[bc]	267[c]	213[d]
Scheinbare Verdaulichkeit					
TS, %	75,0[a]	74,1[a]	74,4[a]	71,4[b]	71,5[b]
NDF, %	71,8[a]	70,0[a]	70,7[a]	62,5[b]	59,0[b]
ADF, %	62,3[a]	60,8[ab]	62,8[a]	53,9[bc]	49,3[c]

Angaben zufolge sind bei einem Gehalt an kondensierten Tanninen zwischen 2-5% TS in Einzelfuttermitteln noch positive Wirkungen beim Wiederkäuer nachweisbar. Bei steigenden Gehalten ist jedoch eine reduzierte Verdaulichkeit der OM zu beobachten, welche auf das verminderte Wachstum der Pansenmikroben zurückzuführen ist. Diese Werte sind in der Literatur sehr umstritten, was neben dem Gehalt selbst auch auf die Eigenschaften der Tannine zurückzuführen ist, wie das Potential zur Komplexierung mit Proteinen, das molekulare Gewicht und die Zusammensetzung der Tannine (McMahon et al. 2000). Neuere Ergebnisse bestätigen den Einfluss kondensierter Tannine auf die Pansenmikroben allerdings bereits bei 1% Zulage von Quebracho (Ahnert et al., 2012; Henke et al., 2014). Ein negativer Effekt auf die Verdaulichkeit von NDF wird bereits ab 4% Zulage beobachtet (Tabelle 1).

Tanninhaltige Futterpflanzen und Pflanzenextrakte

Heimische Futterpflanzen und Wiesenkräuter (z.B. Hornklee, Esparsette, Chicoree) weisen zwar einen mittleren bis hohen Gehalt an Polyphenolen (darunter auch kondensierte Tannine) auf, besitzen jedoch trotz weiter Verbreitung keine oder nur eine bedingte agronomische Relevanz hinsichtlich der Ertragsbildung von Grünlandbeständen.

Der Gehalt an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen einiger Futterleguminosen wie Hornklee und Rotklee wird mit geringeren Proteinabbauraten in Zusammenhang gebracht (Tabelle 2). Somit wäre der effektive Einsatz von Tanninextrakten als Futtermittelzusatzstoff ein großer Fortschritt (Tabelle 3). Neben tanninhaltigen Futterpflanzen sind zur Untersuchung der Wirkung kondensierter Tannine auch Pflanzenextrakte wie Quebracho als Zusatzstoffe in der Milchviehfütterung verfügbar. Bei Quebracho handelt es sich um einen Pflanzenextrakt, welcher zu ca. 70-80% aus extrahierbaren kondensierten Tanninen besteht. Er wird aus dem in Südamerika wachsenden Baum *Schinopsis quebracho-colorado* gewonnen.

Tabelle 2: Schätzung des nutzbaren Rohproteins (nXP) mittels *in vitro* Methode (Gierus et al., 2007)

Arten	Tannine	XP, % TS	Abbaurate, %/h	nXP, g/kg TS
Weißklee	-	24,1	6,1 [a]	194
Rotklee (RK)	+	21,9	6,6 [a]	181
Kaukasischer Klee	-	22,2	6,2 [a]	193
Luzerne	-	22,9	7,2 [a]	175
Hornklee	++	23,2	2,6 [b]	223
Deutsch' Weidelgras (DW)	-	9,7	8,1 [a]	141
DW als Begleitgras des RK	-	11,9	8,0 [a]	138
Silomais (Oldham)	-	7,7	6,2 [a]	122
Silomais (Fuego)	-	6,8	8,2 [a]	126
SE		*0,2*	*0,7*	

[ab] P<0,05

Analyse der kondensierten Tannine und ihrer Wirkungsweise

Mit der Entwicklung von einfachen Bestimmungsmethoden, welche für eine Anwendung in der Praxis erforderlich sind, soll die optimale Zulagenmenge eines Extraktes in der Fütterung von Milchkühen bestimmt werden. Obwohl Hinweise auf eine Steigerung der N-Nutzungseffizienz durch den Einsatz von Tanninen in der Wiederkäuerernährung existieren, bestehen Defizite in der Quantifizierung möglicher Effekte. Daher ist für eine effizientere N-Verwertung beim Tier neben der Bestimmung der Proteinqualität von Futterpflanzen, auch die Bestimmung des Einflusses kondensierter Tannine auf den Proteinabbau im Pansen und/oder im Silo erforderlich. Man nimmt somit an, dass insbesondere die unterschiedliche Zusammensetzung und Proteinbindungskapazität von Tanninen hierbei einen Einfluss ausüben.

Die Bestimmung der pflanzlichen Polyphenole, z.B. kondensierte Tannine, stellt analytisch eine äußerst schwierige Aufgabe dar. Meist werden in Fütterungsversuchen heterogene Gruppen verschiedener Polyphenole mit ähnlichen biologischen Funktionen und chemischen Eigenschaften verwendet. Die Wirkung ist daher in starkem Maße von der Zusammensetzung der Monomere und dem Polymerisierungsgrad abhängig (Dewhurst et al. 2006) sowie von den Eigenschaften (Aufrère et al., 2014) und der zugesetzten Menge (Schweigmann et al., 2012) der Proteine. Eine exakte chemische Charakterisierung dieser Stoffe scheint daher unumgänglich, um deren Wirkung erklären und einen sinnvollen Einsatz in der Fütterungspraxis beurteilen zu können. Allerdings sind für die Anwendung in der Praxis Bestimmungen der biologischen Wirkung von größerer Bedeutung, wie z.B. die Proteinausfällungskapazität (Makkar et al., 1988; Schweigmann et al., 2011). Dieser Ansatz ist damit zu begründen, dass kondensierte Tannine komplexe Verbindungen mit Proteinen eingehen können, die insbesondere im Magendarmtrakt der Wiederkäuer zu positiven Wirkungen auf den Proteinabbau und somit zu einer günstigen N-Verwertung führen können. Es wird angenommen, dass die Komplexbildung pH-abhängig ist und die Proteine im sauren Milieu des Labmagens wieder freigesetzt werden (Haslam, 1996). Sie wären so für das Tier zur Verdauung verfügbar.

Tabelle 3: Extraktgehalte an kondensierten Tanninen (CT) und Gesamtphenolen (GP) in %

	Quebracho	Mimose	Tara	Gambier
CT	13.8	25.3	0.5	4.9
GP	ca. 100	ca. 100	96.7	77.2

Zur Messung der Proteinbindung am Photometer wurde die Methode von Osborne und McNeill (2001) angewendet (Abbildung 1). Der jeweilige Tanninextrakt, wie in Tabelle 3 ersichtlich, wurde in Mengen

von 0 bis 10 mg eingewogen. Als Protein wurde bovines Serum-Albumin (BSA) verwendet. Die BSA-Analysen zeigten teilweise große Differenzen im Ausfällungsverhalten der Extrakte untereinander sowie im Einfluss des pH-Wertes auf. Mimosa erreichte in allen pH-Umgebungen die maximal mögliche BSA-Bindung, wohingegen Quebracho BSA eher im neutralen pH-Bereich bindet. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Tannin-Quelle in Verbindung mit dem pH-Wert das Komplexierungsverhalten der Tannine beeinflusst. Bei Mimosa ist zwar bei geringem Gehalt eine effiziente Bindung zu beobachten, jedoch findet keine Dissoziation statt. Damit wird vermutlich ein hoher Anteil an unverdaulichem Protein im Dünndarm angeflutet. Nur Quebracho scheint deutlich pH-abhängige Bindungen einzugehen und somit am ehesten zur Steigerung der Protein-Nutzungseffizienz geeignet zu sein. Aus der Arbeit ist zu entnehmen, dass bei einer Rationsgestaltung vermutlich Quebracho als Pflanzenextrakt die bessere Wahl ist, da mit einer Dissoziation im sauren Milieu des Labmagens zu rechen ist.

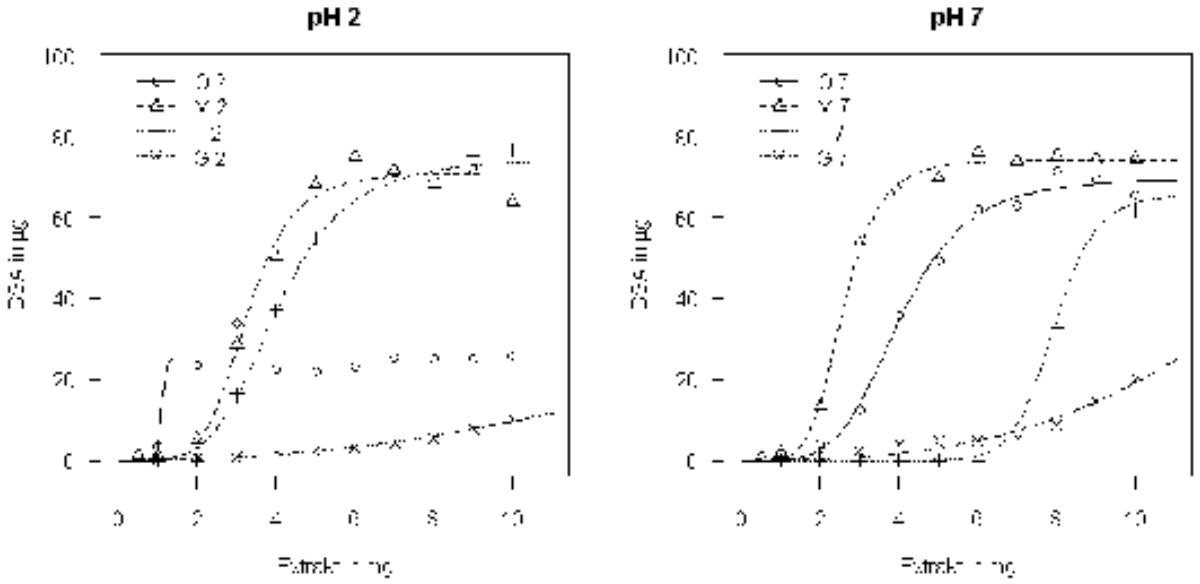


Abbildung 1: Ausfällung von BSA in µg durch die Tanninextrakte bei pH-Wert 2 und 7 für die Extrakt-Einwaage in mg (Q: Quebracho, M: Mimose, T: Tara, G: Gambier) - Schweigmann et al., 2011.

Fazit

- Forschungsergebnisse zeigen eine effizientere Proteinverwertung durch den Einsatz tanninhaltiger Rationen
- Die *in vitro* Proteinbindungsaffinität verdeutlicht die Unterschiede in der biologischen Wirkung verschiedener Tanninquellen. Allerdings ist die Charakterisierung der strukturellen Variation der Tanninquellen für die Erstellung ernährungsphyisiologischer Wirkungsbeziehungen notwendig
- Der Einsatz von tanninhaltigen Futterpflanzen und Pflanzenextrakten trägt zu einer optimierten Proteinverwertung beim Wiederkäuer bei

Literatur

Ahnert S., Susenbeth A., Dickhöfer U. (2012): Urinary purine derivative excretion by heifers in response to increasing Quebracho tannin supplementation. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 21, 46.

Aufrère J., Theodoridou K., Mueller-Harvey I., Yu P. Andueza D. (2014): Ruminal dry matter and nitrogen degradation in realtion to condensed tannins and protein molecular structures in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and Lucerne (*Medicago sativa*). J. Agric. Sci. 152, 333-345.

Beauchemin K.A., McGinn S.M., Martinez T.F., McAllister T.A. (2007): Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 85, 1990-1996.

Broderick G.A., Walgenbach R.P., Maignan S. (2001): Production of lactating dairy cows fed alfalfa or red clover silage at equal dry matter or crude protein contents in the diets. J. Dairy Sci. 84, 1728-1737.

Broderick G.A., Walgenbach R.P., Sterrenburg E. (2000): Performance of lactating dairy cows fed alfalfa or red clover silage as the sole forage. J. Dairy Sci. 83, 1543-1551.

Dewhurst R.J., Shingfield K.J., Lee M.R.F., Scollan N.D. (2006): Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. Anim. Feed Sci. Technol. 131, 168-206.

Gierus M., Herrmann A., Taube F. (2007): *In vitro*-Untersuchungen zum Abbau von Rohprotein verschiedener Futterleguminosen, Deutschem Weidelgras und Silomais. Züchtungskunde 79, 466-475.

Grabber J. H. (2009): Protein fractions in forage legumes containing protein- binding polyphenols: Freeze-drying vs. conservation as hay or silage. Anim. Feed Sci. Technol. 151, 324-329.

Haslam E. (1996): Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. J. Nat. Prod. 59, 205-215.

Henke A., Dickhöfer U., Halser M., Knappstein K., Molkentin M., Köhling I., Susenbeth A. (2014): Influence of quebracho tannin extract in the diet on milk protein, milk urea and urinary allantoin excretion in dairy cows. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 23, 103.

Makkar H.P.S., Dawra R., Singh P. (1988): Determination of both tannin and protein in a tannin-protein complex. J. Agric. Food Chem. 36, 523–525.

McMahon L.R., McAllister T.A., Berg B.P., Majak W., Acharya S.N., Popp J.D., Coulman B.E., Wang Y., Cheng K.-J. (2000): A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. Can. J. Plant Sci. 80, 469-485.

Osborne N.J.T., McNeill D.M. (2001): Characterization of Leucaena condensed tannins by size and protein precipitation capacity. J. Sci. Food Agric. 81, 1113-1119.

Schweigmann M., Gierus M. (2011): Tanninhaltige Pflanzenextrakte und ihre Proteinausfällungskapazität *in vitro*. Mitteilungen der Arbeitsgemeinschaft Grünland und Futterbau 12, 185-190.

Schweigmann M., Harder H., Taube F., Gierus M. (2012): Precipitation ability of quebracho extract for different BSA concentrations. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 21, 124.

Waghorn G.C., Shelton I.D. (1997): Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. J. Agric. Sci. 128, 365-372.

Waghorn G.C., Ulyatt M.J., John A. Fisher M.T. (1987): The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. Br. J. Nutr. 57, 115-126.

Zhu W.-Y., Kingston-Smith A.H., Troncoso D., Merry R.J., Davies D.R., Pichard G., Thomas H., Theodorou M.K. (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.

Autorenanschrift

Univ. Prof. Dr. Martin Gierus
Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie (TTE)
Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln
Universität für Bodenkultur Wien - BOKU
Muthgasse 11, Stiege 1; A-1190 Wien
www.tte.boku.ac.at
E-Mail: martin.gierus@boku.ac.at

Zur Bedeutung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe für die Ernährung von Wiederkäuern

Florian Leiber

FiBL, Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Frick, CH

Einleitung: Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und ihre Wirkungen

Als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe werden Moleküle definiert, die von der Pflanze gebildet werden, aber keine direkte Funktion im Stoffwechsel haben, sondern als Frasshemmer, antibiotische Schutzstoffe, Lockstoffe, etc. abwehrende oder anziehende Wirkungen auf andere Organismen haben. Es wird daher auch von „ökologisch wirksamen Pflanzenstoffen" im Gegensatz zu „physiologisch wirksamen Pflanzenstoffen" gesprochen (Strasburger, 1991). In diesem Sinne haben die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe wesentliche Funktionen in der Interaktion zwischen Futterpflanze und Wiederkäuer. Die Funktion des Frassschutzes wird über antinutritive, toxische und verdauungshemmende Stoffe erreicht, und dieser Aspekt ist seit langem in der Tierernährung relevant (Van Soest, 1994). Hinzu kommen aber Wirkungen, die bei geringeren Dosierungen dieser Substanzen auftreten können und z.B. antioxidative, antiparasitische, antimikrobielle und immunmodulatorische Effekte haben (Villalba et al., 2010). Zudem können sie in vielfältiger Weise die Pansenfermentation beeinflussen. Diese Einflüsse sind nicht nur negativ, sondern können auch als regulierend angesehen werden. In diesem Zusammenhang entsteht die Frage ob sich a) evolutionär Anpassungen des Tieres (Fressverhalten) und der Pansenmikroflora an die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe im Sinne von Regulationsmechanismen für ein physiologisches Optimum ergeben haben, und ob b) diese Regulationsfähigkeiten in der landwirtschaftlichen Tierernährung eine Rolle spielen können, um verschieden definierte Optima zu erreichen. Von der wissenschaftlichen Seite her ist zu diesen Themen bereits viel Wissen vorhanden, das in den folgenden Abschnitten angesprochen wird. Allerdings sind die wenigsten Ansätze bereits in der Praxis angekommen.

Der Begriff „sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe" umfasst eine grosse Vielfalt von Stoffen unterschiedlicher monomerer oder polymerer Strukturen, von denen bislang mehr als 200.000 molekular definiert sind (Hartmann, 2007). Die drei grossen Hauptgruppen sind *Terpene, Phenole* und *Alkaloide* (Bodas et al., 2012). Die Monoterpene sind Hauptbestandteile ätherischer Öle, während die grösseren Sesqui-, Di-, Tri- und Tetraterpene u.a. Steroide, Tocopherole, Retinol, Saponine und Carotenoide mit einer Vielzahl an damit verbundenen physiologischen Wirkungen umfassen. Phenole beruhen auf der Grundstruktur eines aromatischen Rings und treten in sehr vielfältigen Formen und Polymerisierungsgraden auf. Flavone, Flavonoide, Tannine, Lignine und Anthocyanidine gehören in diese Stoffklasse. Alkaloide schliesslich sind dadurch charakterisiert, dass sie N enthalten und meistens stark toxisch, in geringeren Konzentrationen aber auch pharmakologisch wirken.

Die vielfältigen antimikrobiellen, antioxidativen und pharmakologischen Wirkungen dieser Stoffe machen sie zu interessanten möglichen Futterzusatzstoffen mit verschiedenen Funktionen, aber auch Risiken und Problemen. Wichtige bekannte Effekte dieser Stoffe und ihre mögliche Nutzung in der Ernährung von Wiederkäuern sollen im Folgenden umrissen werden. Es soll aber auch die Frage gestellt werden, was sich aus diesen Effekten in Bezug auf Fütterungskonzepte ergibt, namentlich im Hinblick auf die botanische und damit biochemische Vielfalt des Futters, und in welchem Zusammenhang Vielfalt und Selektionsmöglichkeit mit Tierwohl und Tiergesundheit stehen könnten.

Auswirkungen auf die Pansenfermentation und Methanbildung

Durch ihre antimikrobiellen Eigenschaften können viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe die Pansenmikroflora hemmen, bzw., wenn dies art- und funktionsspezifisch stattfindet, Fermentations- und Stoffwechselmuster im Pansen modifizieren. Viele Pflanzen sind im Hinblick auf ihr Potential zur Reduktion der ruminalen Methanbildung untersucht worden (siehe z.B. Broudiscou et al., 2000; Bodas et al., 2008; Jayanegara et al., 2011b und 2011c; Bodas et al., 2012). Verschiedene, v.a. zweikeimblättrige Pflanzen konnten als besonders wirkungsvoll identifiziert werden. Hierzu gehören v.a. Pflanzen, die bislang weniger als Futterpflanzen gebräuchlich waren, wie z.B. Salbei, Rhabarber und Knoblauch, aber auch viele Baum- und Straucharten. Besonders tropische Pflanzen erwiesen sich häufig als wirkungsvoll, da sie hohe Konzentrationen an sekundären Inhaltsstoffen enthalten. Hier konnte eine klare Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Konzentration an phenolischen Inhaltsstoffen nachgewiesen werden (Jayanegara et al., 2011c).

Stofflich betrachtet haben kondensierte und hydrolisierbare Tannine (Goel und Makkar, 2012; Piluzza et al., 2013) aber auch andere Phenole (Jayanegara et al., 2011b; Leiber et al., 2012) ein deutliches Potential für die Methanhemmung. Auch Saponine (Patra und Saxena, 2009; Goel und Makkar, 2012) und ätherische Öle (Bodas et al., 2012) können wirksame Methaninhibitoren sein. Allerdings sind Fermentationsrate und Methanbildung eng korreliert und die Herausfoderung besteht darin, Pflanzen oder Pflanzenkombinationen (Jayanegara et al., 2013) zu finden, welche die Methanbildung stärker als die Gesamtfermentation hemmen und so den ökologischen Vorteil grösser als den wirtschaftlichen Nachteil halten.

Es ist anzumerken, dass die deutlichen Ergebnisse häufig aus *in vitro* Studien stammen und entsprechende Effekte *in vivo* sehr viel schwerer nachzuweisen sind. Dennoch gibt es klare Evidenz für die Wirksamkeit der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe auf die Pansenfermentation auch *in vivo* (Jayanegara et al., 2012; Staerfl et al., 2012). Das Wissen über die Wirkungen und Interaktionen verschiedener Substanzen in Abhängigkeit von Konzentrationen und pflanzlicher Herkunft erscheint bislang jedoch noch zu unsystematisch und unvollständig, um zu wirklich praxisreifen Konzepten genutzt werden zu können.

Auswirkungen auf den Proteinstoffwechsel im Pansen

Moderate Mengen kondensierter Tannine (<5g/kg TS) können unter den pH-Bedingungen des Pansens mit Proteinen Komplexe bilden, die von Pansenmikroorganismen nicht gelöst werden. Damit passieren diese Komplexe durch den Pansen, und lösen sich erst im sauren Milieu des Labmagens oder im alkalischen Milieu des Dünndarms wieder, wo sie enzymatisch verdaut werden können (Piluzza et al., 2013). Bei Rationen mit Rohproteinüberschüssen, kann dies zu einer effizienteren Proteinverwertung führen. Zudem wird der Stoffwechsel weniger mit pansenbürtigem Ammoniak belastet. Die Bindung ist allerdings stark von der Art und Herkunft der Tannine abhängig. Da diese sich auch negativ auf die Verdaulichkeit auswirken können, gibt es auch gegenteilige Versuchsergebnisse (Molle et al., 2009) und die erfolgreiche Nutzung von tanninhaltigem Futter zur Verbesserung der Proteinverdauung ist nicht praxisreif, da es auch hier an ausreichend systematischem Wissen fehlt. Dennoch kann hier noch ein Potential gesehen werden.

Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel im Pansen

Mit dem Futter aufgenommene Fette werden durch Lipolyse in Einzelfettsäuren aufgespalten, und diese werden in der Folge isomerisiert und hydrogeniert (Chilliard et al., 2007). Dass bedeutet, dass die Positionen vorhandener Doppelbindungen verändert werden, bzw. Wasserstoffionen an die freien Bindungsstellen angelagert und die ungesättigten Fettsäuren damit stufenweise gesättigt werden

(Biohydrogenierung). Dadurch gehen grosse Anteile der typischen pflanzlichen Fettsäuren (Ölsäure, C18:1; Linolsäure, C18:2; Linolensäure, C18:3), die für den Säugetierorganismus essentiell sind (Sinclair et al., 2002), im Pansen verloren.

Das Ausmass der Biohydrogenierung kann in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren im Futter stark schwanken. Ein wesentlicher Faktor sind die phytochemischen Wirkstoffe: Enzyme, wie die Polyphenoloxidase sowie sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (Chilliard et al., 2007; Buccioni et al., 2012). Der Einfluss von Tanninen verschiedener Herkunft (Khiaosa-ard et al., 2009; Vasta und Luciano, 2011) und von unterschiedlichen Phenolen (Jayanegara et al., 2011a) konnte *in vitro* mehrfach nachgewiesen werden. Für ätherische Öle und Saponine sind zumindest vereinzelt Wirkungen auf den ruminalen Fettstoffwechsel gefunden worden (Vasta und Luciano, 2011). Die differenzierte Wirkung verschiedener Tannine auf unterschiedliche Stufen der Biohydrogenierung wurde gezeigt (Khiaosa-ard et al., 2009), was auf die differenzierte Hemmung unterschiedlicher beteiligter Mikroorganismen hinweist. Allerdings gibt es bislang keine systematische Übersicht über die Zusammenhänge, und die konkreten Wirkmechanismen sind nur in wenigen Fällen klar.

Die *in vivo* feststellbaren Auswirkungen auf die Fettsäurenmuster in Muskel- und Fettgewebe sowie in Milch zeigen in ähnliche Richtungen. Hohe Grundfutteranteile in der Ration und hohe Kräuteranteile im Grundfutter, die jeweils mit erhöhten Konzentrationen an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen verbunden sein können, führen zu erhöhten Transferraten der intakten ungesättigten pflanzlichen Fettsäuren vom Futter ins Gewebe oder in die Milch (vgl. z.B. Leiber et al., 2005; Petersen et al., 2011; Piluzza et al., 2013; Willems et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass diese Effekte mit erhöhten Konzentrationen an Phenolen im Futter assoziiert sind (Piluzza et al., 2013; Willems et al., 2014). Es wird angenommen, dass der erhöhte Transfer auf einem gewissen Schutz der ungesättigten Fettsäuren vor ruminaler Biohydrogenierung beruht, der durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe gegeben ist.

Ein weiterer Faktor, der die Lipolyse und die Biohydrogenierung hemmen kann, ist die Polyphenoloxidase, die z.B. im Rotklee in hohen Konzentrationen vorkommt. Dieses Enzym findet sich in den Zellvakuolen der Pflanzen und wird aktiviert, wenn diese mechanisch zerstört werden und es mit Sauerstoff in Kontakt kommt (Buccioni et al., 2012), also in der Regel beim Wiederkäuen.

Futterselektion und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Die aufgeführten Aspekte des ruminalen Fettstoffwechsels können zu folgender grundlegenden Überlegung führen: die pflanzlichen ungesättigten Fettsäuren sind für den Wiederkäuer wie für jeden Säugetieroprganismus essentiell (Sinclair et al., 2002). Vor allem für die Ausbildung des zentralen Nervensystems beim Embryo sind sie extrem wichtig. Sie werden jedoch zu einem sehr hohen Anteil (deutlich über 90%; Chilliard et al., 2007) im Pansen hydrogeniert. Wäre die Pansenfermentation auch in Bezug auf die Lipide vollständig effizient, würden also die ungesättigten Fettsäuren vollständig hydrogeniert, wäre der Wiederkäuer nicht überlebens- und fortpflanzungsfähig. Es müssen sich also evolutionär Kontrollmechanismen entwickelt haben, mit denen der Wiederkäuer seine Pansenmikroflora optimal einstellen kann; und das Optimum ist hier ungleich dem Maximum. Eine wesentliche Möglichkeit zur Kontrolle bzw. Regulierung der Vorgänge im Pansen könnte in der Futterselektion bestehen, bei der Futterpflanzen mit ausgewählt werden, welche wirksame Konzentrationen an sekundären Inhaltsstoffen enthalten. Die ungesättigten Fettsäuren könnten als *ein* Beispiel angesehen werden für verschiedene essentielle Pflanzenmetaboliten (z.B. auch Vitamine, Antioxidantien), die durch spezifisches Fressverhalten genügend stark im Pansen geschützt werden müssen.

Im Zusammenhang mit Parasitenbefall ist die Eigenschaft von Wiederkäuern belegt, tanninreiches, antiparasitisch wirkendes Futter zu bevorzugen (Villalba et al., 2010). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass Wiederkäuer, denen die entsprechende Möglichkeit gegeben wird, in der Lage sind, ihre Diät in Bezug auf die sekundären Wirkstoffe so zu balancieren, dass deren Wirkungen sich ausgleichen oder aufheben (Lyman et al., 2011). In diesem Kontext wird auch von *self medication* gesprochen

(Villalba et al., 2010). Zudem ist bekannt, dass die Sequenz, in der Futter mit verschiedenen Wirksubstanzen aufgenommen wird, deutlichen Einfluss auf die Futteraufnahmedauer und –menge hat (Lyman et al., 2011). Es wird also deutlich, dass Wiederkäuer bei der Futterselektion nicht allein *Nährstoffe* maximieren oder balancieren, sondern dass sie auch eine Fähigkeit zur physiologisch sinnvollen Selektion von pflanzlichen *Wirkstoffen* haben. Es ist anzunehmen, dass diese sehr stark über den Geschmack vermittelt wird.

Wenn Futterselektion ein evolutionär entwickeltes zum Wiederkäuer gehörendes Verhalten ist, resultiert die Frage, wie relevant die biochemische (basierend auf der botanischen) und geschmackliche Vielfalt des Futters und die Möglichkeit zur Selektion für das Wohlbefinden und für die Gesundheit der Tiere ist. Das Wohlbefinden ist unmittelbar durch das Ausleben natürlicher Verhaltensweisen betroffen. Die Gesundheit wird durch die offenbar vorhandene Möglichkeit der Tiere, ihren Stoffwechselbedürfnissen entsprechend wirkstoffreiche Pflanzen zu selektieren, beeinflusst. Nicht zuletzt wäre die Erhöhung der Futteraufnahme durch Berücksichtigung der optimalen Sequenz von wirkstoffreichen Futtermitteln von hoher agronomischer Relevanz. Insbesondere bei Rationen, die in Bezug auf die Nährstoffdichte und -balance optimal gestaltet sind, sind aber Vielfalt und Wahlmöglichkeit oder wenigstens sequentielle Fütterungsregimes und die oben genannten Vorteile vielfach ausgeschlossen.

Schlussfolgerungen

Die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe haben vielfältige wichtige Funktionen in der Wiederkäuerernährung. Im Hinblick auf die, wenn auch nur begrenzt wirksame, Methanhemmung, auf mögliche positive Effekte in der Proteinverdauung, auf die verbesserten Fettsäurenmuster der Produkte, auf die antioxidativen Effekte und nicht zuletzt auf die angesprochenen Gesundheits- und Tierwohlaspekte verdienen diese Stoffe eine stärkere Betonung in Fütterungskonzepten. Ein grosser Teil des wissenschaftlichen Wissens zu diesem Thema ist noch nicht systematisch genug und daher bislang nicht in die Praxis eingeflossen. Dies liegt zum Teil daran, dass viele Effekte auf *in vitro* Basis aber seltener auf *in vivo* Basis gezeigt werden konnten. Es liegt ferner an der grossen Vielfalt der Substanzen und ihrer Wirkungen und den grossen analytischen Herausforderungen, die damit verknüpft sind. Dennoch erscheint die weitere Einbeziehung der sekundären Pflanzeninhaltstoffe in die Tierernährung ein sinnvolles und herausforderndes Gebiet für Grundlagen- und angewandte Forschung, insbesondere mit dem Ziel der Umsetzung in praxisrelevante Fütterungskonzepte.

Literatur

Bodas, R., Lopez, S., Fernandez, M., Garcia-Gonzalez, R., Rodriguez, A.B., Wallace, R.J., Gonzalez, J.S. (2008): *In vitro* screening oft he potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 145, 245-258.

Bodas, R., Prieto, N., Garcia-Gonzalez, R., Andres, S., Giraldez, F.J., Lopez, S. (2012): Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. Anim. Feed Sci. Technol. 176, 78-93.

Broudiscou, L.P., Papon Y., Broudiscou, A.F. (2000) : Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. Anim. Feed Sci. Technol. 87, 263-277.

Buccioni, A., Decandia, M., Minieri, S., Molle, G., Cabiddu, A. (2012) : Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. Anim. Feed Sci. Technol. 174, 1-25.

Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Roul, J., Doreau, M. (2007): Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109, 828-855.

Goel, G., Makkar, H.P.S. (2012): Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. Trop. Anim. Health Prod. 4, 729-739.

Hartmann, T. (2007): From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochem. 68, 2831-2846.

Jayanegara, A., Kreuzer, M., Wina, E., Leiber, F. (2011a): Sigificance of phenolic compounds in tropical forages fort he ruminal bypass of polyunsaturated fatty acids and the appearance of biohydrogenation intermediates as examined *in vitro*. Anim. Prod. Sci. 51, 1127-1136.

Jayanegara, A., Marquardt, S., Kreuzer, M., Leiber, F. (2011b): Nutrient and energy content, *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methanogenic potential of alpine forage plant species during early summer. J. Sci. Food Agric. 91, 1863-1870.

Jayanegara, A., Wina, E., Soliva, C.R., Marquardt, S., Kreuzer, M., Leiber, F. (2011c): Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. Anim. Feed Sci. Technol. 163, 231-243.

Jayanegara A., Leiber, F., Kreuzer, M. (2012): Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. J. Anim. Phys. Anim. Nutr. 96, 365-375.

Jayanegara, A., Marquardt, S., Wina, E., Kreuzer, M., Leiber, F. (2013): *In vitro* indications for favourable non-additive effects on ruminal methane mitigation between high-phenolic and high-quality forages. Br. J. Nutr. 109, 615-622.

Khiaosa-ard, R., Bryner, S.F., Scheeder, M.R.L., Wettstein, H.-R., Leiber, F., Kreuzer, M., Soliva, C.R. (2009): Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal α-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. J. Dairy Sci. 92, 177-188.

Leiber, F., Kreuzer, M., Nigg, D., Wettstein, H.-R., Scheeder, M.R.L. (2005): A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows‘ milk of alpine origin. Lipids 40, 191-202.

Leiber, F., Kunz, C., Kreuzer, M. (2012): Influence of different morphological parts of buckwheat (Fagopyrum esculentum) and its major secondary metabolite rutin on rumen fermentation *in vitro*. Czech J. Anim. Sci. 57, 10-18.

Lyman, T.D., Provenza, F.D., Villalba, J.J., Wiedmeier, R.D. (2011): Cattle preferences differ when endophyte-infected tall fescue, birdsfoot trefoil, and alfalfa are grazed in different sequences. J. Anim. Sci. 89, 1131-1137.

Molle, G., Decandia, M., Giovanetti, V., Cabiddu, A., Fois, N., Sitzia, M. (2009) : Responses to condensed tannins of flowering sulla (Hedysarum coronarium L.) grazed by dairy sheep. Livest. Sci. 123, 138-146.

Patra, A.K., Saxena, J. (2009): A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. Nutr. Res. Rev. 22, 204-219.

Petersen, M.B., Soegaard, K., Jensen, S.K. (2011): Herb feeding increases n-3 and n-6 fatty acids in cow milk. Livest. Sci. 141, 90-94.

Piluzza, G., Sulas, L., Bullitta, S. (2013): Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. Gras For. Sci. 69, 32-48.

Sinclair, A.J., Attar-Bashi, N.M., Li, D. (2002): What ist he role of alpha-linolenic acid for mammals? Lipids 37, 1113-1123.

Staerfl, S.M., Zeitz, J.O., Kreuzer, M., Soliva, C.R. (2012): Methane conversion rate of bulls fattened on grass or maize silage as compared with the IPCC default values, and the long-term methane mitigation efficiency of adding acacia tannin, garlic, maca and lupine. Agric. Ecosys. Environ. 148, 111-120.

Strasburger, E. (1991): Lehrbuch der Botanik. 33. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Van Soest, P.J., (1994): Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, MA.

Vasta, V., Luciano, G. (2011): The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants’ products quality. Small Rum. Res. 101, 150-159.

Villalba, J.J., Provenza, F.D., Manteca, X. (2010) : Links between ruminants’ food preference and their welfare. Animal 4, 1240-1247.

Willems, H., Kreuzer, M., Leiber, F. (2014): Alpha-linolenic and linoleic acid in meat and adipose tissue of grazing lambs differ among alpine pasture types with contrasting plant species and phenolic compound composition. Small Rum. Res. 116, 153-164.

Autorenanschrift

Dr. Florian Leiber
FiBL, Forschungsinstitut für biologischen Landbau
Ackerstr. 113
5070 Frick, Schweiz
E-Mail: florian.leiber@fibl.org

AGRANA.
DER NATÜRLICHE MEHRWERT.

ALLE GVO-FREI.GROSSTEILS AUCH IN BIO-QUALITÄT.ACTIPROT AUCH FÜR HEUMILCH-PRODUZENTEN.ALLE MADE IN AUSTRIA.

AGRANA -
größter Einzelfuttermittelproduzent
ÖSTERREICHs!

WWW.AGRANA.COM

AGRANA

Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin nach oraler Applikation

Siegfried Wolffram

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, DE

Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden bei Nutztieren

Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die in Nahrungs- und Futtermitteln pflanzlichen Ursprungs ubiquitär enthalten sind. Neben den Phenolsäuren, Lignanen und Stilbenen gehören sie zur Gruppe der pflanzlichen Polyphenole und stellen dort mit mehr als 5.000 bisher identifizierten Flavonoiden die größte Gruppe dar [1;2]. Die Grundstruktur von Flavonoiden (Abbildung 1) umfasst drei Kohlenstoffringe mit zwei aromatischen und einem O-heterozyklischen Ring. Die jeweilige chemische Struktur sowie die relative Ausrichtung variierender Reste am Flavonoidmolekül bestimmen den biologischen Wirkungsgrad der Flavonoide und ihrer Metabolite. So beruht die große Variabilität der Flavonoide auf dem unterschiedlichen Hydroxylierungs- und/oder Methylierungsmuster der drei Ringe sowie vor allem auf Art, Anzahl und Anordnung nicht acylierter und acylierter Zuckerreste [3]. Flavonoide können je nach Sättigungs- und Oxidationsgrad des heterozyklischen Ringes in sechs Unterklassen eingeteilt werden, dazu zählen Flavanole (z.B. Epicatechin, Gallocatechin), Flavanone (z. B. Hesperidin, Naringenin), Flavone (z. B. Apigenin, Luteolin), Flavonole (z. B. Quercetin, Myricetin, Kämpferol), Anthocyanidine (z. B. Malvidin, Cyanidin, Pelargonidin) und Isoflavone (z. B. Daidzein, Genistein) [4]. In der Unterklasse der Flavonole ist Quercetin (3, 3′,4′, 5, 7-Pentahydroxyflavon) in der Nahrung von Mensch und Tier am weitesten verbreitet und daher häufig Gegenstand von Untersuchungen [5].

In der Pflanze liegt Quercetin jedoch selten in freier Form als Aglycon, sondern meistens an verschiedene Zucker gebunden in Form von Quercetinglucosiden bzw. -glycosiden vor. In den meisten Fällen erfolgt die Verknüpfung mit dem Zuckerrest mittels β-O-glycosidischer Bindung, wobei die Glycosylierung bevorzugt an der Hydroxylgruppe in Position C-3, weniger häufig in Position C-7 erfolgt [5]. Glucose ist dabei der am häufigsten vorkommende Zucker, allerdings kommen auch Glycosylierungen mit Arabinose, Galaktose, Lignin, Rhamnose und Xylose sowie Kombinationen dieser Zucker (Di- oder Trisaccharide) vor [6]. So entsteht beispielsweise durch Verknüpfung des Quercetins mit einem Disaccharid aus Glucose und Rhamnose (Rutinose) in Position C-3 das Glucorhamnosid Rutin. Die Strukturen von Quercetin, Rutin sowie Metaboliten von Quercetin mit intakter Flavonolstruktur (Kämpferol, Isorhamnetin, Tamarixetin), von denen im weiteren Verlauf noch die Rede sein wird, sind in Abbildung 1 dargestellt.

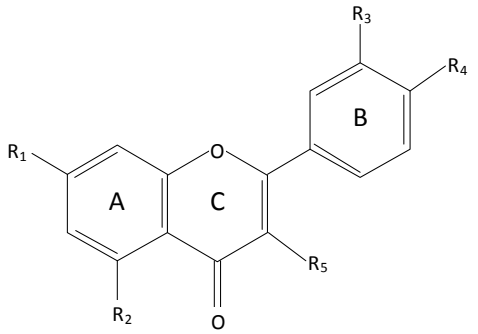


Abbildung 1: Strukturformeln von Quercetin, Rutin und Kämpferol sowie der Quercetinmetabolite mit intakter Flavonolstruktur; Quercetin: R1, R2, R3, R4, R5 = OH; Rutin: R1, R2, R3, R4 = OH, R5 = O-Glucorhamnose; Kämpferol: R1, R2, R4, R5 = OH, R3 = H; Isorhamnetin: R1, R2, R4, R5 = OH, R3 = OCH_3; Tamarixetin: R1, R2, R3, R5 = OH, R4 = OCH_3.

Neben unterschiedlichen Nahrungsmitteln enthalten auch diverse Futtermittel für Nutztiere Flavonoide. Demzufolge werden sie in unterschiedlichen Mengen mit der regulären Ration aufgenommen. Die Gehalte in Futterpflanzen sind allerdings gering. So untersuchten Besle et al. [7] verschiedene Futtermittel aus der Milchviehhaltung auf ihren Polyphenolgehalt. Es zeigte sich, dass Grünfutter den höchsten Polyphenolgehalt (35,3 g/kg Trockenmasse (TM)) der in der Studie untersuchten Futtermittel aufwies, wohingegen Maissilage (3,2 g/kg TM) den niedrigsten aufwies. In Bezug auf die Quercetingehalte der Futtermittel wurde Weidelgrassilage mit 0,68 g/kg TM angegeben, wohingegen das Flavonol in Grünfutter und Maissilage nicht quantifiziert werden konnte. In der Datenbank des United States Department of Agriculture (USDA) sind die Flavonoidgehalte verschiedener ausgewählter Nahrungs- bzw. Futtermittel aufgelistet [8]. Mittlerweile werden zahlreiche Pflanzenextrakte, welche teilweise beträchtliche Konzentrationen an polyphenolischen Verbindungen einschließlich verschiedener Flavonole enthalten, kommerziell vertrieben. Diese sollen ergänzend zur Ration eingesetzt werden mit dem Ziel, die Leistung zu erhöhen sowie den Gesundheitsstatus der Tiere positiv zu beeinflussen. Mit Hinblick auf das seit 1. Januar 2006 in der Europäischen Union geltende Verbot über den Einsatz von Antibiotika als leistungsfördernde Futterzusatzstoffe (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung), kann der Einsatz flavonolhaltiger Pflanzenextrakte als vielversprechende Alternative angesehen werden [9-11].

Biologische Effekte von Flavonolen

Flavonole sowie deren Glykoside besitzen diverse potenziell gesundheitsfördernde Effekte, die in zahlreichen Studien nachgewiesen wurden. Allerdings handelt es sich dabei überwiegend um Untersuchungen an Zellkulturen bzw. Labornagern und Menschen. Zu den etablierten/postulierten Wirkungen zählen u. a. antiinflammatorische, antioxidative, antivirale, antimikrobielle und antikanzerogene Wirkungen [12]. Eine Vielzahl von Studien haben auch den Einfluss von Flavonolen auf die Genexpression sowie die Aktivität von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels untersucht, wobei Interaktionen mit antioxidativen Effekten nicht ausgeschlossen sind. So können den genannten Effekten diverse Wirkungsmechanismen zugrunde liegen. Antioxidative Effekte können beispielsweise aus der Bildung von Metallchelaten, dem Abfangen freier Radikale, Enzymhemmung, und/oder der Induktion der Expression protektiver Enzyme resultieren, während bei antikanzerogenen Wirkungen Enzyminhibierung, antioxidative Effekte und Einfluss auf Genexpression eine Rolle spielen können [13]. Im Hinblick auf die Beeinflussung von Enzymen hat sich gezeigt, dass Quercetin diverse im Rahmen der Signaltransduktion wirkende Enzyme wie Phospholipase A2, Phospholipase C, Proteinkinase C, Proteintyrosinkinase, mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinasen) und zyklische Nucleotid-Phosphodiesterase [12;14-16] hemmt und des Weiteren auf verschiedene Adenosintriphosphatasen (ATPasen), Polymerasen, reverse Transkriptase, Cytochrom P450-Oxidoreductasen, Desoxyribonucleinsäure-Gyrase (DNA) und Topoisomerase inhibiert [12;17-20]. Enzyme des Fettstoffwechsels wie Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen, Acetyl-Co-A-Carboxylase und Diacylglycerol-Acyltransferase werden durch Quercetin ebenfalls nachweisbar gehemmt [12;21-24].

Im Hinblick auf mögliche biologische Wirkungen von Flavonolen beim Wiederkäuer ist kritisch anzumerken, dass die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich Wirkungen und Wirkungsweisen von Quercetin bzw. Flavonolen überwiegend unter *in vitro*-Bedingungen ermittelt wurden [12] und dass die vorliegenden Studien bis auf wenige, die die antimikrobielle Wirkung betreffen [25;26;27-30], ausschließlich an monogastrischen Spezies durchgeführt wurden. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass viele der Effekte aus *in vitro*-Studien auch *in vivo* Relevanz haben und zumindest teilweise auf den Wiederkäuer übertragbar sind.

Bioverfügbarkeit von Quercetin beim Schwein

Im Hinblick auf jegliche biologische Wirkung einer Substanz ist eine Grundvoraussetzung, dass diese nach oraler Aufnahme auch systemisch verfügbar ist. Die orale Bioverfügbarkeit einer Substanz beschreibt demnach die nach oraler Applikation systemisch verfügbare Menge der Substanz im Organismus, die letztendlich für postabsorptive biologische Wirkungen verfügbar ist. Üblicherweise wird die Bioverfügbarkeit anhand der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve erfasst. Entscheidende Aspekte sind dabei die Geschwindigkeit und Höhe der Anflutung im Blut, die Aufnahme und Verteilung aus dem Blut in Gewebe/Organe und die Elimination aus dem Blut bzw. Organismus [31]. Wird dabei die untersuchte Substanz bereits bei der Passage durch die Darmschleimhaut und/oder die Leber metabolisiert bzw. resezerniert, so spricht man vom sog. First-pass-Metabolismus. In den im Rahmen dieses Beitrags vorgestellten Studien wurden Untersuchungen an wachsenden Schweinen durchgeführt. Dabei standen Fragen zur intestinalen Absorption, first-pass-Metabolisierung und Gewebeanreicherung im Vordergrund. Aufgrund des limitierten Umfangs dieses Beitrags kann hier allerdings nur auf einige zentrale Aspekte eingegangen werden.

Ein entscheidender Faktor für die Absorption von Quercetin ist zunächst die chemische Form, in der das Flavonol verfüttert wird. So ist z. B. die Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Applikation von Rutin, dem Glucorhamnosid von Quercetin, deutlich geringer (ca. 20 %) als nach Anwendung des Aglykons (freie, nicht glykosylierte Form, 100 %), wohingegen die Zufuhr des Quercetin-Monoglucosids Isoquercitrin zu einer Verfügbarkeit von Quercetin von ca. 150 % führte [32].

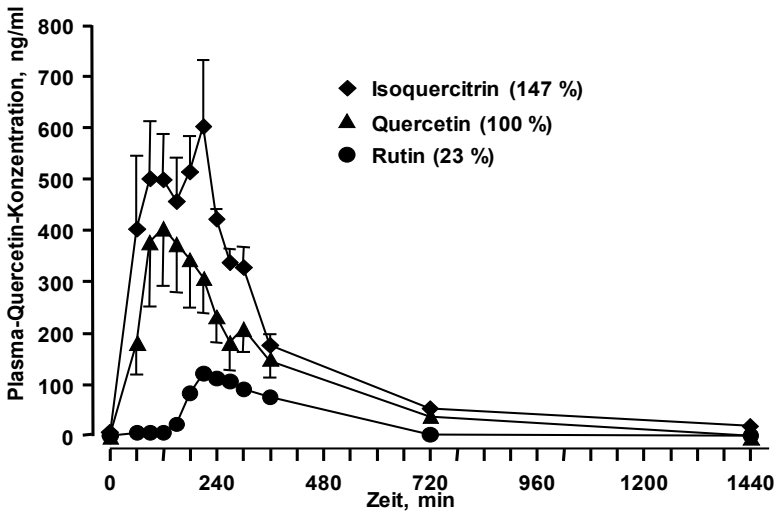


Abbildung 2: Plasmakonzentrationszeitkurven von Quercetin nach oraler Applikation von 50 mg Quercetin/ kg KGW als Quercetin-Aglykon, Isoquercitrin (Quercetin-3-O-Glukosid) oder Rutin. Werte in Klammern = Relative Bioverfügbarkeit, [32].

Die Absorption von Quercetin erfolgt im Dünn- und Dickdarm passiv. Allerdings zeigten diese Untersuchungen, dass bei Applikation des Quercetin-Monoglukosids Isoquercitrin möglicherweise auch der Na-Glucose-Carrier SGLT1 sowie die in der Bürstensaummembran des Dünndarmepithels exprimierte Laktase-Phorizin-Hydrolase beteiligt sind [31]. Dies erklärt die deutliche höhere Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Applikation von Isoquercitrin im Vergleich zur Applikation des Quercetin-Aglykons. Im Unterschied zum Isoquercitrin erfolgt beim Quercetin-Glucorhamnosid Rutin keine Freisetzung des Aglykons im Dünndarm, sodass Quercetin aus Rutin erst im Dickdarm verfügbar wird und dort auch einem umfangreichen mikrobiellen Abbau unterworfen ist, wodurch die niedrige Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Rutin zu erklären ist. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Absorption von Quercetin und Quercetinglykosiden bei Monogastriden [31].

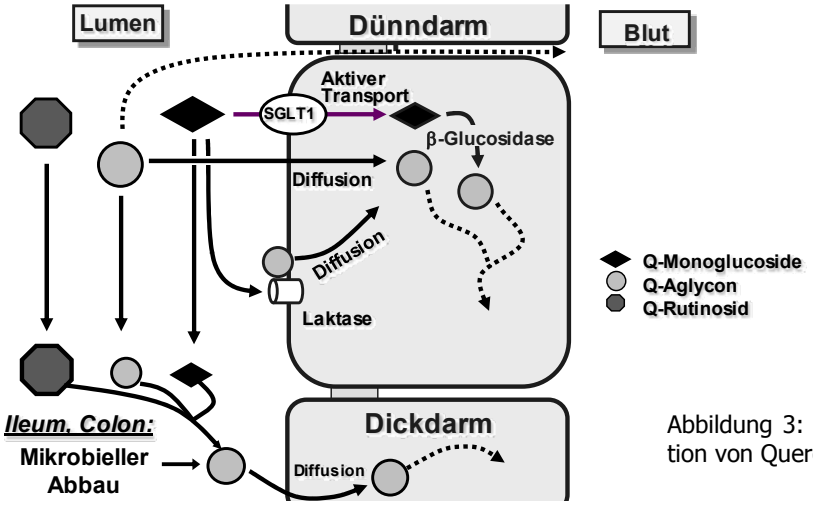


Abbildung 3: Schema zur intestinalen Absorption von Quercetin und Quercetinglykosiden

Des Weiteren unterliegt Quercetin, unabhängig von der chemischen Form, in der es appliziert wurde, bereits während des Transfers durch die (Dünndarm)-Schleimhaut sowie bei der Passage durch die Leber einem umfangreichen first-pass-Metabolismus bzw. Resekretionsmechanismen. Dabei gilt, dass ein Teil (20-30 %) des absorbierten Quercetins in der Schleimhaut bzw. postabsorptiv zu Isorhamnetin bzw. Tamarixetin methyliert wird bzw. zu Käempferol umgebaut (dehydroxyliert) wird [31]. Ein weiterer wichtiger Aspekt der first-pass-Metabolisierung bezieht sich auf die Konjugation von Quercetin bzw. dessen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur. Ungefähr 90 % dieser Verbindungen werden bereits während der Passage durch die Darmschleimhaut bzw. in der Leber mit Glucuron- bzw. Schwefelsäure zu Glucuroniden bzw. Sulfaten konjugiert und zirkulieren in dieser Form im Plasma

Im Hinblick auf eine mögliche postabsorptive Akkumulation von Quercetin und Quercetinmetaboliten in verschiedenen Geweben/Organen vom Schwein erfolgte mit Ausnahme der an der Absorption, Metabolisierung und Ausscheidung von Quercetin beteiligten Organe (v. a. Leber, Darmtrakt) auch nach mehrtägiger Applikation keine nennenswerte Anreicherung [33].

Bioverfügbarkeit von Quercetin beim Wiederkäuer

Im Unterschied zu monogastrischen Spezies sind beim Wiederkäuer dem Labmagen bzw. Darmtrakt die Vormägen vorgeschaltet. Ähnlich wie dies im Dickdarm aller Spezies erfolgt, kann davon ausgegangen werden, dass Quercetin und andere Flavonoide bei der Pansenpassage bereits in großem Umfang einer mikrobiellen Degradation unterliegen.

Zusammenfassend lässt sich dazu festhalten, dass bei der Kuh, abweichend von sämtlichen Befunden bei monogastrischen Spezies (s. o.), die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Glykosid Rutin deutlich höher als nach Applikation des Aglykons ist (Abbildung 3). Die rasche Anflutung von Quercetin bzw. dessen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur legen die Vermutung nahe, dass Quercetin bereits aus den Vormägen absorbiert wird [34]. Des Weitern konnten wir zeigen, dass Quercetin in der Tat in den Vormägen einem umfangreichen mikrobiellen Abbau unterliegt. Versuche mit duodenal fistulierten Kühen ergaben hingegen, dass bei Applikation von Quercetin in das Duodenum die Verhältnisse bei der Kuh durchaus mit den Befunden bei monogastrischen Spezies vergleichbar sind [35], so dass daraus geschlossen werden kann, dass für die orale Bioverfügbarkeit von Quercetin und anderen Flavonoiden beim Wiederkäuer die Passage durch die Vormägen der kritische Punkt ist. Versuche mit pansenfistulierten Rindern zur Bioverfügbarkeit von Catechinen nach intraruminaler Applikation ergaben, dass keine der Ausgangssubstanzen (z. B. Epigallocatechingallat, Epicatechin etc.) im Plasma

nachweisbar war. Dies weist darauf hin, dass in den Vormägen eine umfangreiche Metabolisierung zu nicht bekannten Abbauprodukten stattfindet.

Literatur

1. Beecher G.R. (2003): Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. J. Nutr. 133, 3248S-3254S.
2. Scalbert A., Williamson G. (2000): Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J. Nutr. 130, 2073S-2085S.
3. Harborne J.B., Williams C.A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. Phytochem. 55, 481-504.
4. Ross J.A., Kasum C.M. (2002): Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. Annu. Rev. Nutr. 22, 19-34.
5. Aherne S.A., O'Brien N.M. (2002): Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. Nutr. 18, 75-81.
6. Kühnau J. (1976): The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. World Rev. Nutr. Dietetics 24, 117-191.
7. Besle J.M., Viala D., Martin B., Pradel P., Meunier B., Berdagué J.L., Fraisse D., Lamaison J.L., Coulon J.B. (2010): Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. J. Dairy Sci. 93, 2846-2856.
8. USDA. USDA database for the flavonoid content of selected foods-Release 3. 2011. Ref Type: Internet Communication
9. Greathead H. (2003): Plants and plant extracts for improving animal productivity. Proc. Nutr. Soc. 62, 279-290.
10. Jouany J.-P. (2006): Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. Anim. Reprod. Sci. 96, 250-264.
11. Patra A.K., Saxena J. (2010): A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochem. 71, 1198-1222.
12. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000): The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol. Reviews 52, 673-751.
13. Erlund I. (2004): Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. Nutr. Res. 24, 851-874.
14. Agullo G., Gamet-Payrastre L., Manenti S., Viala C., Remesy C., Chap H., Payrastre B. (1997): Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. Biochem. Pharmacol. 53, 1649-1657.
15. Gamet-Payrastre L., Manenti S., Gratacap M.P., Tulliez J., Chap H., Payrastre B. (1999): Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. General Pharmacol. 32, 279-286.
16. Ko W.C., Shih C.M., Lai Y.H., Chen J.H., Huang H.L. (2004): Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. Biochem. Pharmacol. 68, 2087-2094.
17. Bernard F.X., Sable S., Cameron B., Provost J., Desnottes J.F., Crouzet J., Blanche F. (1997): Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 992-998.
18. Ohemeng K.A., Schwender C.F., Fu K.P., Barrett J.F. (1993): DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1). Bioorg. Med. Chem. Letters 3, 225-230.
19. Plaper A., Golob M., Hafner I., Oblak M., Solmajer T., Jerala R. (2003): Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. Biochem. Biophys. Res. Com. 306, 530-536.
20. Zhai S., Dai R., Friedman F.K., Vestal R.E. (1998): Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. Drug Metab. Dispos. 26, 989-992.
21. Bai H.W., Zhu B.T. (2008): Strong activation of cyclooxygenase I and II catalytic activity by dietary bioflavonoids. J. Lipid Res. 49, 2557-2570.
22. Bai H.W., Zhu B.T. (2010): Myricetin and quercetin are naturally occurring co-substrates of cyclooxygenases in vivo. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 82, 45-50.
23. Gnoni G.V., Paglialonga G., Siculella L. (2009): Quercetin inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat-liver cells. Eur. J. Clin. Invest. 39, 761-768.
24. Liang Y.C., Huang Y.T., Tsai S.H., Lin-Shiau S.Y., Chen C.F., Lin J.K. (1999): Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. Carcinogenesis 20, 1945-1952.
25. Leiber F., Kunz C., Kreuzer M. (2012): Influence of different morphological parts of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and its major secondary metabolite rutin on rumen fermentation *in vitro*. Czech. J. Anim. Sci. 57, 10-18.

26. Broudiscou L.-P., Papon Y., Broudiscou A.F. (2000): Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. Anim. Feed Sci. Technol. 87, 263-277.

27. Bodas R., López S., Fernández M., García-González R., Rodríguez A.B., Wallace R.J., González J.S. (2008): *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 145, 245-258.

28. Broudiscou L.-P., Lassalas B. (2000): Effects of Lavandula officinalis and Equisetum arvense dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. Reprod. Nutr. Dev. 40, 431-440.

29. Broudiscou L.-P., Papon Y., Broudiscou A.F. (2002): Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. Anim. Feed Sci. Technol. 101, 183-189.

30. Lourenço M., Cardozo P.W., Calsamiglia S., Fievez V. (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.

31. Lesser S., Wolffram S. (2006): Oral bioavailability of the flavonol quercetin – A review. Curr. Top. Nutraceut. Res. 4, 239-256.

32. Cermak R., Landgraf S., Wolffram S. (2003): The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. J. Nutr. 133, 2802-2807.

33. Bieger J., Cermak R., Blank, R., de Boer V.C.J., Hollman P.C.H., Kamphues J., Wolffram S. (2008): Tissue distribution of the flavonol quercetin in the pig after long-term dietary supplementation. J. Nutr. 138, 1417-1420.

34. Berger L.M., Wein S., Blank R., Metges C., Wolffram S. (2012): Bioavailability of the flavonol Quercetin in cows after intraruminal application of Quercetin and Rutin. J. Dairy Sci. 95, 5047-5055.

35. Gohlke A., Ingelmann C.J., Nürnberg G., Starke A., Wolffram S., Metges C.C. (2013): Bioavailability of Quercetin from its aglycone and its glucorhamnosid Rutin in lactating dairy cows after intra-duodenal administration. J. Dairy Sci 96, 2303-2313.

Autorenanschrift

Prof. Dr. Siegfried Wolffram
Professur für Ernährungs- und Stoffwechselphysiologie
Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie
Hermann-Rodewaldstr. 9; D-24118 Kiel
E-Mail: wolffram@aninut.uni-kiel.de

Perspectives of plant breeding to improve the feeding value of vegetable feedstuffs

Wolfgang Friedt

Institut für Pflanzenbau & Pflanzenzüchtung, IFZ, Justus-Liebig-Universität Giessen, DE

Introduction

Major plant feedstuffs for farm animals are generated from cereals incl. corn as well as protein and oil crops. For example, in Germany compound animal feed typically contains on average 44% cereals and 28% oil meals and cakes as by-products of oil extraction (http://www.dvtiernahrung.de). A total of about 20 million tonnes of compound feed are currently produced in Germany. The major cereals in Europe are wheat (*Triticum aestivum*), barley (*Hordeum vulgare*), and maize (*Zea mays*). Important oil and protein crops are oilseed rape (OSR, predominantly *Brassica napus*), sunflower (*Helianthus annuus*), soybean (*Glycine max*) and various other grain legumes incl. field beans, lupins and peas. The attractiveness of a crop plant for the user is certainly determined by its quality or value in use, i.e. the composition of the product for the particularly usage such as animal feeding. On the other hand, the specific value of a crop for the grower is substantially determined by its marketable yield.

Enhancing the feed quality of plant products

Improving the feeding value of bread wheat

Regarding total world production maize is the leading forage plant today (http://faostat3.fao.org/). But, amongst the temperate cereals, i.e. barley, oats, rye, triticale and wheat (*T. aestivum*), the latter is the dominant crop of the world with regard to cultivation area. Even in Europe wheat is by far the most important crop grown on about 60 million hectares (EU 26 million ha) with a total production of more than 200 million tonnes. For feed purposes a high protein content of wheat is desirable. Since yield and protein content are negatively related, it is a special challenge for wheat breeders to combine outstanding yield with high quality, i.e. high protein content. Examples of actual winter wheat cultivars released in Germany show that some progress has been made in combining high protein content with moderate grain yield (cv. Akteur) or high yield with medium protein content as in cv. JB Asano. Both, protein content and grain yield are quantitative traits presumably controlled by few or many genes and additionally modified by environment (abiotic factors). By quantitative trait loci (QTL) analysis it is possible to identify the genetic determinants of protein content and yield and by locating relevant chromosomal regions. This may allow an improvement of protein content without reducing grain yield using marker-assisted selection (MAS). For example, QTL detection for grain yield and protein content has been carried out using three related DH populations grown in a multi-environment trial network (Bogard et al. 2013). Several chromosomes showed co-localization of QTL for protein and yield with antagonistic effects, thus contributing to the negative protein/yield relationship. Nevertheless, genomic regions determining protein content independently of grain yield across experiments were found on two chromosomes (3A, 5D) which could help breeders to move the protein/yield relationship in a desirable direction, i.e. antagonistic effects and combing the two important traits in the same wheat genotype.

The value of a plant-derived feedstuff can also be affected by biotic factors such as pathogens producing toxic compounds such as mycotoxins. For example, *Fusarium* species like *F. graminearum* causing the Fusarium head blight (FHB) disease generate mycotoxins such as deoxynivalenol (DON). Therefore, FHB is a devastating disease of wheats (cereals) worldwide, causing significant reductions of grain yield and quality and affecting the health of farm animals fed with contaminated wheat products. Resistant varieties are the only effective way to control this disease, but the molecular basis of FHB resistance is still poorly understood.

Numerous earlier studies on molecular mapping of FHB resistance in wheat were evaluated and summarized by Buerstmayr et al. (2009). QTL for FHB resistance were found on all wheat chromosomes except 7D. Some QTL were identified in different mapping studies indicating that such QTL may be stable and therefore useful for breeding. Since basic questions like this are still not answered, Gottwald et al. (2012) started qPCR experiments using the resistant cultivars 'Dream' and 'Sumai 3'. Two putative defence mechanisms with specific mode of resistance were found in 'Dream'. A non-specific mechanism was based on several defence genes probably induced by jasmonate and ethylene signalling, including lipid-transfer protein, thionin, defensin and GDSL-like lipase genes. Additionally, defence-related genes encoding jasmonate-regulated proteins were up-regulated in response to FHB. Another mechanism based on the targeted suppression of essential *Fusarium* virulence factors comprising proteases and mycotoxins was found to be an essential, induced general defence of wheat. Similar inductions upon fungal infection were frequently observed among FHB-responsive genes of both mechanisms. Further work aiming at the functional analysis of selected genes is expected to open new possibilities for a gene-based molecular breeding for *Fusarium* resistance in wheat. At the same time conventional breeding has been able to develop genotypes with a very low FHB trait expression, e.g. cv. Toras. It remains to be seen whether resistance is sufficient under high pathogen pressure, allowing the production of grain as well as food and feed with minimal mycotoxin levels.

Optimizing the value of oilseed rape extraction meal

After oil extraction, the meals obtained from soybean or oilseed rape (OSR) contain a high-quality protein that is effectively used for livestock feeding. However, in comparison to soybean the meal from OSR possesses higher amounts of anti-nutritive compounds, such as glucosinolates, phenolic acids and indigestible fibres (cf. Lipsa et al. 2012, Liu et al. 2012, Rezaeizad et al. 2011) such as lignin (cf. Bonawitz and Chapple 2010). Breeding efforts with respect to meal quality therefore aim at reducing such components, while increasing the content of valuable ingredients such as protein and essential amino acids.

As a major requirement for extending the application of rapeseed meal (RSM) in livestock breeding and its use in pig or poultry feeding, the glucosinolate (gsl) content of present-day rapeseed 00-varieties is drastically reduced in comparison to former, traditional and low-erucic 0-varieties. EU rules now require a total gsl-content below 18 µmol/g seed. Major substances are progoitrin, gluconapin and 4-hydroxy-glucobrassicin. Monitoring of RSM produced in Germany in the years 2009-2011 has shown that the gsl-level achieved today is very low with annual averages of 6-8 mmol/kg. However, maximum values up to 20 mmol/kg indicate that continued efforts are necessary to maintain a high standard of RSM quality for feeding monogastric animals. This can best be achieved by the genetic approach of breeding and releasing very low-gsl new cultivars, rather than by specific processing steps (e.g. toasting) aiming at a reduction of gsl content in the extraction meal.

A second, even more complex trait determining RSM quality and feed value is dietary fibre as a major part of the rapeseed hull, containing cellulose, hemicelluloses and insoluble lignin. Dietary fibre limits the digestibility of the feedstuff and the corresponding growth performance of animals fed with it. The fibre content can be reduced by either dehulling during processing or by genetic approach, i.e. directed rapeseed breeding. It has been shown that a large diversity for fibre and lignin content exists in the rapeseed gene pool. Seed colour (brightness) and acid detergent lignin (ADL) content are close-

ly related (r = 0.83). Typically, yellow or light-seeded genotypes have a very low ADL content, but black-seed types show a broad variation for the trait. The ADL content can be efficiently predicted by NIRS even from small seed samples (Wittkop et al. 2009, 2012). Light-seeded genotypes tend to be more susceptible to damage, less vigorous and lower yielding than dark-seeded varieties. Slominski et al. (2011) compared the chemical and nutritive composition of meals derived from black- and yellow-seeded *B. napus* (Table 1).

The yellow-seeded type contained more protein, more sucrose, and less glucosinolates, dietary fiber and lignin with associated polyphenols. The reduction in fibre content of the yellow-seed type is a consequence of a bigger seed size, lower contribution of the hull to the total seed mass, and a lower lignin and/or polyphenol content of the hull fraction. In addition, the nutritive value of the meals was investigated with broiler chickens fed corn-based diets containing 30% of rapeseed (canola) meal (Slominski et al. 2011). Significantly higher lysine, methionine, threonine and total ileal digestibility of amino acids were observed in birds fed the yellow-seed diet when compared with those fed diets containing black-seeded *B. napus*. The metabolizable energy (ME) values as determined with broiler chickens and turkeys indicate that the net energy available to the animals were generally higher for the yellow- than the black-seeded *B. napus* (Table 2).

Table 1: Composition of meals derived from black- and yellow-seeded *Brassica napus* canola

Dietary fibre components	***B. napus* black**	***B. napus* yellow**
Nonstarch polysaccharides	20.2 [a]	18.7 [b]
Lignin and polyphenols	7.7 [a]	4.0 [c]
Glycoproteins	2.1 [a]	1.5 [c]
Total fibre	30.1 [a]	24.1 [c]

[a–c] Means within a row with no common superscripts differ significantly (P < 0.05); data from Slominski et al. (2011)

Several studies have been carried out regarding the genetic control of the seed colour and fibre (lignin) content (e.g. Liu et al. 2012, Stein et al. 2013). From this work using different rapeseed populations derived from crosses between yellow- (ADL 4.2% DW) and black-seeded parents (ADL 6.6% DW) it can be concluded that the trait is mainly controlled by a major QTL on *B. napus* chromosome A9. Sequences of the candidate genes *Bna.CAD2/CAD3* and *Bna.CCR1*, encoding a *Cinnamylalcohol-Dehydrogenase* and *Cinnamoyl-CoA-Reductase*, respectively, were found in this region and genetic markers have been identified. The gene sequences show a high genetic diversity (SNPs) which probably are of functional relevance. Confirmation of the major genes involved in the colour/fibre trait will be a basis for molecular breeding approaches in the future. This may lead to a reduction of dietary fibre from the present value of more than 12% in RSM to a value closer to soybean meal (7%).

Table 2: Comparison of the feed value of black- and yellow-seeded *Brassica napus* canola; values indicate metabolizable energy (ME)

	***B. napus* black**	***B. napus* yellow**
Broiler chickens	1,904 [a]	2,190 [a]
Turkeys	2,007 [b]	2,166 [a]

[a–c] Means within a row with no common superscripts differ signif. (P < 0.05); from Khajali & Slominski (2012)

As a valuable fraction of the seed and RSM, the protein content of OSR meal (ca. 33%) is lower than in soybean meal (ca. 44%). Nevertheless, the protein content of rapeseed shows a relatively large genotypic variation (18-27% of dry matter). In addition to that, rapeseed protein is characterized by relatively high proportions of methionine, cysteine, threonine and tryptophan. These essential amino acids determine the high protein value of RSM as a valuable component in compound feedstuffs. In

spite of the general negative relation between seed oil and seed protein content, the whole variation of protein content is found in the high-oil types with 45-47% (Figure 1, Wittkop B., unpublished data). This indicates that the combination of high oil and reasonable protein content should be feasible in high-yielding commercial cultivars, e.g. in F1 hybrids derived from crosses between male-sterile female lines and fertile males.

Advancement of breeding methodology

Classical breeding approaches comprise recurrent cycles of recombination, selection and variety production. But, repeated selection for high performance, incl. disease and stress resistance, superior quality (e.g. by NIRS) and high yield, tends to narrow down genetic diversity. However, advances in biotechnology and molecular breeding allow the identification and transfer of genomic sequences and genes from related species into crop germplasm to broaden the genetic variation and create new genotypes with improved traits. Molecular markers derived from genes or quantitative trait loci (QTL) can provide a tool to track these multiple gene traits in marker-assisted breeding programmes and combine them within the genomes of elite cultivars. For example, Fusarium head blight (FHB) resistance QTL have been localized on different wheat chromosomes. Molecular markers tightly linked to resistant alleles from different cultivars, e.g. 'Dream' and 'Sumai 3', can be used for the development of functional markers as a selection tool.

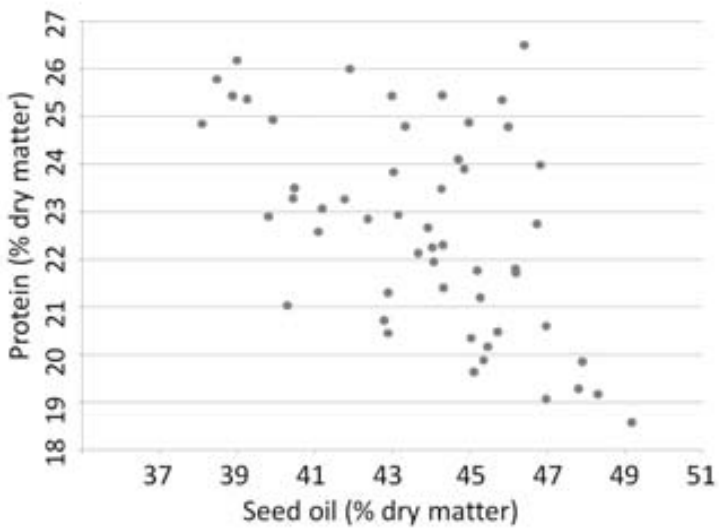


Figure 1: Relationship between seed oil and protein content in a collection of rapeseed genotypes (*Brassica napus*)

Nowadays, molecular markers are widely used to i) discriminate germplasm and genetic pools, ii) identify female and male lines for hybrid breeding, and iii) determine purity of hybrid seed. Since a high-yielding crop is often susceptible to abiotic or biotic stress factors, i.e. environment stress, fungal or viral diseases and insect pests, "combination breeding" for [resistance + quality + yield] is a continuous task in commercial variety development. For this aim, modern molecular approaches are now becoming available for breeding. They are based on high-throughput genomics technologies using the entire genomic information, offering now unprecedented possibilities for gene discovery as well as advanced (physical) phenotyping tools, complex trait analysis by genome-wide association studies, global gene expression analyses, indirect genomic selection (GS) and application of predictive breeding strategies (cf. Snowdon & Iniguez Luy 2012).

In conclusion, it is evident that the amount, composition (quality) and nutritional value of vegetable feedstuffs can be substantially improved by breeding. In the past, our crop plants have been greatly advanced and upgraded by conventional breeding procedures mainly relying on phenotypic trait evaluation, recombination, testing and selection. Nowadays, the new tools of molecular and genome-based breeding exploiting the vast and growing knowledge of the genetic make-up of our crop plants allow the development of new selection schemes and implementation of knowledge-based breeding procedures.

Zusammenfassung

Perspektiven der Pflanzenzüchtung für die Verbesserung von pflanzlichen Futtermitteln: Pflanzliche Futtermittel für die Tierernährung stammen im Wesentlichen von Getreide und Mais sowie von Öl- und Eiweißpflanzen; zu letzteren gehören vor allem Raps, Sonnenblume, Soja und heimische Körnerleguminosen wie Ackerbohne, Erbse und Lupinen. Der Ertrag von Hauptnutzpflanzen – wie Körnerölraps oder Weichweizen - ist in den letzten Jahrzehnten enorm gesteigert worden, zuletzt vor allem durch die Nutzung der „Heterosis" in Hybridsorten.

Nach der Ölgewinnung enthält der Schrot oder Kuchen aus Ölsaaten beträchtliche Anteile von wertvollem Protein, das für die Tierernährung zur Verfügung steht. Allerdings sind hier zuweilen auch nennenswerte Anteile „antinutritiver Substanzen" zu finden, wie z.B. Glucosinolate, Phenolsäuren und Rohfaser im Rapsschrot. Hier setzen Züchtungsarbeiten zur Verbesserung der Schrotqualität für die Tierernährung an: Ziel ist die Minimierung unerwünschter bei gleichzeitiger Erhöhung wünschenswerter Schrotkomponenten, wie Eiweiß und essenzielle Aminosäuren. Hierfür sind sog. „gelbsamige" (gelbschalige) Rapsformen von Interesse, da sie aufgrund eines reduzierten Schalenanteils deutlich reduzierte Gehalte an Rohfaser (Lignin) und Tanninen aufweisen.

Die starke Fokussierung der Züchtung auf die Steigerung der Ertragshöhe und Ertragssicherheit sowie die Qualität kann ggf. zu einer Einengung der genetischen Diversität führen. Einer solchen Tendenz ist entgegenzuwirken, was heute jedoch mit Hilfe biotechnologischer und molekularer Züchtungstechniken gut möglich ist. Beispielsweise können durch Interspezifische Kreuzungen Gene und Eigenschaften aus mehr oder weniger entfernt verwandten Arten für die Erweiterung des Genpools der Kulturpflanzen genutzt werden. Ferner können spezifische Gene aus Wildformen oder anderen Spezies isoliert und gezielt in die jeweilige Nutzpflanze übertragen werden, um neuartige Genotypen mit erweitertem Merkmalsspektrum zu generieren. So kann die rein phänotypische Selektion in der klassischen Züchtung durch markergestützte oder genomische Selektionsverfahren ergänzt und die Effizienz der Züchtung gesteigert werden. Hierdurch ergeben sich neue Möglichkeiten der züchterischen Verbesserung quantitativer Merkmale durch den Einsatz genomweiter Markerdaten im Hochdurchsatz anhand großer Züchtungspopulationen.

Dieser Beitrag gibt einen Überblick über aktuelle züchterische Bestrebungen zur Verbesserung des Ertrags und des Futterwertes mit Beispielen von Raps und Getreide.

References

Bogard M, Allard V, Martre P, Heumez E, Snape JW, Orford S, Griffiths S, Gaju O, Foulkes J, Le Gouis J. 2013. Identifying wheat genomic regions for improving grain protein concentration independently of grain yield using multiple inter-related populations. Mol Breeding 31:587–599

Bonawitz ND, Chapple C. 2010. The Genetics of Lignin Biosynthesis: Connecting Genotype to Phenotype. Annu. Rev. Genet. 44: 337–63

Buerstmayr H, Tan T, Anderson JA. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. Plant Breeding 128:1-26

German Plant Variety Office. 2013. Beschreibende Sortenliste. Bundessortenamt, Hannover

Gottwald S, Samans B, Lück S, Friedt W. 2012. Jasmonate and ethylene dependent defence gene expression and suppression of fungal virulence factors: Two essential mechanisms of Fusarium head blight resistance in wheat? BMC Genomics 13:369

Khajali F, Slominski BA. 2012. Factors that affect the nutritive value of canola meal for poultry. Poult Sci 91: 2564-2575

Lipsa FD, Snowdon R, Friedt W. 2012. Quantitative genetic analysis of condensed tannins in oilseed rape meal. Euphytica 184:195–205

Liu LZ, Stein A, Wittkop B, Sarvari P, Li J, Yan X, Dreyer F, Frauen M, Friedt W, Snowdon RJ. 2012. A knockout mutation in the lignin biosynthesis gene CCR1 explains a major QTL for acid detergent lignin content in *Brassica napus* seeds. Theor. Appl. Genet. 124: 1573-1586

Mosenthin R, Messerschmidt U, Eklund M, Sauer N, Schöne F. 2013. Effect of rapeseed processing on protein quality of rapeseed meal in diets for pigs. Oral presentation, GCIRC Techn. Meeting, Nyon (Switzerland), 28 April - 1 May 2013

Noblet J, Cozannet P, Skiba F: Nutritional value and utilization of wheat dried distillers grain with solubles in pigs and poultry. In: Biofuel co-products as livestock feed - Opportunities and challenges, Harinder P.S. Makkar (ed.). FAO, Rome, 2012

Obermeier C, Hosseini B, Friedt W, Snowdon R. 2009. Gene expression profiling via LongSAGE in a non-model plant species: a case study in seeds of *Brassica napus*. BMC Genomics 10:295

Rezaeizad A, Wittkop B, Snowdon RJ, Hasan M, Mohammadi V, Zali A, Friedt W. 2011. Identification of QTLs for phenolic compounds in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by association mapping using SSR markers. Euphytica 177: 335-342.

Slominski BA, Jia W, Mikulski D, Rogiewicz A, Jankowski J, Rakow G, Jones RO, Hickling D. 2011. Chemical composition and nutritive value of low-fiber yellow-seeded *B. napus* and *B. juncea* canola for poultry. Pages 443–445 in: Proc. 16th Int. Rapeseed Congr., Prague

Snowdon RJ, Iniguez Luy FL. 2012. Potential to improve oilseed rape and canola breeding in the genomics era. Plant Breeding 131: 351–360

Stein A, Wittkop B, Liu LZ, Obermeier C, Friedt W, Snowdon RJ. 2013. Dissection of a major QTL for seed colour and fibre content in *Brassica napus* reveals colocalisation with candidate genes for phenylpropanoid biosynthesis and flavonoid deposition. Plant Breeding (online first DOI: 10.1111/pbr.12073)

Wittkop B, Snowdon RJ, Friedt W. 2009. Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe. Euphytica 170: 131-140

Wittkop B, Snowdon RJ, Friedt W, 2012. New NIRS calibrations for fibre fractions reveal broad genetic in *Brassica napus* seed quality. J. Agric. Food Chem. 60: 2248−2256

Corresponding author

Wolfgang Friedt
Institut für Pflanzenbau & Pflanzenzüchtung, IFZ
Justus-Liebig-Universität Giessen
Heinrich-Buff-Ring 26-32
D-35392 Giessen
E-mail: wolfgang.friedt@agrar.uni-giessen.de

Diet transfer from the base of aquatic food webs to fish – applications for future freshwater aquaculture

Martin J. Kainz[1], Sebastian Schultz[1], David S. Murray[1], Douglas R. Tocher[2] and Hannes H. Hager[1]

[1] WasserCluster – Biologische Station Lunz, Lunz am See, AT
[2] Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland, UK

Abstract

Sustainable feeding methods in Austrian aquaculture are gaining increasing attention. Freshwater salmonids, such as trout and charr, are currently being fed on mostly marine fish-based feeds, while omnivorous cyprinids, such as carp, primarily on natural pond zooplankton and additional vegetable-based feeds. Here we present effects of alternative feeding methods on somatic development and lipid composition of common carp (*Cyrinus carpio*) and Alpine charr (*Salvelinus alpinus*). For common carp, we show that the supply of short-term (30 d) finishing diets, containing omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LC-PUFA), doubled the n-3 LC-PUFA content in carp. However, increased dietary supply of vegetable-based short-chain PUFA resulted in higher short-chain, but not n-3 LC-PUFA, suggesting that there was very little PUFA conversion. For Alpine charr, fish meal and fish oil were replaced in a graded manner by pumpkinseed press cake and rapeseed oil (experimental feeds F2, F3, and F4) and compared to a control feed formulated with fish meal and oil (F1). One thousand two hundred charr of initial weight 10 ± 1 g were randomly distributed into 12 tanks (100/tank) of 1.4 m^3 supplied with pre-alpine spring water and fed one of the feeds in triplicate. Preliminary results showed that fish biomass development in fish fed diet F1 was highest compared to all other feeds. However, the fatty acid compositions of dorsal muscle tissues of the fish showed very similar mean omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) concentrations in fish fed diets F1 and F2. Surprisingly, although diets F3 and F4 contained 6-fold less fish oil than diets F1 and F2, fish fed diets F3 and F4 retained only about 2-fold less highly desired omega-3 LC-PUFA in their dorsal muscle tissue than fish fed diets F1 and F2. This result suggested that the amount of fish oil supplied in the high fishmeal and fish oil feeds may be supplying levels of omega-3 LC-PUFA at levels higher than the physiological requirement and so are not linearly retained in Arctic charr. Studies on the ability of Arctic charr hepatocytes to bioconvert 18:3n-3 to the highly beneficial omega-3 LC-PUFA are ongoing and suggest that this pathway is under nutritional regulation in charr.

Corresponding author

Priv.-Doz. Dr. Martin J. Kainz
WasserCluster * Biologische Station Lunz
Dr. Carl Kupelwieser Promenade 5
A-3293 Lunz am See
E-mail: martin.kainz@donau-uni.ac.at

Streng kontrolliert
schmeckt's garantiert

www.ama.at

Nur die besten Hendln werden mit dem AMA-Gütesiegel ausgezeichnet.

Das AMA-Gütesiegel gibt es nur für Hühnerfleisch, das absolut frisch im Verkaufsgeschäft landet. Von Hühnern, die mit hochwertigem Mais und Getreide gefüttert wurden und die von Bauernhöfen stammen, bei denen Hygiene und Tiergesundheit an oberster Stelle stehen. **Sicher ist sicher.**

Geprüfte Qualität
AMA GÜTESIEGEL
AUSTRIA

- ✓ Ausgezeichnete QUALITÄT
- ✓ Nachvollziehbare HERKUNFT
- ✓ Unabhängige KONTROLLE

Herausforderung in der Geflügelfütterung: Aktuelle Erkenntnisse zur Verdaulichkeit von Stärke und Aminosäuren

Holger Kluth und Theresa Bormann

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE

Einleitung

Eine optimale Versorgung des landwirtschaftlichen Nutztieres mit Nährstoffen und Energie setzt neben Kenntnissen zum Bedarf gleichfalls eine Bewertung von Futtermitteln voraus. Beide Größen sind auf einander abzustimmen und grundsätzlich nach standardisierten und anerkannten Methoden zu bestimmen.

Gegenstand des Beitrages ist es, Ergebnisse aus aktuellen Untersuchungen zum Futterwert beim Nutzgeflügel, insbesondere im Hinblick auf die Verdaulichkeit von Stärke und Aminosäuren relevanter Futtermittel vorzustellen.

Allgemeines zur Messung der Verdaulichkeit

Die Verdaulichkeit der Stärke spiegelt sich üblicherweise in der Höhe des Gehaltes an umsetzbarer Energie (ME) dem energetischen Bewertungsmaßstab beim Geflügel wieder. Sie ist somit kein separater Parameter in der Futtermittelbewertung. Messungen hierfür werden ausschließlich in den Exkrementen vorgenommen. Im Gegensatz dazu basiert die Bewertung von Futterprotein bzw. Aminosäuren auf Messungen der praecaecalen (pc) Verdaulichkeit. Wie beim Schwein bereits eingeführt (GfE, 2005), etabliert sich dieser Parameter auch zunehmend im Geflügelbereich, was durch bereits bestehende Bewertungssysteme bzw. Futterwerttabellen Ausdruck findet (Ravindran et al. 2005).

Es muss vorweggenommen werden, dass die methodische Vielfalt bei der Durchführung von Messungen zur pc Verdaulichkeit von Aminosäuren groß ist. Dies sollte unbedingt bei einem Vergleich von Datensätzen berücksichtigt werden. Selbst bei Vernachlässigung der Diskussion, ob die „scheinbare", „wahre" bzw. „standardisierte" Verdaulichkeit den Futterwert am besten wiederspiegelt, bleibt die Vielfalt erhalten. Aus diesem Grund soll im Folgenden auf einige methodische Details eingegangen werden, die nach Ansicht der Autoren bedeutsam sind, wenn eine Bewertung von Angaben zur Verdaulichkeit von Aminosäuren vorgenommen werden soll.

Von Bedeutung ist insbesondere der Dünndarmabschnitt, aus dem der Chymus entnommen wird. In der Mehrzahl der Untersuchungen wird hierfür der Abschnitt zwischen Meckel' schem Divertikel und der Ileo-Caecal-Klappe herangezogen. Allerdings wird die Länge dieses Abschnittes sehr unterschiedlich bemessen (Kluth und Rodehutscord, 2009). Teilweise wird er in seiner Gesamtlänge genutzt, oder es werden Einkürzungen, mehr oder weniger willkürlich, sowohl proximal als auch terminal vorgenommen. Dieser Bereich reicht von 15 cm (Namkung und Leeson, 1999) bis nur 0,5 cm (Adedokun et al. 2014) und ist somit recht groß.

Aus eigenen Untersuchungen ist bekannt, dass sowohl beim Broiler (Kluth et al. 2005a, Bormann und Kluth, 2013a) als auch bei der Legehenne (Rezvani et al. 2008) im proximalen Drittel dieses Abschnittes die Verdauungsprozesse noch nicht abgeschlossen sind, da die ermittelten Verdaulichkeiten im

Vergleich zum medialen und terminalen Drittel signifikant niedriger waren. Es wird deshalb empfohlen den Chymus ausschließlich aus den letzten zwei Dritteln zu entnehmen.

Bei aller Genauigkeit diesen Abschnitt zu definieren, sei auf mögliche Effekte durch antiperistaltische Bewegungen im Intestinum hingewiesen (Sacranie et al. 2012). Retrograde Bewegungen *post mortem* können die Repräsentativität der Chymusprobe in Frage stellen.

Ein weiterer Einflussfaktor ist das Tieralter, dessen Bedeutung in der Literatur unterschiedlich diskutiert wird. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Ergebnisse aus der Untersuchung von Huang et al. (2005) an Broilern im Alter von 14, 28 und 42 Tagen zu nennen. Demnach wurden die essentiellen Aminosäuren aus Mais am 28. und 42. Tag signifikant besser verdaut als am 14. Tag. Ähnliches wurde für die Aminosäurenverdaulichkeit aus Sojaextraktionsschrot ermittelt. Im Gegensatz dazu wurden die meisten Aminosäuren aus Weizen am 14. Tag besser verdaut. Vergleicht man jedoch die mittlere Verdaulichkeit aller 8 geprüften Einzelkomponenten, so steigt die Verdaulichkeit mit zunehmendem Alter. Eigene Untersuchungen mit Sojaextraktionsschrot lassen ebenfalls eine steigende Verdaulichkeit mit zunehmendem Alter vermuten (Petzold et al. 2010). Weitere systematische Untersuchungen zur Klärung des Alterseinflusses sind daher erforderlich.

Zu beachten sind des Weiteren mögliche Effekte von Behandlungs- bzw. Verarbeitungsverfahren (Vermahlung/Konfektionierung) im Zuge der Mischfutterherstellung. Hier soll auf die umfangreichen Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Kamphues von der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover verwiesen werden.

Auch Untersuchungen von Parsons et al. (2006) zeigten, dass gröbere Maispartikel im Vergleich zu feineren beim 3 bis 6 Wochen alten Broiler eine Verringerung der Passagezeit bewirken, was mit einer verbesserten Nährstoffverdaulichkeit und Futterverwertung einherging. Zu beachten bleibt dabei, dass die Partikelgröße selbst durch anschließende Bearbeitungsprozesse wie dem Pelletieren beeinflusst werden kann, weshalb auch Wirkungen auf die Verdaulichkeit von Aminosäuren nicht ausgeschlossen werden können (Amerah et al. 2007). Es ist anzunehmen, dass dies für die Verdaulichkeit der Stärke gleichermaßen zutrifft. Von Vorteil wäre die Festlegung eines einheitlichen Vermahlungsgrades für eine standardisierte Futtermittelbewertung, da dies zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Messergebnisse führen würde.

Allerdings ergibt sich aus den veröffentlichten Daten hierzu ein eher uneinheitliches Bild. Crevieu et al. (1997) stellten fest, dass das Protein aus Erbsen (*Pisum sativum*) von Broilern bei feiner Vermahlung besser verdaut wird, als bei grober Vermahlung. Als Erklärung wird u.a. eine zu kleine Partikeloberfläche für eine effiziente Hydrolyse angenommen.

Aus Untersuchungen von Ganzer et al. (2007) ist bekannt, dass bei einem weniger stark vermahlenen Mais mit einer höheren Verdaulichkeit der Aminosäuren als bei einem stärker zerkleinerten zu rechnen ist. Die Unterschiede in der Aminosäureverdaulichkeit zwischen grober und feiner Vermahlung lagen zwischen 2 und 11 Prozentpunkten. Im Gegensatz dazu wurden bei Sojaextraktionsschrot bei stärkerem Vermahlungsgrad höhere Verdaulichkeiten gefunden. Auch hier variierten die Unterschiede bei einzelnen Aminosäuren zwischen 4 und 9 Prozentpunkten. Die mittlere Partikelgröße für den Mais und das Sojaextraktionsschrot betrug 0,96 und 1,01 mm (grob) bzw. 0,62 und 0,63 mm (fein).

Untersuchungen zur Verdaulichkeit von Aminosäuren

Eine kontinuierliche Futtermittelbewertung auf der Grundlage von Messungen zur Verdaulichkeit ist notwendig, um Einflüsse wie z.B. durch Sorte, Witterung oder Standortbedingungen auf den Futterwert erfassen zu können. Bisher sind jedoch nur wenig systematische Untersuchungen beim Geflügel zur sortenabhängigen Aminosäurenverdaulichkeit verfügbar.

Bei Erbsen (*Pisum sativum*) kann mit hohen Schwankungen gerechnet werden (Kluth et al. 2005b). Insgesamt lagen die Werte für die vier geprüften Sorten Avia, Laser, Madonna und Miami in einem weiten Bereich von 60 bis 91 %. Im Mittel ergaben sich 80, 81, 81 und 73 % (Avia, Laser, Madonna und Miami). Die signifikant geringere Verdaulichkeit der Sorte Miami konnte aber nicht eindeutig durch die Gehalte an Trypsininhibitoren oder Tanninen erklärt werden. Einflüsse spezieller NSP-Fraktionen wie zum Beispiel die der Galactooligosaccharide können nicht ausgeschlossen werden.

In einem gegenwärtig durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung geförderten Projekt werden umfangreiche Untersuchungen zur Charakterisierung des Futterwertes relevanter Futtergetreide für Pferd, Wiederkäuer, Schwein und Geflügel durchgeführt („GrainUP", www.grain-up.de). Ziel dieser Kooperation aus Forschungseinrichtungen und Vertretern der Wirtschaft ist es, in erster Linie aktuelle Daten zum Futterwert verschiedener Getreidesorten zu generieren.

Im Rahmen eines Teilprojektes wurden u.a. Messungen zur Bestimmung der Verdaulichkeit von Stärke und Aminosäuren aus Weizen bei Broilern und Puten durchgeführt (Bormann und Kluth, 2013b). Je Geflügelart wurden 12 Sorten geprüft. Der XP-Gehalt dieser Sorten variierte von 121 bis 162 g/kg und entsprach somit dem üblichen Spektrum der derzeit in der Praxis genutzten Sorten.

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit Broilern zeigten, dass die mittlere Verdaulichkeit aller essentiellen Aminosäuren, einschließlich Cystin, in einem Bereich von 82 % (Trp) bis 92 % (Met) schwankte (Tabelle 1). Ähnlich hohe Schwankungen wurden in der Verdaulichkeit für die einzelnen Aminosäuren ermittelt. So wurden für das Methionin Unterschiede zwischen den Sorten von maximal 12 Prozentpunkten gemessen. Alle Messungen erfolgten an 3 Wochen alten Broilern (männliche Tiere) bei einer Fütterung der Versuchsmischungen von 4-5 Tagen.

Tabelle 1: Praecaecale Verdaulichkeit von Rohprotein und Aminosäuren aus 12 Weizensorten bei 21 Tage alten Broilern (%)

	XP	Arg	Cys	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val
Min - Max	74 - 92	87 - 93	78 - 88	85 - 94	85 - 93	87 - 96	84 - 96	86 - 93	81 - 91	76 - 86	85 - 94
Mittel	86	90	84	90	89	91	92	89	86	82	89

Aus den Untersuchungen mit Puten resultierten ähnliche Ergebnisse, vergleicht man die mittlere Verdaulichkeit für das Rohprotein und die Aminosäuren (Tabelle 2). Der Schwankungsbereich war zwar bei der Mehrzahl der Aminosäuren geringer. Allerdings muss bei der Interpretation berücksichtigt werden, dass für diesen ersten Vergleich zunächst nur 5 von den insgesamt 12 zu prüfenden Sorten einbezogen werden konnten. Die Puten (gemischt-geschlechtliche Aufstallung) waren zum Zeitpunkt der Chymusentnahme ca. 4 Wochen alt.

Tabelle 2: Praecaecale Verdaulichkeit von Rohprotein und Aminosäuren aus 5 Weizensorten bei 4 Wochen alten Puten (%)

	XP	Arg	Cys	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val
Min - Max	87 - 91	89 - 94	74 - 88	86 - 92	88 - 94	87 - 94	92 - 97	90 - 94	81 - 91	81 - 88	85 - 91
Mittel	89	91	79	89	91	92	94	91	85	83	87

In beiden Versuchen wurde zusätzlich eine Xylanase eingesetzt, da aus früheren Untersuchungen mit weizenbetonten Rationen bekannt ist, dass die Verdaulichkeit sowohl des Rohproteins als auch der Aminosäuren verbessert werden kann (Steenfeldt et al. 1998; Hew et al. 1998; 1999). Darüber hinaus konnte in eigenen Untersuchungen mit Broilern für Weizen als Einzelfutter eine Verbesserung festgestellt werden, wenn eine Xylanase zugesetzt wurde (Kluth et al. 2009). Allerdings blieb die Variation in der Verdaulichkeit zwischen den 3 geprüften Sorten durch die Xylanasezulage unverändert. Für Lysin und Methionin schwankten die Werte von 83 bis 91 % sowie 85 bis 93 %.

Für die im Rahmen von „GrainUp" geprüften Weizensorten konnte kein signifikanter Effekt der Xylanase beim Broiler und der Pute ermittelt werden, wobei jedoch einzelne Aminosäuren mit niedriger Verdaulichkeit tendenziell höhere Verdaulichkeiten bei Xylanasezulage aufwiesen.

Bei caecaectomierten Legehennen fanden Siegert et al. (2013) ähnliche Schwankungsbreiten in der Verdaulichkeit von Aminosäuren für Triticale (Tabelle 3). Deutliche Unterschiede zwischen den Sorten wurden insbesondere für Isoleucin und Valin mit Differenzen von 13 und 11 Prozentpunkten gemessen. Der im Rahmen dieser Untersuchung zusätzlich geprüfte Effekt einer N-Spätdüngung der Triticale führte zwar zu einer Erhöhung der Gehalte an Aminosäuren, jedoch war dies teilweise mit einer signifikanten Abnahme in der Verdaulichkeit verbunden. Demnach verringerte sie sich für das Methionin und das Lysin um 5 und 3 Prozentpunkte.

Tabelle 3: Verdaulichkeit von Aminosäuren aus 3 Triticalesorten bei der caecaectomierten Legehenne (%)

	XP	Arg	Cys	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val
Min - Max	k.A.	82 - 86	79 - 84	68 - 81	77 - 85	66 - 72	74 - 81	81 - 86	70 - 78	77 - 80	68 - 79
Mittel		84	82	75	81	69	78	83	75	79	75

Untersuchungen zur Verdaulichkeit von Stärke

Ähnlich wie bei der Interpretation von Angaben zu pc verdaulichen Aminosäuren sollten auch bei einer Bewertung von Angaben zur Verdaulichkeit von Stärke Einflussfaktoren berücksichtigt werden. Wie bereits erwähnt, ist die Stärkeverdaulichkeit in erster Linie für den Energiegehalt des Futtermittels von Bedeutung. Diese wird auf Basis von „Verdaulichkeitsmessungen" in den Exkrementen bestimmt, was im Wesentlichen nach standardisierten Methoden erfolgt.

Hier soll insbesondere auf die Futterpartikelgröße eingegangen werden, da ihre Wirkung auf die Nährstoffverdaulichkeit zunehmend diskutiert wird.

Kilburn und Edwards (2001) fanden bei einer stärkeren Vermahlung von Mais in mehlförmigen Mischungen für den Broiler einen signifikanten Anstieg im Gehalt an ME. Allerdings konnte dieser Effekt nicht mit pelletiertem Futter bestätigt werden. Die mittlere Partikelgröße der Maiskomponente betrug 1051 (fein) und 3474 μm (grob). Auch in den Untersuchungen von Peron et al. (2005) wurde eine Erhöhung in der Stärkeverdaulichkeit aus Weizen ermittelt, wenn dieser stärker vermahlen war. Ebenso positiv beeinflusst war die umsetzbare Energie. Dagegen konnten Svihus et al. (2004) keine Wirkung auf die Stärkeverdaulichkeit aus Weizen feststellen, obwohl der Energiegehalt anstieg. Die Autoren vermuten, dass trotz der unterschiedlichen Vermahlungsart (Hammermühle *vs.* Walzenstuhl) die anschließende Pelletierung die Unterschiede zwischen den Partikeln wieder ausgleicht.

Betrachtet man das ganze Getreidekorn als „Partikel", so stellten Svihus und Hetland (2001) fest, dass bei einem Austausch von geschrotetem Weizen gegen das ganze Korn die Stärkeverdaulichkeit gleichfalls verbessert war. Hier wurden die ilealen Verdaulichkeiten in weizenbetonten Mischungen bestimmt.

Für die im Rahmen von „GrainUp" beim Broiler geprüften Sorten mit einem Anteil von 70 % in der Mischung wurde eine pc Stärkeverdaulichkeit in einem Bereich von 89 bis 98 % gemessen. Der Zusatz der Xylanase blieb im Mittel ohne signifikante Wirkung, was auf das hohe Niveau auch ohne Zulage zurückgeführt wird. Ein ähnlich hohes Niveau in der Verdaulichkeit konnte auch bei den Puten festgestellt werden, wobei die Stärkeverdaulichkeit bei einer Sorte durch die Xylanase signifikant verbessert wurde. Die ermittelten Verdaulichkeitswerte variierten zwischen 95 und 99 %. Allerdings gehen in diese erste Auswertung lediglich 6 von insgesamt 12 Sorten ein.

Die ermittelten Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Abdollahi et al. (2013) überein, die ebenfalls hohe pc Verdaulichkeiten der Stärke von 92 bis 97 % für weizenbetonte Mischungen (Mehl-/Pelletform) gemessen haben.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Kontinuierliche Untersuchungen zum Futterwert ermöglichen es, die Variabilität in der Nährstoffverdaulichkeit der Einzelfuttermittel zu beschreiben und damit vorhandene Angaben zum Futterwert zu überprüfen und gegebenenfalls der aktuellen Situation anzupassen. Die hier vorgestellten ersten Ergebnisse aus Untersuchungen mit Broilern und Puten zeigen, dass die pc Verdaulichkeit von Aminosäuren aus Weizen relativ hoch ist, aber in Abhängigkeit von der Sorte variieren kann. Gleiches trifft für die pc Verdaulichkeit der Stärke in weizenbetonten Mischungen zu.

Von besonderem Interesse für zukünftige Untersuchungen scheint eine Klärung des Einflusses von Futterpartikelgröße und Konfektionierung auf die Nährstoffverdaulichkeit.

Danksagung

Teile der vorgestellten Projektergebnisse wurden durch Mittel des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) gefördert. Die Projektträgerschaft erfolgt über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung.

Literatur

Abdollahi, M.R., Ravindran, V. and Svihus, B. (2013): Influence of grain type and feed form on performance, apparent metabolisable energy and ileal digestibility of nitrogen, starch, fat, calcium and phosphorus in broiler starters. Animal Feed Sci. Technol. 186, 193-203.

Adedokun, S.A., Jaynes, P., Abd El-Hack, M.E., Payne, R.L. and Applegate, T.J. (2014): Standardized ileal amino acid digestibility of meat and bone meal and soybean meal in laying hens and broilers. Poult. Sci. 93, 420-428.

Amerah, A.M., Lentle, R.G. and Ravindran, V. (2007): Influence of feed form on gizzard morphology and particle size spectra of duodenal digesta in broiler chickens. J. Poult. Sci. 44, 175-181.

Bormann, T. and Kluth, H. (2013a): Precaecal amino acid digestibility of diets rich in wheat depending on intestine section and xylanase supplementation in broilers. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 22, 105.

Bormann, T. and Kluth, H. (2013b): Untersuchungen zur praecaecalen Verdaulichkeit von Aminosäuren verschiedener Weizensorten beim Broiler. In: Zeyner, A., Stangl, G. I., Kluth, H., Kluge, H. und Bulang, M. (Hrsg.) 12. Tagung Schweine- und Geflügelernährung 12.-14. November 2013, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, 222-224.

Crévieu, I., Carré, B., Chagneau, A.-M., Guéguen, J. and Melcion, J.-P. (1997): Effect of particle size of pea (*Pisum sativum* L) flours on the digestion of their proteins in the digestive tract of broilers. J. Sci. Food Agric. 75, 217-226.

Ganzer, C., Kluth, H. and Rodehutscord, M. (2007): Effect of particle size on precaecal digestibility of amino acids from maize and soybean meal in broilers. Proc. 16th Eur. Symp. Poult. Nutr., August 26-30, 2007, Strasbourg, France, on CD 459-462.

GfE [Gesellschaft für Ernährungsphysiologie] (2005): Mitteilungen des Ausschusses für Bedarfsnormen - Standardisierte praecaecale Verdaulichkeit von Aminosäuren in Futtermitteln für Schweine - Methoden und Konzepte. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 14, 185-205.

Hew, L. I., Ravindran, V., Mollah, Y. and Bryden, W.L. (1998): Influence of exogenous xylanase supplementation on apparent metabolisable energy and amino acid digestibility in wheat for broiler chickens. Anim. Feed Sci. Technol. 75, 83-92.

Hew, L. I., Ravindran, V., Ravindran, G., Pittolo, P.H. and Bryden, W.L. (1999): The apparent metabolisable energy and amino acid digestibility of wheat, triticale and wheat middlings for broiler chickens as affected by exogenous xylanase supplementation. J. Sci. Food Agric. 79, 1727-1732.

Huang, K.H., Ravindran, V., Li, X. and Bryden, W.L. (2005): Influence of age on apparent ileal amino acid digestibility of feed ingredients for broiler chickens. Br. Poult. Sci. 46, 236-245.

Kilburn, J. and Edwards, Jr. H.M. (2001): The response of broilers to the feeding of mash or pelleted diets containing maize of varying particle sizes. Br. Poult. Sci. 42, 484-492.

Kluth, H. and Rodehutscord, M. (2009): Standardisierte Futterbewertung auf der Basis der Aminosäurenverdaulichkeit beim Geflügel. Übers. Tierernährg. 37, 1-26.

Kluth, H., Fricke, M. and Rodehutscord, M. (2009): Precaecal amino acid digestibility of different wheat cultivars in broilers. Arch. Geflügelkde. 73, 80-86.

Kluth, H., Mehlhorn, K. and Rodehutscord, M. (2005a): Studies on the intestine section to be sampled in broiler studies on precaecal amino acid digestibility. Arch. Anim. Nutr. 59, 271-279.

Kluth, H., Mantei, M., Elwert, C. and Rodehutscord, M. (2005b): Variation in precaecal amino acid and energy digestibility between pea (*Pisum sativum*) cultivars determined using a linear regression approach. Br. Poult. Sci. 46, 325-332.

Namkung, H. and Leeson, S. (1999): Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. Poult. Sci. 78, 1317-1319.

Parsons, A.S., Buchanan, N., Blemings, K., Wilson, M. and Moritz, J. (2006): Effect of corn particle size and pellet texture on broiler performance in the growing phase. J. Appl. Poult. Res. 15, 245-255.

Peron, A., Bastianelli, D., Oury, F.-X., Gomez, J. and Carre, B. (2005): Effects of food deprivation and particle size of ground wheat on digestibility of food components in broilers fed on a pelleted diet. Br. Poult. Sci. 46, 223-230.

Petzold, M., Georgi, C. and Kluth, H. (2010): Effect of age on the precaecal amino acid digestibility in broilers. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 19, 23.

Ravindran, V., Hew, L.I., Ravindran, G. and Bryden, W.L. (2005): Apparent amino acid digestibility of amino acids in dietary ingredients for broiler chickens. Anim. Sci. 81, 85-97.

Rezvani, M., Kluth, H., Elwert, C. and Rodehutscord, M. (2008): Effect of ileum segment and protein sources on net disappearance of crude protein and amino acids in laying hens. Br. Poult. Sci. 49, 28-36.

Sacranie, A., Svihus, B., Denstadli, V., Moen, B., Iji, P.A. and Choct, M. (2012): The effect of insoluble fiber and intermittent feeding on gizzard development, gut motility, and performance of broiler chickens. Poult. Sci. 91, 693-700.

Siegert, W., Boguhn, J., Maurer, H. P., Weiß, J. and Rodehutscord, M. (2013): Auswirkungen einer Stickstoffspätdüngung auf die Aminosäurenverdaulichkeit verschiedener Triticale-Genotypen bei caecectomierten Legehennen. In: Zeyner, A., Stangl, G. I., Kluth, H., Kluge, H. und Bulang, M. (Hrsg.) 12. Tagung Schweine- und Geflügelernährung 12.-14. November 2013, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, 218-221.

Steenfeldt, S., Hammershøj, M., Müllertz, A. and Fris Jensen, J. (1998): Enzyme supplemenation of wheat-based diets for broilers. 2. Effect on apparent metabolisable energy content and nutrient digestibility. Anim. Feed Sci. Technol. 75, 45-64.

Svihus, B., Kløvstad, K.H., Perez, V., Zimonja, O., Sahlström, S., Schüller, R.B., Jeksrud, W.K. and Prestløkken, E. (2004): Physical and nutritional effects of pelleting of broiler chicken diets made from wheat ground to different coarsenesses by the use of roller mill and hammer mill. Anim. Feed Sci. Technol. 117, 281-293.

Svihus, B. and Hetland, H. (2001): Ileal starch digestibility in growing broiler chickens fed on a wheat-based diet is improved by mash feeding, dilution with cellulose or whole wheat inclusion. Br. Poult. Sci. 42, 633-637.

Autorenanschrift

PD Dr. Holger Kluth und Theresa Bormann
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Professur für Tierernährung
Theodor-Lieser-Str. 11
D-06120 Halle (Saale)
E-Mail: holger.kluth@landw.uni-halle.de

Wenn nicht Übersee-Soja, was dann? Zwischenbilanz und Ausblick der Eiweißstrategie

Hermann Lindermayer

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Poing-Grub, DE

Einleitung

Hochwertige Eiweißfuttermittel sind knapp. Insbesondere in Ländern mit intensiver Tierhaltung (Europa) reicht das einheimische Futterprotein bei weitem nicht aus, um die bedarfsdeckende Versorgung der Tiere (v.a. Schwein, Geflügel) zu gewährleisten. Deswegen werden große Mengen an Sojabohnen und Sojaextraktionsschroten v.a. aus Nord- und Südamerika in die EU importiert. Die Produktion ist dort mittlerweile an räumliche, ökologische und evtl. soziale Grenzen gestoßen – siehe Fakten zu Soja. Und außerdem kommt hinzu - „der Verbraucher" will kein Übersee-Soja mehr. Letztendlich heißt die Kernfrage, Menschenernährung ohne oder mit mehr oder weniger Fleisch?

Fakten zu Soja (Quellen USDA, Bayer. Eiweißinitiative, Markus Wolf, DLG-Mitteilungen, Vortrag Grüne Woche 2014):

- Weltsojaproduktion (2013): 11,5 Mio. ha, 287 Mio. t Ertrag, Anbauzuwachs plus 150 % in den letzten 20 Jahren (1993-2013)
- Sojaverwendung: 80 % Tierfutter (Rind zu Schwein/Geflügel 50:50), 20 % menschliche Ernährung
- Weltweiter Handel: 109 Mio. t Sojabohnen (38 % der Erzeugung), 62 Mio. t Sojaschrot (33 % der Produktion)
- Größte Erzeuger: USA 89 Mio. t, Brasilien 88 Mio. t, Argentinien 55 Mio. t – Flächen und Erträge ausgereizt?
- Größte Sojaexporteure (Bohnen plus Schrot): Brasilien 59 Mio. t, USA 50 Mio. t, Argentinien 39 Mio. t
- Größte Sojaimporteure (Bohnen plus Schrot): China 69 Mio. t (plus 59 Mio. t seit 2002), EU 36 Mio. t (minus 5 Mio. t seit 2002), D ca. 7 Mio. t – 1,8 Mio. t Export, Bayern ca. 0,8 Mio. t Sojaschrot bzw. 0,2-0,3 % der Weltsojaernte)
- EU-Landimport 36 Mio. ha (3 x Ackerfläche von D, 1/3 der EU-Ackerfläche)
- EU-Sojaflächenfußabdruck 15 Mio. ha, D-Sojaflächenfußabdruck 2,8 bzw. nur Inlandsverbrauch 2,0 Mio. ha (Ackerfläche Bayern)
- Verzicht auf Sojaeinfuhren: D-Ackerflächenbedarf 2,0 Mio. ha (20 %), Bayern-Ackerflächenbedarf gesamt 0,4 Mio. ha (20 %) bzw. 0,15 Mio. ha nur für Schwein/Geflügel (7,5 %), Verdrängung von Mais, Getreide, Raps
- Die Wirtschaftlichkeit weltweit entscheidet!

Die Lösung des Problems „kein Übersee-Soja" scheint einfach zu sein, wir nehmen halt andere Eiweißfuttermittel – „heimisch", „ohne Gentechnik", „öko" und tragen so gleichzeitig zum Erhalt von Ökosystemen und zum sozialen Weltfrieden bei.

Leider stellt sich die Problemlösung als nicht so einfach da, wie von politischer Seite gedacht. Heimische (regionale) Eiweißalternativen in ausreichender Qualität und Quantität sowie wirtschaftlicher Konkurrenzfähigkeit zu dem eiweiß- und aminosäurestarken Importsoja sind nicht vorhanden:

- Die Anbauflächen der Körnerleguminosen sind bis auf Restflächen in der Ökolandwirtschaft geschrumpft. Die züchterischen Anstrengungen zur Verbesserung der Ertragssicherheit und des Futterwertes (Methionin, Aminosäureverfügbarkeit, antinutritive Inhaltsstoffe, Schmackhaftigkeit) sind gering. Leguminosenflächen sind keine Gülleflächen, folglich kommt in schweineintensiven bzw. biogasreichen Regionen mit hohen Pachtpreisen nur der Zukauf von Ackerbohnen, Erbsen, Süßlupinen in Frage. Leguminosenrationen brauchen wegen der schlechteren Eiweißausstattung und Eiweißverfügbarkeit immer eine „bessere" Aminosäureergänzung. Sie sind in der Regel rohproteinreicher und teurer. Außerdem macht der höhere Phosphorgehalt eine ausgeglichene P-Bilanz schwieriger (mehr Gülleflächenbedarf).
- Der Anbau von heimischen Sojabohnen nimmt nach Züchtung kälteresistenter, frühreifer Sorten und dem zunehmendem Verbraucherwunsch nach gentechnikfreien Lebensmitteln regional zu. In Bayern sind die Fortschritte allerdings trotz großer Anstrengungen seitens der Politik eher gering. Neben den Anbauflächen/-erträgen fehlt es vor Ort an standardisierten Aufbereitungsverfahren (schonende Dampfdruckbehandlung) zur Optimierung der Aminosäurelieferung (Trypsininhibitor). Die Leistung, die Futterkosten und die Gesamtwirtschaftlichkeit müssen vergleichbar sein mit „normalen" Sojarationen, die Preiswürdigkeit im Trog entscheidet über den Futtereinsatz.
- Die Rapsanbauflächen sind in den letzten Jahren wegen der Biodieselproduktion stark gestiegen. Rapsextraktionsschrot und Rapskuchen, die Reststoffe nach dem Ölentzug, fallen vermehrt an. Sie können aber wegen ihrer antinutritiven Inhaltsstoffe (Alkaloide/Bitterstoffe, Glukosinolate), der geringeren Aminosäuredünndarmverdaulichkeit, der wenigen Energie (Rapsschrot), viel Polyensäuren (Rapskuchen) und erhöhte Phosphoreinträge nicht alleiniger Eiweißträger in den Rationen sein. Je höher die Anforderungen ans Futter, desto weniger preiswürdig sind Rapsprodukte.
- Als „neues Proteinfuttermittel" werden immer mehr Getreideschlempen (flüssig, abgepresst, trocken) aus der Bioethanolherstellung angeboten. Die Einsatzmöglichkeiten in der Schweinefütterung sind wegen der geringen Energiedichte und Aminosäurekonzentration sowie –verdaulichkeit begrenzt. Es ist zu beachten, dass als Ausgangsmaterial keine Importmaissorten, die in der EU nicht zugelassen sind, Verwendung finden. Weiterhin dürfen Schlempen mit „ohne GVO"- Kennzeichnung keine GVO-Mikroorganismen aus der Bioethanolgewinnung enthalten. Bei Importschlempen ist auf Antibiotikafreiheit (teilweise zur Steuerung des Fermentationsprozesses) zu achten. Nach Aufheben der EU-Zuckermarktordnung 2017 denkt man über mehr Bioethanol aus der Zuckerrübe nach. Kann Zuckerrübeneiweiß ein wertvoller Aminosäurelieferant für die Schweine sein?
- Hochwertige Eiweißträger wie Fischmehl (Leerfischen der Meere), Kartoffeleiweiß (Bio), Milchprodukte (Humanernährung) sind entweder knapp oder werden direkt bzw. weiter aufbereitet („Proteinschnitzel") der menschlichen Ernährung zugeführt.
- Nebenprodukte aus der Lebensmittelverarbeitung wie Molke, Bierhefe werden technisch immer mehr auf aminosäure-/energiearme Reststoffe (rohaschereich, zuckerreich) reduziert, der Futterwert nimmt ab.
- Die ökologischen und ökonomischen Konsequenzen verschiedener Fütterungskonzepte mit unterschiedlichen Eiweißträgern in der Ration zeigen die Grenzen der heimischen Eiweißversorgung für den Einzelbetrieb aber auch die Flächennutzung und Wirtschaftlichkeit insgesamt auf (Tabelle 1).

Tabelle 1: Auswirkung verschiedener Fütterungskonzepte auf den Flächenbedarf sowie die Futter- und Gesamtkosten (relativ)

Fütterungssystem	Ration (%)	Flächenbedarf (ha)	Futterkosten (€)	Mehrkosten (€)
Getreide GVO-Soja Mifu (As, Phyt)	79,5 18 2,5	100	100	100
Getreide Non-GVO-Soja Mifu (As, Phyt)	79,5 18 2,5	100	106	103
Getreide Non-GVO-Soja Erbsen/Rapsschrot Mifu (As, Phyt)	66 12,5 19,1 2,4	182	104	104
Getreide Non-GVO-Soja Erbsen/Rapskuchen Mifu (-, -)	61 14 23 2	269	1 11	108

Fazit: Ohne Übersee-Soja kommt die Fleischerzeugung derzeit nicht aus, nach Alternativen wird in der Forschung und in der Praxis mit Nachdruck gesucht. Den Schweinehalter speziell in einer intensiven Veredlungsregion berühren allerdings mehr die fehlenden Energieflächen und Gülleausbringflächen bei Verzicht auf Getreideanbau, den Ackerbauer interessieren die Feldfrüchte mit den höchsten Deckungsbeiträgen bzw. die Substratmengen für die Biogasanlage.

Ansatzpunkte verschiedener „Eiweißstrategien/-projekte"

„Arbeitsschwerpunkt Bayerische Eiweißstrategie" 2008 - An der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft wurde ein Arbeitsschwerpunk „Eiweißstrategie" eingerichtet mit dem Auftrag, durch Forschung und Unterstützung der landwirtschaftlichen Beratung einen Beitrag zur Erhöhung des Anteils inländisch erzeugter Eiweißfuttermittel in der tierischen Erzeugung (Rinder, Schweine, Geflügel) zu leisten. In insgesamt 10 Forschungsprojekten wird nach Lösungen und Verbesserungen zur heimischen und GVO-freien Eiweißversorgung gesucht.

„Aktionsprogramm Heimische Eiweißfuttermittel" 2011 - Hier hat die Bayerische Staatsregierung folgende Ziele ausgegeben:

- unabhängiger werden von Eiweißfuttermittel-Importen aus Übersee, weil wir auf deren Produktion keinen Einfluss haben,
- mittelfristig den Einsatz von Importsoja in der Rinderhaltung halbieren,
- in der ökologischen Tierhaltung den Eiweißbedarf künftig ausschließlich aus heimischer Erzeugung decken.

„Verein Donau Soja" 2012 - Donau Soja soll ein Teil einer sich entwickelnden europäischen Eiweißstrategie und ein wichtiger Beitrag für eine nachhaltige Landwirtschaft und Lebensmittelproduktion werden. Die Ziele des Vereins sind die Förderung des Gentechnik-freien Sojaanbaus, der Aufbau von verlässlichen Liefer- und Wertschöpfungsketten, der Aufbau eines geförderten Züchtungsprogramms für GMO-freie Soja-Sorten. Die Donau Soja Richtlinien setzen Mindeststandards zur Verwendung des

„Donau Soja" Labels fest. Sie definieren die Herkunftsregion des Rohstoffes und des Saatguts und beinhalten Standards für Pflanzenschutz und Düngung, Qualität der Rohstoffe, Rückstände von GMO, Rückverfolgbarkeit und Kontrollsystem, Nachhaltigkeit.

„Eiweißpflanzenstrategie des BMEL 2013 - Netzwerk Sojaanbau" – Ziele - zur Versorgung mit nicht gentechnisch verändertem Soja beitragen, Bereicherung heimischer Fruchtfolgen und der Agrobiodiversität, Verbesserung der Kohlenstoffbilanz, Verringerung der Anwendung mineralischer Stickstoffdünger, (CO_2-Emissionen senken), Beitrag, die Ausweitung nicht nachhaltiger Erzeugungsmethoden in anderen Teilen der Welt zu bremsen. Ein zentraler Punkt des Demonstrationsnetzwerks „Soja" ist der Wissensaustausch zwischen Forschung, Beratung und Praxis. Daher werden über die gesamte Projektlaufzeit von allen Projektpartnern Maßnahmen wie Feldtage, Seminare oder Vortragsveranstaltungen zum Anbau und der Verwertung von Soja durchgeführt. Der heimische Sojaanbau wird mit verschiedenen Maßnahmen angekurbelt, ein bundesweites Netzwerk von Demonstrationsbetrieben wird aufgebaut. Im Netzwerk werden 117 ökologisch und konventionell wirtschaftende Betriebe aus 11 Bundesländern eingebunden; der Schwerpunkt liegt in Bayern und Baden-Württemberg. Auf „Leuchtturmbetrieben" werden aktuelle Erkenntnisse aus der Forschung in die Praxis umgesetzt und in Demonstrationsanlagen vorgestellt. Weitere Betriebe liefern schlagbezogene Daten zum optimalen Anbau sowie Fruchtfolgen und Vergleichs- und Nachfrüchte. Die Daten werden zentral analysiert und informieren über Wirtschaftlichkeit, Vorfruchtwirkung und Ökosystemleistung der Sojabohne. Im Projekt werden zudem drei modellhafte Wertschöpfungsketten entwickelt, in denen vom Feld bis zum Futter oder Lebensmittel alle maßgebenden Stationen identifiziert und analysiert werden.

„Aktionsprogramm Heimische Eiweißfuttermittel" – Ziele im Projektteil Schweinefütterung – seit 2011:

1. Reduzierung des Eiweißfutterverbrauchs (N-reduzierte Rationen, Phasenfütterung)
2. Eiweißfuttermittel gezielt nutzen – optimieren (Futtererhebungen, -aufbereitung, -analytik)
3. Weiterentwicklung der Fütterungsberatung (Fütterungsstrategien, „Stärke/Schwächenprofil", „Futternetzwerk")

Die folgende Zwischenbilanz zur „heimischen" Eiweißversorgung bezieht sich auf die Schweinefütterung in Bayern, - was wurde gemacht, was wurde erreicht.

Zwischenbilanz

In dem Teilprojekt Schweinefütterung I des Aktionsprogrammes „Heimische Eiweißfuttermittel" (Laufzeit 01.04.2011-31.03.2013) sollten mittels maximal N-reduzierten Rationen und Multiphasenfütterung zunächst so viel als möglich teure Eiweißfutter bzw. Importsojaschrot eingespart werden. Dazu liefen 15 Exaktversuche in Schwarzenau, die hochgerechnet auf die bayer. Schweineproduktion ein Einsparpotential an Importsoja aus Übersee von ca. 50.000-100.000 t erbringen könnten (Beispiele):

- Multiphasenfütterung bei Ferkeln und Mastschweinen durch das schrittweise Verschneiden des Anfangsfutters mit jeweils 3 bzw. 4 % Weizen pro Woche mehr;
- Optimierung der eiweißreduzierten Rationen durch aminosäurereichere Mineralfutter bei Ferkeln und Mastschweinen;
- Aufzeigen des tatsächlichen Eiweiß-/Aminosäurebedarfs und Vermeidung von Luxuskonsum – Eber, Mastschweine, Ferkel;
- Test alternativer, heimischer Eiweißträger beim Ferkel (Rapsschrot, Ackerbohnen, Rapskuchen, Donausoja), Mastschwein (Rapsschrot), bei der Zuchtsau (Rapsschrot) als Ersatz von GVO-Überseesoja;

- Bewertung von ca. 160 Nebenprodukten aus der Energiegewinnung (Schlempe, Rapsprodukte usw.) und aus der Lebensmittelherstellung (Milchprodukte, Brauereiprodukte, Müllereiprodukt usw.) auf ihre Futtertauglichkeit und als Sojaersatz.

Die Umsetzung der Versuchsergebnisse in die Praxis ist, begünstigt durch die drastisch gestiegenen Sojapreise in 2012/13 bzw. den großen Preisabstand Soja – Getreide 2013/14 relativ gut gelungen. Aus den Rationsberechnungen der Ringassistenten, den neuen Mineralfutterkonzepten mit mehr freien Aminosäuren und den Analysen der Mischungen lässt sich bis jetzt für Bayern eine nachhaltige Sojaeinsparung von ca. 15-20 % (50.000 t) ableiten. Weitere Reserven sind möglich, der Sojaeinspareffekt wird aber bei zunehmendem Aufwand immer geringer.

Schnellanalyseverfahren zur Bestimmung der Aminosäuregehalte und deren Verfügbarkeit in Schweinefuttermitteln sollten die bedarfsgerechte und umweltschonende Rationsoptimierung unterstützen. Das System AminoNIR und AminoRED im Labor Grub ging ab Juli 2013 in die Praxisanwendung. Bisher wurden über 2000 Getreideproben aus dem Erntejahr 2013 auf Rohnährstoff- und Aminosäuregehalte untersucht (zum Vergleich: 2011 insgesamt nur 725 Proben aus schweinehaltenden Betrieben, davon nur 31 mit Aminosäureanalysen). Die Kenntnis der Aminosäuregehalte in den Rohstoffen trägt enorm zur bedarfsgerechten Schweinefütterung bei und kann den Sojaverbrauch sowie die Futterkosten stark reduzieren. An einem Mastbetrieb mit lysinreichem Weizen lassen sich die Zusammenhänge gut veranschaulichen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Sojaverbrauch, Futterkosten und Gülle-Stickstoff eines Schweinemastbetriebes nach Tabellenwert, Futteranalyse und Optimierung der Beratung

Max Fütterer (3000 erzeugte Mastschweine)				
Kriterien		Tabelle	webFuLab	
		1-phasig	1-phasig	3-phasig
Soja44 - Verbrauch	dt	1640	1490	869
Futterkosten	€	226.030	221.922	204.867
Gülle-N	kg	9.420	9.140	7.220

Auch die Tauglichkeit der in Bayern vorhandenen Aufbereitungsverfahren (Expander, Rösten) wurde in Versuchen und analytisch überprüft- die Ergebnisse waren nicht sehr zielführend. Die Bestimmung der Aminosäuredünndarmverdaulichkeiten der bayerischen Sojaprodukte inkl. Donausoja läuft. Damit sollten dann exaktere Grundlagenwerte für die bedarfsgerechte Rationsformulierung auch in der Ökoproduktion zur Verfügung stehen.

In Felderhebungen wurden durch die Ringassistenten die in Bayern vorhandenen und/oder verfütterten Eiweißfuttermengen und –qualitäten erfasst:

- Für ca. 180 Eiweißfutter (z.B. Molken, Bierhefe) wurden aktuelle Futterdatenblätter mit fütterungsrelevanten Inhaltswerten und speziellen Hinweisen zur Verfütterung erarbeitet;
- Die in Bayern vorhandenen Mineralfutter wurde durch die Fütterungsexperten erfasst und allen Beratern ins Futterprogramm ZifoWin gestellt;
- Ziel ist die Etablierung eines online-Futternetzwerkes (FutterRing) zur bestmöglichen Nutzung der bayerischen Futterressourcen.

Aus den Futterbilanzen (ca. 700 erfasste Betriebe) sollten Stärke/Schwächen-Fütterungsprofile (z.B. Eiweißfutterverbrauch des Betriebes im Vergleich zum besseren Viertel der Betriebe) entwickelt werden. Die EDV-technische Anwendung dazu ist zusammen mit dem LKV in Arbeit:

- Für jeden Betrieb wurden Stärken/Schwächen-Profile der Fütterung erstellt zum Erkennen von Schwachstellen (z.B. zu hoher Soja-/Eiweißverbrauch);
- Die Ringassistenten sollten so Hilfestellung für eine „höherwertige" Beratung bekommen.

LKV/LFL-Analyse der Schweinefütterung

LKV	**Schweinemast 2013**	LfL Tierernährung
VST: 99	M. Muster Musterweg 1 99999 Musterdorf	30.10.2013
Betrieb: 999		

Schnellübersicht

	Ihr Betrieb	**Alle Betriebe (....)**		**- 25 %**	**+ 25 %**
Erzeugte Ms	1350	2129		888	3545
Futterfläche ha	50,2	64,5		55,1	112,9
Erz. Ms/ha	17,5	37,9		12,9	31,3
Profil	**Schwächen**	**Stärken**		**Betrieb**	**Alle (....)**
Zuwachs kg				88,5	89,7
Fleischanteil %				59,6	58,7
Zunahmen g				804	771
Futter/Ms kg				256	264
Futteraufwand kg				2,89	2,94
Futteraufwand €				0,77	0,64
ME/kg Futter MJ				13,4	13,1
ME-Aufwand MJ				38,7	38,5
R-faser/kg Fut. g				28	34
R-prot./kg Fut. g				187	175
Prot.-Aufwand g				540	515
Lys/kg Futter g				9,4	9,0
Lys-Aufwand g				27,2	26,5
P/kg Futter g				4,3	4,5
P-Aufwand g				13,0	13,2
Getreide/ha dt				88,4	77,0
Gülle/ha m³				32,3	28,2
Gülle-N/ha kg				122,1	109,6
Gülle-P_2O_5/ha kg				54,4	56,3
	-10% -25%	+25% +10%			

Abbildung 1: Stärken-/Schwächen-Profil der Berater zur Reduzierung des Eiweißfutterverbrauchs, der Futterkosten und der Umweltbelastung

Fazit: Auf Übersee-Soja konnte teilweise verzichtet werden. Die bisherigen Fortschritte wurden allerdings ausschließlich durch Optimierung der Futterrationen (N-Reduzierung durch Zulage freier Aminosäuren) und der Fütterungsstrategien (Phasenfütterung) erreicht. Heimische Eiweißfuttermittelmengen wurden eher weniger (Ackerbohnen-, Erbsenanbau minus 25 %, Sojaanbau stagniert auf niedrigem Niveau), wirksame Qualitätsverbesserungen sind nicht in Sicht. Die Verwendung von ausreichend vorhandenem Rapsextraktionsschrot (ca. 50.000 t Export aus Bayern) im Austausch gegen Sojaschrot wird in der Schweinefütterung nur dann praktiziert, wenn bei guten Rapsschrotqualitäten die Preiswürdigkeit inkl. Mehrarbeit, Extralager, Ölzulagen usw. stimmt und die sinkende Energiekonzentration (höherer Futteraufwand) bzw. der höhere P-Austrag aufgefangen werden können. Würde die Hälfte des bayrischen Rapsschrotüberhangs in die Schweinefütterung gelangen, dann könnten zu den oben genannten 50.000 t Sojaersparnis noch einmal 20.000 t weniger Import-Sojabedarf kommen (insgesamt minus 23 % Sojaimport).

Ausblick – aus Sicht der Schweinefütterung

Für weitere 2 genehmigte Projektjahre lassen sich aus der Ist-Situation (s.o.) folgende Aufgaben ableiten:

- Forschung – Austesten weiterer heimischer/neuer Eiweißfutter und Optimierung der Aufbereitungstechniken;
- Felderhebungen – Etablierung des Stärken-/Schwächen-Profil und des FutterRing als Dauerberatungsinstrument für die Verbundberatung, sinnvolle Verwendung vorhandener Ressourcen;
- Beratung – „Fitmachen" der Fütterungsexperten und der Ringberater für komplexe Beratungsfragen zur Fütterung mit Berücksichtigung des Stoffkreisläufe, der Betriebsentwicklung und der nachhaltigen Schweinefütterung, Steigerung der Fütterungseffizienz.

Die Eiweißinitiative trägt Früchte, nicht nur wegen der hohen Sojapreise, sondern auch wegen der erfolgreichen „neuen" Beratungskonzepte im Fütterungsbereich. Ein weiteres, nicht unerhebliches Einsparpotential erschließt sich, wenn die Landwirte die Aminosäureschnellanalyse „AminoNIR" für das hofeigene Getreide und für wichtige Zukaufsfutter (Sojaschrot, Rapsschrot) ab 2014 verstärkt nutzen.

Das Einsparungsziel zu Beginn der bayerischen Eiweißinitiative (ca. minus 10 % Importsoja im Vergleich zu 2010) beim Schwein wird höher gesteckt auf minus 20-25 % weniger Überseesoja in 2014!

Es wurde im Projektteil Schweinefütterung des Aktionsprogrammes Heimische Eiweißfuttermittel auf maximale Verknüpfung der Bereiche Forschung/Felderhebung/Beratung und „Durchlässigkeit" der Ergebnisse geachtet. So können z.B. zur Beratung die Schnellanalysen aus der Forschung und die Daten der Felderhebung parallel und betriebsbezogen genutzt werden. Die Forschung profitiert vom Futternetzwerk oder auch von der Rückmeldung der Erfahrungen aus den Arbeitskreisen. Das Ziel ist ein möglichst großer Beratungserfolg. Am Ende des Projektes sollte sowohl bei den Beratern als auch bei den Landwirten die Einsicht vorhanden sein, „am Eiweißfutter muss so weit als möglich und immer gespart werden".

Schlussfolgerungen

Auf Übersee-Soja kann mangels heimischer Alternativen momentan nicht verzichtet werden. Ein Einsparpotential durch weitere Futteroptimierungen und Leistungssteigerungen von ca. 25 % erscheint als realistisch. Der Ansatz, hochwertige Eiweißträger für die Monogasterfütterung im Land zu erzeugen, muss sich ökologisch (N-/P-Belastung) und ökonomisch (Flächenverbrauch, Preiswürdigkeit) „rechnen".

Literatur

González-Vega, J. C., Kim, B. G., Htoo, J. K., Lemme, A., Stein, H. H. (2011): Amino acid digestibility in heated soybean meal fed to growing pigs. *J. Anim. Sci. 89, 3617-3625*

Härle, C., Lettenmayer, K. (2010) Sojabohnen aus Oberbayern. SuB 1-2/10, III 23-III 26

Lindermayer, H., Propstmeier, G., Preißinger W. (2010) Andere Werte für Sojaschrot – Gehalt und Aufbereitung bestimmen den Einsatz. Bayer. Landw. Wochenblatt 33, 64 – 65

Lindermayer, H., Propstmeier, G., Preißinger W. (2013) Aktionsprogramm „Heimische Eiweißfuttermittel II", Qualitative und quantitative Optimierung der Eiweiß- bzw. Aminosäureversorgung in der Schweinefütterung, Zwischenbericht 3, 1-80

Messerschmidt, U., Eklund, M., Rist, V. T. S., Rosenfelder, P., Spindler, H. K., Htoo, J. K., Mosenthin, R. (2012) Standardized ileal amino acid digestibilities in fine and coarse particles of an over-heated soybean meal for grower pigs. Proc. Soc. Nutr. Physiol., 21, 38

Mosenthin, R., Jezierny, D. (2010) Antinutritional factors in protein feedstuffs: gastrointestinal effects and strategies to compensate for these effects. In: Schedle, K., Kraft, M., Windisch, W. M. (Hrsg.) 9. BOKU-Symposium Tierernährung, Wien, 13-26.

Osborne, T. B., Mendel, L.B. (1917) The use of soybeans as food. J. Biol. Chem. 52, 369.

Pontif, J. E, Southern, L. L., Coombs, D. F., McMillin, K. W., Bidner, T. D., Watkins, K. L (1987) Gain, feed efficiency and carcass quality of finishing swine fed raw soybeans. J. Anim. Sci. 64, 177-181.

Preißinger, W, Lindermayer, H., Propstmeier, G., Bauer, A. (2010) Rohe Vollfettsojabohnen in der Ferkelaufzucht und Mast. In M. Gierus, H. Kluth, M. Bulang und H. Kluge (Hrsg): 11. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 23.-25.November 2010 Lutherstadt Wittenberg, 9 -11.

Preißinger, W., Lindermayer, H., Propstmeier, G. (2013): Einsatz von Rapsextraktionsschrot in der Ferkelfütterung. In: Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung, Fulda 2013, Herausgeber: Verband der Landwirtschaftskammern, Bonn, 135-138

Preißinger, W., Lindermayer, H., Propstmeier, G., Wiltafsky, M. K., Htoo, J. K. (2013): Überhitzter Sojaextraktionsschrot in der Schweinemast. In A. Zeyner, I. Stangl, H. Kluth, H. Kluge und M. Bulang (Hrsg.): 12. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 12.-14.November 2013 Lutherstadt Wittenberg, 35-37.

Autorenanschrift

Dr. Hermann Lindermayer
Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft
Prof.-Dürrwaechter-Platz 3
D-85586 Poing-Grub
E-Mail: Hermann.Lindermayer@LfL.bayern.de

Rapsextraktionsschrot, Donau Soja und Ackerbohnen in der Ferkelfütterung, Auswirkungen auf Futteraufnahme und Leistung

Wolfgang Preißinger, Hermann Lindermayer und Günther Propstmeier

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Grub/Schwarzenau, DE

Einleitung

Im Rahmen des Aktionsprogrammes „Heimische Eiweißfuttermittel" wird in Bayern der Einsatz von Rapsextraktionsschrot, großkörnigen Körnerleguminosen (Erbsen, Ackerbohnen) aber auch von heimisch angebauten Sojabohnen in Rationen für Schweine propagiert. Unter „heimisch" werden im weiteren Sinn auch die im Donauraum angebauten Sojabohnen verstanden (Verein Donau Soja, 2013). Nach verschiedenen Fütterungsversuchen mit in Bayern angebauten und unterschiedlich aufbereiteten Sojabohnen (Preißinger et al., 2010, Preißinger et al., 2011) sollten in vorliegender Untersuchung Donau Soja, Ackerbohnen und Rapsextraktionsschrot in einem Ferkelfütterungsversuch mit konventionellem Sojaextraktionsschrot aus Übersee verglichen werden. In der Kontrollgruppe diente HP-Soja als alleiniges Eiweißfuttermittel, in der Raps- und Ackerbohnengruppe wurde HP-Soja als zweite Eiweißkomponente eingesetzt. Folgende Fragen sollten geklärt werden:

- Welche Leistungen (Futteraufnahme, Zunahmen, Futteraufwand) werden durch den Austausch von HP-Soja durch Donau Soja (Herkunft BAG Ölmühle BetriebsGmbH, Güssing, Burgenland) bzw. durch anteiligen Austausch von HP-Soja durch Rapsextraktionsschrot und Ackerbohnen erzielt?
- Wie hoch liegen die Futterkosten?
- Wie hoch ist der N-/P-Eintrag in die Umwelt?

Material und Methoden

Der Fütterungsversuch mit Ferkeln wurde am Lehr-, Versuchs- und Fachzentrum Schwarzenau bis zu einem angestrebten Vermarktungsgewicht von ca. 30 kg LM durchgeführt. Für den Versuch wurden 80 Ferkel der Rasse Pi x (DL x DE) nach Lebendmasse, Abstammung und Geschlecht ausgewählt und gleichmäßig auf folgende vier Gruppen aufgeteilt.

- Kontrolle, Sojaextraktionsschrot mit 48 % Rohprotein (= HP-Soja)
- Sojaextraktionsschrot aus dem Anbaugebiet Donau (= Donau Soja)
- Raps- + Sojaextraktionsschrot mit 48 % Rohprotein (= Raps)
- Ackerbohnen + Sojaextraktionsschrot mit 48 %Rohprotein (= Ackerbohnen)

Die Ferkel wurden in 8 Buchten zu je 10 Tieren auf Kunststoffspalten ohne Einstreu gehalten. Sie waren zu Versuchsbeginn im Durchschnitt 32 Tage alt und wogen 9,4 kg. Pro Behandlungsgruppe wurden 2 Buchten gemischtgeschlechtlich aufgestallt. Die Futterzuteilung erfolgte über Abrufstationen mit integrierter Futterverwiegung für das Einzeltier (Fa. Schauer). Die Lebendmassen wurden wöchentlich am Einzeltier erfasst. Die Ferkelaufzuchtfutter (FAF I, FAF II) wurden in der Versuchsmahl- und Mischanlage der Stoffwechselanlage Grub hergestellt und pelletiert. Die Futteruntersuchen wurden im

Labor der Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub (AQU 3) nach VDLUFA-Richtlinien durchgeführt (VDLUFA, 2012). Die Phosphorausscheidungen wurden aus der Differenz Aufnahme mit dem Futter und Ansatz je kg Zuwachs ermittelt.

Die Versuchsrationen (Tabelle 1) basierten auf Weizen, Gerste, den zu testenden Eiweißfuttermitteln sowie einem handelsüblichen Mineralfutter. Sie waren bei den wesentlichen Parametern vergleichbar. Zur Energieaufwertung wurde ein Gemisch aus Soja- und Rapsöl verwendet. Alle Futter wurden mit 1 % Fumarsäure stabilisiert. Die gewünschten Aminosäurengehalte auf Basis dünndarmverdaulich (10,3 g dvd Lysin bis 18 kg LM; 9,8 g dvd Lysin bis 32 kg LM) im Ferkelaufzuchtfutter I bzw. II wurden durch entsprechende Dosierungen der Eiweißfutter im Austausch gegen Getreide erreicht.

Tabelle 1: Rationen und analysierte Inhaltsstoffe (88 % T)

Futter/		HP-Soja		Donau Soja		Raps		Ackerbohnen	
Inhaltsstoffe		FAF I	FAF II	FAF I	FAF II	FAF I	FAF II	FAF I	FAF II
Weizen	%	38	38	40	40	36	40	37	35,5
Gerste	%	38	39,5	34	35,5	36	30	35,5	38
Soja-/Rapsöl	%	1	1	1	1	2	2	1	1
HP-Soja	%	18	17	--	--	15	9,5	15,5	13
Donau Soja	%	--	-	20	19	-	--	--	--
Rapsextr.-Schrot	%	--	-	--	--	6	14	--	--
Ackerbohnen	%	--	-	--	--	-	--	6	8
Mineralfutter [1)]	%	4	3,5	4	3,5	4	3,5	4	3,5
Fumarsäure	%	1	1	1	1	1	1	1	1
Eiweißfutteranteil	%	18	17	20	19	21	23,5	21,5	21
Kosten/dt[2)]	€	32,02	31,50	35,24	33,96	32,74	32,00	31,50	30,62
ME	MJ	13,51	13,57	13,52	13,53	13,52	13,52	13,53	13,46
Rp	g	173	167	169	166	171	169	169	164
Lys	g	12,4	11,4	12,8	11,4	12,5	10,7	12,4	11,4
M+C	g	6,8	6,5	7,3	6,6	7,3	6,7	6,7	6,5
Thr	g	7,4	7,0	7,5	7,1	7,6	7,3	7,5	7,2
Trp	g	2,4	2,4	2,4	2,3	2,4	2,3	2,3	2,1
Ca	g	7,2	6,4	7,2	6,4	7,5	7,2	7,2	6,4
P	g	5,2	5,0	5,2	5,0	5,6	6,0	5,2	5,0

[1)] 15,5 % Ca; 3,5 % P; 5 % Na; 10 % Lys; 3 % Met; 3,5 % Thr; 0,4 % Trp
[2)] HP-Soja 50 €/dt, Donau Soja 60 €/dt, Rapsex.schrot 35 €/dt, Ackerbohnen 25 €/dt

Ergebnisse und Diskussion

In 6 Versuchswochen (41 Tage) wurde eine Lebendmasse von knapp 32 kg erreicht. Mit täglichen Zunahmen von 550 g (HP-Soja), 548 g (Raps) und 543 g (Donau Soja) lagen die Leistungen in den einzelnen Fütterungsgruppen eng beieinander. In der Gruppe mit Ackerbohnen wurden nur 510 g tägliche Zunahmen verzeichnet (Tabelle 2). Die Unterschiede zu den anderen Behandlungsgruppen waren statistisch nicht abzusichern.

Mit 902 g pro Tier und Tag war der Futterverbrauch in der Gruppe Raps signifikant höher als in den Gruppen mit HP-Soja (816 g), Donau Soja (829 g) und Ackerbohnen (783 g). Daraus resultierte mit 1,65 kg Futter je kg Zuwachs auch der ungünstigste Futteraufwand in der Rapsgruppe. Der günstigste Futteraufwand mit 1,49 kg/kg Zuwachs wurde in der Kontrollgruppe mit HP-Soja verzeichnet. Die Werte für Donau Soja bzw. Ackerbohnen lagen bei 1,53 bzw. 1,55 kg Futter pro kg Zuwachs.

In einem vorher durchgeführten Ferkelfütterungsversuch unter praxisnahen Bedingungen (Gruppenfütterung, Kurztrog mit Sensor;) und gleichen Anteilen an Rapsextraktionsschrot in den Versuchsmi-

schungen wurden bei Raps in der Tendenz sogar etwas höhere Leistungen (527 g gegenüber 510 g tägliche Zunahmen) festgestellt. Auch der Futteraufwand war mit 1,53 gegenüber 1,60 kg je kg Zuwachs in der Rapsgruppe günstiger (Preißinger et al., 2013).

Tabelle 2: Aufzuchtleistungen – Einzeltierfütterung (LSQ-Werte)

Gruppen	**-**	**HP-Soja**	**Donau Soja**	**Raps**	**Ackerbohnen**	**Sign.**
Tierzahl	n	20	20	20	20	-
Gewichte						
Beginn - Versuch	kg	9,5	9,5	9,5	9,0	0,251
Ende – Versuch	kg	32,0	31,8	32,0	29,9	0,218
Zuwachs						
Gesamt	kg	22,5	22,3	22,5	20,9	0,334
Zunahmen						
Anfang/Phase 1	g	406	383	390	352	0,315
Ende/Phase 2	g	701	711	714	675	0,547
Gesamt (10-30 kg LM)	g	550	543	548	510	0,334
Futterverzehr/Tag						
Anfang/Phase 1	g	533	551	569	477	0,147
Ende/Phase 2	g	1113[a]	1122[a]	1252[b]	1104[a]	0,014
Gesamt (9-32 kg LM)	g	816[a]	829[a]	902[b]	783[a]	0,042
Futteraufwand (kg Futter/kg Zuwachs)						
Anfang/Phase 1	kg	1,31	1,45	1,47	1,39	0,152
Ende/Phase 2	kg	1,60[a]	1,58[a]	1,77[b]	164[a]	0,011
Gesamt (10-30 kg LM)	kg	1,49[a]	1,53[a]	1,65[b]	1,55[a]	0,026
Futterverwertung (g Zunahmen/kg Futter)						
Anfang/Phase 1	g	766	711	696	749	0,191
Ende/Phase 2	g	628[a]	638[a]	580[b]	612[a]	0,037
Gesamt (10-30 kg LM)	g	674[a]	661[a]	618[b]	652[a]	0,067
Energieverzehr/Tag						
Anfang/Phase 1	MJ	7,2[a]	7,5[a]	7,7[a]	6,4[b]	0,029
Ende/Phase 2	MJ	15,1[a]	15,2[a]	16,9[b]	14,9[a]	0,013
Gesamt (10-30 kg LM)	MJ	11,1	11,2	12,2	10,6	0,188
Energieaufwand (MJ ME/kg Zuwachs)						
Anfang/Phase 1	MJ	17,7	19,6	19,9	18,8	0,057
Ende/Phase 2	MJ	21,7[a]	21,4[a]	24,0[b]	22,1[a]	0,010
Gesamt (10-30 kg LM)	MJ	20,2[a]	20,7[a]	22,3[b]	20,9[a]	0,014
Energieverwertung (g Zunahmen/MJ ME)						
Anfang/Phase 1	g	57	53	51	55	0,188
Ende/Phase 2	g	46[a]	47[a]	43[b]	45[a]	0,043
Gesamt (10-30 kg LM)	g	50	49	46	48	0,075
Ausscheidungen						
Phosphor pro Ferkel	g	48	51	66	67	-
Phosphor pro Zuwachs	g	2,1	2,3	3,2	2,9	-
Futterkosten						
pro Ferkel	€	11,60	12,69	12,44	12,00	-
pro 1 kg Zuwachs	€	0,52	0,57	0,55	0,57	-

Bei Einsatz von Donau Soja bestätigten sich die Ergebnisse eines unter Praxisbedingungen durchgeführten Versuches, wo tägliche Zunahmen von 529 g (HP-Soja) und 516 g (Donau Soja) erzielt wurden. Wie auch in der vorliegenden Untersuchung waren die Futterkosten bei Einsatz von Donau Soja deutlich höher (Preißinger et al., 2014; vorliegender Tagungsband).

Pro kg Zuwachs wurden 2,1 g (HP-Soja), 2,3 g (Donau Soja), 3,2 g (Raps) und 2,9 g (Ackerbohnen) Phosphor ausgeschieden. Damit ist bei der Rapsschrotfütterung neben dem geringeren Energiegehalt (höhere Ölzulage) auch der höhere Phosphorgehalt zu berücksichtigen (LfL, 2012). Es ist zu diskutieren, ein im P-Gehalt reduziertes bzw. P-freies Mineralfutter bei hohen Anteilen von Rapsextraktionsschrot in der Ration einzusetzen.

Im Versuch lagen die Futterkosten in der Gruppe mit HP-Soja am niedrigsten, gefolgt von der Ackerbohnengruppe (ca. +0,4 €/Ferkel) und der Rapsgruppe (+0,8 €/Ferkel). Mit über 1 € höheren Futterkosten pro Ferkel lag die Gruppe mit Donau Soja hinten.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In einen Ferkelaufzuchtversuch wurden HP-Soja aus Übersee, Donau Soja, Rapsextraktionsschrot und Ackerbohnen in rechnerisch gleichwertigen Rationen miteinander verglichen. In der Ackerbohnengruppe führte der verminderte Futterverzehr zu ca. 40 g geringeren täglichen Zunahmen. In der Gruppe mit Rapsextraktionsschrot wurde am meisten Futter verbraucht, jedoch nicht effizient verwertet. Bei den getesteten Alternativen zu Sojaextraktionsschrot aus Übersee ist bei gegebenen Preisen mit höheren Futterkosten zu rechnen. Mit Donau Soja ließen sich zwar vergleichbare Leistungen wie mit HP-Soja erzielen, der Mehrpreis (ca. 10 €/dt) schlägt aber mit ca. 1 €/Ferkel zu Buche. Bei gegebenen Futtermittelpreisen ist der Einsatz von Donau Soja bei konventioneller Vermarktung unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten nicht sinnvoll.

Literatur

LfL 2012: LfL-Information, Futterberechnung für Schweine, 19. unveränderte Auflage

Preißinger, W., Lindermayer, H., Propstmeier, G., Bauer, A. 2010: Rohe Vollfettsojabohnen in der Ferkelaufzucht und Mast. In M. Gierus, H. Kluth, M. Bulang und H. Kluge (Hrsg): 11. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 23.-25.November 2010 Lutherstadt Wittenberg, 9 -11.

Preißinger, W., Lindermayer, H., Propstmeier, G. 2011: Einsatz unterschiedlich behandelter Sojabohnen in der Ferkelerzeugung. In: Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung, Fulda 2011, Herausgeber: Verband der Landwirtschaftskammern, Bonn, 124 – 128

Preißinger, W., Lindermayer, H., Propstmeier, G. 2013: Einsatz von Rapsextraktionsschrot in der Ferkelfütterung. In: Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung, Fulda 2013, Herausgeber: Verband der Landwirtschaftskammern, Bonn, 135-138

Preißinger, W.; Lindermayer, H.; Propstmeier, G. 2014: Einsatz von Sojaextraktionsschroten aus Donausoja und Überseeware beim Ferkel. In Tagungsband 13. BOKU-Symposium Tierernährung, eingereicht

VDLUFA-Methodenbuch Band III: Die Untersuchung von Futtermitteln 3. Aufl. 1976, 8. Ergänz.lief. 2012, VDLUFA-Verlag Darmstadt

Verein Donau Soja (2013): Donau Soja Richtlinie (Guidelines) April 2013, http://www.donausoja.org/uploads/media_files/document/orig/071/071_433_4eec0045e78034f871aae2ea96db59991c9be3c7.pdf; (Abruf 20.02.2014, 17:20)

Autorenanschrift

Dr. Wolfgang Preißinger
Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft
Dienstort Schwarzenau
Stadtschwarzacher Str. 18
D-97359 Schwarzach a. Main
E-Mail: Wolfgang.Preissinger@LfL.bayern.de

Einsatz von Sojaextraktionsschroten aus Donau Soja und Überseeware beim Ferkel

Wolfgang Preißinger, Hermann Lindermayer und Günther Propstmeier

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Grub/Schwarzenau, DE

Einleitung

Der Einsatz von Extraktionsschrot aus Sojabohnen, die im Donauraum angebaut werden (Verein Donau Soja, 2013) wird im Rahmen des Aktionsprogrammes „Heimische Eiweißfuttermittel" in Bayern stark diskutiert. Stichworte dazu sind „heimisch", „GVO-frei", „nachhaltig". Nach verschiedenen Erhebungen und Abrechnungen der Versuchsstationen und der Lehr-, Versuchs- und Fachzentren in Bayern beträgt dabei der Preisunterschied zu Sojaextraktionsschrot mit 48 % Rohprotein aus Übersee (HP-Soja, Übersee) bis zu 16 €/dt. Neben einem Ferkelaufzuchtversuch an Abrufstationen bei dem auch noch weitere heimische Eiweißträger getestet wurden (Preißinger et al., 2014; vorliegender Tagungsband), sollte unter praxisnahen Bedingungen (Gruppenfütterung, Kurztrog mit Sensor) Sojaextraktionsschrot aus der „Donausojabohne" (Donau Soja) mit HP-Soja aus Übersee verglichen werden.

Folgende Versuchsfragen sollten beantwortet werden:

- Welche Leistungen (Futteraufnahme, Zunahmen, Futteraufwand) werden durch den Austausch von HP-Soja durch Donau Soja (Herkunft BAG Ölmühle BetriebsGmbH, Güssing, Burgenland) erzielt?
- Wie hoch liegen die Futterkosten?
- Wie hoch ist der N-/P-Eintrag in die Umwelt?

Material und Methoden

Der Fütterungsversuch mit Ferkeln wurde am Lehr-, Versuchs- und Fachzentrum Schwarzenau bis zu einem angestrebten Vermarktungsgewicht von ca. 30 kg LM durchgeführt. Für den Versuch wurden 192 Ferkel der Rasse Pi x (DL x DE) nach Lebendmasse, Abstammung und Geschlecht ausgewählt und gleichmäßig auf zwei Gruppen („HP-Soja" bzw. „Donau Soja") aufgeteilt. Die Ferkel wurden in 16 Buchten zu je 12 Tieren auf Kunststoffspalten ohne Einstreu gehalten. Sie waren zu Versuchsbeginn im Durchschnitt 32 Tage alt und wogen 10,2 kg. Pro Behandlungsgruppe wurden 2 Buchten mit weiblichen Tieren, 2 Buchten mit männlich kastratierten Tieren und 4 Buchten gemischtgeschlechtlich aufgestallt. Die Fütterung erfolgte am Kurztrog mit Trogsensor und separaten Spotmix-Fütterungsanlagen der Firma Schauer für jede Behandlungsgruppe. Die Futtermengen wurden für jede Bucht automatisch mit der Spotmix-Anlage verwogen. Die Lebendmassen wurden wöchentlich am Einzeltier erfasst. Die Ferkelaufzuchtfutter (FAF I, FAF II) wurden in der Versuchsmahl- und Mischanlage Schwarzenau hergestellt. Die Futteruntersuchen wurden im Labor der Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub (AQU 3) nach VDLUFA-Richtlinien durchgeführt (VDLUFA, 2012). Die Phosphorausscheidungen wurden aus der Differenz Aufnahme mit dem Futter und Ansatz je kg Zuwachs ermittelt.

Die Versuchsrationen (Tabelle 1) basierten auf Weizen, Gerste, HP-Soja bzw. Donau Soja und einem handelsüblichen Mineralfutter. Sie waren bei den wesentlichen Parametern vergleichbar. Zur Energieaufwertung wurde ein Gemisch aus Soja- und Rapsöl verwendet. Alle Futter wurden mit 1 % Fumar-

säure stabilisiert. Die gewünschten Aminosäurengehalte auf Basis dünndarmverdaulich (10,3 g dvd Lysin bis 18 kg LM; 9,8 g dvd Lysin bis 32 kg LM) im Ferkelaufzuchtfutter I bzw. II wurden durch entsprechende Dosierungen der Eiweißfutter im Austausch gegen Getreide erreicht.

Tabelle 1: Rationen und analysierte Inhaltsstoffe (88 % T)

Futter/ Inhaltsstoffe		HP-Soja		Donau Soja	
		FAF I	FAF II	FAF I	FAF II
Weizen	%	38	38	40	40
Gerste	%	38	39,5	34	35,5
Futteröl	%	1	1	1	1
Sojaextraktionsschrot 48 % Rp	%	18	17	--	--
Extraktionsschrot aus Donau Soja	%	--	-	20	19
Mineralfutter [1)]	%	4	3,5	4	3,5
Fumarsäure	%	1	1	1	1
Kosten/dt[2)]	€	29,50	28,95	32,10	31,45
ME	MJ	13,42	13,45	13,33	13,41
Rp	g	165	155	177	166
Lys	g	12,2	11,4	12,0	11,2
M+C	g	7,3	6,8	7,2	6,4
Thr	g	7,3	7,0	7,2	6,9
Trp	g	2,4	2,3	2,3	2,3
Ca	g	8,1	6,9	8,6	6,4
P	g	5,2	4,6	5,3	4,9

[1)] 15,5 % Ca; 3,5 % P; 5 % Na; 10 % Lys; 3 % Met; 3,5 % Thr; 0,4 % Trp
[2)] HP-Soja 45 €/dt, Donau Soja 55,5 €/dt

Ergebnisse und Diskussion

In 6 Versuchswochen (41 Tage) wurde eine Lebendmasse von knapp 32 kg erreicht. 6 Tiere mussten vorzeitig aus dem Versuch genommen werden und wurden nicht in die Auswertungen einbezogen.

In der Gruppe mit HP-Soja wurden 529 g, in der Gruppe mit Donau Soja 516 g tägliche Zunahmen erreicht. Der Futterverbrauch lag bei 982 g (HP-Soja) bzw. 953 g pro Tier und Tag (Donau Soja). Die Unterschiede zwischen den Gruppen ließen sich statistisch nicht absichern. Der Futteraufwand war mit 1,84 kg Futter je kg Zuwachs in beiden Gruppen gleich.

Dies bestätigt Ergebnisse eines weiteren Versuches mit Ferkeln und Einzeltierfütterung. Dort wurden tägliche Zunahmen von 550 g (HP-Soja) und 543 g (Donau Soja) ermittelt (Preißinger et al., 2014; vorliegender Tagungsband).

Pro 1 kg Zuwachs wurden 3,3 g (HP-Soja) bzw. 3,8 g (Donau Soja) Phosphor ausgeschieden. Damit wurde bei höherem Sojaanteil in der Donau Soja-Gruppe die Umwelt etwas stärker belastet, was ca. 15 % mehr an Flächenbedarf für die bilanzneutrale Gülleausbringung bedeutet.

Die Futterkosten lagen pro 1 kg Zuwachs mit HP-Soja weit niedriger als mit Donau Soja. So kostet das Aufzuchtfutter in der Gruppe mit Donau Soja ca. 0,8 € pro Tier mehr. Leistung und Futteraufwand waren bei Donau Soja in Ordnung.

Tabelle 2: Aufzuchtleistungen (LSQ-Werte)

Gruppen	**-**	**Kontrolle**	**Testgruppe**	**Sign.**
Phasen	**n**	**2-phasig**	**2-phasig**	**<0,05**
Eiweißfutter	**-**	**HP-Soja**	**Donau Soja**	
Tierzahl	n	92	94	-
Gewichte				
Beginn - Versuch	kg	10,2	10,1	0,649
Umstellung	kg	18,5	18,1	0,112
Ende – Versuch	kg	31,9	31,3	0,171
Zuwachs				
Gesamt	kg	21,7	21,2	0,164
Zunahmen				
Anfang/Phase 1	g	398	380	0,089
Ende/Phase 2	g	667	659	0,501
Gesamt (10-30 kg LM)	g	529	516	0,164
Futterverzehr/Tag				
Anfang/Phase 1	g	723	684	0,234
Ende/Phase 2	g	1255	1236	0,590
Gesamt (10-32 kg LM)	g	982	953	0,354
Futteraufwand (kg Futter/kg Zuwachs)				
Anfang/Phase 1	kg	1,79	1,78	0,865
Ende/Phase 2	kg	1,88	1,88	0,885
Gesamt (10-30 kg LM)	kg	1,84	1,84	0,867
Futterverwertung (g Zunahmen/kg Futter)				
Anfang/Phase 1	g	559	562	0,885
Ende/Phase 2	g	532	533	0,906
Gesamt (10-30 kg LM)	g	542	544	0,872
Energieverzehr/Tag				
Anfang/Phase 1	MJ	9,7	9,1	0,166
Ende/Phase 2	MJ	16,9	16,6	0,502
Gesamt (10-30 kg LM)	MJ	13,2	12,7	0,270
Energieaufwand (MJ ME/kg Zuwachs)				
Anfang/Phase 1	MJ	24,0	23,7	0,564
Ende/Phase 2	MJ	25,3	25,1	0,671
Gesamt (10-30 kg LM)	MJ	24,8	24,6	0,553
Energieverwertung (g Zunahmen/MJ ME)				
Anfang/Phase 1	g	42	42	0,589
Ende/Phase 2	g	40	39	0,692
Gesamt (10-30 kg LM)	g	40	41	0,564
Ausscheidungen				
Phosphor pro Ferkel	g	72	82	+10
Phosphor pro Zuwachs	g	3,3	3,8	+0,5
Futterkosten				
pro Ferkel	€	11,63	12,38	+0,75
pro 1 kg Zuwachs	€	0,54	0,58	+0,04
pro 21,5 kg Zuwachs	€	11,61	12,47	+0,86

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In dem Ferkelaufzuchtversuch wurden HP-Soja und Donau Soja in rechnerisch gleichwertigen Rationen miteinander verglichen. Die Einsatzraten (18 und 17 % HP-Soja bzw. 20 und 19 % Donau Soja) richteten sich jeweils nach den Ausgangsgehalten an dünndarmverdaulichen Aminosäuren. Mit Donau Soja ließen sich zwar vergleichbare Leistungen zu HP-Überseesoja erzielen, der Mehrpreis (10,5 €/dt)

schlug aber mit ca. 0,8 €/Ferkel zu Buche. Außerdem brachte der höhere Anteil an Donau Soja in den Testrationen mehr Phosphoraustrag mit sich. Die höheren Kosten von Donau Soja würden sich erst rechnen, wenn dies der Markt honoriert (heimisch, GVO-frei).

Literatur

Preißinger, W.; Lindermayer, H.; Propstmeier, G. (2014): Rapsextraktionsschrot, Donau Soja und Ackerbohnen in der Ferkelfütterung - Auswirkungen auf Futteraufnahme und Leistung. In Tagungsband 13. BOKU-Symposium Tierernährung, eingereicht

VDLUFA-Methodenbuch Band III: Die Untersuchung von Futtermitteln 3. Aufl. 1976, 8. Ergänz.lief. 2012, VDLUFA-Verlag Darmstadt

Verein Donau Soja (2013): Donau Soja Richtlinie (Guidelines) April 2013, http://www.donausoja.org/uploads/media_files-/document/orig/071/071_433_4eec0045e78034f871aae2ea96db59991c9be3c7.pdf; (Abruf 20.02.2014, 17:20)

Autorenanschrift

Dr. Wolfgang Preißinger
Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft
Dienstort Schwarzenau
Stadtschwarzacher Str. 18
D-97359 Schwarzach a. Main
E-Mail: Wolfgang.Preissinger@LfL.bayern.de

The effect of natural feed additive containing an essential oil on growth, mortality and gut flora of piglets

A. Jerešiūnas[1], O. Jerešiūnienė[2], I. Sviliuvienė[1] and D. Tamašauskienė[1]

[1] Marijampolės College, LT
[2] Public institution Abromiškės Rehabilitation Hospital, LT

Introduction

Feed and it's quality have a great influence on piglet productivity and their health. Feed constitutes approximately 70% of all animal breeding production expenses. Therefore, feed composition for piglets has a main economic role in pig breeding.

Pig weaning is a strong and stressful factor which has a negative influence on both pig productivity and their immunity (Simon, 2001). The protection of optimal pig feeding conditions is recommended within this period. Normal intestine microflora of piglets influences their wellness, formation of immunity and resistance to infections (Lovatto et al., 2005). The decrease of intestine microflora (*Bifidobacteria, Enterococcus*) population of piglets during the stress leads to the pathogenic microorganism increase (Sudikas et al., 2011). The security of stable microflora in the intestine of piglets after weaning is one of the main factors determining their health and productivity.

Enzymes, probiotics, prebiotics, oxide of zink, sulfate of copper, acidifiers are often used in Lithuania as the growth promoters (Jerešiūnas and Tamašauskienė, 2013). Phytobiotics, alone or in combination (synbiotics), are the most popular potential alternative for other growth promoters. Phytogenic feed additives (phytogenics) are an extremely heterogeneous group of feed additives originating from leaves, roots, rubers or fruits of herbs, spices or other plants. They are either available in a solid, dry and ground form or as extracts or essential oils. Phytogenic feed additives usually vary seriuosly in their chemical ingredients (Steiner, 2006).There is a large number of herbs and spices that may be used as growth promoters in pig nutrition. One of the alternatives is the Orego-Stim, based on 100% natural feed additive containing an essential oil, which can be included in the feed or water. Oregano is rich in carvacrol and thymol, which are known to have strong antibacterial and antioxidative properties. According to Kamel (2000), oregano showed broad *in vitro* efficiency against varipus pathogenic bacteria including *E. coli, Salmonella typhimurium* and *Clostridium perfingens*.

Several reports have shown that essential oils reduced stress during piglets weaning, increased weaning weight, improved growth and feed conversion ratio, improved palatability and feed intake, etc. (Steiner et al., 2006; Veligratli, 2014). Orego-Stim also acts as a feed flavour and appetite enhancer. Moreover, due to the antioxidant properties of active ingredients, it has some other valuable benefits.

The purpose of our experiment was to establish the effect of natural feed additive containing an essential oil (Orego-Stim) on growth rate of the pigs, the feed intake and feed consumption per one kg weight gains, mortality and gut flora of suckling and weaning piglets.

Material and methods

The experiment was conducted in 2011 in an industrial pig farm. Approximately 8 000 fatting pigs are cultured here annually. The piglets were selected and divided into two groups. Each group included six (6) sows. There were 57 piglets in both groups. The trial was performed with mixed German York-

shire, Norwegian Landraces and Great White breed piglets. The piglets were weaned off at the age of 34 days old. The experiment was divided into two periods – suckling and after weaning. The experiment lasted for 59 days. The piglets were given complete compound feeds. Their composition and feeding values are presented in table 1. While composing the recipes of compound feeds, computer programme "Hybrimin Futter 2008" was applied. The data of this programme nutritive value of feeds were gained from the literature (NRC 1998). The energy amount of compound feeds was calculated according to the formulas (Jeroch et al. 2004).

Table 1: Composition and nutritive values of starter compound feed for piglets

Ingredients, %	I group	II group
Wheat	28.5	28.47
Barley	40.0	40.0
Soya meal	13.0	13.0
Soya protein concentrate HP 300	7.0	7.0
Whey meal	5.0	5.0
Rape (canola) oil	2.5	2.5
Mineral vitamine supplement	4.0	4.0
Feed additive Orego-Stim	-	0.03

Calculated analysis / kg feed: 13.5 MJ-metabolizable energy, 19.0% - crude protein, 3.74% - crude fibre, 4.2% - crude fat, 1% - calcium, 0.55% - phosphorus, 0.32% - sodium, 1.35% - lysine, 0.38% - methionine, 0.82% - threonine, 0.23% - tryptophan, 14000 IU - vit A, 2000 IU - D, 120 mg - E, 80 mg - C, 4 mg - K, 2.8 mg - B_1, 7.2 mg - B_2, 4.8 mg - B_6, 36 mg - niacin, 20 mg - panthotenic acid, 1 mg - folic acid, 400 mg - choline chloride, 124 mg - Zn, 214 mg - Fe, 83.5 mg - Mn, 161.4 mg - Cu, 1.0 mg - Co, 2.0 mg - J, 0.44 mg - Se, 500 FTU - phytase

The piglets of the second group got 300 g of Orego-Stim per tone of complete compound feed.

Piglets of both groups were weaned and moved to the breeding cote. Two pens, each including 30-35 pigs, were formed out of the weaned piglets in each group.

During the experiments the piglets of both groups were fully fed by the dry powder compound feed from automatic feeders. Automatic separate water-troughs were applied in order to get enough water. Every stall was equipped with one automatic water-trough and feeder.

In order to ascertain piglets' health condition at the beginning and the end of the experiment, microbiological analyses of piglets' faeces were conducted and the piglets were kept under observation. Samples of faeces from the piglets of both groups were taken to the sterile bottles before the experiment and at the end of experiment. 1 g of faeces was used for the microbiological investigations at the proportion of 1:99 suspended in physiological liquid. The initial dilution of 1:100 of the faeces obtained was later diluted at the proportion from 1:9 to 10^{-7}. 0.05 ml of the suspension under investigation out of 10^{-4} dilution was inoculated on the onto agar of Petri plates. Total amount of enterobacteria was estimated while investigating faeces. Experimental samples were inoculated on three Petri plates with Mc Conkey agar. Cultivation was practiced under aerobic conditions for 24 hours at the temperature of +37 ^{o}C. Colony-forming unit (CFU/g) was calculated according to LST ISO 7218:2000 and presented in logarithm.

The main data of the research conducted, except the indices of chemical feed composition and consumption, were assessed by the methods of statistical analysis. The results were subjected to statistical processing with application of WinExcel program. The arithmetic average values ($\bar{x}$), standard deviation of the mean (Sd) were calculated for all data and presented in tables (Juozaitienė and Kerzienė 2001). Experimental average values ($\bar{x}$) were tested using the Student's t-test. Statistical differences among means ($p<0.05$) were indicated by superscript (*).

Results and discussion

Growth rate of piglets is presented in table 2. It was determined that during the suckling period the piglets from II group (that were fed by the compound feed with 300 g/t Orego-Stim) gained 12.5 g weight per day on average or 5.6% percent more (p>0.05) than the piglets from the first group.

During the second period (after weaning) the II group piglets also grew faster and gained weight of 20,7 g per day on average or 4.9% more (P>0.05) in comparison with the piglets from the control group.

During the whole trial period the piglets of the second group getting the tested feed additive every twenty-four hours increased in weight approx. 5.2% (P>0.05) more than the piglets of control group.

Table 2: Growth rate of pigs

Item	Group 1 (Control) $\bar{x} \pm sd$	Group 2 (Experimental) $\bar{x} \pm sd$
Average weight of piglets, kg		
at the start	3.65±0.74	3.44±0.84
at the weaned period	9.35±1.5	9.47±1.69
at the end	22.66±2.9	22.45±3.09
Average daily gain, g:		
during the suckling period	210.9±44.2	223.4±41.6
during the weaned period	416.1±66.4	436.8±69.9
during the whole trial	322.2±45.6	339.1±45.71

Such result in piglets' growth may be explained by the fact that the tested Orego-Stim had a significant positive influence on the growth of piglets during the suckling and weaning periods.

In the course of experiment it was determined that feed additive containing an essential oils did not have any positive effect on feed intake. Feed intake is presented in table 3. It is estimated that after weaning this feed additive had negative effect. The piglets of the second group ate feed in 2.7% worse than the piglets of control group. This can be explained by the fact that the feed additive containing an essential oil, change feed taste characteristics.

Table 3: Compound feed intake kg/pig/day

Parameters	Group I (Control)	Group II (Experimental)
During the suckling period	0.050	0.054
During the weaned period	0.710	0.691
During the whole trial	0.408	0.399

The calculation of compound feed consumption per 1 kg overweight showed, that feed additive containing an essential oil did not have any material impact during the suckling period. However, it was stated that during the second period after weaning Orego-Stim reduced significantly the consumption of compound feed per 1 kg overweight. 300 g/t Orego-Stim additive in 7.6% reduced the consumption of compound feed per 1 kg overweight. The feed consumptions per kg gain of the compound feed are presented in table 4. Some scientists have also underline the significant effect of Orego-Stim on the feed consumption per kg gain in their works (Kyriakis, 2014).

Table 4: Compound feed consumption per kg gain

Parameters	Group I (Control)	Group II (Experimental)
During the suckling period	0.24	0.28
During the weaned period	1.71	1.58
During the whole trial	1.27	1.22

When using the feed additive containing an essential oil, the mortality of experimental group piglets decreased in 1.6%.

The variation of enterobacteria amount is presented in table 5. At the beginning of the experiment, enterobacteria amount of the second group piglets was lower in 4.6% in comparison with the first group. Such tendency remained the same at the end of the experiment, i.e. enterobacteria count of the second group piglets was 22.7% lower than that of the first group. Compound feeds with essential oils containing feed additive Orego-Stim had a significant effect on the number of enterobacteria in faeces. 300 g/t Orego-Stim additive sicnificallty decreased enterobacteria count in piglets faeces. Some scientists have also estimated significant effect of Orego-Stim on the faecal bacterial count in their works (Veligratli[b], 2014).

Table 5: Total enterobacteria count in piglets' faeces

Parameters	Group I n=5 $\bar{x} \pm sd$	Group II n=5 $\bar{x} \pm sd$
At the start of the trial	6.87±0.15	6.55±0.05
At the end of the trial	6.47±0.36	5.0±0.38

Conclusion

Compound feed, containing 300 g per tone feed of essential oil, that includes feed additive Orego-Stim improves piglets health status – no diarrhoea cases were reported, mortality decreased in 1.6%.

Feeding stuffs with feed additive containing essential oils improves pig growth during the suckling and post weaned periods approximately by 5%. However, this feed additive does not have any positive effect on the feed intake.

The effect of feed stuffs with feed additive containing essential oils on feed consumption was determined after the weaning only.

We recommend to add 300 g/t dose of Orego-Stim to piglets' diets and to feed with that feed stuffs during the whole suckling period and two-thee weeks after the weaning.

Acknowledgement

The research was conducted and supported by the author's finance. The authors would like to thank to family members for the understanding and patience.

References

Jerešiūnas A., Tamašauskienė D. Rūgštiklių panaudojimo efektyvumas nujunkytų paršelių šėrime. (The efficiency of the use of the acidifier in weaning pigs feeding). Juornal of Homo-Societas-Technologiae. 2013 Nr. 1 (1). pp. 37-43.

Jeroch H., Šeškevičienė J., Kulpys J. Žemės ūkio gyvulių ir paukščių mitybos fiziologinės reikmės (Nutrient requirement for agricultural animals). Kaunas, 2004. P. 158.

Juozaitienė V., Kerzienė S. (2001): Biometrija ir kompiuterinė duomenų analizė (Biometric and computer data analyses). Kaunas. P. 114.

Kamel C. (2000). Natural plant extracts: Classical remedics bring modern animal production solutions. 3rd Conference on Sow Feed Manufacturing in the Mediaterranean Region. March 22-24, Reus, Spain, pp. 31-38.

Kyriakis S.C. The use of Orego-Stim as growth promoter in pigs. http://www.orego-stim.com/commercial-farming/swine/more-swine/20-swine-trials (accesed: 2014-02-17).

Lovatto P. A., Oliveira V., Hauptli l., Hauschild l., Cazarre M. (2005): Feeding of piglets in post weaning with diets without microbian additives, with garlic or colistin. Ciencia Rural. Vol. 35, N. 3, pp. 656–659.

LST ISO 7218. (2000): Maisto ir pašarų mikrobiologija. Mikrobiologiniai tyrimai. Bendrosios taisyklės. (Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations).

Nutrient Requirements of Swine. National Acadedemy of Sciences, 1998. P. 597.

Simon, O. (2001): Probiotika aus der Sicht der Tierernährung. Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier. 8. Symposium 26. und 27. September 2001, Jena/Thüringen, pp. 118-127.

Steiner T. Managing Cut Health. Natural Growth Promoters as a Key to Animal Performance. Nottingham, 2006. P. 94.

Steiner T., Kroismayr A. and Zhang C. (2006). Evaluation of a phytogenic feed additive as natural growth promoter for piglets. 21st Interantionalo Pig veterinarian Society Congress, Copenhagen, Denmark.

Sudikas G., Juškienė V., Leikus R., Kulpys J., Jerešiūnas A., Norvilienė J., Sudikienė K. The influence of probiotics for the wellness and growth intensity of wean piglets. Veterinary and zootechnics. 2011. 55 (77) tome. pp. 65-71.

Veligratli E. The effect of Orego-Stim on growth, development and ebteric health of weaned piglets. http://www.orego-stim.com/commercial-farming/swine/more-swine/20-swine-trials (accesed: 2014-02-17).

Veligratli E.b Effects of Orego-Stim feed addtitive on the porcine intestinal mikroflora *in vitro*. http://www.orego-stim.com/commercial-farming/swine/more-swine/20-swine-trials (accesed: 2014-02-17).

Corresponding author

Dr. Andrejus Jerešiūnas
Marijampolės College
Catering and Agricultural Technologies Department
P. Armino street 92, Marijampolė LT-68125
E-mail: andrejus_jeresiunas@yahoo.com

ZINPRO
PERFORMANCE MINERALS®

Essential Trace Minerals.

Exceptional Performance.

Zinpro Performance Minerals® unterstützen erwiesenermaßen Leistung und Gesundheit von Tieren unter verschiedensten Bedingungen.

Unsere patentierten Spurenelemente bieten eine hohe Rentabilität, die gestützt wird durch eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten, die einzigartig ist.

STRIP ON FEIX FIELD ADDITIVES

Wollen Sie mehr wissen? Besuchen Sie **zinpro.com** oder sprechen Sie mit Ihrem nächsten Zinpro Vertreter.

Verlassen Sie sich auf Zinpro Performance Minerals in Bezug auf:

- umfangreiche tatsächlich gemessene Leisstungssteigerung der Tiere
- Kontinuierliche Rentabilität
- Dauerhafte Wirtschaftlichkeit garantiert durch Forschung
- Absicherung durch ein weltweit führendes Unternehmen

5R RETURN • RESPONSE • REPEATABILITY • RESEARCH • REASSURANCE

Performance Minerals® is a registered trademark of Zinpro Corp.
©2014 Zinpro Corp. All rights reserved.

Das Potenzial von *Agrimonia procera* als phytogener Zusatzstoff in der Ferkelaufzucht

Tobias Gräber[1], Gert Horn[2], Corinna Brandsch[1], Holger Kluge[1] und Gabriele I. Stangl[1]

[1] Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, DE
[2] Exsemine GmbH, DE

Einleitung

In der landwirtschaftlichen Praxis hat das Verbot leistungsfördernder antibiotischer Futterzusatzstoffe zu einer wesentlichen Steigerung der therapeutischen Anwendung von Antibiotika geführt. Besonders die Jungtieraufzucht ist eine kritische Phase, da hier bei Weitem der größte Bedarf an antibiotischen Arzneimitteln besteht (Maran, 2008). Statistischen Erhebungen zufolge hat sich der jährliche Verbrauch an Antibiotika in der Tierhaltung im Zeitraum von 2005 bis 2011 von 784 t auf 1.706 t erhöht. (DART, 2011; BVL 2013). Nicht nur im ökologischen Landbau, wo der Einsatz von Antibiotika reglementiert ist, auch im kommerziellen Bereich, unter dem Aspekt der raschen Resistenzentwicklung, sucht man folglich nach Alternativen, um den Einsatz von Antibiotika minimieren zu können.

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen eines DBU-Projektes eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, wobei das Nutzungspotenzial von *Agrimonia procera* (AP) in der Ferkelaufzucht geprüft wurde. Beim Großen bzw. Wohlriechenden Odermennig (*Agrimonia procera* Wallr.) handelt es sich um eine ausdauernde krautige Pflanze aus der Familie der Rosengewächse. Schon in der Antike fand sie Verwendung als Heilpflanze und wird heute noch als Teedroge bei unspezifischen Durchfallerkrankungen eingesetzt. Als Hauptwirkstoffe von AP wurden Agrimoniin (Gallotannin) und um die beiden Flavone Apigenin und Luteolin identifiziert.

In vorrangegangenen Untersuchungen konnten durch die Zulage von AP (0,1%) im Futter in der Ferkelaufzucht verschiedene Leistungsparameter signifikant bzw. tendenziell verbessert werden. Zudem zeigte sich in *in-vitro* Studien das antiinflammatorische Potenzial von AP-Extrakt (APE) bei der Stimulierung von mononukleären Zellen (Gräber et al., 2013). Das in der Literatur beschriebene antibakterielle, antioxidative und antiinflammatorische Potenzial von AP konnte in diesen Zusammenhang noch nicht bzw. nur in der Zellkultur nachgewiesen werden und war Gegenstand der folgenden Untersuchungen am Tier.

Material und Methoden

Die Untersuchung umfasste zwei Experimente, bei denen AP in Form eines Aufgusses (Experiment 1) und als feingemahlenes Blattmaterial (Experiment 2) eingesetzt wurde. Im ersten Experiment wurden nach vier Wochen abgesetzte Ferkel der Kreuzung (DExDL)xPi verwendet. Die 60 männlichen und weiblichen Ferkel mit einem Durchschnittsgewicht von 8,6 kg wurden randomisiert auf drei Gruppen (3x2) verteilt. In den ersten beiden Versuchswochen wurde den Ferkeln der beiden Behandlungsgruppen anstelle von Tränkwasser Tee (Teeaufguss 1g bzw. 10g AP/L Wasser) über eine Fülltränke (10L) mit Tränkbecken angeboten. Verfüttert wurden zwei bedarfsgerechte Ferkelrationen basierend auf Weizen, Gerste, Mais und Sojaextraktionsschrot (GfE, 2006). Die Futter- und Flüssigkeitsaufnahme erfolgte ad libitum. Die Futteraufnahme und die Gewichte der Tiere wurden wöchentlich erfasst. Ba-

sierend auf diesen Daten konnten die durchschnittlichen Lebendmassezunahmen (LMZ), Futteraufnahmen (FA) und die Futterverwertung (FV) der Tiere berechnet werden. Am Versuchstag 15 wurde der Kot der Tiere beprobt und Blut (EDTA, Plasma) entnommen. Die antioxidative Kapazität im Blutplasma wurde mittels TEAC-Test ermittel. Die Messungen basierten auf der Methodenbeschreibung von Mueller et al., (2012). Als Referenzsubstanz diente Trolox ein synthetisches, wasserlösliches Vitamin E-Analogon.

Im zweiten Experiment wurde den Ferkeln über das Futter verabreicht (0,1 bzw. 1% AP). In den ersten drei Versuchswochen war es möglich die Tiere in Gruppen zu halten. Anschließend wurden 6 Tiere je Gruppe auf die entsprechenden Stoffwechselkäfige verteilt. Nach einer Adaptationsphase von drei Tagen konnte dann mit dem eigentlichen Versuchsvorhaben begonnen werden. Hierfür wurde den Tieren Lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* 0111:B4 (Sigma); 25µg/kg BW gelöst in 0,9% NaCl; Applikationsmenge 0,1ml/kg BW) i.p. injiziert. Um das antiinflammatorische Potenzial von AP bestimmen zu können, wurde den Tieren über einen Zeitraum von 24h Blut entnommen (Heparin, Serum) und mittels ELISA-Kit (R&D Systems) die Konzentration an TNFα bestimmt. Zudem wurde die Körpertemperatur der Tiere erfasst und das Fressverhalten bzw. die Aktivität der Ferkel dokumentiert.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (Minitab, Version 13, State College, PA, USA). Die Gruppenmittel wurden mittels Student's t-Test bzw. Fisher-Test bewertet. Als Signifikanzgrenze wurde dabei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zugrunde gelegt ($P<0,05$).

Ergebnisse

Experiment 1

Die Leistungen der Tiere konnten durch die Applikation von AP über das Tränkwasser im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verbessert werden. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme betrugen die täglichen LMZ 160 (0), 148 (1) bzw. 189 (10) g/Tier. Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet betrugen die täglichen LMZ 550 (0), 554 (1) bzw. 566 (10) g/Tier. Beim Futteraufwand konnten, über den gesamten Versuchszeitraum, keine signifikanten Effekte zwischen den Gruppen beobachtet werden.

Durch die Anreicherung des Tränkwassers mit AP wurde die antioxidative Kapazität im Plasma signifikant um 4,1 bzw. 15 % erhöht. Ebenfalls positiv zu bewerten ist der Rückgang der Prävalenz an Durchfall am Versuchstag 15. Entsprechend konnten signifikant erniedrigte TS-Gehalte im Kot der Kontrolltiere gegenüber der Behandlungsgruppe (10) ermittelt werden ($P<0,05$; Tabelle 1).

Experiment 2

Durch die LPS-Injektion konnte das Immunsystem der Tiere erfolgreich stimuliert werden. Die Körpertemperatur betrug zum Zeitpunkt 0 im Mittel 39,5°C und die ermittelten TNFα Mengen 97 pg/ml Serum. Durch die Injektion von LPS stieg die Körpertemperatur innerhalb von 1h in der Kontrollgruppe um 0,5°C und in den beiden Behandlungsgruppen um 0,8°C (0,1% AP) bzw. 1°C (1% AP). Danach stieg die Körpertempertur der Tiere über die Gruppen gleichmäßig an und erreichte das Maximum in den beiden Behandlungsgruppen nach ca. 3h und in der Kontrollgruppe nach ca. 4h. Im Anschluss ging das Fieber der Tiere schrittweise zurück. Nach 24h zeigten sich bei allen Tieren wieder normale Körpertemperaturen. Die ermittelten TNFα Konzentrationen im Blutserum der Gruppe, die 1% AP erhielten, waren nach 1h um 17% gegenüber den beiden anderen Gruppen erhöht (Abbildung 1). Des Weiteren fiel der Rückgang der TNFα Konzentrationen im Blut deutlich flacher aus und das Niveau der Kontrollgruppe wurde nach 6h erreicht. Nach 24h wurden TNFα Konzentrationen von 372 (Kontrolle),

252 (0,1% AP) und 168 (1% AP) pg/ml Serum ermittelt. Die ermittelten Werte unterschieden sich jedoch nicht zwischen den Gruppen.

Tabelle 1: Die TEAC-Werte und Kottrockensubstanzen von Experiment 1 am Versuchstag 15.

***Agrimonia procera* (g/L)**	**TEAC-Wert (µmol/ml_Plasma)**	**TS_Kot (%)**	**Anzahl aufälliger Tiere (TS<15%)**
0	6,28 (0,86)[a]	19,8 (8,14)[a]	6
1	6,54 (0,97)[ab]	22,2 (6,13)[ab]	3
10	7,22 (0,86)[b]	24,8 (3,43)[b]	1

Mittelwerte (Standartabweichung)
[a, b] kennzeichnen signifikante Unterschiede (P<0,05), Fisher-Test; n=20

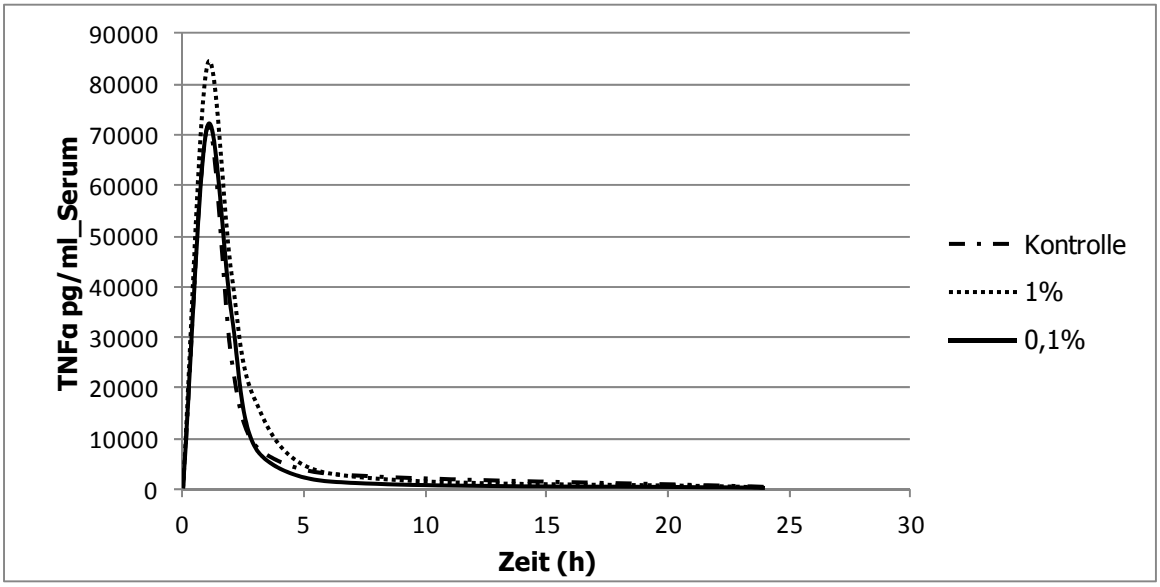


Abbildung 1: Wirkungen von *Agrimonia procera* auf die gemessene TNFα Konzentration im Blutserum von Ferkeln, die LPS (25µg/kg BW) erhielten. Die Konzentration an TNFα wurde mittels eines ELISA-Kits bestimmt. n=6

Diskussion

Es befinden sich bereits eine Reihe von phytogenen Futterzusatzstoffen auf dem Markt, die den Appetit der Nutztiere anregen und somit deren Futteraufnahme und Leistung steigern. In vorrangegangen Versuchen konnte man durch die Futterzulage von AP (0,1%) entsprechende Wirkungen beobachten. So konnte die FA und die FV der Ferkel um bis zu 5% verbessert und die täglichen LMZ um bis zu 8% erhöht werden.

Durch die Applikation von AP über das Tränkwasser konnte im Gegensatz zur Futterzulage eine signifikante antioxidative (TEAC-Wert) und antibakterielle Wirkung (TS-Kot) von AP nachgewiesen werden. Wobei besonders Agrimoniin und Apigenin die Produktion von ROS unterdrücken sollen (Bazylko et al., 2013; Duarte et al., 2013), welche die Durchlässigkeit der Darmwand erhöhen (Mueller et al., 2012). Es ist zudem hinreichend bekannt, dass Polyphenole in der Lage sind, die Mikrobiota im Darm zu verändern (Lee et al., 2006). Vor allem Gallotannine besitzen die Fähigkeit Antibiotikaresistenzen von Bakterien herabzusenken (Hatano et al., 2006). Vor dem Hintergrund, dass nach 24h nur ca. 50% der abgesetzten Ferkel das erste Futter aufgenommen haben und die FA der Tiere in den ersten Wochen

(150-200 g/Tag) eher als gering einzuschätzen ist, lässt den Schluss zu, dass die Aufnahme von AP über das Futter nicht ausreichend ist, um eine sichtbare Wirkungen hervorzurufen. Durch die Applikation über das Tränkwasser können die aufgenommenen Mengen von AP um das 5 bzw. 50 fache gesteigert werden. Diese Konzentrationen an AP scheinen notwendig zu sein, um antioxidative und antibakterielle Effekte zu erzielen.

In *in-vitro* Untersuchungen konnte die antiinflammatorische Wirkung von Apigenin und Luteolin nachgewiesen werden. Apigenin nimmt dabei eine besondere Rolle bei der Inaktivierung des Nuclear Factor kappaB bei Monozyten und Makrophagen ein (Nicholas et al., 2007; Liang et al., 1999). Im Gegensatz zu früheren Studien mit primären mononukleären Zellen des Schweins, bei denen die Expression und Bildung von TNFα durch APE signifikant gesenkt werden konnten, zeigten sich in der akutell durchgeführten Studie keine bzw. im Falle der Dosierung von 1% eher stimulierende Effekte von AP auf die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen. Derzeit gibt es kontroverse Diskussionen darüber, wie eine gehemmte oder stimulierte Synthese von proentzündlicher Mediatoren auf die Gesundheit zu bewerten sind. Möglicherweise ist durch eine zu ausgeprägte Hemmung der Zytokinbildung, auch keine effiziente Abwehr pathogener Keime mehr möglich. Dies müsste jedoch in entsprechenden Studien erst geprüft werden.

Abschließend ist festzuhalten dass durch die Applikation von AP über das Tränkwasser die antioxidative Kapazität im Blutplasma und der TS-Gehalt im Kot von Ferkeln positiv beeinflusst werden können. Bei der Stimulierung durch LPS zeigte sich, bei den mit 1% AP gefütterten Tieren, dahingegen ein vermehrter Anstieg des proinflammatorischen Zytokins TNFα.

Danksagung

Für finanzielle Unterstützung möchten wir der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) herzlich danken.

Literatur

DART - Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie. Herausgeber: Bundesministerium für Gesundheit, 2011, Berlin, 112 S.

Bazylko A, Piwowarski JP, Filipek A, Bonarewicz J, Tomczyk M: *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Potentilla recta* and its main ellagitannin, agrimoniin. *J. of Ethnopharmacology* 2013, 149: 222-227.

BVL: Zweite Datenerhebung zur Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin. Internetseite des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: http://www.bvl.bund.de/DE/08 PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01 Presse und Hintergrundinformationen/05 Tierarzneimittel/2013/2013 11 11 pi Abgabemengen.html; am 27.11.2013

Duarte S, Arango D,Parihar A, Hamel P, Yasmeen R, Doseff AI: Apigenin protects endothelial cells from Lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by decreasing Caspase-3 activation and modulating mitochondrial function. *Int. J. Sci.*2013, 14:17664-17679

Gesellschaft für Ernährungsphysiologie: *Recommendations for energy and nutrients supply of pigs*. 1. Auflage, Frankfurt am Main: DLG-Verlag; 2006.

Gräber T, Brandsch C, Horn G, Kluge H, Stangl G: The effect of Agrimonia procera extract on LPS-stimulated porcine blood mononuclear cells. In: Tagungsband 22 Proceedings of the Society of Nutrition Physiology, DLG-Verlag; 2013

Hatano T, Tsugawa M, Ohyabu T, Kusuda M, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T: Effects of polyphenols in tea and foods on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the sustainability of the antibacterial effects in the presence of food additives. *J. Jpn. Soc. Med. Use Funct. Foods* 2006, *4*:43-48.

Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK: Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. in Microbiology* 2006*, 157:876-884.*

Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK: Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999, 20:1945-1952.

MARAN: Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2008. [www.maran2008.wur.nl]

Mueller K, Blum NM, Kluge H, Bauerfeind R, Froehlisch J, Mader A, Wendler KR, Mueller AS. Effects of Broccoli extract and various essential oils on intestinal and faecal microflora and on xenobiotic enzymes and the antioxidant system of piglets. Open Journal of Animal Sciences 2012, No.2: 78-98.

Nicholas C, Batra S, Vargo MA, Voss OH, Gavrilin MA, Wewers MD, Guttridge DC, Grotewold E, Doseff AI: Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *J. Immunol.* 2007, 179:7121-7127.

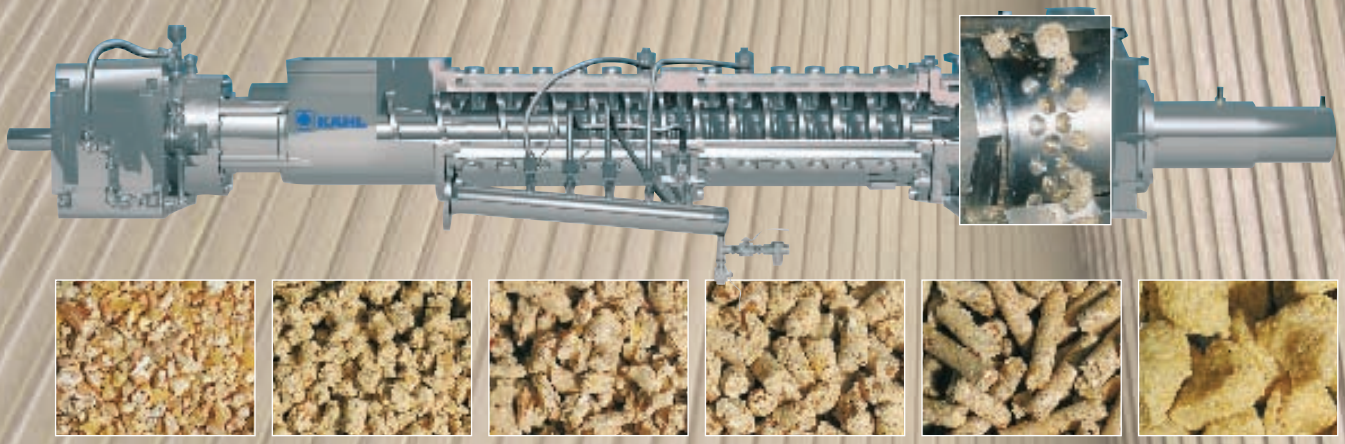
Autorenanschrift

Tobias Gräber
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
Von-Danckelmann-Platz 2
06120 Halle/Saale
E-Mail: tobias.graeber@landw.uni-halle.de

KAHL Komplette Futtermittelwerke, Anlagen und Maschinen

KAHL Brech-Walzenstuhl: Wirtschaftliche Zerkleinerung von Futtermischungen, Getreide, Leguminosen und Ölsaaten

KAHL 2 in 1: Expandieren + Formen mit dem Kronen-Expander



AMANDUS KAHL GmbH & Co. KG, Dieselstrasse 5, D-21465 Reinbek, Hamburg
Telefon: (040) 727 71-0 · Fax: (040) 727 71-100, info@amandus-kahl-group.de **www.akahl.de**

Impact of various probiotic products (*Bacillus spp.*) on growth performance and health of weaning piglets

Detlef Kampf[1], Toon Elsen[2], Luc Martens[2], Joni De Sutter[3], Noriko Nakamura[4] and Dirk Fremaut[5]

[1] Orffa Additives, Werkendam, NL
[2] PVL Bocholt, Bocholt, BE
[3] Orffa Additives, Bornem, BE
[4] Calpis, Paris, FR
[5] University College, Ghent, BE

Introduction

Therapeutic antimicrobials are customarily used in pigs in preventing and treating diseases and in consequence to improve daily gain and feed utilization (Barton 2000). Despite their beneficial effects, the recent concern on drug residues in food and the potential transfer of antibiotic resistance to human pathogens open discussions towards alternative solutions such as probiotics. Probiotics are live cultures of harmless bacteria or yeast species that equilibrate intestinal microflora to the benefit of the animal (Fuller 1989). Unfortunately the most known probiotics are not able to survive the applied technologies in feed production, e.g. heat administration. One way to overcome these problems is the use of spore forming probiotics, particularly of the genus *Bacillus*.

The admission of *Bacillus spp*. to piglet feed has several pathways in which it may improve production parameters. *Bacillus spp*. consumes oxygen in the digestive tract and additionally they produce certain enzymes like subtilisin and catalase. This results in a positive environment for beneficial bacteria such as Lactobacilli. Lactobacilli colonize gut mucous membranes and block adhesion sites for pathogens, a mechanism known as competitive exclusion. Besides this, Lactobacilli produce lactic acid, which acts against pathogens such as *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter* and *Clostridium* (Hosoi *et al.* 2000). Numerous trial results are available on the reduction of these pathogens by *Bacillus spp*. (e.g. Maruta *et al.* 1996, Fritts *et al.* 2000, Ragione and Woodward 2003) as well as on the improvement of animal performance (e.g. Kritas *et al.* 2010, Marubashi *et al.* 2012, Medel *et al.* 2009). Determinations of the impact of heat administration in combination with pelleting or expansion on the survivability of for instance *Bacillus subtilis* were recently described, too (Nollet 2005, Kampf 2012).

The objective of the study was to investigate the effect of various probiotic *Bacillus spp.* products on growth performance, daily feed intake, feed conversion ratio, faecal consistency and health of weaning piglets. The effect of the probiotic addition on the microbial composition of faeces was also investigated.

Materials and Methods

The trial was conducted at PVL Bocholt, Belgium. Piglets were housed in three identical nursery rooms, each containing 12 pens. All pens were separated with plastic walls to avoid cross contamination of the similar probiotic strains. The trial was carried out as 3 equal repeats in these compartments of each 120 piglets (4 treatments x 3 pens per treatment x 10 piglets per pen), within the 3rd repeat only 80 piglets (4 treatments x 2 pens per treatment x 10 piglets per pen) were used due to a short-

age of piglets. The used breed was Topigs20 x Pietrain with 50 % females and 50 % castrates. Piglets were weaned at approximately day 28 of age (7-8 kg body weight). Trial should last for 6 weeks up to 25 kg bodyweight. Feed was provided *ad libitum* throughout the trial from one feed hopper per pen, water (without additives) from 1 nipple drinker. The following treatments were used: (A) basal diet without any probiotic, (B) basal diet + *Bacillus subtilis* (DSM 5750) and *licheniformis* (DSM 5749) at 12.8x10^5 cfu/g, (C) basal diet + *Bacillus subtilis* C-3102 (DSM 15544) at a dosage of 3x10^5 cfu/g, and (D) basal diet + *Bacillus cereus var. toyoi* (NCIMB 40112/CNCM I-1012) at 10x10^5 cfu/g feed. All dosages corresponded to the recommendation of the minimum usage of the similar manufacturer. Animals received two feeds (one during weaning period (day 1-14) and one during starter period (day 14-42)) and diets were based on barley and wheat with a commercial energy level. Details of diet formulation are shown in table 1. Feed composition was the same for all treatment groups (no use of additional feed additives), only the kind of probiotic differed. All feeds were pelleted (4.8mm) to also prove heat stability of the similar products. The heat stability was confirmed for all probiotics by analysis.

Table 1: Diet composition / ingredients of the weaning and starter diets

Composition (%)	**Weaning diet**	**Starter diet**
Barley	35	35
Wheat	18.49	20.354
Corn	5.5	6
Corn flakes crushed	5	-
Wheat bran	-	7.5
Fullfat soybeans, toastet	17	20
Soy bean meal, 49/3,5	5	2.3
Sugar beet pulp, Su<10	1.5	-
Sour whey powder	5	2.5
Soy bean oil	1	-
Lysine-HCl	0.073	0.029
Methionine	0.094	0.061
Tryptophane	0.090	0.074
Threonine	0.076	0.043
Valine	0.177	0.139
Starter Premix	6	6
Ingredients (g/kg)		
Crude protein	175	177
dig. Lysine	11.0	10.6
dig. Met+Cys	6.5	6.2
dig. Treonine	6.9	6.6
dig. Tryptophane	2.4	2.3
Net energy (MJ/kg)	10.05	9.71

All piglets were weighed at day 1 post-weaning (trial start), 14 (end weaning period and start starter period) and 42 (trial end). Feed intake was recorded per pen at day 14 and day 42 post-weaning (residuals were weighed at those days). Faecal score was daily detected during the weaning period and weekly during the starter period by using the following scaling:

0= diarrhoea at nearly all animals with general medication
1= diarrhoea at some animals
2= soft faeces
3= normal faeces
4= solid faeces
5= very hard faeces

Faecal analysis of microbial composition was done at the end of the trial as a pooled sample of minimum 2-3 fresh droppings from 2-3 piglets per pen to quantify the similar colony morphologies of the tested strains. All data were tested by using analyses of variance of the GLM procedures of SAS.

Results

During the experiment no medical treatment was necessary, also mortality was approximately equally (2-4 per treatment) for the various treatments.

The bodyweight development over the similar trial rounds is shown in table 2. The initial bodyweights varied between the similar repetitions but no variation was detected between treatments within one round. Due to the fact that piglets were not completely homogeneously distributed across the rounds, the factors kind of probiotic, gender, trial round, and initial bodyweight were investigated, which could have a significant influence on the realized average bodyweight developments. It's shown in table 3 that the average bodyweight was influenced by the repetition and initial bodyweight. Therefore all measured parameter were corrected for significant effects on the similar parameter via least squares method.

Table 2: Effect of various *Bacillus spp.* probiotics on average piglet bodyweight over the similar trial rounds (kg; mean ± standard deviation)

Treatment	**Control**		***Bac. subt. + lich.***		***Bac. subt.***		***Bac. cere.***	
	mean	**± sd**	**mean**	**± sd**	**mean**	**± sd**	**mean**	**± sd**
Round 1								
BW0	5.89	0.99	5.85	1.11	5.89	0.98	5.90	1.09
BW14	7.67	1.14	7.49	1.32	7.61	1.10	7.86	1.32
BW42	19.98	3.05	20.16	2.95	21.09	3.13	20.84	3.34
Round 2								
BW0	6.85	0.90	6.92	0.95	6.89	0.91	6.96	0.95
BW14	9.45	1.34	9.72	1.37	9.55	1.35	9.87	1.52
BW42	21.60	3.24	22.21	2.27	22.31	3.38	22.34	3.29
Round 3								
BW0	7.72	1.20	7.40	1.07	7.67	1.28	7.37	1.05
BW14	8.88	1.38	8.96	1.59	8.76	1.62	8.64	1.85
BW42	20.49	3.44	19.71	1.64	20.27	3.06	20.72	2.49

BW0 = average bodyweight at the start of the trial, BW14 = average bodyweight at day 14 of the trial, BW42 = average bodyweight at day 42 of the trial

Table 3: Significance explanation and R^2 of the analysis of variance carried out for body weight

	P-model	**R^2 (%)**	**Probiotic**	**Gender**	**Repetition**	**Initial bodyweight**
BW0	-	-	-	-	-	-
BW14	0.0001	68.1	0.4058	0.0828	0.0001	0.0001
BW42	0.0001	42.9	0.1248	0.8946	0.0001	0.0001

BW0 = average bodyweight at the start of the trial, BW14 = average bodyweight at day 14 of the trial, BW42 = average bodyweight at day 42 of the trial

Table 4 is showing the corrected results on the measured zootechnical parameter. After 14 days of trial no difference between any of treatments was recorded on body weight but over the entire trial period piglets fed with *Bac. cereus* gained in tendency better than control piglets (P<0,10), *Bac. subtilis* indicated a numerical improvement in contrast to control (P>0,10), *Bac. subtilis+lichneniformis* didn't showed an effect on body weight. Between the 3 probiotics no significant difference occurred.

The same results were detected for daily weight gain. No explanation can be drawn for the in general low performance level which was not in line with the expectations as well as the sanitary conditions. On daily feed intake no effect was measured by feeding the various probiotics, the same happened for feed conversion ratio. But the trend was monitored, that all probiotics tended numerically to a better feed conversion. In example, within the first 14 days the highest improvement was shown by *Bac. cereus* and within day 14 and 42 and for the entire period by the use of *Bac. subtilis* (0.06 pts resp.).

Table 4: Effect of various *Bacillus spp.* probiotics on corrected average bodyweight, daily weight gain, daily feed intake, feed conversion ratio and faecal score of weaning piglets (Least square mean ± standard error mean)

		Control	***Bac. subt. + lich.***	***Bac. subt.***	***Bac. cere.***	**SEM**	**P=**
BW0	kg	6.67	6.67	6.67	6.67	0.00	0.987
BW14	kg	8.53	8.65	8.51	8.74	0.11	0.152
BW42	kg	**20.51^{A}**	20.68^{AB}	21.17^{AB}	**21.23^{B}**	0.29	**0.077**
DWG0-14	g/day	133	140	131	148	8	0.146
DWG14-42	g/day	**425^{A}**	**428^{A}**	**451^{B}**	442^{AB}	9	**0.052**
DWG0-42	g/day	**329^{A}**	333^{AB}	**345^{B}**	**347^{B}**	6	**0.059**
DFI0-14	g/day	**214^{B}**	**204^{A}**	206^{AB}	212^{AB}	4	**0.078**
DFI14-42	g/day	568	565	572	583	8	0.119
DFI0-42	g/day	450	445	450	459	6	0.101
FCR0-14	kg/kg	1.70	1.52	1.69	1.51	0.12	0.247
FCR14-42	kg/kg	1.33	1.32	1.27	1.32	0.03	0.109
FCR0-42	kg/kg	**1.36^{B}**	1.33^{AB}	**1.30^{A}**	1.32^{AB}	0.02	**0.079**
FS0-14	-	**3.06^{B}**	**2.95^{A}**	3.02^{AB}	2.97^{AB}	0.04	**0.041**
FS14-42	-	3.01	3.00	3.01	3.04	0.03	0.387
FS0-42	-	**3.04^{B}**	**2.96^{A}**	3.02^{AB}	2.99^{AB}	0.03	**0.059**

A,B: different letters in the same row indicate significant differences (P<0,10)
BW (bodyweight): 0 = at trial start, 14 = at day 14 of trial, 42 = at day 42 of trial
DWG (daily weight gain), DFI (daily feed intake), FCR (feed conversion ratio), FS (faecal score): 0-14 = from start till day 14, resp.; 14-42 = from day 14 to trial end, resp.; 0-42 = from the start to end of trial, resp.

Faecal scores indicated normal faeces consistency as an incidence of good sanitary conditions during the trial period. Nevertheless significant differences between control and *Bac. subtilis+lichniniformis* were detected within the first 14 days of trial and over the entire trial period but absolute differences were very tight (about 0,1 unit). By the faecal analysis the correct colony morphologies of the tested strains were quantified as a confirmation of the correct incorporation of the similar probiotic products and the avoidance of cross contamination between treatments.

Summary

The use of *Bacillus spp.* has been shown positive effects in reducing pathogenic pressure in the gut of piglets in numerous studies. Probiotics in this form are able to survive heat stress during pelleting and expansions processes and are compatible with feed agents such as organic acids and therapeutic antibiotics, which are widely used in piglet diets.

In the present trial the efficacy of various probiotic *Bacillus spp.* strains was tested to investigate the impact on growth performance of weaning piglets. Over the entire trial period average daily gain seemed to be enhanced by the use of probiotics, the same happened for feed conversion ratio. Body weight and daily gain of piglets was improved best when receiving *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Feed conversion was affected best by the use of *Bacillus subtilis*. Faecal score was not clearly affected

by probiotics and quantified colony morphology confirmed the correct inclusion of the similar probiotics.

From the obtained results it can be concluded that probiotic *Bacillus spp.* strains are able to enhance zootechnical performance of weaning piglets. The partially significant differences shown in contrast to control animals demonstrate this, but no significant differences occurred between the 3 tested strains. To receive a better response of probiotics the environmental conditions play an important role, too, under more challenging conditions stronger effects may be expected.

References

Barton M.D. (2000): Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, 13, 279-299.

Fritts, C., Kersey, J., Motl, M., Kroger, E. Yan, F., Jiang, J., Campos, M., Waldroup, L., Waldroup P. (2000): Bacillus subtilis C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbial status of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 9, 149-155.

Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66, 365-368.

Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K., Kaminogawa, S. (2000): Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of Bacillus subitlis (natto), catalase or subtilisin. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 892-897.

Kampf, D. (2012): Mode of action of Bacillus subtilis and efficiency in piglet feeding. *Feed Compounder*. (2), 30-31.

Kritas, S.K., Petridou, E., Valergakis, G., Fortomaris, P., McCartney, E., Marubashi, T. (2010): Efficacy of the thermo-tolerant probiotic, containing Bacillus subtilis spores, in weaned pigs. *Proceedings of the 21st IPVS Congress*, Vancouver, Canada, July 18-21, 1020

Medel, P., Esteve-García, E., Kritas, S., Bontempo, V., Marubashi, T., McCartney, E., Sánchez, J. (2009): Efficacy of a probiotic (Bacillus subtilis C-3102) in weaned piglets. *Proceedings of the 60th Annual Meeting of the EAAP*, Barcelona, Spain, August 24-27, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 515.

Marubashi, T., Gracia, M.I., Vilà, B., Bontempo, V., Kritas, S.K., Piskoríková, M. (2012): The efficacy of the probiotic feed additive Calsporin® (Bacillus subtilis C-3102) in weaned piglets: combined analysis of four different studies. *Journal of Applied Animal Nutrition*, 1 (2), 1-5.

Maruta, K., Miyazaki, H., Masuda, S., Takahashi, M., Marubashi, T., Tadano, Y., Takashi, H. (1996): Exclusion of intestinal pathogens by continuous feeding with Bacillus subtilis C-3102 and its influence on the intestinal microflora in broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 67 (3), 273-280.

Nollet, L. (2005): Stability of Calsporin® during pelleting of broiler feeds at 70, 80 or 90°C. CLO-INVE, Dendermonde, Belgium. Study code: PelInveCal0204/Broiler feeds.

Ragione, R., Woodward, M. (2003): Competitive exclusion by Bacillus subtilis spores of Salmonella enterica serotype enteritidis and Clostridium perfringens in young chickens. *Veterinary Microbiology*, 94, 245-256.

Corresponding author

Dr. Detlef Kampf
Orffa Additives B.V.
Vierlinghstraat 51
4251 LC Werkendam, Netherlands
E-mail: kampf@orffa.com

The effect of supplemental protease on digestibility of nitrogen and amino acids in piglets

S. Nitrayová, M. Brestenský, J. Heger and P. Patráš

National Agricultural and Food Centre, Institute of Nutrition, Nitra, SK

Introduction

Amino acid digestibility of soybean meal, the main protein source in common pig diets, may be compromised by the presence of residual soybean trypsin inhibitors and lectins which may cause the inactivation and hypersecretion of pancreatic serine proteases such as trypsin and chymotrypsin. Also, the enzymatic system in weaned piglets is not fully developed to be able to digest protein sources of plant origin effectively (Makkink and Verstegen, 1990). Activity of proteolytic enzymes increases from the 7th week of life and total activity of chymotrypsin and trypsin is elevated linearly with age (Lindeman et al., 1986). The supplements of a microbial protease to weaner diets may complement the digestive enzymes of the young piglets and/or to degrade trypsin inhibitors and lectins, thus improving protein digestibility and animal performance.

Application of exogenous enzymes for improvement of animal production is not a new idea and it was intensively studied in poultry (Selle et al., 2000; Acamovic, 2001; Cowieson, 2005) and also in pigs (Caine et al., 1997, Omogbenigung et al., 2004, Willamil et al., 2009). Some scientists observed effect of "enzyme cocktails"- combination of different enzymes, on nutrient digestibility in poultry (Covieson and Adeola, 2005, Yegani and Korver, 2013) and pigs (Omogbenigung et al., 2004, Pierzynowski et al., 2012), but the results showing better nutrient utilization are inconsistent. Experiments evaluating the effect of proteases on digestibility of nutrients are contrary (or inconsistent) too.

The objective of this study was to investigate the effect of microbial serine protease on apparent ileal and faecal digestibility of total N and on apparent ileal digestibility of amino acids in piglets.

Materials and methods

Animals and experimental design

A total of 7 female piglets (Slovak Large White x Landrace) of the Institute herd with a mean initial body weight 22.5 kg were used. The animals were housed individually in metabolism cages and fed a common starter diet. After a 5-day adaptation period, the piglets were fitted with a simple T-cannula at terminal ileum. A standard procedure of cannulation developed previously was used. After a recovery period of 14 days, the piglets were weighed and assigned to three dietary treatments using a cross-over design. The experiment comprised a control basal diet (BD) treatment and two experimental treatments with standard (P1; 15 000 PROT/kg) and high (P2; 150 000 PROT/kg) dietary levels of Ronozyme® ProAct, which is a protease preparation marketed by DSM Nutritional Products Ltd. for use in poultry feeds. Piglets were allotted to 3 x 7 factorial arrangement with 7 animals and 3 diets.

Diets and feeding

The basal diet (Table 1) served as a control and was formulated to meet or exceed the requirements for nutrients and energy as given by NRC (1998) for piglets. Except for small amount of fish meal,

only plant proteins were used in the diet. Soybean meal with low CP content (45 % CP) served as the main protein source. Chromic oxide was included as an indigestible marker. To the basal soybean meal-based diet (BD) protease was added via premix to provide 15 000 and 150 000 protease units per kg, thus forming experimental diets P1 and P2, respectively. The diets were fed twice daily at 7.00 and 17.00 h in two equal meals at a daily rate of 90 g/kg$^{0.75}$. Water was available *ad libitum.* The spilled feed was dried and weighed to check the actual feed intake.

Table 1: Composition and calculated nutrient content of the basal diet (g/kg air-dry)

Barley	15.00
Maize	38.84
Dehulled oats	10.00
Soybean meal 45% CP	25.24
Fish meal 64% CP	5.00
Sunflower oil	2.12
Limestone	1.03
Monocalcium phosphate	1.37
Salt	0.32
L-lysine.HCl	0.33
DL-methionine	0.04
L-threonine	0.11
Vitamin - mineral premix*	0.30
Chromic oxide	0.30
ME (MJ/kg)	13.50
Crude protein	218.40
Crude fibre	34.25
Calcium	9.50
Total phosphorus	8.70
Digestible phosphorus	5.12
Sodium	2.12
SID lysine	12.62
SID threonine	7.82
SID methionine + cystine	6.72
SID tryptophan	2.22

*provided the following per kg of diet: vit A 4 300 000 m.j, vit D3 625 000 m.j., vit E 25 000 mg, vit B1 83000 mg, vit B2 2 000 mg, vit B6 1 300 mg, vit B12 10 000 µg, vit K3 1 000 mg, vit C 26 600 mg, biotin 80 mg, folic acid 330 mg, niacin 13 300 mg, calcium pantothenate 6 600 mg, choline 83 400 mg, endox 42000 mg, Cu 50 300 mg, Zn 46 700 mg, Mn 20 000 mg, Fe 41 600 mg, Co 165 mg, I 495 mg, Se 130 mg, added to 1 kg with feed flour

Digestibility study

Each experimental period consisted of a 6-day preliminary period followed by a 24-h collection period during which ileal digesta was collected into plastic bags attached to the cannula barrel in approximately 60-min intervals and immediately chilled with ice. At the end of the collection period, the samples were homogenized, frozen to -20 °C, lyophilized, ground to pass a 0.5 mm screen and stored for subsequent analysis. Faeces were collected for the last two days of each experimental period, stored at 4°C and then homogenized to obtain representative samples for subsequent analysis.

Chemical analysis

Dry matter and total nitrogen were analyzed in accordance with AOAC (1989) standard procedures. The amino acid composition of diets and digesta were analyzed by ion-exchange chromatography (AAA automatic analyzer, Ingos, Prague) using the manufacturer's recommendation. Chromic oxide

was determined by atomic absorption spectrometry as described by Williams et al. (1962). The proteolytic activity of Ronozyme® ProAct in experimental diets P1 and P2 was measured by DSM Nutritional Products Ltd.

Calculations

Coefficients of apparent digestibility (AD) of amino acids and of total N were calculated using the following formula: $AD [\%] = 100 \times [1-(N_i \times C_d)/(N_d \times C_i)]$

where N_d = dietary concentration of the nutrient under study, C_d = dietary concentration of Cr_2O_3, N_i = concentration of the nutrient in ileal digesta (faeces) and C_i = concentration of Cr_2O_3 in ileal digesta (faeces). All values were expressed as $g.kg^{-1}$ dry matter.

Statistical analysis

Data were subjected to ANOVA using Statgraphic Plus 3.1. package. When significant values for treatment effect were observed ($P<0.05$), the differences between means were assessed using Fisher's LSD procedure.

Results and discussion

The results of diet analysis for their proteolytic activity (Table 2) showed that there was a close agreement between the declared and determined values.

Table 2: Determined proteolytic activity of experimental diets

Diet	Activity (PROT/kg)		
	Declared	Determined	CV (%)
BD	0	below LOD (level of detection)	
P1	15 000	14 577	4
P2	150 000	147 995	1

Table 3: Determined nitrogen and amino acid contents in diets (g/kg DM)

	BD	P1	P2
Total nitrogen	39.61	39.24	39.22
Alanine	10.43	10.30	10.62
Arginine	16.68	16.36	16.62
Aspartic acid	20.44	20.13	20.49
Cystine	3.14	3.16	3.08
Glutamic acid	36.79	37.03	38.09
Glycine	9.83	9.82	9.88
Histidine	6.31	6.21	6.32
Isoleucine	8.82	8.81	8.77
Leucine	18.61	18.58	18.80
Lysine	15.30	15.23	16.67
Methionine	4.08	3.80	3.75
Phenylalanine	11.04	10.85	10.98
Proline	12.48	12.69	13.24
Serine	11.48	10.92	11.78
Threonine	10.38	10.44	10.24
Tyrosine	6.54	6.39	6.55
Valine	10.74	10.77	10.80

The samples of basal (BD) and experimental diets (P1 and P2) were analyzed for total nitrogen and amino acids to check their composition. The results are summarized in Table 3. There were no major differences between the diets as for protein or amino acid composition.

The mean coefficients of apparent ileal and faecal digestibility of dry matter and total nitrogen are given in Table 4. There was no significant effect of standard or high level of protease on ileal or faecal digestibility, even though a slight numerical increase in nitrogen digestibility was observed. However, the improvement was only about 1 relative percent. Similarly, the results of Jo et al. (2012) indicate that supplementation of 0.05% of AMP (α-amylase + β-mannanase + protease) enzymes to a corn-soybean meal diet did not improve values of apparent total tract digestibility of nutrients.

The coefficients of nitrogen digestibility found in the present experiment were similar to those estimated by Knabe et al. (1989) in growing pigs fed diets containing soybean meal (44% crude protein) as the main protein ingredient. The authors mentioned above reported mean values of 78 and 85 % for ileal and faecal N digestibility, respectively. Therefore, it seems that the pigs having more than 30 kg body weight possess an efficient proteolytic system capable of digesting proteins of common feeds and that even the ten-fold increase of the microbial protease supplement is unable to improve protein digestibility.

Table 4: Coefficients of apparent ileal and faecal digestibility of dry matter and of total N (%)

Treatment	Digestibility			
	Ileal		Faecal	
	dry matter	nitrogen	dry matter	nitrogen
BD	68.3	77.0	84.6	85.5
P1	67.1	77.7	85.6	86.0
P2	68.3	77.8	85.0	86.8
Pooled SEM	0.70	0.67	0.66	0.89
P-value	0.41	0.63	0.54	0.57

Table 5: Coefficients of apparent ileal digestibility of amino acids (%)

Amino acid	Diet			Pool SEM	P-value
	BD	P1	P2		
Alanine	77.6	78..2	79.4	0.86	0.33
Arginine	87.9	88.5	88.7	0.48	0.51
Aspartic acid	75.3	75.0	75.9	0.60	0.55
Cystine	68.1	69.5	70.9	0.98	0.15
Glutamic acid	83.6	84.4	84.7	0.69	0.51
Glycine	69.6	70.5	71.3	0.96	0.48
Histidine	78.0	78.0	78.4	0.65	0.88
Isoleucine	81.9	83.0	83.1	0.61	0.34
Leucine	82.5	83.6	83.6	0.60	0.36
Lysine	85.2	85.5	86.9	0.54	0.09
Methionine	87.1 [a]	86.7 [a]	84.6 [b]	0.61	0.03
Phenylalanine	82.9	83.3	84.2	0.60	0.33
Proline	75.1	78.2	78.9	1.76	0.30
Serine	77.7	77.3	79.0	0.69	0.21
Threonnine	75.7	75.8	75.6	0.78	0.98
Tyrosine	67.0 [a]	66.7 [a]	72.6 [b]	1.48	0.02
Valine	79.3	80.2	80.6	0.70	0.41

[a,b] Means within a row with a different superscript are significantly different (P<0.05)

The mean data on apparent ileal digestibility of amino acids are presented in table 5. In general, the values of apparent ileal digestibility tended to increase with increasing level of supplemental enzyme. However, the response was very small and, except for methionine and tyrosine, insignificant. The digestibility of methionine in treatment P2 was significantly lower ($P<0.05$) as compared with treatments BD or P1, the relative decrease being about 3 %. In contrast, the addition of the higher protease level resulted in a significant increase ($P<0.05$) in apparent tyrosine digestibility.

Conclusion

The inclusion of both levels of microbial protease to a soybean meal-based diet for piglets had no significant effect on ileal or faecal digestibility of nitrogen, even though a slight numerical increase in N digestibility was observed. However, the improvement was only about 1 relative percent. Likewise, the apparent ileal digestibility of amino acids tended to increase with increasing level of supplemental enzyme, but the response was very small and, except for methionine and tyrosine, insignificant.

There were no significant differences between the responses of piglets to both inclusion levels of Ronozyme® ProAct.

Acknowledgements

This article was written during realization of the project "ZDRAVIE no. 26220220176" supported by the Operational Programme Research and Development funded from the European Regional Development Fund. Financial support by DSM Nutritional Products Ltd is highly appreciated.

References

Acamovic, T. 2001. Commercial applications of enzyme technology for poultry production. World's Poult. Sci. J. 57:225–243.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Assoc. Offic. Anal. Chem., Washington, DC.

Caine, W. R., Sauer, W. C., Tamminga, S., Verstegen, M. W. A., Schulze, H. 1997. Apparent ileal digestibilities of amino acids in newly weaned pigs fed diets with protease-treated soybean meal 1997. J Anim. Sci., 75:2962-2969.

Cowieson, A. J. 2005. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. Anim. Feed Sci. Technol. 119:293–305.

Cowieson, A. J., and O. Adeola. 2005. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. Poult. Sci. 84:1860–1867.

Jo, J. K., Ingale, S. L., Kim, J. S., Kim, Y. W., Kim, K. H., Lohakare, J. D., Lee, J. H. and Chae, B. J. 2012. Effects of exogenous enzyme supplementation to corn- and soybean meal-based or complex diets on growth performance, nutrient digestibility, and blood metabolites in growing pigs. J. Anim. Sci. 90, 3041-3048.

Knabe D.A., LaRue D.C., Gregg E.J., Martinez G.M., Tanksley T.D., Jr. 1989. Apparent digestibility of nitrogen and amino acids in protein feedstuffs by growing pigs. J. Anim. Sci. 67, 441-458.

Lindemann, M. D., S. G. Cornelius, S. M. El Kandelgy, R. L. Moser, and J. E. Pettigrew. 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. J. Anim. Sci. 62:1298–1307.

Makkink, C. A., and M.W.A. Verstegen. 1990. Pancreatic secretion in pigs. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 64:190-208.

Omogbenigun F. O., C. M. Nyachoti and B. A. Slominski. 2004. Dietary supplementation with multienzyme preparations improves nutrient utilization and growth performance in weaned pigs, 2004. J Anim. Sci.. 82:1053-1061.

Pierzynowski S., Szwiec K., Valverde Piedra J.L., Gruijc D., Szymanczyk S., Swieboda P., Prykhodko O., Fedkiv O., Kruszewska D., Filip R., Botermans J., Svendsen J., Ushakova G., Kovalenko T., Osadchenko I., Goncharova K., Skibo G., Weström B. 2012. Exogenous pancreatic-like enzymes are recovered in the gut and improve growth of exocrine pancreatic insufficient pigs. J Anim. Sci. 90 Suppl 4:324-326.

Selle, P. H., V. Ravindran, R. A. Caldwell, and W. L. Bryden. 2000. Phytate and phytase: Consequences for protein utilization. Nutr. Res. Rev. 13:255–278.

Willamil, J., Badiola, J.I, Torrallardona, D., Geraert, P.A., Devillard, E. 2009. Effect of enzyme supplementation on nutrient digestiblity and microbial metabolite concetrations in ileal and caecal digesta of growing pigs. Book of abstracts, p. 98, Digestive physiology of pigs, XI International symposium, Montbrio del Camp, Costa Daurada, Spain, 20-th – 22-nd May, 2009.

Williams C.H., David D.J., Lismoa O. 1962. The determination of chromic oxide in fecal samples by atomic absorption spectrophotometry. J. Agric. Sci. 59: 381-390.

Yegani M. and Korver D.R. 2013. Effects of corn source and exogenous enzymes on growth performance and nutrient digestibility in broiler chickens. Poult. Sci. 92:1208-1220.

Corresponding author

Soňa Nitrayová
National Agricultural and Food Center, Reasearch Institute of Animal Production Nitra,
Institue of Nutrition, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovakia
E-mail: nitrayova@vuzv.sk

Sunpro-46

Sunpro is a **high protein concentrate** derived from sunflower extraction meal through a patented technology.

Sunpro contains a minimum of 46% crude protein and less than 8% crude fibre.

Sunpro is free of GMO.

Sunpro contains high levels of essential amino acids.

Also available as Sunpro-20 with a minimum of 18% crude protein and over 36% crude fibre.

Manufacturer: BONMIX Ltd
North Industrial Zone
5500 Lovech
Tel.: +359 68 602 132
Email: marketing@bonmix.bg
Web: www.bonmix.bg

Representation Austria: BonAgro GmbH
Campus 21, Businesspark Wien Süd
2345 Brunn am Gebirge
Tel.: +43(0)69918163080
Email: office@bonagro.at
Web: www.bonagro.at

Step by step improvement of performance of weaned piglets with an intimate combination of a high intensity sweetener and phytonutrients

A.L. Wagner[1], C. Oguey[2], C. Bruneau[2], D. Bravo[2] and B. Viel[2]

[1] Cooperative Research Farms, Richmond, VA
[2] Pancosma S.A. Le Grand –Saconnex, Geneva, CH

Introduction

Piglets weaning is a highly challenging phase due to the stress associated with the numerous changes occurring. New breeding allocation, litter mates change and feed form evolution are some of the elements which directly impact the animal and its performance. The first parameter affected is feed intake which drops during the first days and results in a negative energy balance for an animal with few body reserves. In addition to the physical and immune weakening of the piglet, this low feed intake compromises intestinal development possibly leading to diarrhea which as a drawback will limit intake and growth. Promoting feed consumption is therefore crucial. To achieve this aim in addition to a specific attention to formulation the use of palatability agent is frequent. High intensity sweeteners are commonly added and one of them (SUCRAM®) has been shown to increase feed consumption, reduce diarrhea and improve weight gain (Sterk, 2008). Recently, it has also been shown that this sweetener was detected by enteroendocrin cells and induced the release of a gut trophic hormone (GLP-2). This led to a greater capacity of glucose absorption and improved villi development (Shirazi-Beechey, 2013). In order to implement the benefits of this product, it has been intimately combined with anethol renown for its soft and fresh odor and for its benefits as phytonutrient. Indeed, anethol is known to be an immune modulator and have a strong antioxidant and gastro protecting activity (Gülçına, 2003 and Kim, 2013). This combination (TakTik® X-IN, TT) targets feed intake and intestinal development via two modes of action possibly synergic. Some trials done with piglets at weaning effectively showed the beneficial output of this product. In order to implement this product knowledge, this trial has been set up to evaluate this product efficacy in a medicated context.

Materials and methods

One group of 360 crossbred piglets (PIC) aged of about 20 days and initially weighing on average 5.5kg (±0.2kg) were used in this experiment. Borrows and guilts were divided depending on their initial weight and gender into 36 pens: 15 of borrows, 15 of guilts and 6 of guilts and borrows. Pens, 10 animals in about 2.79m^2, were then allocated to 3 dietary treatments in a randomized complete-block design (12 pens per treatment).

Animals were fed *ad libitum* via one 4-hole self-feeder and one combination nipple-cup waterer. For all treatments the 3 phases feeding program consisted the first week in a pre-starter diet (26.2% CP, 5.4% CF, 3473 kcal/kg ME). Then, during weeks 2 and 3, a starter diet was offered (25.4% CP, 5.6% CF, 3407 kcal/kg ME) and finally from week 4 to 6 a grower diet was provided (23.8% CP, 5.9% CF, 3391 kcal/kg ME). All diets were supplemented with 441 ppm chlortetracyclin, 39 ppm tiamulin, 2'000 ppm Zn and 264 ppm Cu.

During the whole trial, the dietary treatment considered as control (Ctrl) was not supplemented with the evaluated additive. The second treatment was a full supplementation (FS) done with 150 gram of

TT per ton of feed during all the experiment (12 pens). Finally, a partial supplementation (PS) was done with the same dosage of additive but only during the pre-starter and starter phase (Table 1).

Table 1: Description of the treatments

		Treatment, TT supplementation in g/t of feed		
		Ctrl	PS	FS
Feeding phase	Pre-starter, week 1	0	150	150
	Starter, week 2 and 3	0	150	150
	Grower, week 4 to 6	0	0	150

Piglet body weight was checked individually initially and then per pen by the end of each week. Feed consumption was also measured weekly per pen. Based on these data feed intake, body weight, body weight gain and gain to feed ratio values were obtained. All were analyzed using the MIXED procedure of SAS Version 9.3 (SAS Institute Inc., Carey, NC) with treatment and block as the fixed and random effects, respectively. Pen served as the experimental unit and differences among treatment least square means were assessed using the PDIFF option. Statistical significance and tendencies were considered at $P \leq 0.05$ and $0.05 < P \leq 0.10$.

Results

From week 1 to 3 results from FS and PS data were regrouped (N=24) and compared to Ctrl. During the prestarter phase, TT supplementation did not modify feed consumption and weight gain ($P = 0.83$ and $P = 0.49$, respectively). However, during the starter phase improvement of feed intake (+7.6%, $P < 0.05$) and body weight gain (+3.1%, $P < 0.1$) were measured for piglets supplemented with TT. During these three weeks an overall improvement of feed intake ($P < 0.05$) and weight gain ($P < 0.1$) was reported for animal supplemented with the additive (Table 2).

Table 2: Evolution of feed consumption and weight gain from week 1 to 3

		Ctrl	PS and FS	SEM	*P* - value
Feed intake, in g/d	Week1	112.2	112.9	2.8	0.832
	Week 2 and 3	433.7	466.6	7.0	0.001
	Week 1 to 3	326.5	348.7	5.9	0.002
Weight gain, in g/d	Week1	107.5	110	3.0	0.485
	Week 2 and 3	425.2	438.5	6.2	0.085
	Week 1 to 3	326.5	348.7	5.9	0.09

From weeks 4 to 6 there was no difference regarding feed consumption between the 3 treatments ($P = 0.42$). However, weight of animal still supplemented with TT (FS) had a greater weight gain than the ones of Ctrl and PS (no longer supplemented with TT) (on average +4.2%, $P < 0.05$). The gain to feed ratio of piglet fed FS was on average enhanced of 4.8% ($P < 0.05$).

For the whole trial, feed intake was not affected by the treatments ($P = 0.14$). But, FS resulted in the highest body weight gain, Ctrl to the lowest one ($P < 0.03$) and PS led to an in between result. Finally, looking at feed to gain ratio FS optimized this parameter ($P < 0.05$) compared to Ctrl and PS (figure 1).

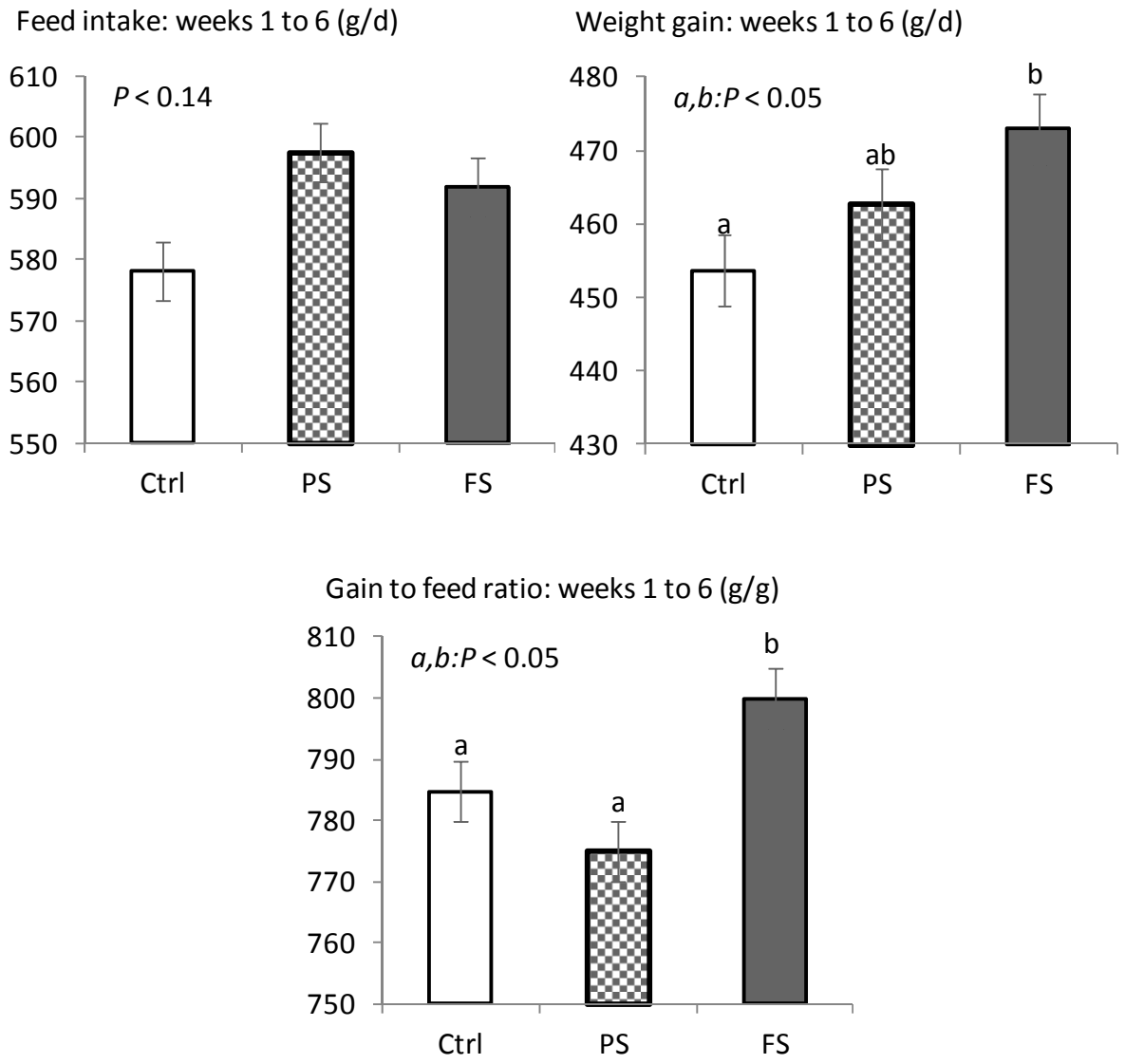


Figure 1: Impact of the treatments on the whole trial performance of piglets

Discussion

This trial showed that the supplementation of TT improved performance parameters during the weaning transition. The first week after weaning no effect of the product was noticed but it resulted during the two following weeks in a greater feed consumption, followed then by a greater gain to feed ratio. These two elements induced each time a greater gain of weight of the piglets.

The delay of apparent efficacy is difficult to explain if this additive is only considered as a palatant. Indeed, its effect on feed intake should have been observed more or less instantaneously and should not have disappeared after 3 weeks. However, TT formulation is based on actives which targets palatability and additionally gut development. This greater development is nonetheless not instantaneous and this especially in the case of a weaning animal with limited resources. Therefore,

the week of apparent delay might in fact be a week of development of the intestinal tract functionality. Active substances of TT target GLP-2 release known to induce crypt proliferation. The enterocytes produced might also be more efficiently protected thanks to the antioxidating effect of anethol. This should progressively result in a more functional gut mucosa supporting the absorption of nutrient in greater amounts. Knowing that feed intake is favorably influenced by diet digestibility (Patience, 1995), the greater feed intake observed during week 2 and 3 could be explained by the enhance gut maturity. Then, from weeks 4 to 6 feed aversion might no longer be an issue explaining the absence of impact on intake. Nonetheless, by this stage the favorable effect of the additive at gut level supporting its development and maintenance could explained the higher gain to feed ratio. Consequently, the main effect of this intimate combination of high intensity sweeteners and phytonutrients is probably due to its impact at gut level.

Finally, the interest of using this additive was not limited to the starter phases. It was also improving performance during the growing stage. In addition, during this phase it optimized feed use which is economically becoming valuable due to the greater amounts consumed and greater price pressure on formulation. This supplementation might be considered for a longer duration than the weaning transition.

References

Gülçına I., Oktayb M., Kıreçcıc E., Ö.İrfan Küfrevıoğlu O.I., 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (Pimpinella anisum L.) seed extracts. Volume 83, Issue 3, November 2003, Pages 371–382

Kim D. K., Lillehoj H.S., Lee S.H., Jang S.I., Park M.S., Min W., Lillehoj E.P., Bravo.D., 2013. Immune effects of dietary anethole on Eimeria acervulina infection. Poultry Science 92 :2625–2634.

Patience J.F., Thacker P.A, De Lange C.F.M, 1995. Swine nutrition Guide. 2nd Edition. Prairies Swine Center Inc.

Shirazi-Beechey S.P., Daly K., Al-Rammahi M., Moran A.W., Bravo D, 2013. Role of nutrient-sensing taste 1 receptor (T1R) family members in gastrointestinal chemosensing British Journal of Nutrition.

Sterk A., Schlegel P., Mul A.J., Ubbink-Blanksma M., E. M. A. M. Bruininx E.M.A.M, 2008. Effects of sweeteners on individual feed intake characteristics and performance in group-housed weanling pigs. Journal of Animal Science.November 2008 vol. 86 no. 11 2990-2997.

Corresponding author

Bastien Viel
PANCOSMA
Voie des Traz 6
1218 Le Grand-Saconnex, Switzerland
E-mail: bastien.viel@pancosma.ch

Comparison between a cost-optimized feed-calculation for fattening pigs based on ME as well as NE at reduced protein content on the performance of pigs

Anne Winkler[1], Georg Dusel[1], Jörg Bartelt[2] and Etienne Corrent[3]

[1] University of Applied Science Bingen, DE
[2] Lohmann Animal Health GmbH Cuxhaven, DE
[3] Ajinomoto Eurolysine Paris Cedex, FR

Introduction

The aim of an economic productive pig fattening is the optimization of performance and slaughter parameter in association with reduced feeding costs. The supply of energy for animals adapted to their requirement is responsible for proportionally higher feeding costs. Therefore an energetic feed evaluation system is an essential condition for the economic assessment of feedstuffs used in animal feed rations. Whereas the metabolized energy (ME) is used for the energetic feed evaluation in Germany other countries like the Netherlands, France, Denmark, USA or China estimate the feed for pigs based on a net energy (NE) system. In contrast to ME system, the NE system considers the heat increment of feeding reflecting the energetic inefficiency during utilization of nutrients. Therefore, the NE estimates the part of feed energy retained in animal products and used for maintenance purposes. As a result of different heat increment, the energy value of protein-rich feedstuffs is overestimated when expressed on ME basis in comparison to NE. On the other hand, fat or starch sources are underestimated by the ME system. When NE system is used, the feed optimization leads to a reduction of the dietary crude protein content by a better valorization of cereals together with feed use amino acids. Low protein diets supplemented with the most important essential amino acids are able to relieve the metabolism, to decrease nitrogen excretion into the environment, to minimize dependence of protein sources like soybean meal and to reduce feeding costs. To verify these possibilities, we investigated the effect of energy system during least cost formulation on the performance of fattening pigs.

Materials and methods

The study was conducted with 180 pigs (♀/♂ 1:1 - Topigs x Pietrain) fed 3 treatments between 26 kg body weight (BW) and slaughter weight (approx. 115 kg BW). The pigs were housed on continuous solid floor with two pigs per pen. Therefore they were individually ear-tagged and weighted and balanced by weight and gender randomly allocated to an experimental diet. The feed (two-phases, I: from 26 to 75 kg BW, II: from 75 to approx. 115 kg BW) based on wheat, barley, corn and soybean meal was offered daily as pelleted feed ad libitum in an automatic feeder. Treatment A and B differed in the crude protein content at equal energy level calculated on metabolized energy. Treatment C had the lowest crude protein content and the energy content calculated on net energy was equal compared to treatment A (table 1). NE values of feedstuffs were taken from INRA tables (2004). The calculated standardised ileal digestible lysine levels in the diets were 0.90 % and 0.75 % in phase I and II, respectively.

The other essential amino acids correspond to the ideal amino acid profile of Ajinomoto Eurolysine s.a.s. (2011). Each treatment comprises 60 replicates for body weight and 30 replicates for feed in-

take, feed conversion ratio and slaughter parameters (equally distributed to barrows (castrated) and females). Water was offered ad libitum whereby each pen contained one water nipple.

To quantify the nitrogen utilization a N-balance study with 4 castrated pigs per treatment (only treatments A and C) and feed phase (phase I and II) were conducted according to the instructions of the Committee for Requirement standards of the Society of Nutrition Physiology (GfE, 2005). Crude nutrients in feed were analysed according to the methods of VDLUFA at the Laboratory of the University. The analysis of AA in diets was performed by Ajinomoto Eurolysine s.a.s. according to Commission regulation N° 152/2009 - standard NF EN ISO 13903. The tryptophan content in the diets was determined after hydrolysis at 120°C for 16 h with barium hydroxide and separation by reverse-phase HPLC and fluorometric detection. Analysis of variance (ANOVA) and comparisons of mean differences between groups (Tukey-HSD-test, $p<0.05$) were performed using STATISTICA for Windows Operating System. Significant differences are identified with lower case letters.

Results and discussion

The expected lowering of protein level for diet B in phase II was not achieved as compared with phase I. Therefore, the analysed contents of Lys, Met, Thr and Trp were higher in comparison to the other diets in this feeding phase (table 1). The same level of performance (weight gain, feed intake, feed conversion ratio) was obtained in both feeding phases as well as during the whole fattening period. Additionally, no differences were determined in the slaughter performance (table 2). However, the higher lysine supply in treatment B could be responsible for the improvement of feed conversion in phase II. The plasma urea nitrogen was significantly decreased ($p<0.001$) by the lower protein content in diet C (13.1 %) during phase II compared to diet A (16.3 %) and B (17.2 %) (table 2). The daily nitrogen excretion was significantly reduced in both feeding phases ($p<0.05$) I and II for pigs fed diet C compared to diet A during N-balance study. Additionally, pigs fed the diet C retained significantly more nitrogen ($p<0.05$) in phase I (table 3).

Table 1: Feed characteristic and experimental design

Parameter	Phase I (25-75 kg BW)			Phase II (75-115 kg BW)		
	A ME	B ME-low CP	C NE-low CP	A ME	B ME-low CP	C NE-low CP
Dry matter, %[1]	87.8	88.1	88.4	88.1	88.4	88.2
Crude protein, %[1]	19.1	17.9	17.5	16.3	17.2	13.1
ME MJ/kg[2]	13.4	13.4	13.3	13.4	13.4	13.2
NE MJ/kg[2]	10.0	10.1	10.0	10.1	10.2	10.1
Lysine, %[1]	1.06	1.05	1.05	0.81	0.97	0.75
Threonine, %[1]	0.75	0.74	0.73	0.60	0.71	0.57
Methionine, %[1]	0.29	0.31	0.30	0.23	0.26	0.21
Cystine, %[1]	0.31	0.32	0.29	0.28	0.30	0.25
Tryptophan, %[1]	0.24	0.23	0.23	0.20	0.21	0.17
Valine, %[1]	0.86	0.82	0.81	0.74	0.77	0.57
Isoleucine, %[1]	0.75	0.69	0.68	0.62	0.65	0.45
Leucine, %[1]	1.34	1.25	1.25	1.11	1.16	0.89

[1)] analysed total amino acids
[2)] calculated

The economical evaluation of the different feeding is given in table 4. The reduction of crude protein (diet B) lowered the feeding costs for 0.96 €/pig compared to diet A. In combination with energy evaluation based on NE (diet C), the feeding cost decreased by 1.15 €/pig. Cleared with the slaughter

receipts, pigs fed with diet C realised 1.00 € per pig more compared to the pigs fed with diet A. The higher savings in treatment B are related to the higher lysine supply. A comparison to the other two diets is not appropriate.

Table 2: Performance parameters and blood results

	A ME		**B ME-low CP**		**C NE-low CP**		Analysis of Variance	
DAY	MEAN	*SD*	MEAN	*SD*	MEAN	*SD*	SEM	p-level
Body weight (kg)								
BW 0	25.8	2.9	26.0	3.2	25.8	3.2	0.23	0.955
BW 60	75.2	7.7	75.4	6.4	75.6	7.5	0.55	0.969
BW slaughter day	113.4	6.2	114.1	5.9	113.9	7.1	0.49	0.835
Average daily gain (g)								
ADG phase I	838	105	838	86	843	106	7.5	0.952
ADG phase II	961	116	969	126	973	141	9.8	0.888
ADG total	888	76	892	75	894	86	6.1	0.928
Daily feed intake (g)								
DFI phase I	1816	290	1905	234	1885	227	26.6	0.358
DFI phase II	2741	324	2699	366	2755	448	40.0	0.842
DFI total	2218	280	2248	188	2240	203	23.7	0.873
Feed conversion ratio (kg feed/kg weight gain)								
FCR phase I	2.26	0.18	2.27	0.16	2.25	0.16	0.017	0.892
FCR phase II	2.89	0.35	2.81	0.24	2.96	0.29	0.031	0.167
FCR total	2.54	0.23	2.51	0.13	2.56	0.15	0.018	0.488
Slaughter performance (n=30 pigs per treatment)								
Slaughter weight (kg)	91.4	3.3	91.9	3.1	91.9	3.1	0.332	0.792
Lean rate FOM (%)	55.1	4.0	55.5	3.2	54.6	3.2	0.366	0.646
Loin eye fat (cm^2)	16.90	3.99	17.14	3.61	18.24	3.98	0.408	0.363
Loin eye meat (cm^2)	53.52	4.62	51.70	3.81	53.00	3.96	0.440	0.221
Meat rate belly (%)	57.51	3.06	57.26	2.59	56.96	3.04	0.304	0.764
Meat rating – FBZ	50.12	11.43	51.57	13.05	53.68	9.45	1.198	0.482
Plasma urea nitrogen (mmol/l)								
Urea nitrogen phase I	4.50	0.74	4.89	1.21	4.06	0.51	0.165	0.121
Urea nitrogen phase II	5.65[a]	0.88	5.40[a]	1.19	3.67[b]	0.77	0.235	**<0.001**

Table 3: N-Balance

		Phase I (25-75 kg LW)			**Phase II (75-115 kg LW)**		
		A ME	C NE-low XP	p-level	A ME	C NE-low XP	p-level
Daily intake							
N	g	53.7 [a]	49.7 [b]	**0.019**	58.3 [a]	46.7 [b]	**0.002**
Daily N excretion							
N total	g	36.2 [a]	25.8 [b]	**0.009**	47.0	37.1	0.060
N feaces	g	8.8	7.1	0.228	7.0	6.4	0.424
N urine	g	27.4 [a]	18.7 [b]	**0.044**	40.0 [a]	30.8 [b]	**0.047**
N-Balance							
Daily N retained	g	17.5 [a]	23.9 [b]	**0.030**	11.3	9.6	0.669
N (% of N intake)	%	32.6 [a]	48.2 [b]	**0.021**	19.4	20.4	0.908

Table 4: Economic evaluation

	A		**B**		**C**		Analysis of Variance	
	ME		**ME-low CP**		**NE-low CP**			
DAY	MEAN	*SD*	MEAN	*SD*	MEAN	*SD*	SEM	p-level
Feed costs in € per pig (n=30 per treatment)								
Feed cost (phase I)	36.0	3.7	35.8	4.1	35.0	3.1	0.389	0.529
Feed cost (phase II)	29.1	3.9	28.3	3.9	28.9	3.9	0.415	0.716
Feed cost (total)	65.1	4.6	64.1	5.5	63.9	4.6	0.524	0.634
Difference vs. treatment A			0.96		1.15			
Slaughter performance and slaughter income (n=30 per treatment)								
Carcass proceeds (€/kg)	1.59	0.185	1.60	0.136	1.58	0.153	0.017	0.883
Carcass proceeds (total €)	145.2	17.4	146.3	11.9	145.0	14.0	1.536	0.937
Difference vers. treatm. A (€)	---	---	1.12	---	-0.15			
Difference income (feed costs + slaughter income) (n=30 per treatment)								
Difference vers. treatment A (€) total per pig			+2.08		+1.00			

Conclusion

Feeding low protein diets for pigs based on a net energy (NE) system associated with an adequate supplementation of commercial available amino acids led to an equal performance during fattening as well as at slaughtering. Furthermore the usage of NE system reduced the feeding costs and nitrogen excretion compared to diets optimized by using ME system. It is concluded using NE system can reduce the impact of pig feeding on ammonia emission without additional cost for farmers. A reduction of crude protein level by 2 percentage points in fattening pig diets can reduce the ammonia emission up to a quantity of 22 kt in Germany based on 14.4 million tons of feed. This relative simple approach can help to reach the 550 kt ammonia emission per year fixed for Germany in frame of Directive 2001/81/EC of the European Parliament and of the Council on national emission ceilings for certain atmospheric pollutants.

References

Ajinomoto Eurolysine s.a.s., 2011: Formulating pig grower diets with no minimum crude protein. Information N° 37

GfE 2005: Determination of digestibility as the basis for energy evaluation of feedstuffs for pigs, Proc. Soc. Nutr. Physiol. (2005) 14, 207-213

INRA, 2004: Tables of composition and nutritional value of feed material (Sauvant, D., J.-M. Perez and G. Tran, eds.), Wageningen Academic Publisher, INRA Editions and AFZ, Paris

Corresponding author

M. Sc. Anne Winkler
Abteilung: Tierernährung
Fachhochschule Bingen, Fachbereich 1- Life Science and Engineering
Berlinstrasse 109, 55411 Bingen am Rhein
E-mail: anne.winkler@fh-bingen.de

Effect of low protein cereal grains-based diets on growth performance and carcass quality of starter/ grower- finisher pigs

Georg Dusel[1], Julia Trautwein[1] and John K. Htoo[2]

[1] University of Applied Science Bingen, DE
[2] Evonik Industries AG, Hanau, DE

Introduction

Lowering level of crude protein (CP) and combined with a balanced supplementation of amino acids (AA) in pig diets has environmental and economic benefits (Canh et al., 1998). However, in a previous study the performance of growing pigs were reduced when dietary CP was reduced greater than 4 %-units although diets were balanced to be adequate in standardized ileal digestible (SID) essential AA (EAA; Guay et al., 2006). The reduced performance may be associated with insufficient amount of non-essential AA (NEAA) in the low CP diets.

Thus, the current experiments were conducted to evaluate the effect of balancing low CP diets fortified with supplemental AA and maintaining optimal essential AA:total N ratio on performance, carcass composition and nitrogen (N) retention of 24 to 111 kg pigs.

Materials and methods

A 83-d growth trial was conducted with 180 TOPIGS pigs [initial body weight (BW) of 24.4 kg] with 2 pigs per pen and 18 pens per treatment. Pigs were assigned to 5 diets based on corn, barley, wheat, soybean meal (SBM) and rapeseed meal for each of the grower 1 (1.0 % SID Lys; d 0-18), grower 2 (0.86 % SID Lys; d 19-39), finisher 1 (0.74 % SID Lys; d 40-61) and finisher 2 (0.64 % SID Lys; d 62-83) phases. The high CP diet (diet 1) and low CP (diet 5; without SBM) were initially produced without inclusion of free AA (table 2/3). Diets B, C and D were produced by blending diets A and E in varying proportions (75, 50 and 25 % of diet A). All diets were analyzed for AA and CP contents, and free AA were added to meet requirements for EAA. All diets contained similar EAA and net energy (NE) contents in each phase. Gly, Pro, Arg and Glu were added in diets 4 and 5 of grower 1 and grower 2 diets to balance the EAA: total N ratio to be 50 % (table 1). The step-wise reductions of CP level in the diets are shown in table 4.

Table 1: Dietary treatments

diet A	Conventional grains-SBM based diet (Control)
diet B	Reduced CP diet (-25 % SBM inclusion) + EAA (Lys, Met, Thr)
diet C	Low CP diet (-50 % SBM inclusion) + EAA (Lys, Met, Thr, Trp)
diet D	Low CP diet (-75 % SBM inclusion) + EAA + NEAA (EAA: total N of 50 %)
diet E	Low CP diet (without SBM)+EAA+NEAA+Arg in Grower 1 / 2 (EAA:total N ratio of 50 %)

Table 2: Ingredient and nutrient compositions of grower diets (25 to 60 kg body weight; as-fed basis)

Ingredients, Nutrients (%)	Grower 1 (25-40 kg)					Grower 2 (40-60 kg)				
	Diet A Control	Diet B -3% CP	Diet C -8% CP	Diet D -11% CP	Diet E -17% CP	Diet A Control	Diet B -4% CP	Diet C -11% CP	Diet D -18% CP	Diet E -19% CP
Corn	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
Barley	11.62	13.72	15.81	17.91	20.00	11.78	13.83	15.89	17.94	20.00
Wheat	19.19	24.08	28.96	33.85	38.74	20.00	23.74	27.48	31.21	34.95
Soybean meal	25.00	18.75	12.50	6.25	0.00	21.00	15.75	10.50	5.25	0.00
Rapeseed meal	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Wheat bran	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Rapeseed oil	4.80	4.02	3.25	2.47	1.69	3.92	3.32	2.73	2.13	1.54
Others*	2.89	2.94	2.00	3.03	3.07	2.31	2.36	2.41	2.46	2.51
L-Lys·HCl	0.18	0.34	0.50	0.65	0.81	0.03	0.17	0.31	0.45	0.59
DL-Met	0.06	0.08	0.12	0.16	0.20	0.00	0.02	0.05	0.07	0.09
L-Thr	0.00	0.07	0.14	0.21	0.28	-	-	0.04	0.10	0.17
L-Trp	-	0.00	0.03	0.05	0.07	-	-	-	0.02	0.04
L-Val	-	-	-	0.08	0.16	-	-	-	-	0.04
L-Ile	-	-	-	0.05	0.14	-	-	-	-	0.05
L-His	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-
L-Phe	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-
L-Glu	-	-	-	0.95	1.52	-	-	-	0.30	0.57
L-Gly	-	-	-	0.30	0.61	-	-	-	0.11	0.34
L-Pro	-	-	-	0.23	0.43	-	-	-	0.05	0.14
L-Arg	-	-	-	-	0.25	-	-	-	-	0.23
CP, without free AA	21.40	19.40	17.50	15.50	13.60	21.30	19.50	17.80	16.00	14.30
CP in final diet**	20.43	19.84	18.87	18.20	16.95	20.18	19.45	18.05	16.46	16.38
NE (MJ/kg)	10.20	10.20	10.19	10.19	10.18	10.00	10.00	10.00	9.99	9.99
SID Lys	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
SID Met	0.34	0.34	0.36	0.38	0.40	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
SID Met +Cys	0.63	0.61	0.62	0.62	0.62	0.59	0.57	0.56	0.55	0.53
SID Thr	0.65	0.65	0.65	0.65	0.66	0.64	0.58	0.56	0.56	0.56
SID Trp	0.22	0.20	0.20	0.20	0.20	0.21	0.19	0.17	0.17	0.17
SID Val	0.85	0.77	0.68	0.68	0.68	0.83	0.76	0.69	0.61	0.58
SID Ile	0.76	0.67	0.58	0.55	0.55	0.73	0.65	0.58	0.50	0.47
EAA:total N ratio	52	53	53	50	50	52	52	52	50	50

*Consisted of rapeseed oil, limestone, mono-Ca phosphate, salt, mineral and vitamin premix; **Analyzed values.

Finisher 2 diets were fed until the pigs reached slaughter BW of approximately 117 kg, and 10 pigs per treatment except diet 3 (9 pigs) were selected for carcass assessment. On d 95, blood was collected from 6 pigs per treatment to determine plasma urea N (PUN) concentration. Additionally, a 5-d N-balance trial was conducted by feeding diets A or E of finisher 2 phase to 6 pigs (initial BW of 111.0 kg; 3 pigs per treatment) to measure N retention. These studies were conducted according to the instructions of the Committee for Requirement standards of the Society of Nutrition Physiology (GfE, 2005). All data were analyzed by ANOVA using GLM procedure of SAS with pen as the experimental unit.

Results and discussion

During each phase and the overall 83-d period, average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG) and feed conversion ratio (FCR) as well as final BW were not different among treatments (P>0.05; table 5). The PUN concentration (d 95) decreased linearly (P<0.001) as dietary CP decreases and was the lowest for pigs fed diet E which indicates a reduced need for deamination of excess AA

(table 4). The dressing %, lean yield and back fat thickness were not affected by the CP levels. Daily N retention was not affected (P>0.05) but total N excretion was reduced by 32% (P<0.01) by lowering the CP level in finisher 2 diet from 15.9 to 11.4 % (table 7).

Table 3: Ingredient and nutrient compositions of finisher diets (60 to 110 kg body weight; as-fed basis)

Ingredients, Nutrients (%)	Finisher 1 (60-80 kg)					Finisher 2 (80-110 kg)				
	Diet A Control	Diet B -3% CP	Diet C -9% CP	Diet D -15% CP	Diet E -20% CP	Diet A Control	Diet B -4% CP	Diet C -13% CP	Diet D -21% CP	Diet E -23% CP
Corn	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00
Barley	12.00	16.09	20.18	24.27	28.36	19.55	25.37	31.18	37.00	42.81
Wheat	35.95	34.46	32.97	31.49	30.00	30.00	27.24	24.49	21.73	18.97
Soybean meal	10.00	7.50	5.00	2.50	0.00	12.00	9.00	6.00	3.00	0.00
Rapeseed meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Wheat bran	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50
Rapeseed oil	1.96	1.84	1.72	1.60	1.48	0.96	0.87	0.78	0.69	0.60
Others*	2.09	2.11	2.13	2.15	2.16	1.99	2.02	2.05	2.09	2.12
L-Lys·HCl	0.24	0.31	0.38	0.45	0.52	0.13	0.22	0.30	0.39	0.47
DL-Met	0.04	0.05	0.02	0.05	0.07	0.02	0.04	0.02	0.05	0.08
L-Thr	0.04	0.07	0.10	0.14	0.17	0.01	0.05	0.09	0.13	0.17
L-Trp	-	-	0.00	0.01	0.02	-	-	-	-	0.01
L-Val	-	-	-	-	0.02	-	-	-	-	0.01
L-Ile	-	-	-	-	0.03	-	-	-	-	0.03
CP, without free AA	17.00	16.00	14.90	13.90	12.90	15.90	14.80	13.70	12.50	11.40
CP in final diet**	17.31	16.75	15.71	14.79	13.90	16.07	15.45	13.93	12.73	12.43
NE (MJ/kg)	9.80	9.80	9.80	9.80	9.80	9.60	9.60	9.60	9.60	9.60
SID Lys	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
SID Met	0.26	0.26	0.22	0.24	0.25	0.23	0.23	0.20	0.21	0.23
SID Met +Cys	0.52	0.51	0.47	0.47	0.47	0.48	0.46	0.42	0.42	0.42
SID Thr	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
SID Trp	0.17	0.16	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	0.14	0.12	0.12
SID Val	0.65	0.61	0.56	0.52	0.50	0.62	0.57	0.52	0.48	0.44
SID Ile	0.55	0.51	0.46	0.42	0.41	0.53	0.48	0.42	0.37	0.35
EAA:total N ratio	52	52	51	51	51	50	50	50	50	50

*Consisted of rapeseed oil, limestone, mono-Ca phosphate, salt, mineral and vitamin premix; **Analyzed values.

Table 4: Analyzed crude protein content (%)[1] in experimental diets

Diets	Grower 1	Grower 2	Finisher 1	Finisher 2
A	21.4 (20.4)	21.3 (20.2)	17.0 (17.3)	15.9 (16.1)
B	19.4 (19.8)	19.5 (19.5)	16.0 (16.8)	14.8 (15.5)
C	17.5 (18.9)	17.8 (18.1)	14.9 (15.7)	13.7 (13.9)
D	15.5 (18.2)	16.0 (16.5)	13.9 (14.8)	12.5 (12.7)
E	13.6 (16.9)	14.3 (16.4)	12.9 (13.9)	11.4 (12.4)

[1]Dietary crude protein contents in parentheses are "with added free amino acids"

Table 5: Effect of dietary protein levels on pig performance (d 0 to 83)

Items	Diet A	Diet B	Diet C	Diet D	Diet E	SEM	P-value
BW at d 83, kg	100.0	100.4	98.5	98.1	98.0	0.943	0.171
ADFI, g/d	2218	2132	2164	2096	2068	39.80	0.085
ADG, g/d	916	915	893	888	886	11.36	0.169
FCR, g/g	2.41	2.35	2.43	2.36	2.33	0.039	0.324

A fresh perspective on our masterpieces

Evonik provides you with all four essential amino acids for animal nutrition: MetAMINO®, Biolys®, ThreAMINO®, TrypAMINO®. But just as importantly, our range of AMINO TOOLS provides you with everything you need to maximize efficiency.

Evonik AMINO Tools:

Analytics

AMINO*Dat*®
AMINO*Lab*®
AMINO*NIR*®
AMINO*Prox*®
AMINO*Q*®
AMINO*RED*®
AMINO*VAR*™

Nutrition

AMINO*Carp*®
AMINO*Chick*®
AMINO*Cow*®
AMINO*Hen*®
AMINO*NEC*®
AMINO*Pig*®

Handling Solutions

AMINO*Sys*®
AMINO*Batch*®
AMINO*Batch*® *WPT*
AMINO*Trak*®

Communication

AMINO*News*®
Facts & Figures

Sustainability

AMINO*Footprint*®

www.evonik.com/feed-additives feed-additives@evonik.com

Evonik. Power to create.

EVONIK INDUSTRIES

Table 6: Effect of protein levels on plasma urea N level (on d 95) and carcass quality

Items	Diet A	Diet B	Diet C	Diet D	Diet E	SEM	*P-value*
Plasma urea N, mg/dl	15.41[a]	13.91[ab]	10.82[bc]	9.95[bc]	8.75[c]	0.61	<0.001
BW at slaughter, kg	117.7	117.8	118.3	116.6	117.2	0.553	0.904
Dressing, %	77.2	76.9	77.4	78.0	77.6	0.438	0.425
Lean meat, %	57.9	58.1	55.9	56.8	57.8	0.707	0.190
Meat area, cm^2	60.2	60.4	58.5	59.2	58.8	0.707	0.266
Fat area, cm^2	16.8	16.5	17.6	16.8	17.6	0.561	0.790

Table 7: Effect of dietary protein levels on N retention (initial BW of 111.0 kg; 3 pigs per treatment)

	Finisher 2 diets			
Items	Diet A (16.1% CP)	Diet E (12.4% CP)	SEM	*P-value*
N intake, g/d	51.3	38.9	0.367	<0.001
N in urine, g/d	32.8	22.2	1.659	0.011
Total N excretion, g/d	40.4	29.3	1.171	0.003
N retained, g/d	10.9	9.6	1.150	0.458

In conclusion, lowering dietary CP level by replacing SBM with supplemental AA is possible to maintain optimal pig performance when diets are balanced for adequate SID AA and NE, and maintained an EAA: total N ratio of approximately 50 %.

References

Canh T.T., Aarnink A.J.A., Schutte J.B., Sutton A., Langhout D.J. & M.W.A. Verstegen (1998): Dietary protein affects nitrogen excretion and ammonia emission from slurry of growing finishing pigs. *Livestock Production Science* **56,** 181–191.

GfE 2005: Determination of digestibility as the basis for energy evaluation of feedstuffs for pigs, Proc. Soc. Nutr. Physiol. (2005) 14, 207-213.

Guay, F., S. M. Donovan and N. L. Trottier, 2006. Biochemical and morphological developments are partially impaired in intestinal mucosa from growing pigs fed reduced-protein diets supplemented with crystalline amino acids. J. Anim. Sci. 84:1749-1760.

Corresponding author

Prof. Dr. Georg Dusel
Abteilung: Tierernährung
Fachhochschule Bingen, Fachbereich 1- Life Science and Engineering
Berlinstrasse 109, 55411 Bingen am Rhein
E-Mail: dusel@fh-bingen.de

Effect of dietary fat sources on reproduction parameters in gilts

Eva Václavková, Miroslav Rozkot, Jaroslava Bělková and Alena Lustyková

Institute of Animal Science Prague, Department of Pig Breeding, in Kostelec nad Orlici, CZ

Introduction

The role of endogenous stores of lipids and the role of fatty acids in reproduction process, oocytes development and embryos pre-implantation in pigs have been studied less intensively than the effect on nutritional value and quality of meat and meat products. But the fatty acids, especially polyunsaturated fatty acids, play an important role in reproduction processes (Wathes et al., 2007). The presence of lipids within oocytes and early embryos has been long known, and comparison between species indicates that the amounts and types of lipid vary considerably. Triglycerides are the major component of intracellular lipid in the oocytes and thus provide a potential energy reserve. The role of lipid in the peri-ovulatory and peri-conception phase of livestock reproduction is multifaceted and effects can be modulated at the endocrine as well as at nutrient provision level. Arachidonic acid is the precursor of prostaglandins, cholesterol is needed for steroid hormone biosynthesis. Among the steroid hormones, progesterone plays a key role (Sturmey et al., 2009). Progesterons of two series are derived from arachidonic acid, one and three series progesterons can be formed from dihomogamma linolenic acid and alpha linolenic acid. Provision of dietary fats can affect reproductive parameters but experimental results are very differing in literature sources. The aim of this study is to evaluate the effect of dietary fat on parameters of the reproductive system in gilts.

Materials and Methods

Forty crossbred gilts were divided into four groups (10 animals in each group) and fed with four feed mixtures-control (C), linseed diet (L) with 7 % of ground linseed, sunflower diet (S) with 5 % of ground sunflower seeds and mixture with 1 % of conjugated linoleic acid addition (CLA). Conjugated linoleic acid was supplemented in the form of the preparation LUTA-CLA (BASF, Germany). All mixtures had very similar content of crude protein and energy. Fatty acid content of feed mixtures is illustrated in table 1. The L diet was characterized by high amount of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), S diet contained high amount of n-6 PUFA. The feeding of experimental mixtures to gilts started at the age of 150 days. Gilts were inseminated on the third estrus (on average 236.6 ± 7.5 days of age) and 6 days after the insemination they were slaughtered and reproductive organs were recovered, ovaries were cut and weighted, embryos were flushed from uterine horns with 40 ml of Dulbecco PBS medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) warmed to 38.5°C. Following parameters were detected: weight of left and right ovary, number of corpora lutea, percentage of fertilized oocytes was calculated from total number of corpora lutea and total number of embryos. The statistical evaluation was performed using the computer program QCExpert (TriloByte Statistical Software Ltd.) – ANOVA was used to evaluate statistical significancy. Data were presented as the mean, standard deviation (SD) and the significance levels.

Table 1: Fatty acid content in control and experimental feed mixtures

Fatty acid	Diet			
	Control (C)	Linseed (L)	Sunflower (S)	CLA
Total SFA	15.16	15.70	16.42	14.40
Total MUFA	43.79	21.11	19.48	36.68
Total PUFA	41.03	63.18	64.09	48.91
Linoleic	32.89	33.33	54.74	32.65
Alpha-linolenic	7.61	29.25	8.55	6.74
Total n-6 PUFA	33.05	33.61	54.93	32.83
Total n-3 PUFA	7.96	29.53	8.99	7.24
n-6/n-3 PUFA	4.15	1.14	6.11	4.53

Results

The selected morphometric parameters of reproductive organs in gilts fed with different fat sources are presented in table 2. The weight of ovaries and number of corpora lutea were measured immediately after gilts´ slaughter. The highest weight of left ovary was found in CLA group (8.50 ± 2.54 g) and the highest weight of right ovary (7.28 ± 2.67 g) was in gilts fed sunflower diet (S). Analagous to ovary weight, the highest number of corpora lutea was in CLA group (10.20 ± 3.35 in left ovary) and S group (8.60 ± 2.07 in right ovary). We found statistically significant differences between S and CLA group ($P<0.05$). The relations between selected morphometric traits of reproductive tract were calculated as correlations regardless of experimental group. Highly significant correlations ($P<0.01$) were observed between the right resp. left ovary weight and the number of corpora lutea ($r=0.535$ resp. 0.788). Percentage of fertilized oocytes was calculated from total number of corpora lutea and total number of embryos. The highest number of embryos was measured in C (8.50 ± 3.35) and CLA (9.00 ± 2.37) group, the lowest in S group (6.60 ± 1.20). There were significant difference among groups. The highest number of fertilised oocytes was found in C (58.12 %) and CLA (54.44 %) groups.

Table 2: Parameters of reproductive organs (mean ± standard deviation) in gilts fed control and experimental diets

Trait	Diet			
	Control (C)	Linseed (L)	Sunflower (S)	CLA
Right ovary weight (g)	5.38 ± 2.18	5.70 ± 2.30	7.28 ± 2.67	6.74 ± 2.52
Left ovary weight (g)	6.37 ± 3.20	7.33 ± 3.69	5.44 ± 2.84[a]	8.50 ± 2.54[a]
Number of corpora lutea-right ovary	7.17 ± 1.94	7.00 ± 3.74	8.60 ± 2.07[a]	6.20 ± 2.59[a]
Number of corpora lutea-left ovary	7.17 ± 2.31	7.50 ± 3.01	5.80 ± 3.27[a]	10.20 ± 3.35[a]
Total number of embryos	8.50±3.35[a]	7.50±3.95	6.60±1.20[ab]	9.00±2.37[b]
Percentage of fertilised oocytes	58.12	52.63	46.64	54.44

a, b – values in rows with different letters differ significantly ($P<0.05$)

Discussion

The objective of the study was to determine the effect of different fat sources in feed mixture on morphometric parameters of reproductive system in gilts. Effects of nutrition on age at puberty, return to oestrus after weaning, ovulation rate and embryo survival in pigs were studied by several authors. Nutrition may influence reproduction at the three levels of the hypothalamic–pituitary–ovarian axis via neuroendocrine pathways and/or variation in metabolic clearance of reproductive hormones. Nutrition influences follicular growth and maturation; for example, the percentage of small (1–3 mm) healthy follicles and the ovulation rate are decreased under feed restriction. Decreased metabolic clearance of progesterone resulting in increased plasma concentrations of this hormone could be involved in the inhibition of gonadotrophin release and reduction of the ovulation rate occurring in feed-restricted

cyclic gilts (Prunier and Quesnel, 2000). Kojima et al. (1997) studied the effect of dietary administration with essential unsaturated fatty acids on early embryo development of pubertal female pigs. The greatest number of corpora lutea was found in gilts given the PUFA-enriched diet ($P<0.05$). Their results indicated that the unsaturated fatty acids-enriched diet may be beneficial for improving ovulation rate. The effect of lipid sources and digestible energy levels on the performance and reproduction traits of Landrace gilts was evaluated by Brustolini et al. (2004). The number of corpora lutea increased linearly ($P<0.01$) according to digestible energy levels. Perez-Rigau et al. (1995) evaluated the effect of dietary n-3 PUFA on embryo development. They did not find no effect on the number of corpora lutea and number of embryos. Similar result is mentioned by Estienne et al. (2006). There was not found significantly higher number of corpora lutea in gilts fed linseed diet enriched by n-3 PUFA in our experiment. But we observed higher number of corpora lutea in gilts from SD and CLA groups.The correlations between monitored morphometric parameters of reproductive system were evaluated in our experiment. The number of corpora lutea were correlated with ovarian weight ($P<0.01$). This result corresponds with findings of Brussow et al. (2004).

Conclusion

From the experiment could be concluded that feeding fat sources tended to affect ovulation rate in gilts at the first mating. But many other factors play important role in pig reproduction and they also must be taken into account.

Acknowledgement

The study was developed within the project of NAZV (National Agency for Agricultural Research, Czech Republic) QI111A166.

References

Brussow K.P., Egerszegi I., Ratky J., Soos F., Casado P.G., Tuchscherer A., Toth P. (2004). Organometric Data of the Reproductive Tract in Cycling and Early Pregnant Hungarian Mangalica pigs. Arch. Tierz.-Arch. Anim. Breed, 47:585-594.

Brustolini P.C., Silva F.C.O., Donzele J.L., Veloso J.A.F., Fontes D.O., Kill J.L. (2004). Effect of Lipid Sources and Digestible Energy Levels on the Productive and Reproductive Performance of Gilts. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 56:511-521.

Estienne M.J., Harper A.F., Estienne C.E. (2006). Effects of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids on some reproductive characteristics in gilts. Reprod. Biol., 6: 231-241.

Kojima T., Zeniya Y., Aoyama T., Kondo A., Yoshino J. (1997). Dietary Administration of Fatty Acids-Enriched Mold Dried Cell Containing γ-Linolenic Acid to Female Pigs Improves Ovulation Rate and Embryo Quality in Summer. J.Reprod.Dev., 43:121-127.

Perez Rigau A., Lindemann M.D., Kornegay E.T., Harper A.F., Watkins B.A. (1995). Role of dietary lipids on fetal tissue fatty acid composition and fetal survival in swine at 42 days of gestation. J. Anim. Sci., 73:1372-1380.

Prunier A., Quesnel H. (2000). Nutritional Influences on the Hormonal Control of Reproduction in Female Pigs. Livest. Prod. Sci., 63:1-16.

Sturmey R.G., Reis A., Leese H.J., McEvoy T.G. (2009). Role of Fatty Acids in Energy Provision During Oocyte Maturation and Early Embryo Development. Reprod. Dom. Anim., 44 (Suppl. 3): 50-58.

Wathes D.C., Abayasekara D.R.E., Aitken R.J. (2007). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. Biol. Reprod., 77:190-201.

Corresponding author

Eva Václavková
Institute of Aninal Science Prague
Depratment of Pig Breeding in Kostelec nad Orlicí
Komenského 1239; 51741 Kostelec nad Orlicí, Czech Republic
E-mail: vaclavkova.eva@vuzv.cz

Supplemental valine for sows nursing large litters

Holger Kluge[1], Jörg Bartelt[2], Etienne Corrent[3] and Gabriele I. Stangl[1]

[1] Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE
[2] Lohmann Animal Health GmbH, Cuchaven, DE
[3] Ajinomoto Eurolysine S.A.S., Paris, FR

Introduction

In a first study (Kluge et al., 2013), the supplementation of 0.2 % valine in the diet of lactating sows improved the daily weight gain when the litter size increased from 9 to 11 piglets per sow. This effect was also observed by Richert et al. (1996). The mean litter size in this study was 10.3 pigs across treatments. Based on the linear response observed by the authors, the requirement was at least 1.15 % of the diet (72 g/d of valine intake) to maximize litter weaning weight and litter weight gain. This is much greater than recommended by the GfE (2006) (70 % of pcv lysine, 39.5 g/d and litter weight gain 3.0 kg/d). This study aimed to confirm the results of the first study Kluge et al. (2013) with the same valine supplementation but increasing nursing pigs per sow. Due to genetic selection for hyper-prolificacy, i.e. sows with a higher number of fetuses, is this question currently important.

Materials and methods

This study was completed with 18 sows of parity 2. The sows were allotted three days after farrowing to two treatments and litters were standardized to 13 pigs/sow. Six gilts (three per treatment were used as nurse sow to standardized the litter to 13 pigs/sow. The basal diet was based on barley, wheat, corn, wheat bran, soybean meal, vitamin trace mineral premix and a supplementation of L-Lysine-HCl, L-Threonine, DL-Methionine and L-Tryptophan. The experimental diet was supplemented with 0.2 % L-Valine in exchange for wheat bran. The calculated metabolisable energy and AA concentration analysed are shown in table 1. To calculate sow weight loss during lactation the sows were weighed before cross-fostering and at the time of weaning (28 days post cross-fostering). To calculate the change in loin and back fat depth, these were measured at the 10th rib by using ultrasound (Mindray DP 50 Vet Sonde 75 L) at the same time as the sows were weighed. Changes in loin and fat depth were used as an indication of body protein and lipid mobilization. To calculate the litter growth rate, the piglets were weighed on the cross-fostering day, day 21 and at weaning (28 days post cross-fostering). Plasma samples and milk samples were taken on day 21 for amino acid analyses. The sows were fed ad libitum 3 days after farrowing and the feed intake was recorded daily. All diets were analysed for crude protein [(CP) Nx6.25] according to the Dumas method. The concentrations of AA in the diets, plasma and milk were analysed using different methods. The analysis of AA in feed ingredients and diets was performed by Ajinomoto Eurolysine S.A.S. using a JLC-500/V AminoTAC AA Analyzer (Jeol, Croissy-sur-Seine, France) after hydrolysis with 6 N HCl at 110°C for 23 h. The tryptophan content in the diets was determined after hydrolysis at 120°C for 16 h with barium hydroxide and separation by reverse-phase HPLC and fluorometric detection. The free AA in plasma reacted with o-phthalaldehyde (OPA) and mercaptopropionic acid in alkaline medium to a fluorescence isoindol derivate and was measured with HPLC and fluorescence detection. Milk samples (10 to 20 ml) were taken three hours after feeding and injection of oxytocin. After milking, whole milk was immediately centrifuged at 1500 x g for 10 min at 4°C to remove fat, mononuclear cells and other suspended cells. One milliliter of defatted milk was deproteinised and the supernatant was neutralised. The supernatant was

diluted and used for analysis of free amino acids via the same procedure as plasma amino acid analysis. The content of standardised ileal digestibile (sid) AA was calculated on the basis of the AA concentration of the individual ration components and the estimated sid of the AA in the individual components according to data from tables (GfE, 2006). All data was statistically treated by variance analysis (Statistica 7.0 for Windows Operating System). Means of $p<0.05$ were considered significant.

Results and discussion

The analysed protein and AA concentration and calculated ME and sid AA in the diets are presented in table 1. The supplementation of 0.2 % L-Valine in the diet increased the plasma valine concentration at more than hundred per cent (Table 2). Plasma lysine and futher AA concentrations were not influenced by the supplementation of dietary valine. These results are in agreement with data of Richard et al. (1997). A increase of valine concentration in the feed from 0.72 % to 1.07 % increased the plasma valine concentration from 200 to 500 µmol/l. However this high valine concentration in the plasma leads to a significant increase of free valine in the milk (Table 2). In experiments to investigate the relationship between litter size and plasma amino acid arteriovenous differences (A-VD) was found that for the majority of AA, as litter size increased, A-VD did not increase, except for alanine and valine (Nielsen et al., 2002). Jackson et al. (2000) estimated the valine uptake in porcine mammary tissue with a K_m of 0.64 m*M*. Physiological plasma concentrations of valine without supplementation of valine are below the K_m of the specific valine transport system. A valine supplementation can improved the diffusion uptake capabilities. The activating of specific transporter proteins in porcine mammary gland during lactation for valine and other branched change amino acids (BCAA) such as CAT-1, CAT-2B and $B^{o,+}$ to be accountable for the increasing valine concentration in the milk.

The sid Val:Lys ratio in the control diet corresponds to the recommendation of (GfE 2006). The Valine supplementation reduced significantly (P= 0.012) the meat loss of sows and improved significantly the piglet weight gain in the first 21 day of lactation and over the whole lactation period (Table 3).

Table 1: Metabolisable Energy (MJ/kg), protein, AA concentration and sid AA in the experimental diets (% feed)

	Control diet (0 % valine)	Experimental diet (0.2 % valine)
ME	13.6	13.6
Crude protein	174	176
Lysine	0.98	1.01
Sid Lysine	0.87	0.87
Methionine + Cystine	0.62	0.63
Sid Met+Cys	0.54	0.54
Threonine	0.74	0.75
Sid Threonine	0.62	0.62
Tryptophan	0.23	0.23
Sid Tryptophan	0.19	0.19
Valine	0.78	0.97
Sid Valine	0,65	0.84
Sid Val:sid Lys	0.75	0.97

Table 2: Valine and lysine concentration (µmol/l) in plasma and milk fed sows with different level of valine

	Control diet (0 % valine)	Experimental diet (0.2 % valine)	SEM	P-value
Valine plasma	239	498	35.6	<0.001
Lysine plasma	205	215	21.6	0.826
Free valine milk	29.0	80.6	8.9	0.0013
Free lysine milk	31.0	34.6	2.7	0.535

According to experiments of Kim et al. (2001), the ratio of Val: Lys in the carcass of sows after a 21-d lactation is 0.62:1 and in the milk 0.78:1 (Mavromichalis et al. 2001). For this reason the sows are

able to ensure the valine requirement for milk synthesis by mobilisation of valine from the body protein. Therefore, the valine supplementation decreased the valine mobilisation from body protein. The feed intake of sows tented to be higher (P=0.105) by supplementation of 0.2 % L-Valine in the diet.

Table 3: Performance parameters of lactating sows fed 0.2 % valine over 28 days

	Control diet (0 % valine) n=9	Experimental diet (0.2 % valine) n=9	SEM	P-value
Sow weight postfarrowing (kg)	249	239	4.4	0.287
Sow weight day 21 postfarrowing (kg)	223	219	5.1	
Sow weight at weaning (kg)	220	214	4.9	0.076
Sow weight change (kg)	28.8	24.6	2.9	0.375
Meat thickness postfarrowing (mm)	61.0	59.8	1.27	0.645
Meat thickness at weaning (mm)	51.9	55.7	1.1	0.444
Meat loss (mm)	9.1	4.1	1.0	0.012
Backfat thickness postfarrowing (mm)	21.9	19.8	1.0	0.318
Backfat thickness at weaning (mm)	14.2	12.4	0.7	0.289
Backfat loss (mm)	7.7	7.4	0.7	0.830
Litter weight at cross-fostering (kg)	25.6	26.7	0.65	0.388
Piglets at weaning	12.7	12.7	0.11	1.000
Litter weight at weaning (kg)	111.9	119.9	2.5	0.108
Litter weight gain (kg/d)	3.08	3.33	0.08	0.156
Piglet weight gain, day 1-21 (g/d)	234	253	4.2	0.024
Piglet weight gain, day 1-28 (g/d)	243	263	3.8	0.011
Feed intake of sows (kg/d)	5.6	6.3	0.22	0.105

Conclusion

These results demonstrate that increasing dietary valine for high-producing sows (13 pigs per sow) results in higher concentration of valine in plasma and milk and in improved piglet weight gain and reduced meat loss of the sows.

References

GfE: Ausschussf. Bedarfsnormen d. Gesellschaft f. Ernährungsphysiologie (2006): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen. DLG-Verlag

Jackson S.C., Bryson J.M., Wang H., Hurley W.L. (2000) Cellular uptake of valine by lactating porcine mammary tissue. J.Anim. Sci. 78, 2927-2932.

Kim S.W., Baker D.H., Easter R.A. (2001) Dynamic ideal protein and limiting amino acid for lactating sows: the impact of amino acid mobilization. J. Anim. Sci. 79, 2356-2366.

Kluge H., Hirche F., Bartelt J., Corrent E., Stangl, G. (2013) Effects of dietary valine concentrations on lactational performance of sows nursing large litters. 12. Tagung Schweine und Geflügelernährung, 228-231.

Mavromichalis I., Parr T. M., Gabert V. M., Baker D.H. (2001) True ileal digestibility of amino acids in sow's milk for 17-day-old pigs. J Anim. Sci. 79,707-713.

Nielsen T.T., Trottier N.L., Stein H.H., Bellavers C., Easter R.A. (2002) The effect o flitter size and day of lactation on amino acid uptake by the porcine mammary glands. J. Anim. Sci. 80, 2402-2411.

Richert B.T., Tokach M.D., Goodband R.D., Nelssen, J.L., Pettigrew J.E., Walker R.D., Johnston L.J. (1996) Valine requirement of the high-producing lactating sow. J. Anim. Sci. 74, 1307-1313.

Corresponding author

Holger Kluge
Institute of Agricultural and Nutritional Science; Martin-Luther-University Halle-Wittenberg
Von Danckelmann Platz 2, 06120 Halle/Saale
E-mail: Holger.Kluge@landw.uni-halle.de; Tel. +4903455522706

Feed Additives

Kraftvoller Auftritt

Aminosäurenversorgung ohne Kompromisse

L-Valin

AJINOMOTO
AJINOMOTO ANIMAL NUTRITION
AJINOMOTO EUROLYSINE S.A.S.

Kräftige Ferkel benötigen essentielle Aminosäuren im richtigen Verhältnis zueinander. Durch die Ergänzung mit L-Valin werden niedrige Rohproteingehalte im Ferkelfutter ermöglicht. Das verbessert die Eiweißverwertung, unterstützt die Verdauung und schont die Umwelt. L-Valin erweitert den Horizont bei der Futteroptimierung.

Prevention first.

Lohmann
Animal Health

Lohmann Animal Health GmbH
Heinz-Lohmann-Straße 4
27472 Cuxhaven, Germany

www.lohmann.de

Feeding live *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (SB) to sows increases immunoglobulin content in colostrum and milk

David Guillou[1], Erich Chevaux[1], David Rosener[1], Yannig Le Treut[1] and Jean Le Dividich[1]

[1] Lallemand Animal Nutrition, Blagnac, FR
[2] Lallemand Animal Nutrition, Breteil, FR

Introduction

The acquisition of passive immunity by the newborn piglet is necessary because it provides a high level of immune protection, therefore improving the development of piglet's active immunity during lactation and its level of systemic immunity at weaning (Le Dividich *et al.*, 2005). The acquisition of passive immunity depends mainly on the amount of colostrum consumed, and on its immunoglobulin G (IgG) content. Live yeast fed to the sow improved the IgG plasma level in their 24h old piglets in a dose dependent manner (Jang *et al.*, 2010), suggesting an increased colostral IgG concentration and (or) colostrum production of the sows. We hypothesized that sows fed live *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I-1079 (SB) would produce more immunoglobulins in colostrum and milk.

Materials and methods

This experiment was performed in a commercial farm located in Brittany (France). Sows (n=66; Large White×Landrace), housed individually in stalls, were blocked by parity and body condition 3 weeks before expected parturition. They were divided into: a control group (C, n=33) fed the regular feeding program of the farm (gestation diet before moving the sow to the farrowing room, followed by peri-partum diet until the week-end after farrowing, then lactation diet until weaning); SB group (n=33), fed 25 g per day of SB concentrate (10% SB on dextrose carrier), *i.e.* 5×10^{10} CFU per day, from the start of the trial to weaning (21d post-partum). On each sow, colostrum was sampled randomly from most teats all along the udder just after birth of the first piglet (0), and 12 and 24h later. With the same procedure, a sample of milk was collected during natural letdown on day 19 of lactation. Samples were immediately filtered on gauze and stored (-20°C). Colostral Ig (A, G and M) and milk IgA were analyzed using a commercial kit (Pig Ig ELISA Quantitation kit, Bethyl Laboratories, Montgomery, USA). For the colostrum data, area under the Ig (G, A and M) curves (AUC) was calculated using the trapezoidal rule to represent the mean value over 24h. Colostrum Ig AUC and milk Ig contents were compared using Student's t test.

Results and discussion

S. cerevisiae CNCM I-1079 increased significantly IgA and IgG levels in colostrum & milk:

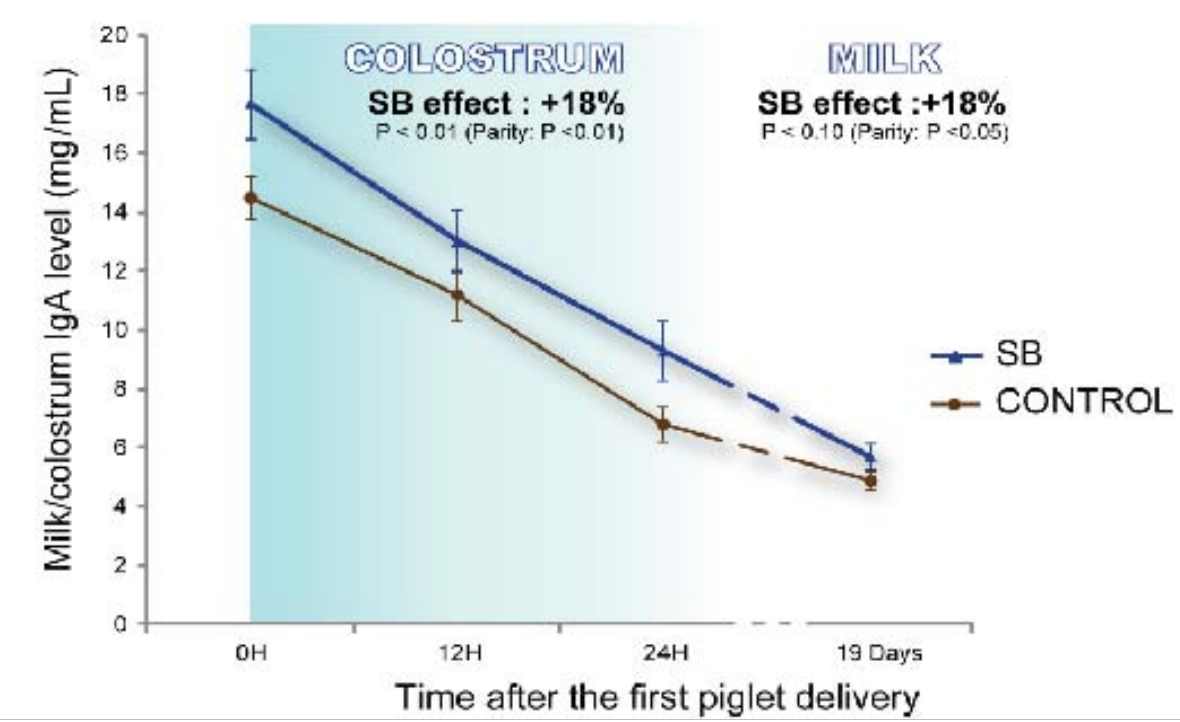


Figure 1: Effect of treatment on colostrum/milk IgA content

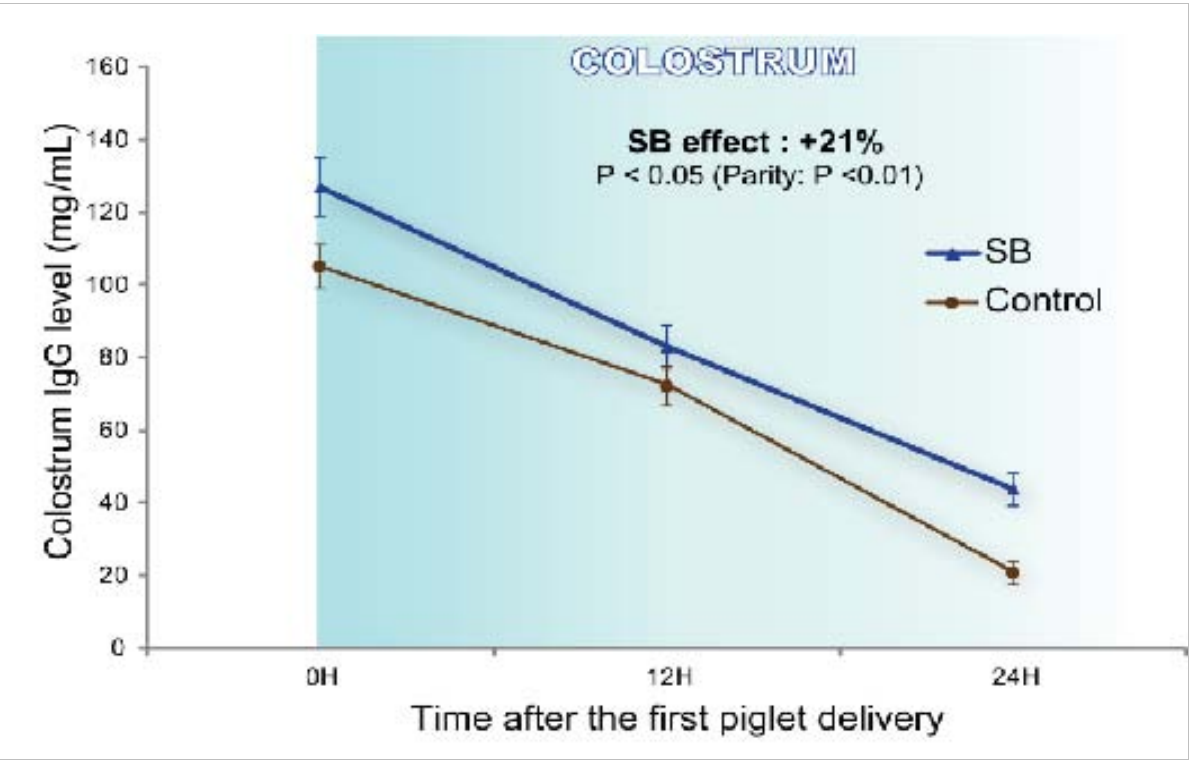


Figure 2: Effect of treatment on colostrum IgG content

Table 1: Influence of *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I-1079 on immunoglobulins in sow colostrum (mg/mL)

	IgA			IgG			IgM		
	C	SB	S.E.M.	C	SB	S.E.M.	C	SB	S.E.M.
0H	14.5	17.5	0.72	105.2	127.7	4.81	7.1	7.7	0.35
12H	11.2	12.7	0.64	72.4	83.1	3.68	5.7	6.0	0.30
24H	6.8	8.9	0.56	30.9	50.7	3.54	4.4	4.8	0.29
AUC mg.h/mL	263	317	P<0.10	1684	2016	P<0.05	138	141	N.S.

The relative change of quantity over time of Ig classes (Table 1) was in agreement with previous reports: IgG represented the major share of total immunoglobulins (73 to 84%, depending on sampling time), followed by IgA (11 to 16%) and IgM (5 to 10%). Feeding SB increased significantly the IgG concentration of colostrum by 21% (P<0.05), tended to improve (+18%, P<0.10) IgA concentration in both colostrum and milk (milk IgA: 5.78 *vs*. 4.90 mg/mL in SB *vs*. Control, respectively), but didn't influence IgM concentration. These data support previous findings of an increase in piglet plasma IgG concentration following live yeast supplementation (Jang *et al*., 2010). Moreover, higher concentration of colostral and milk IgA observed in the current study suggests an improved immune protection of the piglets intestine when SB is fed to the sow. However, to what extent feeding SB improves the colostrum produced by sows and consumed by piglets remains to be determined. Feeding the probiotic *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I-1079 to the sow should be considered when designing strategies to improve piglet's immune status.

References

JANG, Y.D., LEE, G.Y., KIM, D.H., JANG, S.K., KIM, Y.Y.(2010). ADSA-ASAS Midwest 2010 abstracts, 233 p77.

LE DIVIDICH, J., ROOKE, J.A., HERPIN, P.(2005). Journal of Agricultural Science, 143:469-485.

Corresponding author

David Guillou
Lallemand Animal Nutrition
19 rue des Briquetiers, 31702 Blagnac, France
Tel: +33 5 62 74 55 55, Fax: +33 5 62 74 55 00
E-mail: dguillou@lallemand.com

Lallemand is a privately held Canadian company, founded at the end of the 19th century, specializing in the development, production, and marketing of yeasts and bacteria.
Our objective is to develop and offer products and services that will bring value to the producer in a way that respects the environment and the equilibrium of ecosystems, at the same time answering consumers' growing demand for safe and natural food ingredients.
Our products do this by revealing and optimizing the existing potential of animals in terms of health and performance.

"animal sanum in natura sana"

Probiotics

Rumen Specific Live Yeast: Saccharomyces cerevesiae CNCM I-1077
- Increased rumen development and function
- Increased fiber digestibility
- Increased rumen ph

Specific Live Yeast for monogastrics: Saccharomyces c. boulardii CNCM I-1079
- Reorientation of the intestinale flora
- Improve of Colostrum quality and intake
- Better feed intake

Lactic acid Bacteria for monogastrics: Pediococcus acidilactici (MA18/5M)
- Promote beneficial intestinal flora
- Improvement in feed digestibility
- Pathogenic resistance

High Value Yeast Derivates

Inactivated Yeast Saccharomyces cerevesia R397 enriched in organic selenium
- Reinforce immunity
- Improved fertility
- Increase product quality (meat, milk, egg)

Yeast cell wall, combination of high level Mannans (MOS) and ß-Glucans
- Protect the small intestine against pathogens
- Favors feed intake
- Strengthen animal in critical period

LALLEMAND SPECIALTIES GmbH
Lallemand Animal Nutrition
Tel.: +43 (0) 1 602 28 76
Email: animalaustria@lallemand.com

Phytogenic feed additives improve digestibility and growth performance in broilers

Tobias Steiner[1], Klaus Männer[2] and Jürgen Zentek[2]

[1] BIOMIN Holding GmbH, Herzogenburg, AT
[2] Free University Berlin, Institute of Animal Nutrition, Berlin, DE

Abstract

The effects of two phytogenic feed additives (PFA1 and PFA2) on growth performance and coefficients of apparent ileal digestibility were determined in two experiments using male Cobb 500 broilers kept in floor pens.

In Experiment 1, 480 broilers were assigned to three treatments (8 pens/treatment, 20 birds/pen) over a period of 42 days. BW, feed intake and FCR were determined weekly. In Experiment 2, 120 birds were randomly assigned to 6 pens. After 21 days birds were killed after stunning and digesta was collected from the posterior half between Meckels´ Diverticulum and 2 cm prior to the ileo-caecal junction. PFA1 was a blend of spray-dried essential oils; PFA2 was a blend of matrix-encapsulated essential oils (Digestarom® P.E.P. MGE 150). Treatments were (1) Control; (2) PFA1 (150 mg/kg); (3) PFA2 (100 mg/kg). Birds were fed pelleted diets based on corn, soybean meal and wheat in three feeding phases: Starter (1–14 days), Grower (15–28 days) and Finisher (29–42 days). In comparison to the Control overall BW was increased (p = 0.023) in birds fed PFA2 (3212 vs. 3134 g), whereas live weight of birds fed PFA1 was intermediate (3188 g) and not different from the other treatments (p > 0.05). Feed intake and mortality did not differ between treatments (p > 0.05). FCR in week 6 was improved (p = 0.020) in birds fed PFA2 compared to the Control (1.73 vs. 1.81). Overall FCR tended to be reduced by PFA2 (Control: 1.61; PFA1: 1.60; PFA2: 1.58, p = 0.083). PFA2 supplementation enhanced apparent ileal digestibility of crude protein (p < 0.001) and phosphorus (p = 0.028) in comparison to the Control. In conclusion, positive effects of two PFA on broiler performance and ileal apparent digestibility were shown. Benefits of PFA2 were superior to those of PFA1. Hence, matrix-encapsulated PFA represent a tool for enhancing digestibility and growth performance in high-performing broilers.

Introduction

Phytogenic feed additives (PFA) have been gaining growing attention in feeding programs for poultry and pigs. In addition to their flavouring properties, biological effects of PFA include stimulation of gastric juices and saliva, as well as anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-microbial effects in the gastro-intestinal tract (Gessner et al., 2013; Müller et al., 2012; McReynolds et al., 2009). Several studies indicate improvements in digestibility in pigs (Maenner et al., 2011; Kong et al., 2009) and poultry (e.g. Mountzouris et al., 2011; Amad et al., 2011).

The objective of the present study was to evaluate the efficacy of two PFA, added into diets for broiler chickens from hatch until 42 (Exp. 1) or 21 days of age (Exp. 2) compared to broiler chickens fed similar basal diets without addition of PFA. The study was performed according to the guidelines given by EFSA (The EFSA Journal, 2008, 658, 1-5) by targeting the parameters productive performance (body weight, body weight gain, feed intake, feed conversion ratio) and apparent ileal digestibility (crude ash, crude fat, crude protein, amino acids, calcium, phosphorus).

Materials and methods

Animals and housing

For both trials a total of 600 male Cobb 500 broiler chickens were assigned to three treatments without and with supplementation of PFA. In Exp. 1, 480 broilers were assigned to 24 pens (8 pens/ treatment, 20 birds/pen) over a period of 42 days. In Experiment 2, 120 birds were randomly assigned to 6 pens (2 pens/treatment; 20 birds/pen).

Diets and feeding

During the 42 d experimental period (Exp. 1) three basal diets for the feeding phases from 1-14 days of age (starter), 15-28 days of age (grower) and 29-42 days of age (finisher) were fed, meeting or slightly exceeding the nutritional requirements of growing broiler chickens as recommended by the Society of Nutrition Physiology (1999).

During the 21 d experimental period (Exp. 2) similar starter (1-14 days of age) and grower diets (15-21 days of age) were used. The ingredients and calculated nutritional composition of the diets are presented in table 1.

Table 1: Formulation and chemical composition (% as-fed) of the experimental diets

	Starter (1–14 d)	Grower (15–28 d)	Finisher (29–42 d)
Formulation (%)			
Corn	32.34	33.03	35.00
Soy bean meal	32.00	30.16	32.30
Wheat	25.89	26.50	23.00
Soybean oil	5.08	5.08	5.08
Limestone	1.48	1.46	1.47
Monocalcium phosphate	1.40	1.38	1.25
Premix*	1.20	1.20	1.20
Amino acids	0.41	0.49	0.50
Silica/test products	0.20	0.20	0.20
Titanium dioxide	-	0.50	-
Calculated composition			
ME_N (MJ/kg)	12.5	12.6	12.7
Crude protein (%)	22.1	20.1	18.7
Crude fibre (%)	2.5	2.4	2.4
Crude fat (%)	7.4	7.4	7.1
Starch (%)	36.1	39.1	41.0
Calcium (g/kg)	9.0	8.8	8.5
Total phosphorus (g/kg)	7.0	6.7	6.4
Sodium (g/kg)	1.6	1.7	1.7

*including vitamins and trace elements

The test products were included in the diets at the expense of silica (silicium dioxide). All diets were fed in pellet form.

Measurements

All broilers were observed daily for any abnormalities, abnormal behaviour and clinical signs of sickness. Health status was monitored twice daily throughout the experiment.

Productive performance (body weight, body weight gain, feed intake, feed conversion ratio) was measured once a week per pen (replicate unit) between 1 and 42 d of age (Exp. 1), or 1 to 21 d of age (Exp. 2), respectively.

Apparent ileal digestibility of crude ash, crude fat, crude protein, amino acids, calcium and phosphorus was calculated using titanium dioxide (5 g/kg) as an inert indigestible marker in grower diets. Eight broiler chickens from each pen or 16 broiler chickens per treatment with body weights closest to the pen average were selected at the end of the 21-day-feding period and killed after stunning, about two hours after starting the lighting cycle. Ileal digesta from the posterior half between Meckels´ Diverticulum and 2 cm prior to the ileo-caecal junction was collected and kept at -20°C before being freeze-dried for chemical analyses.

Statistical analysis

Results are presented as means ± standard deviation. The statistical model included random effects of animal and fixed effect of treatment. One-way ANOVA was performed with the software package SPSS (IBM SPSS Version 21). All treatment least squares means were compared with each other and the Tukey adjustment was used to control for experiment-wise error. Differences among least squares means with a probability of $p < 0.05$ were accepted as statistically significant. Furthermore, mean differences with p-values ranging from 0.06 to 0.10 were accepted as trends.

Results

Positive effects of PFA supplementation on broiler performance and ileal apparent digestibility were shown. Overall mortality amounted to 2.7% ($p > 0.05$), thus reflecting good management and health conditions. No medical treatments were necessary. Growth rates were very high, exceeding the breed standard (Cobb Vantress, 2013) by 10.3% in the Control treatment. Even under these conditions, supplementation of the basal diets with PFA2 increased ($p < 0.05$) broiler live weight at six weeks of age.

Feed intake did not differ between treatments ($p > 0.05$). Feed conversion ratio was improved ($p < 0.05$) by supplementation of the basal diets with PFA2 in the finisher period (Control: 1.769; PFA1: 1.774; PFA2: 1.726). Overall performance results are shown in table 2.

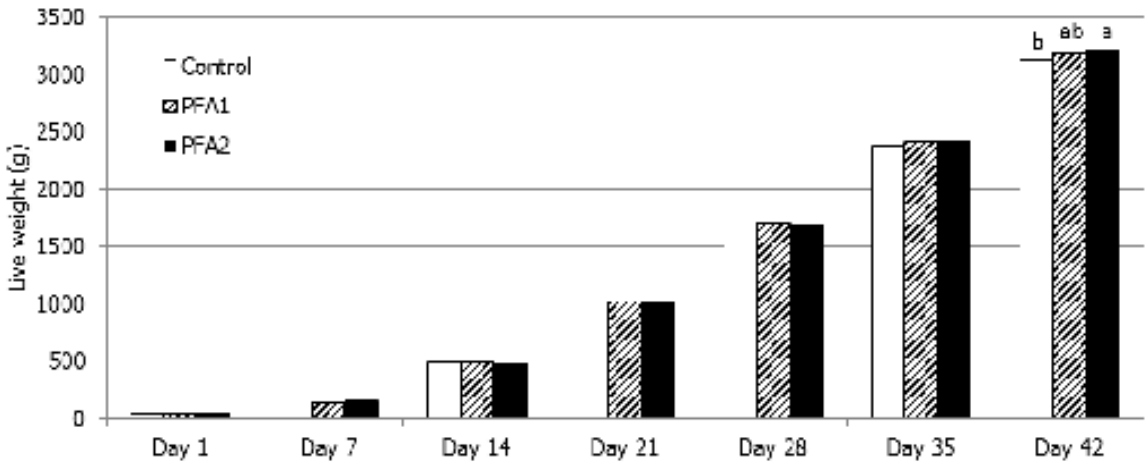


Figure 1: Effect of dietary supplementation with two PFA on broiler live weight weight.
[a,b]Means with different superscripts differ ($p < 0.05$).

PFA2 supplementation enhanced apparent ileal digestibility of crude protein ($p < 0.001$) in comparison to the other treatments (Table 3). Furthermore, PFA2 increased apparent ileal digestibility of total amino acids (p = 0.050) and phosphorus ($p = 0.028$).

Table 2: Effects of PFA supplementation on overall growth performance in broilers in Experiment 1 (42 days of age)

	Control	PFA1	PFA2	*p*-value
n	156	156	155	
Body weight (g)	3134^{b}	3188^{ab}	3212^{a}	0.023
Body weight gain (g)	3091^{b}	3145^{ab}	3169^{a}	0.024
Feed intake (g)	4973	5031	5007	0.461
Feed conversion	1.609^{B}	1.600^{AB}	1.580^{A}	0.083

^{a,b}Means with different superscripts differ ($p < 0.05$).
^{A,B}Means with different superscripts tend to differ ($p < 0.1$).

Table 3: Effects of PFA supplementation on apparent ileal digestibility of broilers in Experiment 2 (21 days of age)

	Control	PFA1	PFA2	*p*-value
n	16	16	16	
Crude ash (%)	40.3	41.8	42.0	0.535
Crude protein (%)	82.3^{b}	83.0^{b}	84.8^{a}	<0.001
Total amino acids (%)	81.2^{b}	82.5^{ab}	83.1^{a}	0.050
Crude fat (%)	92.3	92.7	92.7	0.712
Calcium (%)	35.3	35.3	36.8	0.428
Phosphorus (%)	39.0^{b}	40.3^{ab}	42.4^{a}	0.028

^{a,b}Means with different superscripts differ ($p < 0.05$).

Discussion

Although no statistical significances could be analysed, broilers fed PFA2 had an overall somewhat better body weight and body weight gain compared to broilers fed PFA1. Corresponding to the higher response of PFA2 body weight at the end of the 42 d feeding period and overall body weight gain was significantly improved when compared to broilers fed without addition of PFA. However, no consistent effect on feed intake was found. A slightly positive effect on feed intake was limited to the grower and finisher period (data not shown). Birds fed PFA1 had a somewhat higher feed intake than birds offered diets with PFA2. However, no statistical significances were determined. Therefore, the reduced feed conversion of broiler chickens fed with PFA mainly resulted from an increase in body weight gain. Consequently, the positive response of PFA2 on feed conversion was higher in comparison to PFA1, but differences between both test products were only significant during the finisher period.

With inclusion of PFA benefits on ileal apparent digestibility of selected nutrients was found. The positive response of PFA2 was superior to PFA1. However, differences between the test products were only significant for protein. The benefits of PFA2 were reflected in significantly enhanced apparent ileal digestibility for crude protein, cysteine (data not shown) and total amino acids as well as phosphorus by 3.1, 4.3, 2.3 and 8.8% in comparison to broiler chickens fed without PFA. These effects may partly explain the benefits on broiler performance when feeding diets with addition of PFA.

Conclusion

In the present study positive effects of two PFA on broiler performance and ileal apparent digestibility were shown. Benefits of PFA2 were superior to those of PFA1. Hence, matrix-encapsulated PFA represent a tool for enhancing digestibility and growth performance in high-performing broilers.

References

Amad A A, Männer K, Wendler K R, Neumann K, Zentek J (2011) Effects of a phytogenic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. Poult. Sci., 90, 2811-2816.

Cobb Vantress (2013) Cobb 500 Broiler Performance & Nutrition Supplement. Cobb Vantress Incorporated, Siloam Springs, Arkansas, USA 72761-1030. http://www.cobb-vantress.com//docs/default-source/cobb-500-guides/cobb500-broiler-performance-nutrition-supplement-(english).pdf

EFSA (2011) EFSA Journal, 9(5), 2175. Scientific opinion. Technical guidance. Tolerance and efficacy studies in target animals. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP).

Gessner D K, Syed B, Steiner T, Eder K (2013) Influence of a phytogenic feed additive on inflammatory processes in intestinal cells. European Symposium of Porcine Health Management, 22–24, May 2013, Edinburgh, U.K.

Kong X F, Yin F G, He Q H, Liu H J, Li T J, Huang R L, Fan M Z, Liu Y L, Hou Y Q, Peng Li, Ruana Z, Deng Z Y, Xie M Y, Xiong H, Yin Y L (2009) Acanthopanax senticosus extract as a dietary additive enhances the apparent ileal digestibility of amino acids in weaned piglets. Livest. Sci., 123, 261–267.

McReynolds C, Waneck C, Byrd J, Genovese K, Duke S, Nisbet D, (2009) Efficacy of multistrain direct-fed microbial and phytogenetic products in reducing necrotic enteritis in commercial broilers. Poult. Sci., 88, 2075-2080.

Maenner K, Vahjen W, Simon O (2011) Studies on the effects of essential-oil-based feed additives on performance, ileal nutrient digestibility, and selected bacterial groups in the gastrointestinal tract of piglets. J. Anim. Sci., 89, 2106-2112.

Mountzouris K, Paraskeyas V, Tsirtsikos P, Palamidi I, Steiner T, Schatzmayr G, Fegeros K (2011) Assessment of a phytogenic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. Anim. Feed Sci. Technol., 168, 223–231.

Müller K, Blum N M, Kluge H, Müller A S (2012) Influence of broccoli extract and various essential oils on performance and expression of xenobiotic- and antioxidant enzymes in broiler chickens. Br. J. Nutr., 108 (4), 588-602.

Corresponding author

Dr. Tobias Steiner
BIOMIN Holding GmbH
Industriestrasse 21
A-3130 Herzogenburg
E-mail: tobias.steiner@biomin.net

BIOMIN Research & Development

Turning science into sustainable solutions

Our strong in-house R&D and global cooperation with leading institutions form the basis by which innovative solutions are developed for our customers.

research.biomin.net

Naturally ahead

Biomin®

Einfluss des natürlichen Betains als potenzielle Glycin-Quelle auf die Broiler-Leistung

Svetlana Peganova[1], Mike Bedford[1] und Benjamin Schröder[2]

[1] AB Vista Feed Ingredients, Marlborough, UK
[2] Pulte GmbH & Co. KG, Rimsting, DE

Einleitung

Beim Einsatz von tierischen Nebenprodukten in der Formulierung für Monogastrier-Rationen enthalten diese hohe Gehalte an den Aminosäuren Glycin und Serin. Seit durch entsprechende Vorgaben der EU gänzlich auf Fleischknochenmehl verzichtet wurde und ausschließlich pflanzliche Proteinträger eingesetzt werden durften, wurde nie die Frage gestellt, ob diese beiden Aminosäuren nicht vielleicht doch limitierend wirken könnten.

Mittlerweile ist bekannt, dass Rationen ohne tierische Nebenprodukte vor allem in der Junggeflügelfütterung bezüglich der Gehalte an Glycin und Serin limitiert sind (Bedford und Fothergill, 2002). Betain als Tri-Methylglycin-Derivat wird durch vollständige Demethylierung zu Glycin umgewandelt und kann so als Quelle für diese Aminosäure dienen (Eklund et al., 2005).

Die vorliegende Studie hatte das Ziel, den Einfluss unterschiedlicher Betainzulagen auf die Leistung von Broilern in rein pflanzlichen Rationen zu untersuchen und zu ermitteln, ob es unter den gegebenen Umständen tatsächlich eine Glycinquelle darstellt.

Material und Methoden

In dem Versuch wurden 2.240 Broiler der Rasse „Ross 308" als ausgebrütete Küken am Tag der Schlüpfung in 4 Versuchsgruppen mit 14 Wiederholungen pro Behandlung (zur Hälfte mit weiblichen und männlichen Tieren) und 40 Tieren pro Abteilung eingeteilt. Die Behandlungen bestanden aus 4 diversen Zulagen (0, 1, 2 oder 5 kg/t) des natürlichen Betains „Vistabet®", AB Vista Feed Ingredients, Marlborough, Großbritannien. Die Tiere wurden ad libitum vom Tag 0 bis 38 gefüttert. Alle Rationen wurden auf Basis von Mais und Sojaschrot erstellt und enthielten keine Cholinzulagen. Die Futterzusammensetzung der Basalrationen von 3 Fütterungsphasen (Starter, Mast, Endmast) kann der Tabelle 1 entnommen werden. Es wurden Futteraufnahme (FA) und Lebendmassezunahme (LMZ) erfasst und die Futterverwertung (FVW) am Tag 21 und am Ende des Versuchs berechnet. Die Mortalität wurde täglich erfasst. Der Europäischer Effizienzfaktor (EEF) wurde zur Auswertung des gesamten Versuchs herangezogen und mittels folgender Formel ermittelt: ((100 – Mortalitätsrate) x Lebendgewicht kg) / (Alter in Tagen x Futterverwertungsrate)) x 100.

Der Versuch wurde 4 x 2 faktoriell aufgestellt und mit dem Statistikprogramm JMP Pro ausgewertet. Das statistische Model berücksichtigte die Betain-Zulage, das Geschlecht und die Interaktion zwischen Geschlecht und Betain. Die Abteile dienten als Versuchseinheit für alle Messungen. Als signifikant galten Werte ab $P \leq 0{,}05$.

Ergebnisse

Während der Starter-Phase (Tag 0-21) wurde keiner der erfassten Leistungsparameter durch die Interaktion zwischen Geschlecht und Betain beeinflusst. Die Parameter Futteraufnahme und Futterverwertung wurden sowohl durch die Betain-Zulagen als auch das Geschlecht signifikant beeinflusst (siehe Tabelle 2). Wie zu erwarten war, wuchsen männliche Broiler schneller als die weiblichen (P = 0,0001), und die Lebendmassezunahme wurde durch die Betain-Zulagen nicht beeinflusst. Die Mortalität war niedrig und stand nicht im Zusammenhang mit der Behandlung und Geschlecht. Im Mittel der beiden Geschlechter wurde die Futteraufnahme durch den Einsatz von Betain signifikant reduziert (P = 0,02) und die Futterverwertung signifikant verbessert (P = 0,0001). Dabei wurde die beste Futterverwertung bei einer Zulage von 5 kg Betain/Tonne Futter erreicht und war um 3% besser als im Vergleich zur Kontrollgruppe (1,23 vs. 1,27, siehe Abbildung 1).

Sehr ähnliche Ergebnisse wie in der Starter-Phase wurden über den Gesamtzeitraum (Tag 0-38) ermittelt (siehe Tabelle 3). Dabei stellte sich heraus, dass Futteraufnahme und Futterverwertung mit steigenden Einsatzraten von Betain signifikant beeinflusst wurden. Die beste Futterverwertung wurde bei einer Zulage von 5 kg Betain/Tonne Futter erreicht und war um 2% besser als im Vergleich zur Kontrollgruppe (1,54 vs. 1,58, siehe Abbildung 2). Das Optimum lag bei einer Zulage von 2 kg Betain/Tonne Futter. Der Europäische Effizienzfaktor wurde von 419 auf 436 durch Steigerung der Betain-Zulage auf 2 kg/Tonne Futter im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell erhöht. Insgesamt wurde eine sehr hohe Leistung bei den Tieren erzielt; insbesondere bei männlichen Broilern, die eine Lebendmassezunahme von 2,9 kg bei einer Futterverwertung von 1,5 am 38. Versuchstag unter Einfluss von Betain-Zulagen erreicht haben.

Tabelle 1: Kalkulierte Nährstoffzusammensetzung der Basalrationen

Inhaltstoffe,%	**Starter (0-21 Tag)**	**Mast (21-35 Tag)**	**Endmast (35-38 Tag)**
Mais	55,74	65,43	65,48
Rapsextraktionsschrot	3,00	5,00	5,00
Sojaextraktionsschrot	34,66	23,31	23,31
Sojaöl	2,84	3,03	3,03
Viehsalz	0,45	0,32	0,32
Kohlensaurer Futterkalk	0,70	0,58	0,58
Dicalcium Phosphat	1,86	1,47	1,47
Rest[1], %	0,75	0,86	0,81
Kalkulierte Gehalte			
Umsetzbare Energie Geflügel, ME MJ/kg	12,80	13,18	13,18
Rohprotein, %	22,15	18,20	18,20
Calcium, %	0,95	0,80	0,80
Phosphor %	0,79	0,68	0,68
Natrium %	0,20	0,15	0,15
Lysin, %	1,32	1,10	1,10
Methionin, %	0,59	0,52	0,52
Methionin +Cystin, %	0,97	0,85	0,85
Threonin, %	0,86	0,76	0,76
Tryptophan, %	0,26	0,21	0,21
Glycin, %	0,93	0,77	0,77
Glycin+Serin, %	2,00	1,64	1,64
Cholin, mg/kg	1 492	1 376	1 376

[1] Rest = Kokzidiostatikum (Wirkstoff Salinomycin), Antioxidantien (Ethoxiquin), synth. Aminosäuren (DL-Methionin, Lysin-HCl, L-Threonin), Vitaminpremix, Phytase-Enzym (Quantum® Blue)

Tabelle 2: Einfluss unterschiedlicher Zulagen von Betain auf Leistungsparameter von Broilern (Tag 0-21)

Geschlecht	**Betain, kg/t**	**FA, g**	**LMZ, g**	**FVW, kg/kg**	**Mortalität, %**
Weiblich	0	1173	908	1,293	0,36
Weiblich	1	1172	914	1,283	1,07
Weiblich	2	1144	895	1,278	-
Weiblich	5	1152	918	1,255	-
Männlich	0	1278	1028	1,243	0,71
Männlich	1	1243	1012	1,229	1,07
Männlich	2	1248	1023	1,220	-
Männlich	5	1244	1033	1,204	1,79
	5-%-LSD	28	26	0,016	1,61
Weiblich		1160	909	1,277	0,36
Männlich		1253	1024	1,224	0,89
	5-%-LSD	14	13	0,008	0,80
	0	1225	968	1,268	0,54
	1	1208	963	1,256	1,07
	2	1196	959	1,249	-
	5	1198	976	1,230	0,89
	5-%-LSD	20	19	0,012	1,14
R^2		0,7964	0,8692	0,8173	0,1638
RMSE		26	24	0,015	1,49
Statist. Modell		**0,0001**	**0,0001**	**0,0001**	0,2513
Geschlecht		**0,0001**	**0,0001**	**0,0001**	0,186
Betain		**0,0202**	0,3203	**0,0001**	0,2543
Geschlecht x Betain		0,3012	0,4164	0,8913	0,345

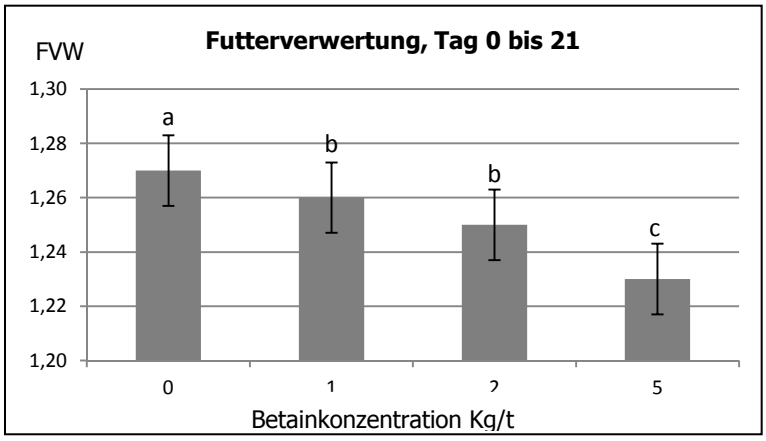


Abbildung 1: Durchschnittliche Futterverwertung von Broilern (Tag 0 bis 21) beider Geschlechter in Abhängigkeit unterschiedlicher Zulagen von Betain

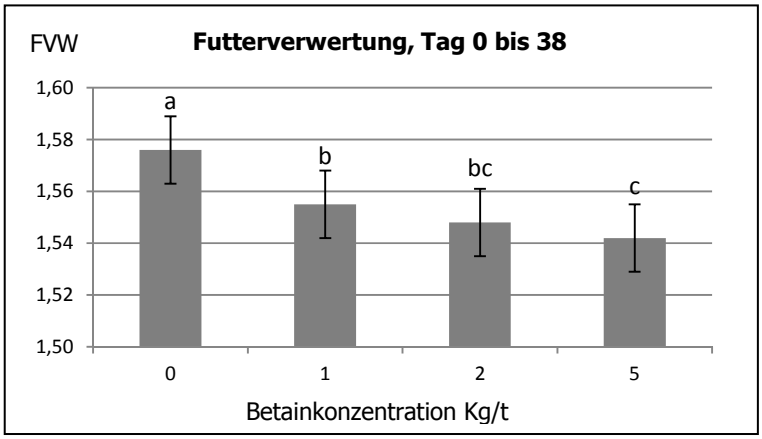


Abbildung 2: Durchschnittliche Futterverwertung von Broilern (Tag 0 bis 38) beider Geschlechter in Abhängigkeit unterschiedlicher Zulagen von Betain

Tabelle 3: Einfluss unterschiedlicher Zulagen von Betain auf Leistungsparameter von Broilern (Tag 0-38)

Geschlecht	**Betain, kg/t**	**FA, g**	**LMZ, g**	**FVW**	**EEF**	**Mortalität, %**
Weiblich	0	3932	2434	1,615	375	0,71
Weiblich	1	3850	2411	1,597	389	1,07
Weiblich	2	3815	2406	1,585	394	0,71
Weiblich	5	3805	2407	1,581	392	0,36
Männlich	0	4447	2896	1,536	463	3,21
Männlich	1	4334	2864	1,513	471	4,62
Männlich	2	4345	2876	1,511	479	1,79
Männlich	5	4347	2894	1,502	475	4,64
	5-%-LSD	89	62	0,018	21	2,57
Weiblich		3851	2415	1,595	387	0,71
Männlich		4368	2882	1,516	472	3,57
	5-%-LSD	45	31	0,009	10	1,28
	0	4190	2665	1,576	419	1,96
	1	4092	2637	1,555	430	2,84
	2	4080	2641	1,548	436	1,25
	5	4076	2650	1,542	433	2,50
	5-%-LSD	63	44	0,013	15	1,82
R^2		0,9217	0,9504	0,8762	0,8495	0,3605
RMSE		83	58	0,017	19	2,39
Statist. Modell		**0,0001**	**0,0001**	**0,0001**	**0,0001**	**0,0021**
Geschlecht		**0,0001**	**0,0001**	**0,0001**	**0,0001**	**0,0001**
Betain		**0,0016**	0,5813	**0,0001**	0,1078	0,3256
Geschlecht x Betain		0,8719	0,8805	0,9073	0,9876	0,3229

Diskussion

Insgesamt wurde gezeigt, dass hohe Leistungen von Broilern durch die Zulagen des natürlichen Betains „Vistabet®" auf Basis von rein pflanzlichen Rationen erreicht werden können.

Mit steigenden Einsatzraten von Betain wurde die Futteraufnahme vermindert und Futterverwertung sowie der Europäischer Effizienzfaktor verbessert. Alle Rationen enthielten keine Cholin-Zulagen, so dass mit der Steigerung der Betain-Zulagen ein Teil des Betains als Ersatz für Cholin dienen könnte. Die beste Futterverwertung wurde bei einer Zulage von Betain von 5 kg/Tonne Futter erreicht und lag damit deutlich über der Einsatzrate, die bislang genutzt wurde, um die Effekte des Betains als Methyl-Gruppen–Spender (Yu und Xu, 2000) zu nutzen (dieser Effekt ist bekannt und wird auch in der praktischen Tierfütterung angewandt). Das steht im Einklang mit den Ergebnissen von früheren Studien (El-Husseiny et al., 2007; Hassan et al., 2005). Wie man gezeigt hat, führte die Erhöhung der Betain-Zulagen zur Steigerung des Gehaltes an Waschstumshormon (GH) bei Ferkeln (Yu und Xu, 2000). Man nimmt an, dass dies ein Ergebnis des gestiegenes Gehaltes an Glycin im Blut ist (direkt abgeleitet von der Demethylierung von Betain), welches auf eine direkte Wirkung der hypothalamisch-hypophysären Funktion hindeutet (Eklund et al., 2005). Da die Steigerung des Gehaltes an GH in Blutplasma im Zusammenhang mit positiven Effekten auf Wachstumleistung und Effizienzparameter beim Geglügel steht (Vasilatos-Younken und Scanes, 1991), ist davon auszugehen, dass die Fütterung von hohen Betain-Dosierungen zur Verbesserung der Leistung über diesen Mechanismus führt, insbesondere wenn Glycin limitierend ist.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen auf, dass Betain eine wichtige und bislang wenig beachtete und wenig untersuchte Rolle als Glycinquelle spielen kann. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um im direkten Vergleich von Betain und Glycin diesen Wirkmechanismus zu bestätigen.

Literatur

Bedford, M.R., Fothergill, A., 2002. Alternatives to Antibiotics - Nutritional strategies to manage microfloral populations. In: Animal Nutrition Association of Canada, University of Guelph, pp. 65-79.

Eklund, M., Bauer, E., Wamatu, J., Mosenthin, R., 2005. Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. Nutr. 18, 31-48.

El-Husseiny, O.M., M.A.Abo-El-Ella, Magda M.Abd-Elfattah, 2007. Response of broilers performance to dietary betaine and folic acid at different methionine levels. International Journal of Poultry Science 6, 515-523.

Hassan, R.A., Attia, Y.A., El-Ganzory, E.H., 2005. Growth, Carcass Quality and Serum Constituents of Slow Growing Chicks as Affected by Betaine Addition to Diets Containing 1. Different Levels of Choline . International Journal of Poultry Science 4, 840-850.

Vasilatos-Younken, R., Scanes, C.G., 1991. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factors in Poultry

Yu, D.Y., Xu, Z.R., 2000. Effects of methyl-donor on the performances and mechanisms of growth-promoting hormone in piglets. Chinese Journal of Animal Science 36, 8-10.

Autorenanschrift

Dr. Svetlana Peganova
AB Vista Feed Ingredients
2/3 Woodstock Court, Blenheim Road, Marlborough Business Park
Marlborough, Wiltshire SN8 4AN, UK
E-Mail: Svetlana.Peganova@abvista.com

leading by example…

®vistabet
LEADING BY EXAMPLE

AB Vista ist seit Herbst 2012 Lieferant für natürliches Betain im europäischen Markt

Betain ist ein effektiver Osmo-Regulator und Methylgruppen-Donator

- reduziert die Probleme in Stresssituationen
- erhält und fördert die Darmgesundheit
- verbessert die Schlachtkörper-Qualität und sorgt für trockene Einstreu
- ersetzt Cholinchlorid vollständig und spart Methionin und Cystein

®vistabet liegt als Pulver (96%) und flüssig (32%) vor
Finden Sie mehr heraus: email@pulte de
Tel. + 49 (0)89 649 628 90

ABVista Feed Ingredients
abvista.com

PULTE
www.pulte.de

Synergistic effects of citrus extract on performance of young animals

Olivier Clech[1], Alexia Lepont[1], Sébastien Lé[2] and Ulrich Steinruck[3]

[1] Nor-Feed Sud, Beaucouzé, FR
[2] Agrocampus Ouest, Applied Mathematics Laboratory, Rennes, FR
[3] Pulte GmbH & Co. KG, Grünwald, DE

Introduction

Citrus concentrate contains a set of well characterized phytochemical compounds like citroflavonoids, limonene, pectic-oligosaccharides and citrus essential oil. Especially because of the synergy of the active compounds citrus extract is effective as a natural growth promoter during specific periods such as weaning or starter period, when animals are subjected to changes in their gut microbiota (Rasmussen and Siemsen, 1998; Chicoteau and *al*, 2001; Aurensan, 2012; Lamballais, 2013). The prebiotic effect influences the gut flora in favour of beneficial species, combined with a gut flora control. Thus, citrus extract has a positive influence on feed conversion and growth on young animals.

Nor-Spice AB Powder is a premixture of feed additive formulated from lemon extract, so it is containing all the positive characterized phytochemical compounds of citrus concentrate. Lemon extract is a natural product- botanically defined additive (European Union Register of Feed Additives, 2014), for which a feed additive registration dossier has been submitted to EFSA on 23/09/2010.

Considering its natural composition, Nor-Spice AB Powder may be used in organic farming according to the regulations (CE) No. 834/2007 and (CE) No. 889/2008.

Nor-Spice AB Powder has been formulated to enhance the micro flora in the gut which leads to an optimised digestion tract for high performance.

Materials and methods

In order to measure the effect of Nor-Spice AB Powder on growth performances of young animals, several trials were conducted in post-weaning piglets and in broilers during the starter period, in varied conditions and their results evaluated via a comprehensive statistical analysis.

Piglet trials

Ten trials were designed on more than 2000 post-weaning piglets in Denmark, the United Kingdom, Canada and Switzerland. Nine trials were realised in commercial farms, and one trial has been done as part of a thesis at the Royal Danish Veterinary and Agricultural University. Of these ten trials, three involved a positive control with the addition of a synthetic growth promoter in the control group (trial 8, 9, 10).

At the beginning of the trial, the piglets were between the ages of 21 and 28 days of life, to characterise the effect of Nor-Spice AB on the critical period around weaning. The piglets were homogenously divided into a control group and a trial group according to their live weight and their gender. The difference of the average start weights of the animals in each group did not, as far as possible, exceed 2%, and each pen consisted of an equivalent number of each gilts and castrates.

Piglets were fed *ad libitum* with a commercial feed formulated according to good manufacturing practice and had free access to fresh water. Nor-Spice AB Powder (Nor-Feed Sud, France) was added to trial groups during a given period following the product direction of use, typically 250 grams per ton of complete feed. Detail of each trial is presented in table 1.

The piglets were weighed together in each pen, at the start and at the end of each trial. Feed intake was calculated by weighing of the feed refusal once a week. Number, date and weight of dead piglets were registered, as well as medications used.

Average daily gain (ADG) and feed conversion rates (FCR) were compared by two-way unbalanced variance analysis (ANOVA), using firstly a Fisher test in order to demonstrate the global effect of treatment factor, and secondly a Student test, as a test of significance of coefficient.

Table 1: details of the piglets trial conditions

Trials	**Location**	**Duration (days)**	**Number of animals**	**Average weight, start (Kg)**	**Positive control**
1	Denmark, commercial farm	14	55 piglets in each group	8.1	-
2	Denmark, commercial farm	13	63 piglets in each group	7.6	-
3	Denmark, Royal Danish Veterinary and Agricultural University.	49	86 piglets in each group	6.9	-
4	United Kingdom, commercial farm	42	60 piglets in each group	8.4	-
5	Denmark, commercial farm	28	35 piglets in each group	5.3	-
6	Denmark, commercial farm	21	35 piglets in each group	6.7	-
7	Denmark, commercial farm	21	30 piglets in each group	7.9	-
8	Switzerland, commercial farm	90	30 piglets in each group	9.8	50 ppm Olaquindox
9	United Kingdom, commercial farm	63	60 piglets in each group	7.1	50 ppm Avilamycin
10	Canada, commercial farm	49	612 piglets in control group, 607 piglets in trial group	5.6	Aureomycin

Broilers trials

Nine trials were conducted on more than 150.000 broiler chicks in commercial or experimental farms in Europe, Canada, Taiwan and India. Of these nine trials, three involve a positive control with the addition of a synthetic growth promoter in the control group.

Animals were one day old at the beginning of the trial. Animals were fed *ad libitum* with a commercial feed formulated according to good manufacturing practice and had free access to fresh water. Nor-Spice AB Powder (Nor-Feed Sud, France) was added to trial groups during a given period following the product direction of use, typically 400 grams per ton of complete feed. Detail of each trial is presented in table 2.

Animals were weighed at the start and at the end of each trial. Feed intake was calculated by weighing of the feed refusal. Number, date and weight of dead animals were registered, as well as medications used.

Growth and feed conversion rates (FCR) were compared by two-way unbalanced variance analysis (ANOVA), using firstly a Fisher test in order to demonstrate the global effect of treatment factor, and secondly a Student test, as a test of significance of coefficient.

Table 2: details of the broilers trial conditions

Trials	Location	Duration (days)	Number of animals	Positive control
1	France, INRA Le Magneraud (experimental farm)	24	25 Ross chicken in each group	-
2	Switzerland, Aviforum Zollikofen (experimental farm)	42	4200 Ross chicken	-
3	Denmark, Commercial farm	35	80 broilers in each group	-
4	United Kingdom, commercial farm	43	102000 broilers	-
5	France, INRA Tours-Nouzilly (experimental farm)	23	20 Ross chicken in each group	-
6	Taiwan, commercial farm	26	16.900 chickens in control group, 6.500 broilers in trial group	-
7	Canada, Research center	42	204 broilers	Antibiotic used as a growth promoter
8	India, commercial farm	42	160 broilers in each group	Furazolidon and oxytetracyclin
9	France, commercial farm	35	22.400 broilers in each group	Avilamycin (10 ppm then 8 ppm)

Results

Piglets trials

The results are presented in table 3.

Except for trial 2, all trials, taken individually, show positive results of Nor-Spice AB Powder on ADG parameters, compared to negative or positive control. In the same way, all trials except trials 3 and 9 show individually improvement of FCR with Nor-Spice AB Powder added to the feed.

We observe a positive effect of Nor-Spice AB Powder with ADG and FCR improvement for trials 8, 9 and 10 (except for trial 9 with no change of FCR between both groups as previously described), *i.e.* trials which involved a synthetic growth promoter as a positive control, with average results for these three trials comparable to the average results of all trials (10.9% average ADG improvement, and 6.3% average FCR improvement for trials 8-10).

The ADG average improvement calculation for these ten trials show a 10.9 % improvement of trial groups compared to control groups, with a statistical significance at $p<0.001$, for both Fisher and Student tests. Whereas for the parameter FCR the average improvement calculation indicate a 7.1 % improvement of trial groups compared to control groups, with a statistical significance at $p<0.01$, for both Fisher and Student tests.

Table 3: Piglets trial results

Trials	Control ADG (g/animal/d)	Trial ADG (g/animal/d)	ADG improvement/ Control group	Control FCR	Trial FCR	FCR improvement/ Control group
1	158	190	20,3%	1,37	1,11	-19%
2	178	170	-4,8%	1,16	1,06	-8,6%
3	314	337	7,3%	1,85	1,85	0%
4	407	500	22,9%	1,56	1,49	-4,5%
5	161	173,5	7,8%	1,95	1,94	-0,5%
6	194	216	11,4%	1,4	1,25	-11,0%
7	275	305	10,9%	1,45	1,32	-8,6%
8	408	474	16,2%	1,51	1,39	-7,9%
9	412	468	13,6%	1,46	1,46	0%
10	431	444	3%	1,37	1,22	-10,9%
Average			**10,9 % *****			**-7,1 % ****

*** p<0.001; ** p<0.01

Broilers trials

The results are presented in table 4.

All trials, taken individually, represent positive results of Nor-Spice AB Powder on growth parameters, compared to negative or positive control. In the same way, all trials except trial 9 show individually improvement of FCR with Nor-Spice AB Powder added to the feed.

We observe a positive effect of Nor-Spice AB Powder with growth and FCR improvement for trials 7, 8 and 9 (except for trial 9 with + 0.4 % of FCR for trial group as previously described), *i.e.* trials which involved a synthetic growth promoter as a positive control. Growth average results for these three trials are comparable to the average results of all trials (3.6 % average ADG improvement for trials 7-9), but FCR improvement seems to be lesser with only 1.3 % average FCR improvement for trials 7-9.

By calculating the average improvement of growth for these nine trails, we observed an improvement of 3.4 % in comparison to control groups, with a statistical significance at p<0.001, for both Fisher and Student tests. The same statistical significance (p<0.001; Fisher and Student test) was reached for the parameter FCR, with an average improvement for all trials of 2.8%.

Table 4: Broilers trial results

Trials	Control growth (g/animal)	Trial growth (g/animal)	Growth improvement/ Control group	Control FCR	Trial FCR	FCR improvement/ Control group
1	472	493	4,4%	1,916	1,827	-4,6%
2	2543	2594	2,0%	1,784	1,773	-0,6%
3	1785	1819	1,9%	1,69	1,63	-3,6%
4	2450	2550	4,1%	1,96	1,84	-6,1%
5	285	291	2,3%	2,84	2,74	-3,5%
6	1920	2010	4,7%	1,77	1,72	-2,8%
7	3159	3234	2,4%	1,68	1,64	-2,4%
8	1807	1878	4,0%	2,132	2,092	-1,9%
9	1593	1665	4,5%	1,759	1,766	+0,4%
Average			**3.4 % *****			**-2,8 % *****

*** p<0.001

Discussion

Nor Spice AB Powder had therefore a positive effect on piglet's and chicken's growth performances. These results confirm conclusions from different reviews on growth promoter alternatives (Vondruskova and *al*, 2010; Pirot, 2007; Wenk, 2002) in which plant extracts have been demonstrated as efficient natural alternatives to the use of growth promoters, especially antibiotics. The importance of selection and standardization of plant extracts has been highlighted by Budzinski et al., 2000 and Oetting et al.,2006.

For broilers, the Indian and Taiwan trials results indicate that Nor-Spice AB Powder works efficiently in tropical conditions too. Inclusion of Nor-Spice AB Powder in broiler feeds may improve weight gain and feed conversion rate during a growth period of up to 43 days of age in temperate, subtropical and tropical climates.

Furthermore, we observe positive growth and FCR average improvement with Nor-Spice AB Powder added to the feed compared to negative control or positive control (synthetic growth promoters such as ionophores), but we have no explanation of these results.

This growth promoting effect of Nor-Spice AB Powder for young animals has also previously been studied with calves (Nor-Feed Sud, 2013). Overall results show better zootechnical performances with Nor-Spice AB Powder, compared to fructo-oligosaccharides (FOS). Moreover, Nor-Spice AB Powder is 6 times more cost effective than FOS.

This zootecnical effect may be explained by a prebiotic action supporting the growth of certain beneficial micro-organisms of the digestive track (*e.g.* lactic acid bacteria), combined to a gut flora control, resulting in the depression of the population of other micro-organisms (gram negative bacteria), including potential or opportunistic pathogens.

This complementary mode of action is illustrated with *in vitro* work (comparative growth of selected micro-organisms, Tours University, 2000; Nor-Feed Sud, 2012) and *in vivo* experiments (characterization of the ileal microflora of the pigs using a DNA probe technique by a T-RLFP analysis, Berg, 2001).

Nor-Spice AB Powder naturally contains citroflavonoids, pectic-oligosaccharides, organic acids, limonene and citrus essential oil. Flavonoids from citrus have been well described in the literature to have antimicrobial effect (Pistelli and Giorgi, 2012; Cushnie and Lamb, 2005; Pretorius, 2003; Benavente-Garcia, 1997). A dietary **prebiotic** has been defined as a selectively fermented ingredient that results in specific changes in the composition and/or activity of the gastrointestinal microbiota, thus conferring benefit(s) upon host health (Gibson and *al*, 2010). Pectic-oligosaccharides (POS) are complex fragments coming from degradation of pectin (Agnan Marie Michel Combo and *al*, 2011). These molecules have prebiotic properties that have been recently described and studied by various authors (Gullon and *al*, 2013; Manderson et *al*, 2005; Hotchkiss et al, 2003; Olano-Martin et *al*, 2002). Other beneficial effects induced by POS include the inhibition of pathogenic bacteria (Olano-Martin and *al*, 2003) and the prevention of the adhesion of microorganisms (Hotchkiss et al, 2003; Guggenbichler et al, 1997).

Thus, the phytogenics contained in Nor-Spice AB Powder might act synergistically to enhance the gut flora balance, which result in improved performances during periods associated with severe stress for young animals.

Conclusion

Nor-Spice AB Powder has shown a technical interest illustrated by a positive effect on growth performances for piglets and broilers in varied conditions.

The economic interest should now be evaluated according to these zootechnical results, and by analysis of the Nor-Spice AB Powder price and dosage compared with the feed economy in relation to the actualised cost of feed.

References

Aurensan C. (2012). Valorisation Marketing & Technique d'une Gamme de produits, Rapport de stage Master Innoagro Istia Innovation, Université d'Angers, 63 pages.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F. R., Ortuño A., Del Rio J. A. (1997). Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids. J. Agric. Food Chem. 45 (12), 4505-4515.

Berg H. (2001). Virkningen af polyphenolers metalkompleksbinding på tarmbakterier fra grise (The effect of complex binding of metalions by polyphenolic compounds on intestinal bacteria in pigs). M.Sc. Thesis, The Royal Vet. & Agric. University Copenhagen.

Budzinski JW, Foster BC, Vandenhoek S, Arnason JT (2000). An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. Phytomedicine 7, 273–282.

Chicoteau P., Elgaard T. & Baucher J.F. (2001). Les productions animales sans facteur de croissance, c'est possible, c'est rentable et c'est sûr. L'exemple du Norspice AB. Forum Agrosante´ , Beauvais, Avril 2001.

Combo A.M.M., Aguedo M., Paquot M. (2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2011 15(1), 153-164.

Cushnie T.P.and Lamb A.J., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids, International Journal of Antimicrobial Agents, Volume 26, Issue 5 , Pages 343-356, November 2005.

European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003, Appendixes 3e & 4 (I), Annex I: List of additives, edition 182, released 12.02.2014.

Glenn R. Gibson, Karen P. Scott, Robert A. Rastall, Kieran M. Tuohy, Arland Hotchkiss, Alix Dubert-Ferrandon, Melanie Gareau, Eileen F. Murphy, Delphine Saulnier, Gunnar Loh, Sandra Macfarlane, Nathalie Delzenne, Yehuda Ringel, Gunhild Kozianowski, Dickmann R., Lenoir-Wijnkoop I., Walker C. and Buddington R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition, Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods 7 (1) 1–19.

Guggenbichler J. P., Bettignies-Dutz A., Meissner P., Schellmoser S. and Jurenitsch J. (1997). Acidic oligosaccharides from natural sources block adherence of *Escherichia coli* on uroepithelial cells, Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 7(1), 35-38.

Gullon B., Gomez B, Martinez-Sabajanes M., Yanez R., Parajo J.C. and Alonso J.L (2013). Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties, Trends in Food Science & Technology 30 (2013) 153-161.

Hotchkiss A.T., Olano-Martin E., Grace W.E., Gibson G. and Rastall B.(2003). Pectic oligosaccharides as prebiotics. ACS Symp. Ser., 849, 54-62.

Lamballais A. (2013). Valorisation et consolidation de la gamme Citrozest, Rapport de stage Master 2 SIMS Produits de santé, ISSBA, Université d'Angers, 108 pages.

Manderson K., Pinart M., Tuohy K.M., Grace W.E., Hotchkiss A.T., Widmer W., Yadhav M.P., Gibson G.R., Rastall R.A. (2005). *In vitro* determination of the prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacture by-product stream. Appl. Environ. Microbiol., 71 (12), 8383-8389.

Nor-Feed Sud (2012). Effect on Nor Spice AB Liquid, its aromatic compounds such as limonene and lemon essential oil and its organic acid on *Lactobacillus acidophilus* growth, unpublished data.

Nor-Feed Sud (2013). Product Information 37 – Nor-Spice AB Powder improves zootechnical performances vs. fructo-oligosaccharides, unpublished data.

Effect on Nor Spice AB Liquid, its aromatic compounds such as limonene and lemon essential oil and its organic acid on *Lactobacillus acidophilus* growth, unpublished data.

Oetting LL, Utiyama CE, Giani PA, Ruiz UD, Miyada VS (2006). Effects of herbal extracts and antimicrobials on apparent digestibility, performance, organs morphometry and intestinal histology of weanling pigs. Brazilian Journal of Animal Science 35, 1389–1397.

Olano-Martin E., Gibson G.R. and Rastall R.A. (2002). Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pecticoligosaccharides, Journal of Applied Microbiology, 93 (3), 505-511.

Olano-Martin E., Williams M.R., Gibson G.R., Rastall R.A. (2003). Pectins and pectic-oligosaccharides inhibit *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin as directed towards the human colonic cell line HT29, FEMS Microbiology Letters 218 (2003) 101-105.

Pistelli L. and Giorgi I. (2012). Chapter 2 : Antimicrobial Properties of Flavonoids, A.K. Patra (ed.), Dietary Phytochemicals and Microbes, Springer-Verlag Gmbh Mrz 2012, 2012, 407 pages.

Pirot D. (2007). Focus Valorial « Ingrédients alternatifs aux antibiotiques facteurs de croissance en alimentation animale », Synthèse réalisée par CBB Développement dans le cadre de Valorial, 47 pages.

Pretorius JC (2003). Flavonoids: a review of its commercial application potential as anti-infective agents. Curr Med Chem – Anti-Infective Agents 2:335–353.

Rasmussen A. & Siemsen S. (1998). Nor-Spice AB – et alternativ til antibiotiske vækstfremmere? (Nor-Spice AB – an alternative to antibiotic growth promoters?). M.Sc. Thesis. The Royal Vet. Agric. University. Copenhagen.

Tours University (2000). Effects of three diets compared to a control diet on zootechnical performance and faecal flora of rats. Study realized by students from DESS Animal Production, Environment, Hygiene and Quality at Tours University, France.

Vondruskova H., Slamova R. Trckova M., Zraly Z., Pavlik I. (2010). Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review, Veterinarni Medicina, 55, 2010 (5): 199–224.

Wenk, C. (2002). Growth promoter alternatives after the ban of antibiotics, CW 29.7.2002 - EAAP – 3.9.2002.

Corresponding author

Olivier Clech
Nor-Feed Sud
3 rue Amedeo Avogadro
49070 Beaucouzé, France
E-mail: olivier.clech@nor-feedsud.fr

NOR-FEED SUD

Natural Origin Response For Feed

Nor-Grape
the natural antioxidant

Norponin
making the most of saponins

Citrozest
citrus extract for a healthier gut flora

Specialties
natural origin responses

For over 20 years, Nor-Feed explores the vegetal kingdom and develops innovative, efficient and competitive solutions to meet the feed industry needs in the field of health and animal nutrition. Its capacity of innovation fuels Nor-Feed growth, especially on the international markets. Nor-Feed products are organized in 3 well documented concise portfolios:

Citrozest (prebiotic activity from citrus), Nor-Grape (antioxidant properties from grape extracts) and Norponin (saponins from a large range of plants, with benefits for both nutrition and health).

www.nor-feedsud.fr

Synergistic effects of *Melissa officinalis* and magnesium to reduce stress for animal welfare and good performance

A. Lepont[1], A. Lamballais[1], C. Pommelet[2] and M. Tocha[3]

[1] Nor-Feed Sud, Beaucouzé, FR
[2] Pont-Aven, Brittany, FR
[3] Pulte GmbH & Co. KG, Grünwald, DE

Introduction

Stress in livestock appears during sensitive periods like weaning, re-grouping, transport or manipulations, leading to changes in behaviour, such as an increase of aggressiveness and movements. These behaviour changes have a negative impact on the animal welfare as well as on zootechnical performances (Wellock et al., 2003; Leek et al., 2004; Mounier et al., 2009; Cafe et al., 2011).

To address this issue of stress, one particular nutritional objective, appointed « reduction of stress reactions » has been established through EU regulation No. 5/2014. This nutritional objective specifies that dietetic complementary feed must be formulated with a high content of magnesium. In line with this recommendation, Durelax has been formulated with soluble magnesium and *Melissa officinalis* extract, a plant known for its sedatives properties (British herbal pharmacopoeia, 1996). A feed additive registration dossier for *Melissa officinalis* extract has been received by EFSA (17/11/2010). *Melissa officinalis* extract is registered as a natural product- botanically defined additive (European Union Register of Feed Additives, 2014).

Considering its natural composition, Durelax may be used in organic farming according to the regulations (CE) No. 834/2007 and (CE) No. 889/2008. Durelax exists in two forms, as a premixture of additive to be used in complete feed, and as a dietetic feed (liquid form) to be used in drinking water.

Durelax has been designed to calm sows during parturition and to prevent new born piglets crushing. Indeed, breeders and veterinarians have observed a decrease of aggressiveness and calmer sows and a decrease of piglet mortality by crushing.

New scientific trials have been set up to further document the efficacy of Durelax on pigs and broilers.

Materials and methods

Animal trials were conducted in accordance with the European guidelines and regulations for experimentation with animals. Animals had free access to drinking water at every time during the trials.

Pig trial: Two similar experimentations were designed on 2 farms in Brittany, France, in order to verify the calming effect of adding 1,000 ppm of Durelax Liquid to the drinking water of post weaning piglets. On-farm observations were conducted on 96 pigs (Trial 1) and 125 pigs (Trial 2). For each trial, pigs were divided into a control group and a treated group. Pigs were moved to new pens, and mixed with pigs from other groups. Aggressive events, like aggression, ear biting, tail biting and running were counted during 90 minutes. This observation was repeated four times for each group. Furthermore, during Trial 2, the number of laying and standing pigs was recorded every fifteen minutes, during eight hours.

Broiler trial: To observe the efficacy of Durelax on zootechnical performances, two trials were performed on Spanish (Trial 3) and French (Trial 4) farms, respectively on 120,000 broilers (during 10 to 15 days) and 13,200 broilers (during 10 days). For that purpose, broilers were homogenously divided into a control and a treated group having access to drinking water supplemented with 1,000 ppm of Durelax Liquid. Mortality rate was calculated at the end of the test. To complete the study, number of Grade 2 carcass rate was counted at the end of Trial 3.

Results

Pig trial: As shown in figure 1, the number of aggressive events decreased significantly ($p<0.05$) when Durelax Liquid is included in drinking water for the two experimentations. Average number of aggressive events for one observation of 90 minutes, were reduced in Durelax group by 35 % in Trial 1 and by 50 % in Trial 2, compared to the control group. Trial 2 results also showed an increase of 15% of laying pigs number (Figure 2) after re-grouping, when supplemented with Durelax Liquid. The difference between standing and laying pigs was higher during the afternoon, which is the most active period of pigs.

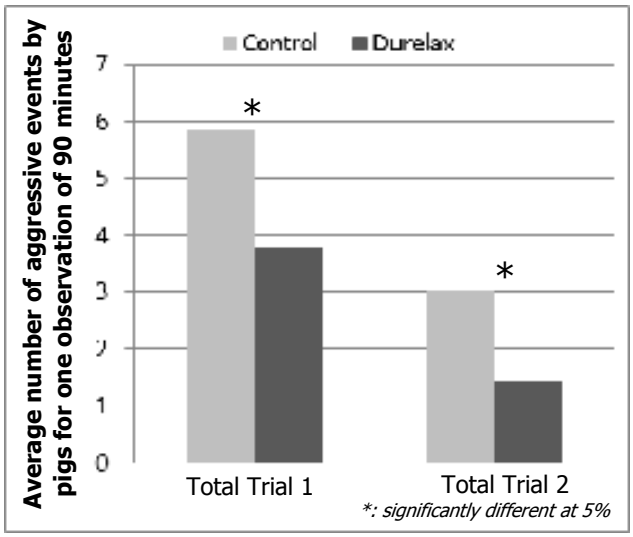


Figure 1: Effect of Durelax on aggressive events in trial group compared to negative control group

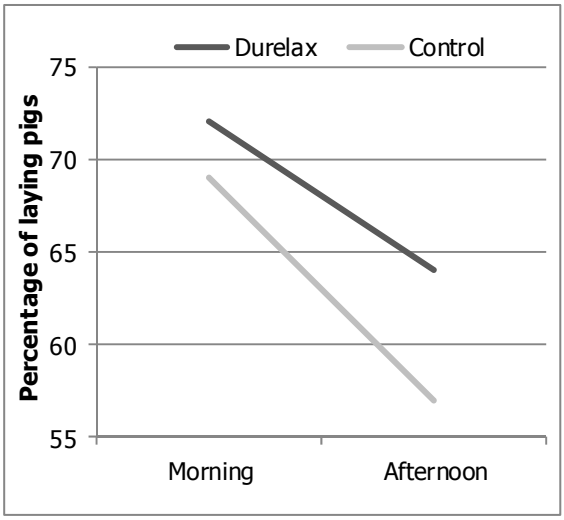


Figure 2: Percentage of laying pigs with or without Durelax supplementation

Broiler trial: The trial highlighted that Durelax Liquid has decreased the mortality from 2.9% to 1.4% in Trial 3 and from 4% to 2% in Trial 4, which represents an overall reduction of 50% (Figure 3). Moreover, breeders in Trial 4 noticed an increase of pecking (injury due to aggressiveness) after stopping Durelax supplementation. Grade 2 carcass rate in Trial 3 decreased from 15% to less than 8%, which represents a reduction of 46% (Figure 4). Furthermore, breeders have observed that animals had a calmer behaviour during loading in the truck and slaughtering compared to the control group.

Discussion

Durelax has therefore an effect on the reduction of behavioural stress reactions. These results confirm conclusions from previous studies conducted on pigs and broilers (Nor-Feed Sud, 2005-2012), where

Durelax supplementation permitted to reduce aggressive events on these animals. According to broilers performances, results have shown a high decrease of mortality and a significant improvement of carcass quality. Pigs and broilers were calmer, improving their welfare during and after stress periods and their manipulation by breeders was made easier.

This stress reduction effect may be explained by the combined action of *Melissa officinalis* extract and soluble magnesium. Both components, taken individually, have demonstrated properties on stress reaction.

The sedative properties of *Melissa officinalis* have been reported since ancient times (British herbal phamacopoeia, 1996; Blumenthal *et al*., 1998; Bruneton, 1999)**.** These characteristics have been studied by Soulemani *et al*, 1991 and Fleurentin, 1993, using the stairs test model and demonstrating the efficacy of *Melissa officinalis* extract. Moreover, it has been shown that *Melissa officinalis* extract plays an important role on fear, anxiety and hypnotic in mice (Vafaei, 2005).

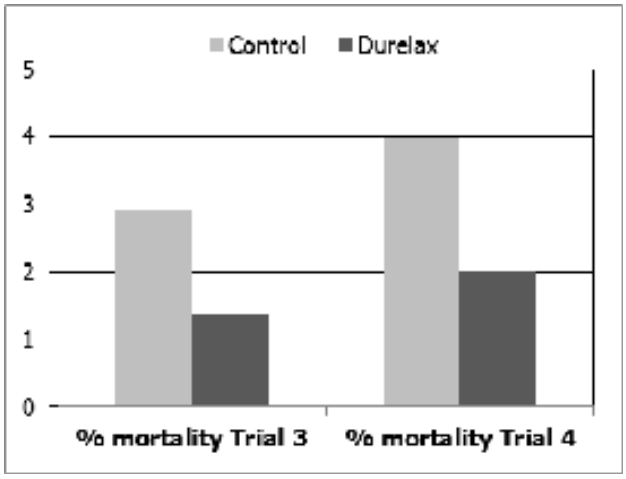


Figure 3: Effect of Durelax use on mortality rate in trial group compared to negative control group

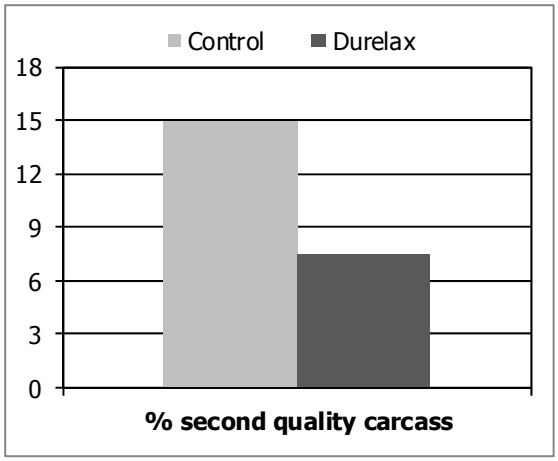


Figure 4: Effect of Durelax use on Grade 2 carcass rate in trial group compared to negative control group

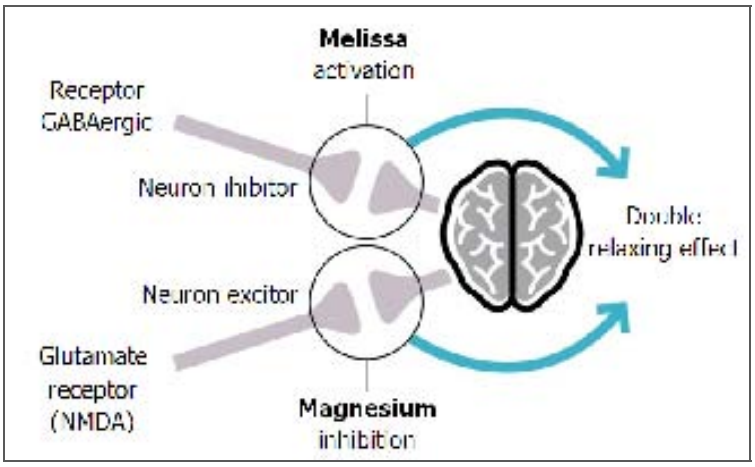


Figure 5: Durelax double effect

Magnesium also has various effects on stress reduction. Magnesium deficit has been described to increase stress reactions (Seelig, 1994); and cortisol concentration, a stress hormone, is reduced significantly after magnesium supplementation (Golf *et al*, 1984). Magnesium has been shown to act on the reduction of post-traumatic stress and anxiety in rats (Vink, 2002) and reduction of sympathetic nervous system reaction during stress (Peeters et al, 2005).

The hypothesis proposed for Durelax mode of action is a double relaxing effect (see Figure 5). On the one hand, *Melissa officinalis* activates the inhibitor neuron. The central nervous system, controlled by GABAergic receptors, would seem to be a target for the sedative properties of *M. officinalis* which have an inhibitory action on GABA (Kennedy, 2004). On the other hand, magnesium inhibits the excitor neuron activity. Magnesium blocks the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor on external and internal exciter neuron binding sites (Kupper, 1996).

Hence, Melissa has antispasmodic and sedative properties while magnesium reduces the cortisol concentration in the blood and serves to muscle relaxation, this leads to less post-traumatic stress with their combination in Durelax.

Conclusion

Durelax has shown a positive effect on the reduction of stress reactions for pigs and broilers in varied conditions, which can be explained by the combined actions of *Melissa officinalis* extract and magnesium. Durelax is an effective solution to decrease the aggressiveness of animals. As a complementary feed, it is particularly efficient during sensitive periods, thanks to its flexibility and focused usage. At a time when pig castration is under pressure in the EU, with direct consequences on animal aggressiveness and meat quality (EFSA, 2004), Durelax could also be a natural solution to handle the aggressiveness for entire male pigs, however additional investigation is necessary to prove this.

References

Blumenthal M., Busse WR, Goldberg A, eds. (1998). The complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines. Austin, TX: American Botanical Council.

British herbal phacopoeia. London, British herbal medicine association.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, 3e édition. Paris (FR): Technique & Documentation.

Cafe L.M., Robinson, D.L., Ferguson, D.M., McIntyre, B.L., Geesink, G.H. and Greenwood, P.L. (2011). Cattle temperament: Persistence of assessments and associations with productivity, efficiency, carcass and meat quality traits, J ANIM SCI 2011, 89:1452-1465.

European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003, Appendixes 3e & 4 (I), Annex I: List of additives, edition 182, released 12.02.2014.

European Food Safety Authority (EFSA) 2004 Welfare aspects of the castration of piglets. The EFSA Journal 91,1-18.

Fleurentin J. (1993). Ethnopharmacologie et aliments: Introduction au sujet et réflexions sur l'efficacité biologique.

Golf S.W., Happel O., Graef V., Seim K.E. (1984). Plasma aldosterone, cortisol and electrolyte concentrations in physical exercise after magnesium supplementation, J Clin Chem Clin Biochem. Nov 22(11):717-21.

Kennedy D.O., Little W., Scholey A.B. (2004). Attenuation of Laboratory-Induced Stress in Humans After Acute Administration of Melissa officinalis (Lemon Balm); Psychosomatic Med. 66:607–613.

Kupper J., Ascher P., Neyton J. (1996). Probing the pore region of recombinant N-methyl-D-aspartate channels using external and internal magnesium block, Proc Natl Acad Sci USA.

Leek, A.B.G., Sweeney B.T., Duffy P., Beattie V.E., O'Doherty J.V. (2004). The effect of stocking density and social regrouping stressors on growth performance, carcass characteristics, nutrient digestibility and physiological stress responses in pigs. Anim. Sci. 79:109–119.

Mounier, L., Veissier, I., Dubroeucq, H., Ingrand, S., Boissy, A., Colson, S., Grosjean, B., Roux, M. (2005). Conditions d'engraissement des jeunes bovins issus des troupeaux allaitants : Rôle de l'environnement social et humain sur le bien-être des

animaux et leurs performances. Communication présentée à Symposium INRA - PSDR (Pour et Sur le Dévelopement Régional) "Territoires et enjeux du développement régional", Lyon, FRA (2005-03-09 - 2005-03-11).

Nor-Feed Sud (2005-2012), Observation of Durelax efficiency on diverse trials on livestock animals. Unpublished data.

Nor-Feed Sud (2008), Interest and effect of Durelax in gilts and sows around farrowing, synthesis of seven field trials, unpublished data.

Peeters E., Neyt A, Beckers F., De Smet S, Aubert A.E., Geers R. (2005). Influence of supplemental magnesium, tryptophan, vitamin C, and vitamin E on stress responses of pigs to vibration. J. Anim. Sci. 2005. 83:1568-1580.

Seelig M.S. (1994). Consequences of magnesium deficiency on the enhancement of stress reactions; preventive and therapeutic implications. Journal of the American College of Nutrition, Vol 13, Issue 5 429-446.

Soulemani R., Fleurentin J., Mortier F., Misslin R. (1991). Neurotropic action of hydroalcoholic extract of Melissa officinalis L. in mice. Planta Medica 5, 7,2,105-110.

Vafaei (2005). Anxiolytic effects of the aqueous extracts of Melissa officinalis and the role of opioid receptors in mice, Journal of the neurological sciences, 238; S342.

Vink R., O'Connor C.A., Nimmo A.J., Health D.L. (2002). Magnesium attenuates persistent functional deficits following diffuse traumatic brain injury in rats. Neuroscience letters, volume 336, Issue 1.

Wellock I.J., Emmans G.C., Kyriazakis I. (2003) Predicting the consequences of social stressors on pig feed intake and performance. Jour. Anim. Sci., 81:2995-3007.

Corresponding author

Alexia Lepont
Nor-Feed Sud
3 rue Amedeo Avogadro
49070 Beaucouzé, France
E-mail: alexia.lepont@nor-feedsud.fr

Wirkung von *Papaveraceae*-Präparaten bei wachsenden monogastrischen Nutztieren

Krzysztof Kozłowski und Heinz Jeroch

Warmia und Mazury Universität in Olsztyn, PL

Einleitung

Phytogene Futterzusatzstoffe (Phytobiotika) werden verschiedentlich als alternative Substanzen für die seit 01.01.2006 generell in der EG verbotenen Fütterungsantibiotika angesehen, obgleich diese nach der EG Verordnung (Nr. 1831/2003) in die Gruppe der „Sensorischen Zusatzstoffe" eingeordnet sind. Die Ausgangsmaterialien für phytogene Futterzusatzstoffe sind vielseitig: verarbeitete ganze Pflanzen von Kräutern oder Gewürzpflanzen oder nur verarbeitete Pflanzenteile von diesen (wie Samen, Früchte, Wurzeln, Rhizome), des Weiteren Extrakte (z. B. ätherische Öle und Alkaloide) aus Ganzpflanzen oder Pflanzenteilen. In mehreren Literaturübersichten der letzten zehn Jahre, insbesondere in der von Ehrlinger (2007), wird über diese Gruppe von Zusatzstoffen umfassend berichtet. Zu der inzwischen sehr umfangreichen Palette von phytogenen Präparaten zählt eines, das aus Pflanzen der Familie *Papaveraceae* hergestellt wird und unter dem Handelsnamen Sangrovit® registriert ist. In diesem Beitrag werden die Ergebnisse von Untersuchungen mit verschiedenen wachsenden monogastrischen Nutztieren (Schweine, Kaninchen, Hühnergeflügel, Puten) vorgestellt, die als Zielstellung hatten, den Einfluß von Sangrovit® auf zootechnische und ernährungsphysiologische Parameter zu ermitteln. Damit soll ein Beitrag zur wissenschaftlichen Bewertung von phytogenen Futterzusatzstoffen in der Nutztierfütterung geleistet werden.

Material und Methoden

Dieser Artikel berücksichtigt alle von den Autoren durchgeführten Versuche mit dem Präparat Sangrovit® im Zeitraum 2002 bis 2008 (Tabelle 1). Es handelt sich hierbei um Leistungsversuche und Stoffwechselversuche. Die geprüften Dosierungen vom Präparat Sangrovit® erfolgten in Abstimmung mit der Herstellerfirma „Phytobiotics", D-Eltville. Nach Abschluss einiger Leistungsversuche wurden versuchsmäßige Ausschlachtungen nach verbindlichen Richtlinien vorgenommen.

Tabelle 1: Übersicht über die Experimente mit Sangrovit®

Tierart/ Nutzungsrichtung	Versuchstyp	Anzahl der Versuche	Versuchseinrichtungen
Ferkel	Leistungsversuch	1	UWM[1] Olsztyn/Polen
Mastschweine	Leistungsversuch	3	LVA[2] Kaunas/Litauen, UWM Olsztyn/Polen
Mastkaninchen	Leistungsversuch	3	KMU[3] Kaunas/Litauen, LVA Kaunas/Litauen
Broiler	Leistungsversuch	2	UWM Olsztyn/Polen
	Stoffwechselversuch	1	
Mastputen	Leistungsversuch	2	UWM Olsztyn/Polen,
	Stoffwechselversuch	1	LVA Kaunas/Litauen

[1] Warmia und Mazury Universität in Olsztyn/Polen
[2] Litauische Veterinärmedizinische Akademie in Kaunas/Litauen
[3] Medizinische Universität Kaunas/Litauen

Ergebnisse

Die ermittelten Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 2 bis 7 zusammengestellt. Nachfolgend eine kurze Wertung:

- In allen Leistungsversuchen bestand kein signifikanter Einfluss des geprüften Präparates auf den Futterverzehr der Tiere.

- Signifikante leistungsverbessernde Effekte (Zunahme, Futteraufwand) wurden in 2 von 4 durchgeführten Experimenten mit Schweinen ermittelt. Des Weiteren konnte ein signifikanter Effekt des Prüfpräparates im Putenmastversuch mit den weizenreichen Futtermischungen ermittelt werden. In allen weiteren Versuchen wurden keine oder numerische Effekte (Kaninchenversuche) ermittelt.

- Zum Teil zeigten sich positive Auswirkungen auf die Schlachtkörperqualität, die partiell signifikant sind (Mastschweine).

- In den Stoffwechselversuchen wurden keine Einflüsse des Prüfpräparates gemessen.

Tabelle 2: Leistungsdaten vom Ferkelversuch (Lipinski und Tywonczuk 2008)

Sangrovit® mg/kg Futter	Futterverzehr g/Tier/Tag	Anfangsmasse kg/Tier	Endmasse kg/Tier	Tägliche Zunahme g/Tier	Futteraufwand kg Futter/kg LMZ	Verluste %
0	569±79	6,25±0,50	21,11±1,49[a]	354±33[a] (100)	1,65±0,20	4,1
15	590±58	6,23±0,61	22,50±1,33[b]	387±22[b] (109)	1,54±0,10	3,3

[a,b] signifikant (P<0,05)

Tabelle 3: Leistungsdaten der Mastschweineversuche (Lipinski und Tywonczuk 2008, Seskeviciene et al. 2003, 2005a)

Versuch	Sangrovitzusatz mg/kg Futter	Futterverzehr kg/Tier/Tag	Endgewicht kg/Tier	Tägliche Zunahme g/Tier	Futteraufwand, kg Futter/kg LMZ
1/LVA	0	2,46±0,26	100,90±7,4	828±148 (100)	3,05±0,35
Kaunas	30	2,51±0,29	100,40±5,4	826±142 (100)	3,12±0,40
2/LVA	0	2,61±0,33	101,00±6,9	753±60 (100)	3,48±0,28
Kaunas	30	2,60±0,31	100,30±5,8	744 ±66 (99)	3,52±0,34
3/UWM	0	2,41±0,08	98,27±1,85	864±24[a] (100)	2,80±0,05
Olsztyn	15	2,44±0,09	99,90±2,78	889±29[b] (103)	2,74±0,12

Tabelle 4: Mastleistungsdaten der Broiler (Kozłowski et al. 2008a, Kozłowski et al. 2014)

Versuch	Sangrovitzusatz mg/kg	Futter-mischungen	Futterverzehr g/Tier	Mastendmasse g/Tier	Futteraufwand kg Futter/kg LMZ	Verluste %
1	0	AS-Gehalte	3900±45	1724±56	2,313±0,070	1,0
	20	reduziert	3913±116	1724±37	2,316±0,047	1,4
2	0	konven-	3246±63	2043±51	1,641±0,048	1,9
	15	tionell	3243±61	2036±64	1,644±0,062	2,3

Tabelle 5: Nährstoffverdaulichkeit, Umsetzbarkeit der Bruttoenergie (BE)[1] und N-Retention bei Broilern (Kozlowski et al. 2008b)

Sangrovitzusatz mg/kg	OS-Verdaulichkeit %	Umsetzbarkeit BE %	AME_N MJ/kg	N-Retention %
0	69,8±1,0	70,4±1,2	12,33±0,23	55,1±1,0
20	69,7±0,6	69,9±1,9	12,15±0,16	56,8±1,1

[1] 17,40 MJ/kg Futter

Tabelle 6: Einfluß von Sangrovit® auf Leistungsparameter von männlichen Mastputen (Seskeviciene et al. 2005b, 2005c)

Versuch	Sangrovit® mg/kg	Getreideart im Futter	Futterverzehr kg/Tier	Endmasse g/Tier	Futteraufwand kg Futter/kg LMZ	Verluste %
1	0	Mais,	57,48±1,89[a]	19680±1539[a]	2,93±0,10[a]	11
140 Tage	25	Weizen[1]	57,28±2,29[a]	19212±1527[a]	2,98±0,09[a]	11
	50		57,69±2,60[a]	19404±1658[a]	2,97±0,11[a]	16
2	0	Weizen	6,83±0,19[a]	3359±485[a]	2,08±0,14[a]	2,5
56 Tage	25		6,99±0,24[a]	3528±521[b]	2,02±0,13[a]	0
	50		7,05±0,17[a]	3535±423[b]	2,03±0,16[a]	0
	0	Mais	6,99±0,20[a]	3580±368[bc]	1,99±0,13[b]	2,5
	25		7,13±0,15[a]	3640±412[bc]	2,00±0,18[ab]	0
	50		7,05±0,19[a]	3460±358[abc]	2,08±0,21[ab]	0

a, b, c – Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (P<0,05)
[1] Ab 5. Mastwoche enthielten die Futtermischungen ansteigende Anteile an Weizen (z. B. 5.-8. Woche - 15 %)

Tabelle 7: Leistungsdaten von den Mastkaninchenversuchen (Jeroch et al. 2014)

Versuch	Sangrovitzusatz mg/kg Futter	Futterverzehr g/Tier/Tag	Mastendmasse g/Tier	Futteraufwand kg Futter/kg LMZ	Verluste Stück (%)
1	0	99±14	2607±254 (100)	3,06±0,32	17 (3)
(7.-14. LW)	30	100±6	2645±189 (101)	3,05±0,30	11 (2)
	60	102±13	2692±265 (103)	3,00±0,23	6 (1)
2	0	124±15	3317±335 (100)	3,08±0,18	17 (2)
(7.-16. LW)	30	127±9	3386±372 (102)	3,08±0,16	8 (1)
	60	125±11	3355±251 (101)	3,09±0,13	8 (1)
3	0	119±5	2952±338 (100)	3,11±0,11	0
(7.-14. LW)	60	123±11	3011±297 (102)	3,11±0,07	0

Schlussfolgerungen

Die ermittelten Ergebnisse mit dem Präparat Sangrovit® ordnen sich in das Gesamtbild bisheriger Befunde mit phytogenen Futterzusatzstoffen ein. Auch bei den früheren Fütterungsantibiotika fielen die Ergebnisse sehr unterschiedlich aus, d.h. von ausgebliebenen Effekten über numerische Verbesserungen bis zu signifikanten Leistungssteigerungen.

Danksagung

Der Firma PHYTOBIOTICS Futterzusatzstoffe GmbH (Eltville/Deutschland) wird für die Bereitstellung des Prüfpräparates und Unterstützung der Untersuchungen gedankt.

Literatur

Ehrlinger M. (2007): Phytogene Zusatzstoffe in der Tierernährung. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Jeroch H., Matusevicius, P., Jeroch, J. (2014): Investigations with a phytogenic feed additive from *Macleaya cordata* by growing rabbits (in Vorbereitung).

Kozlowski K., Lecewicz A., Jeroch, H., Zdunczyk, Z., Jankowski, J. (2008a): Effect of a phytogenic feed additive from *Macleaya cordata* on performance and carcass parameters of broilers. Arch. Geflügelk. 72, 140-142.

Kozlowsk,i K., Lecewicz, A., Jeroch, H., Zdunczyk, Z., Jankowski, J. (2008b): Einfluß eines *Macleaya cordata*-Präparates auf die Nährstoffverdaulichkeit, die N-Retention, die Umsetzbarkeit der Bruttoenergie und den Gehalt an Umsetzbarer Energie eines Broilermastfutters. Arch. Geflügelk. 72, 238-240.

Kozlowski K., Sobczak A., Jankowski J., Jeroch H. (2014): Efficacy of *Macleaya cordata* preparation in growing broiler chickens. Vet. Med. Zoot. (zur Veröffentlichung eingereicht).

Lipinski, K., Tywonczuk, J. (2008): Testing the efficiency of *Macleaya cordata* as feed additive in pigs. Proc. Intern. Scient. Conf. "The topical problems of pigs and poultry nutrition and quality of production", 6th June 2008 Kaunas, Lithuania, 81-84.

Seskeviciene J., Martinavicius V., Rimkevicius S., Jeroch H. (2003): Einfluß von phytogenen Futterzusatzstoffen auf die Mast- und Schlachtleistung von Schweinen. Veterinarija ir zootechnika. 23, 96-98.

Seskeviciene J., Martinavicius V., Jeroch H. (2005a): Investigations with phytobiotics by growing pigs. Proc. 14th Intern. Conf. „Current problems of breeding, health, growth and production of pigs", Ceske Budejovice, 9.-10.2.2005, 203-207.

Seskeviciene J., Kozlowski K., Jankowski J., Faruga A. Jeroch H. (2005b): Erste Untersuchungen mit einem Präparat aus der Pflanze *Sanguinaria canadensis L.* bei Putenküken. Veterinarija ir zootechnika 30 (52), 88-91.

Seskeviciene J., Kozlowski K., Jankowski J., Faruga A. (2005c): Use of *Sanguinaria canadensis L.* preparation in turkey feeding. Pol. J. Natur. Sc. 18, 88-91.

Autorenanschrift

Dr. habil. Krzysztof Kozłowski
Lehrstuhl für Geflügelkunde
Warmia und Mazury Universität in Olsztyn
Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn, Polen
E-Mail: kristof@uwm.edu.pl

Genetically modified feeds (maize MON 89034 x NK 603) in rabbit nutrition

Ľubica Chrastinová[1], Mária Chrenková[1], Andrea Lauková[2], Mária Polačiková[1], Zuzana Formelová[1], Ľubomír Ondruška[1], Ján Rafay[1], Iveta Plachá[2], Viola Strompfová[2], Jana Imrichová[2], Anna Kandričáková[2], Klaudia Čobanová[2] and Silvia Pomikalová[1]

[1] National Agricultural and Food Centre, Research Institute for Animal Production Nitra, Lužianky, SK
[2] Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, SK

Introduction

GM maize MON 89034 x NK603 was produced by crossing of two genetically modified parental lines MON 89034 and NK603. Like MON 89034 parental line, hybrid MON 89034 x NK603 produces the Cry1A.105 and Cry2Ab2 insecticidal proteins, which impart protection against damage caused by the European corn borer (ECB, *Ostrinia nubilalis*) and other lepidopteran insect pests. Like NK603 parental line, hybrid MON 89034 x NK603 expresses the CP4 EPSPS proteins, derived from *Agrobacterium sp.* strain CP4, which provides tolerance to glyphosate (the active ingredient of a broad spectrum Roundup® herbicide). There were only very slight differences between the basic components of GM maize and nontransgenic maize. However, the increasing use of genetically modified plants in the production of animal feed has raised concerns about their safety. In the European context, Slovakia ranks among other 7 EU countries which have practical experience in Bt maize cultivation; these are: Spain, France, Romania, Portugal, Germany, the Czech Republic and Poland (Křistková, 2009; James, 2011). In review article Animal Nutrition with Feeds from Genetically Modified Plants Flachowsky et al. (2007; 2010), Poláčiková et al., 2013 and Chrenková et al. (2007, 2013 a,b) summarized the beneficial effects on the nutrients digestibility and selected fattening data and performance of animals.

The aim of this work was to determine the effect of GM maize MON 89034 x NK 603 in complete mixture for rabbits on nutrient digestibility and rabbit broilers growth performance.

Materials and methods

Seventy two rabbits (meat line M91 and P91, (♂+♀) 5 weeks old) were divided into 2 experimental (EG) and one control (CG) groups. Complete granulated mixture 1 enriched with 12% isogenic maize (DKC 5143) per 100 kg mixture was tested in the first experimental group (EG1). In the second group (EG2) was tested complete granulated mixture 2 enriched with 12% GM maize MON 89034 x NK603. The rabbits in the 3rd control group were fed granulated mixture including 12% reference maize (PR 36V52). In fattening experiment were studied the growth of live weight and consumption of feed mixtures per unit of live weight growth. Between 65 and 70 days of age, 5 rabbits from each group were selected for digestibility tests using the balance method. The digestibility test was performed in accordance with the recommended methodology (Meartens and Lebas, 1989). The samples of individual feeds were analyzed for content of nutrients (Table 1) according to procedures of the AOAC (1995), and starch according to the alpha-amyloglucosidase method.

Table 1: Ingredients and chemical analysis of the experimental diets for rabbits

Ingredients	in %	Parameter (g. kg^{-1})	1- EG	2- EG	3- CG
Lucerne meal	32.0	Dry matter	894.1	901.9	893.0
Oats	11.0	Crude protein	137.2	137.0	137.3
Barley	7.0	Crude fibre	169.0	165.6	163.2
Rape extr. meal	9.0	Fat	36.6	37.8	35.9
Wheat bran	8.0	N free extract	484.3	492.2	489.8
DDGS	5.0	Organic matter	827.2	832.6	826.2
Maize	12.0	Ash	66.9	69.3	66.8
Dry malting gems	13.0	Starch	179.9	183.5	178.2
Mineral &Vitamins*	1.7	Calcium	7.0	6.99	6.63
NaCl	0.3	Phosphorus	4.42	4.63	4.91
Limestone, pulverized	1.0	ME (MJ. kg^{-1})	9.42	9.16	8.99

*Provided per kg diet: vit. A 12000 IU; vit.D_2 2500 IU; vit. E 20 mg; vit.B_1 1.5 mg; vit. B_2 7.5 mg; vit. B_6 4.5 mg; vit.B_{12} 30 µg; vit.K 3 mg; nicotic acid 45 mg; folic acid 0.8 mg; biotin 0.08 mg; choline chloride 450 mg; premix minerals: Ca 9.25 g; P 6.2 g; Na 1.6 g; Mg 1.0 g; K 10.8 g; Fe 327.5 mg; Mn 80 mg; Zn 0.7 mg

Body weight and feed consumption were registered weekly. In experiment were studied the growth of live weight and consumption of feed mixtures per unit of live weight growth. Faeces were sampled at the start of the experiment and at day 42 to measure the counts of rabbit intestinal microflora as well as the occurrence of *Eimeria sp*. oocysts. To test microbiota, sampling of faeces was provided on the start of the experiment, faecal mixture of 72 animals in 8 samples, and then after 6 weeks, 5 faecal mixtures per each group. The samples (1g) were treated by the standard microbiological dilution method (in Ringer solution, pH 7.0; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) by plating appropriate dilutions on the selective media according to ISO (International Organization for Standardization). To enumerate lactic acid bacteria (LAB) MRS agar (Merck, Germany) was used. Amylolytic streptococci were detected by the use of M17 medium enriched with starch (Oxoid, England). Enterococci were enumerated on Slanetz-Bartley agar (Merck, Germany). Baird-Parker agar supplemented with egg yolk tellurite solution (ISO 21527-1, Difco, Detroit, USA) was used to enumerate coagulase-positive staphylococci (CoPS). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) were enumerated by the use of Mannitol Salt agar (Merck), *Clostridium difficile* agar with the supplement SR0096E and 7% (v/v) defibrinated horse blood (SR0050- ISO 15883, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) was used to enumerate *Clostridium*-like bacteria. Mac Conkey agar (ISO 7402, Becton and Dickinson, Cockeysville, USA) was used to detect coliform bacteria. To counts *Pseudomonas-like* bacteria, Pseudomonas agar (Biomark, India) was used. The plates were incubated at 30 ºC and/or 37 ºC for 24-48 h depending on the bacterial genera. Bacterial counts were expressed in colony forming units (log10) cfu per gram ± SD.

At the end of the experiment three animals per each group (n=3) were slaughtered in the morning. Caecums were separated and the contents (1g) were sampled to check former mentioned genera. Samples from appendix were plated on Plate count agar (Biomark, India) to detect the total microbial count in appendix as well as on *Clostridium difficile* agar. *Eimeria sp.* oocysts were observed in faeces samples microscopically at the start of the experiment (age of rabbits 35 days) and after 42 days cessation of experimental diets. The samples were then evaluated by the quantitative flotation technique – Mc Master Method. The intensity of the infection was determined in counts of oocysts per 1 g of faeces - OPG. Blood was sampled for biochemical and haematological analyses from the marginal ear vein (*Vena auricularis*) into dry non-heparinized glass tubes and blood serum was separated by centrifugation at 3000 x G for 10 min; for phagocytic activity it was sampled into Eppendorfs tubes containing microspheric hydrophilic particles (MSHP) and heparin. Moreover, the phagocytic activity (PA) was monitored and expressed as percentage of bacteria ingested per phagocyte (100 neutrophils and monocytes) during a limited period of incubation at 37°C for 1 h. Blood smears were then prepared and stained in accordance with May-Grünwald and Giemsa-Romanowski. The percentage of phagocyte

particles was evaluated using an optical microscope, by counting PMN up to 100. (Vetvicka et al., 1982).

Results and discussion

The study was carried in the National Agricultural and Food Centre, Research Institute for Animal Production Nitra. A total number of 72 weaned rabbits at 35 days of age were divided into 3 groups (rabbits 2 per cage). Among the experimental groups were not found significant differences in feed intake, body weight and carcass value in the fattening experiment. Digestibility results are given in table 2.

Table 2: Results from experiments

Parameter	1- EG	2- EG	3- EG
Relation between feed consumption (n=24)			
Daily weight gain g/day	31.38	34.33	32.20
Feed conversion ratio in g /g	3.37	3.37	3.24
Carcass yield in %	57.27	57.78	57.55
Coefficient of nutrients digestibility in % (n=5)			
Crude protein	67.96± 2.71	71.07± 3.37	67.53± 2.26
Fat	85.60± 4.46	87.69± 5.08	85.76± 4.70
Crude fibre	20.53± 5.09	19.55± 3.03	19.83± 3.56
Nitrogen-Free Extract	74.62± 3.38	75.03± 0.97	74.70± 4.23
Organic matter	63.12± 3.54	64.27± 1.26	62.79± 3.56
Starch	94.92± 1.49	94.83± 0.71	94.09± 2.24
Phagocytic activity (%) and index of phagocytic activity ($\bar{x}$±SD)			
Phagocytic activity (PA)	44.83 ± 2.04	44.67 ± 2.34	43.33 ± 2.50
Index of phagocytic activity (IPA)	2.28 ± 0.15	2.32 ± 0.19	2.13 ± 0.24

Table 3: Total numbers of bacteria (log 10 CFU.g^{-1}±SD) in the caecum contents and in faeces of rabbits after the application of the experimental diets

Bacterial strains	in caecum			in faeces		
	1-EG	2-EG	3-CG	1-EG	2-EG	3-CG
Enterococcus sp.	<10^2	<10^2	<10^2	7.31 ±0.63	7.04 ±0.47	8.30 ±0.19
Lactic acid bacteria	2.40 ±0.47	2.65 ±0.62	1.44 ±0.48	7.31 ±0.63	6.06 ±0.82	8.10 ±0.9
(CoNS)	2.81 ±0.11	2.86 ±0.70	2.30 ±0.10	6.35 ± 0.51	7.54 ±0.74	6.20 ±0.49
(CoPS)	1.60 ±0.24	1.54 ±0.14	1.10 ±0.10	5.10 ± 0.25	6.68 ±0.58	5.92 ±0.43
Clostridium-like sp.	2.39 ±0.09	1.89 ±0.70	2.45 ±2.19	3.10 ± 0.70	4.41 ±0.21	4.80 ±0.81
Pseudomonas-like *sp.*	3.54 ±0.6[a]	2.88 ±0.16	2.23 ±0.09	6.17 ± 0.70	7.10 ±0.51	5.10 ±0.7
Coliform bacteria	2.02 ±0.10	<10^1	<10^2	5.67 ± 0.53	5.66 ±0.24	5.25 ±0.72

(P<0.01, [a]); Coagulase negative staphylococci (CoNS); Coagulase positive staphylococci (CoPS)

The microbiological conditions of farm environment are very important to obtain good performance (e.g. daily live weight gains, feed conversion rate, meat quality, etc.) even if this parameter is often disregarded. The data (Table 3) reported in this paper demonstrate that a good environmental con-

trol, particularly a microbiological control, can be very useful for maintaining good health status in animals. All the monitored groups were parasitized by coccidia with small counts of *Eimeria sp*. oocysts (60 in 1EG; 120 in 2EG; was lower P≥0.05 OPG as was determined in rabbit intestinal ecosystem in 3CG). Feeding of genetically modified maize to rabbits did not change the composition of microbial populations in the gastrointestinal tract.

Conclusion

To ensure the safety of GM plants in the food-chain it should be monitored continually. Obtained results demonstrate statistically no significant differences in nutrient digestibility and performance of rabbits after feeding the complete feed mixtures with 12% proportion of GM maize MON 89034 x NK603, isogenic maize (DKC 5143) and reference maize (PR 36V52). Neither of the maize had a negative influence on the health status.

Acknowledgments

This work was supported by the project "BELNUZ No. 26220120052" supported by the Operational Programme Research and Development funded from the European Regional Development Fund. The authors are grateful to Assoc. Prof. Mária Goldová from UVLF for the skilful technical assistance in detailed determination of *Eimeria sp*.

References

EFSA (2008): Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. Food Chem Toxicol 46: p. 2-70. (http://www.plosone.org/article/findcited/4677873)

FLACHOWSKY G., WENK C. (2010): The role of animal feeding trials for nutritional and safety assessment of feeds from genetically modified plants – Present stage and future challenges. J. Anim. Feed Sci., 19:p. 149-170

FLACHOWSKY G., AULRICH K., BÖHME H., HALLE I. (2007): Studies on feeds from genetically modified plants (GMP) – Contributions to nutritional and safety assessment. Anim. Feed Sci. Technol., vol. 133, No. 1, p. 2-30.

CHRENKOVÁ M., CHRASTINOVÁ Ľ., ČEREŠŇÁKOVÁ Z., RAFAY J., FLACHOWSKY G., MIHINA Š. (2007): Assessment of nutritive value of Bt-maize using rats and rabbits. In: EAAP 2007, Books of Abstracts of 58th Annual meeting of the European association for animal production, Dublin, Ireland, August 26th - 29th, 2007, Session 20, Poster 11, p. 178

CHRENKOVÁ M., CHRASTINOVÁ Ľ., LAUKOVÁ A., POLÁČIKOVÁ M., FORMELOVÁ Z., STROMPFOVÁ V., ONDRUŠKA Ľ., RAFAY J., PLACHÁ I., SZABÓOVÁ R., POGÁNY SIMONOVÁ M. (2013): Inclusion of GM Maize into diet of animals – Pros and Cons. In: Book of Abstracts + oral presentations - Final Feed for Health Conference „ Healthy Food from Healthy Animals" 19-20. 2. 2013, Milano, Italy, p. 34.

CHRENKOVÁ M., CHRASTINOVÁ Ľ., RAFAY J., FORMELOVÁ Z., POLÁČIKOVÁ M., LAUKOVÁ A., ONDRUŠKA Ľ., POGÁNY SIMONOVÁ M. (2013): Performance of rabbits fed diets containing genetically modified corn. In: Book of Abstracts from The 5th International meeting on rabbit biotechnology. 7th–8th June 2013 Shanghai, China, p. 35.

JAMES C. (2011): Global status of commercialized biotech/GM crops: 2011. ISAAA

KŘÍSTKOVÁ M. (2009): Dosavadní zkušenosti s pěstováním geneticky modifikované Bt kukuřice v ČR 2005–2009. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2009. 44 p. ISBN 978-80-7084-871-5 http://eagri.cz/public/eagri/file/42167/Dosavadni_zkusenosti_Bt_kukurice_v_CR_2005_2009.pdf

MEARTENS L., LEBAS F. (1989): Energy evaluation of rabbit feeds and feedstuffs. A critical approach. In: Cuni-Sciences, 5, 1989, p. 35-46

POLAČIKOVÁ M., CHRENKOVÁ M., FORMELOVÁ Z., CHRASTINOVÁ Ľ., POMIKALOVÁ S. (2012): Comparison of the nutritional profile of GM maize MON 89034 × NK603 and conventional maize. In: Book of Abstracts/Paper Review 15th International Feed Technology Symposium „FEED-TO-FOOD"/ COST „FEED FOR HEALTH" joint Workshop, 3-5 October, 2012. Novi Sad, Serbia, p. 278-283. ISBN 978-86-7994-032-2

AOAC (1995): Official Methods of Analysis. Washington, DC: *Association of Official Analytical Chemists,* 1018

SAMPIETRO D.A., DIAZ C.G., GONZALEZ V., VATTUONE M.A., PLOPER L.D., CATALAN C.A., WARD T.J. (2011): Species diversity and toxigenic potential of Fusarium graminearum complex isolates from maize fields in northwest Argentina, Int. J. Food Microbiol. 145, 2011, 359-264

VETVIČKA V., FORNOUSEK L., KOPEČEK J., KAŠPÁREK L., VRÁNOVÁ M.(1982): Phagocytosis of human blood leukocytes a simple micro-method. Immunol Lett 5, 97-100

Corresponding author

Dr. Mária Chrenková
National Agricultural and Food Centre,
Research Institute for Animal Production Nitra,
Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovak Republic
E-mail: chrenkova@cvzv.sk

Rohfaserkonzentrate (Lignocellulose) in der Karpfenfütterung

Astrid Bosse

J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. KG, Rosenberg, DE

Einleitung

Lignocellulosen werden im Futtermittelhandel unter dem Begriff "Rohfaserkonzentrate" (RFCs) angeboten. Es handelt sich hier um Faserquellen mit einem Rohfasergehalt von mindestens 60%. Bei der Herstellung dieser RFCs wird Holzmehl durch spezielle Mühlentechnologie feinst auffibrilliert (siehe Abbildung 2) und es entsteht ein sehr homogenes Endprodukt. Daher können RFCs im Vergleich zu handelsüblichen Rohfaserträgern, wie Weizenkleie (siehe Abbildung 1), auch als funktionale Fasern bezeichnet werden. Ein solches RFC kann die Mikrovilli im Darm stimulieren, es verfügt über ein sehr hohes Wasserbindungsvermögen und kann im Chymus ein Fasernetzwerk ausbilden. Standardmäßig werden RFCs bereits in den Rationen verschiedener Heim- und Nutztiere eingesetzt. In der Produktion von Speisefischen finden RFCs wegen ihrer technischen Eigenschaften (z.B. Abriebreduktion, Ölbindung) Anwendung – ernährungsphysiologisch wird ihnen jedoch weniger Bedeutung beigemessen.

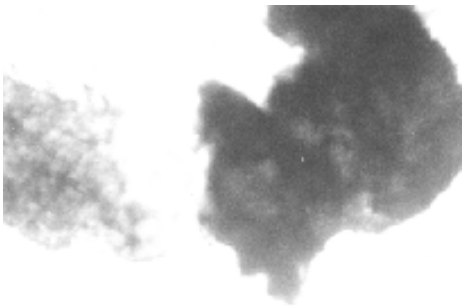


Abbildung 1: Weizenkleie (50x Vergrößerung)

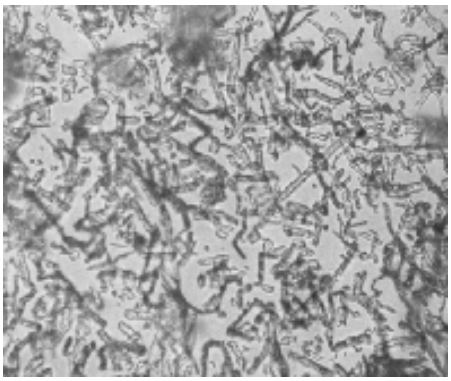


Abbildung 2: RFC ARBOCEL® (50x Vergrößerung)

In der Literatur finden sich zahlreiche Fütterungsversuche, die sich mit dem Einfluss verschiedener Kohlenhydrate und Faserquellen auf Wachstum, Futterverwertung (FVW), Verdaulichkeit und Kotkonsistenz beschäftigen. Dabei erweist sich unlösliche α-Cellulose als inerter Füllstoff ohne negativen Einfluss auf die scheinbare Verdaulichkeit von Stärke und Protein bis zu 8% Einsatzrate (Amirkolaie et al. 2005). Ab einer Einsatzrate von 25% konnten Anderson et al. (1984) eine Reduktion von Wachstum und FVW beobachten. Bei diesen Versuchen steht neben der Verdaulichkeit der Nährstoffe auch die Kotcharakteristika und das Abwassermanagement im Vordergrund. Denn das mit Kotpartikeln belastete Ablaufwasser in Fischzuchten kann umso leichter und effektiver durch mechanische Klärung gereinigt werden, um so größer die suspendierten Kotpartikel sind (Brinker, 2009). In Tilapia wurden Guar gum, Cellulose und Guar/Cellulose Diäten verglichen. Während Guar gum zu einer Reduktion der Wiederfindungsrate des Kotes führte konnte die Zulage von Cellulose die Wiederfindung tendenziell verbessern (Amirkolaie et al. 2005).

Die positive Wirkung von RFCs als unlösliche Faser konnte bereits bei verschiedenen Tierarten beobachtet werden. Die vorliegende Untersuchung sollte die Wirkung von Lignocellulose auf Leistungsparameter, Darmhistologie und Kotwiederfindung beim Karpfen untersuchen.

Material und Methoden

Im Herbst 2012 wurde hierzu ein Fütterungsversuch mit Karpfen (*Cyprinus carpio*) durchgeführt (Stejskal und Mráz; unveröffentlichte Daten). 720 fünf Monate alte Karpfen mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 33,3±4,8 g wurden nach einer Eingewöhnungsphase von zwei Wochen einer von vier extrudierten Diäten zugeordnet. Die Tiere erhielten neben einer Kontrolldiät Futter mit dem Zusatz (on top) von 1%, 2% bzw. 3% Lignocellulose (ARBOCEL®) zu einer Fischmehl, Soja, Weizen, basierten Diät. Das Futter wurde über einen Zeitraum von 70 Tagen verfüttert. Die Karpfen wurden hierzu in 12 Aquarien zu je 60 Tieren gehalten. In den ersten 14 Tagen erhielten die Tiere 2% ihrer Lebendmasse als Futter. Die verbleibenden 56 Tage wurden 3% der Lebendmasse verfüttert.

Tabelle 1: Zusammensetzung Karpfendiät

Komponenten	**%**		**%**
Fischmehl	25,0	Hefe	10,0
Weizenkeime (gepresst)	25,0	Fischöl	3,0
Weizen	14,0	Dicalciumphosphat DCP 18	0,5
Sojaextraktionsschrot	12,0	Vitamin/Mineral/AS Premix	0,5
Mais	10,0	Methionin	0,2

Während des Fütterungsversuches wurden die Karpfen unter optimalen Bedingungen (Ø Temp. 23°C, Sauerstoff 5 mg/L, pH Wert 7,0) gehalten. Wassertemperatur, Sauerstoffgehalt und pH Wert wurden zweimal täglich geprüft. Die Aquarien wurden 14 tägig gereinigt und die Sedimentationszonen wurden morgendlich vor der Fütterung über einen Abfluss gesäubert. Die Wasserqualität war während des Versuches im optimalen Bereich für Karpfen eingestellt.

Als zootechnische Parameter wurden Gewicht (14-tägig), Futterverbrauch, Futterverwertung und Überlebensrate bestimmt.

Die Sedimentationsrate des Kotes wurde in Imhoffkegeln bestimmt. Der Kot wurde hierzu am Ende des Versuches (70 Tage) von den jeweiligen Aquarien gesammelt. Die Sedimentation des Kotes nach 1, 2, 3, 4, 5 und 10 Minuten wurde bestimmt. Der Anteil nach 10 Minuten wurde als 100% angenommen, um so die Sedimentationsrate zu bestimmen (6 Messungen je Versuchsgruppe).

Fünfzehn Fische (5 Fische je Aquarium) von jeder Versuchsgruppe (0%, 1%, 2%, 3% Lignocellulose) wurden histologisch untersucht. Hierzu wurden 4-5 cm lange Proben vom mittleren Teil des Verdauungstraktes entnommen und in 4% Formalin fixiert. Die Proben wurden in Parafin eingebettet und ein 5 µm dicker Schnitt angefertigt. Die Schnitte wurden mit Haematoxylin und Eosin eingefärbt. Daraufhin mit einem Lichtmikroskop bei 40-facher bzw. 100-facher Vergrößerung fotografiert. Mikrovilli Länge, Lumen und Durchmesser sowie Anzahl wurden ermittelt.

Ergebnisse

Der Einsatz von Lignocellulose hatte keine negative Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung der Karpfen (Tabelle 2). Das Gewicht nach 70 Tagen unterschied sich nicht signifikant nach Zulage von 1-3% Lignocellulose. Dabei schnitten die Tiere mit einer Zufütterung von 3% Lignocellulose tendenziell

am besten ab. Dies spiegelt sich auch in der FVW (Tabelle 3) zwischen Kontrolle und 3% Lignocellulose wider.

Um den Einfluss von Lignocellulose auf die Morphologie des Intestinaltraktes zu ermitteln wurde die Länge und Anzahl der Mikrovilli im mittleren Abschnitt des Verdauungstraktes ermittelt (Tabelle 4). Während die Zulage von Lignocellulose zu einer signifikanten Zunahme der Mikrovillianzahl führte, nahm die Länge der Mikrovilli bis 3% ab.

Tabelle 2: Einfluss auf das Körpergewicht

Einsatzrate Lignocellulose	**0%**	**1%**	**2%**	**3%**
Tag 0 ; Ø Körpergewicht (g)	33,6 ± 0,9	33,7 ± 1,1	33,6 ± 0,4	33,5 ± 0,6
Tag 70 ; Ø Körpergewicht (g)	125,5 ± 3,8	128,9 ± 2,8	131,7 ± 1,4	133,3 ± 6,3

Tabelle 3: Einfluss auf die Futterverwertung

Einsatzrate Lignocellulose	**0%**	**1%**	**2%**	**3%**
Tag 0 ; Ø FVW	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,1
Tag 70 ; Ø FVW	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1

Tabelle 4: Histologie Intestinaltrakt

Einsatzrate Lignocellulose	**0%**	**1%**	**2%**	**3%**
Darmzottenlänge	747± 161[a]	885± 214 [b]	788± 158 [a]	677± 179 [c]
Darmzotten:Lumen Verhältnis	8,2± 1.5 [a]	8,1± 1,3 [a]	8,2± 1,3 [a]	7,2± 1,5 [b]
Anzahl Darmzotten	29± 8 [a]	36± 5 [b]	35± 4 [b]	35± 6 [ab]

[ab], signifikante Unterschiede werden mit Hochbuchstaben gekennzeichnet ($p<0.05$)

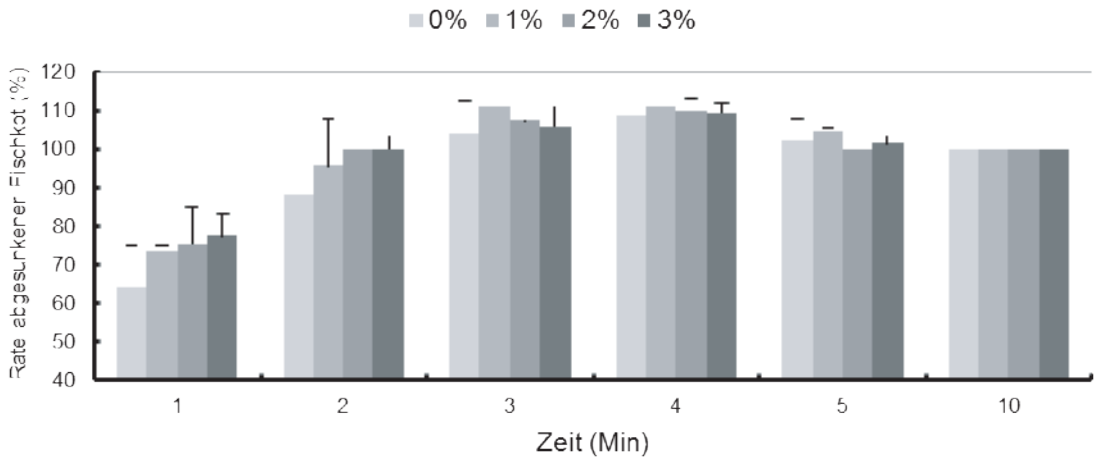


Abbildung 3: Sedimentationsrate des Kotes

Die Untersuchung der Sedimentationsrate des Kotes sollte darüber Aufschluss geben ob Lignocellulose in der Lage ist die Kotkonsistenz zu beeinflussen. Dies wäre vor allem in Fischzuchten mit Ablaufwasser und in geschlossenen Produktionssystemen ein Vorteil. Denn stabiler Kot lässt sich schnell und effizient abfiltrieren. Im vorliegenden Versuch bei einer höheren Zulage an Lignocellulose (2% & 3%) eine schnellere Absinkrate des Kotes festgestellt werden.

Schlussfolgerung

Lignocellulose wird bereits standardmäßig in der Fütterung vieler Heim- und Nutztiere eingesetzt. In der Aquakultur wird nach Möglichkeiten gesucht neben einer optimalen Versorgung der Fische mit Nähr- und Wirkstoffen die Darmgesundheit zu fördern und eine umweltschonende Produktion zu gewährleisten. Hier wird vor allem nach Möglichkeiten einer effizienten Reinigung und Aufbereitung von Abwässern gesucht.

Lignocellulose zeigte bis zu einer Einsatzrate von 3% keinerlei negative Auswirkung auf die Entwicklung von Karpfen. Darüber hinaus konnten morphologische Parameter sowie die Kotkonsistenz der Fische durch Zulage von Lignocellulose beeinflusst werden. Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass durch Lignocellulose die selben Parameter angesprochen werden können wie bei Landtieren. In Folgeversuchen sollten diese Ergebnisse weiter untersucht werden und die zugrundeliegenden Mechanismen beim Fisch näher beleuchtet werden.

Literatur

Anderson, J; Jackson, AJ; Matty, AJ; Capper, BS (1984): Effects of Dietary Carbohydrate and Fibre on the Tilapia (Oreochromis niloticus Linn.). Aquaculture 37:303-314

Amirkolaie, AK; Leenhouwers, JI; Verreth JAJ, Schrama JW (2005): Type of fibre (soluble versus insoluble) influences digestion, faeces characteristics, faecal waste production in Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.). Aquaculture Research 36: 1157-1166

Brinker, A und Rösch, R (2007): Projekt - Verbesserung der Ablaufwasserreinigung aus Fischzuchten durch Erhöhung der Fischkotstabilität. http://www.lazbw.de/pb/,Lde/668618

Stejskal, V und Mráz, J (2013): Effect of ARBOCEL addition on common carp (Cyprinus carpio) growth – final report (unpublished data)

Autorenanschrift

Dr. Astrid Bosse
J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. KG
BU Animal Nutrition
Holzmühle 1
73494 Rosenberg, Germany
E-Mail: astrid.bosse@jrs.de

Untersuchungen zum Einsatz einer Trocken-TMR in der Aufzucht männlicher Fresserkälber

Thomas Ettle und Anton Obermaier

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft, DE

Einleitung

In der Aufzucht von Fresserkälbern werden meist Rationen auf Basis Maissilage, Heu und Kraftfutter eingesetzt. Vereinzelt werden die Fresserkälber jedoch auch ohne Maissilage mit einer Trocken-TMR basierend auf Heu/Stroh und Kraftfutter gemästet. Als Ursache sind steigende Preise für Maissilage anzuführen. Darüber hinaus ist die Trocken-TMR für mehrere Wochen im Voraus zu erstellen und lagerbar, woraus sich verfahrenstechnische Vorteile ableiten lassen. In der Praxis gibt es Beispielsbetriebe, in denen die Verfütterung der Trocken-TMR lediglich während der Tränkephase durchgeführt wird. Vorteil ist, dass die Tiere beim Verkauf mit etwa 200 kg Lebendgewicht bereits auf Maissilage umgestellt sind, was vom Bullenmäster auch erwartet wird. In einem früheren Versuch konnten bei einem Leistungsniveau von etwa 1150 g Zuwachs/Tier und Tag keine unterschiedlichen Auswirkungen der Fütterungsverfahren Maissilage-TMR oder Trocken-TMR auf Futteraufnahme und Leistung festgestellt werden (Ettle und Obermaier, 2013). Mit vorliegendem Versuch sollte überprüft werden, ob sich diese Ergebnisse bei einem höheren Leistungsniveau bestätigen.

Material und Methoden

Der Versuch wurde mit 72 männlichen Fleckviehkälbern am Versuchsgut Karolinenfeld der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) durchgeführt. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere im Durchschnitt 46 ± 9 Tage alt und 77 ± 4 kg schwer. Die Versuchsdauer betrug 14 Wochen. Die Kälber wurden vor dem Versuch unter Berücksichtigung von Lebendmasse und Alter gleichmäßig auf zwei Gruppen (Trocken-TMR, Versuchsgruppe und Maissilage-TMR, Kontrolle) aufgeteilt. Ein Teil der Tiere (21 je Versuchsgruppe) war getrennt nach Versuchsgruppe in 2 Tiefstreubuchten in einem Warmstall untergebracht, die übrigen Tiere in 2 Tiefstreubuchten in einem Aussenklimastall. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde eine TMR auf Basis Maissilage, Kraftfutter und Heu ad libitum angeboten, die in Ihrer Zusammensetzung wöchentlich an den Bedarf angepasst wurde (Tabelle 1). Die Tiere der Gruppe Trocken-TMR erhielten über die gesamte 42-tägige Tränkeperiode hinweg eine TMR mit 57 % Kraftfutter, 33 % Heu und 10 % Melasse (i.d. TM), die hinsichtlich Nährstoff- und Energiegehalt so kalkuliert war, dass bei gleicher Futteraufnahme die Nährstoff- und Energieversorgung im Mittel der Tränkephase zwischen den Versuchsgruppen gleich sein sollte. Nach der Tränkephase wurden beide Gruppen über die Maissilage-TMR versorgt (Tabelle 2).

Die Zusammensetzung der maissilagebasierten TMR orientierte sich an dem Rationsbeispiel in der Gruber Tabelle zur Fütterung in der Rindermast für mittlere Zuwachsraten von 1300 g/Tag (LfL, 2012), es erfolgte jedoch entsprechende Anpassung der Ration an den TM-Gehalt der im Versuch eingesetzten Maissilage. Die mittleren Nährstoff- und Energiegehalte der einzelnen Futtermittel sind in Tabelle 3 dargestellt. Während der Tränkephase wurde eine Maissilage Ernte 2011 verfüttert, danach wurde auf eine Maissilage Ernte 2012 umgestellt. Die Maissilage wurde unter Zusatz eines Silierhilfsmittels (Bonsilage Mais) in Ballen siliert. Die Maissilage-TMR wurde täglich im Futtermischwagen er-

stellt, die Trocken-TMR wurde im Futtermischwagen auf Vorrat (400 kg Chargen) erstellt und bis zur Verfütterung zwischengelagert.

Tabelle 1: Futterplan (kg TM/Tier und Tag) während der Tränkephase (Woche 1-6)

Woche	Kontrollgruppe, Mais-TMR			Versuchsgruppe, Trocken-TMR		
	Kraftfutter	Maissilage	Heu	Kraftfutter	Melasse	Heu
	% der Frischmasse			% der Frischmasse		
1	0,36	0,15	0,31	0,47	0,08	0,27
2	0,53	0,27	0,31	0,63	0,11	0,37
3	0,89	0,38	0,31	0,90	0,16	0,52
4	1,16	0,57	0,31	1,16	0,20	0,67
5	1,51	0,84	0,31	1,52	0,27	0,88
6	1,69	1,14	0,31	1,79	0,31	1,04

Tabelle 2: Futterplan (kg TM/Tier und Tag) während der Versuchsphase nach dem Absetzen (Woche 7-14)

	Kraftfutter	Maissilage	Heu
		% der Frischmasse	
7	2,05	1,34	0,31
8	2,22	1,60	0,31
9	2,22	1,83	0,31
10	2,22	2,08	0,31
11	2,31	2,35	0,31
12	2,31	2,67	0,31
13	2,31	3,04	0,31
14	2,31	3,04	0,31

Tabelle 3: Trockenmasse-, Nährstoff- und Energiegehalte eingesetzten Futterkomponenten

	TM	XA	XP	XF	ME
	g/kg		g/kg TM		MJ/kg TM
Kraftfutter für Trocken-TMR	892	86	156	80	12,29
Kraftfutter für Mais-TMR	893	84	179	94	12,36
Maissilage Ernte 2011	432	23	71	183	11,27
Maissilage Ernte 2012	418	28	77	174	11,35
Heu	878	53	120	281	9,76
Melasse	719	244	127	0	10,43

Neben der TMR wurde in den ersten 42 Versuchstagen Milchaustauschertränke (MAT mit 40 % Magermilchpulveranteil, 100 g/l Tränke, angestrebte MAT-Aufwandmenge 25 kg/Tier) am Tränkeautomaten nach Plan angeboten. Von den TMR und den Einzelkomponenten der TMR wurden regelmäßig Proben gezogen und daran die Rohnährstoffgehalte nach Weender analysiert (Naumann et al., 1997) analysiert. Die Energiegehalte der Einzelkomponenten wurden mit dem Programm „Zifo" unter Nutzung der hinterlegten Verdaulichkeiten berechnet. Die Rohnährstoffgehalte und Energiegehalte der TMR wurden aus deren Zusammensetzung und den Gehalten in den Einzelkomponenten errechnet. Die Futteraufnahme wurde täglich je Futtergruppe erfasst, die Aufnahme an MAT wurde automatisch am Tränkeautomaten erfasst. Die Lebendmasse der Tiere wurde alle 2 Wochen festgestellt und daraus die Tageszunahmen errechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket SAS (Varianzanalyse, Mittelwertsvergleich).

Ergebnisse und Diskussion

Die Futter-, Energie- und Rohproteinaufnahme (Tabelle 4) während der Tränkephase lag in beiden Gruppen auf einem Niveau, wie es auch in früheren Fresserversuchen an der Versuchsstation Karolinenfeld beobachtet wurde (Ettle und Obermaier, 2012). Auch die täglichen Zunahmen waren während dieser Versuchsphase mit früheren Versuchen vergleichbar (Tabelle 5). Aus Versuchen mit pansenfistulierten Bullenkälbern lässt sich ableiten, dass auch bei jungen Tieren eine TMR-Fütterung in Abhängigkeit des Kraftfutterniveaus zu einer Stabilisierung des Pansenmilieus führt (Van Ackeren et al., 2008). Dementsprechend berichtet auch Jilg (2003) von guten Erfahrungen beim Einsatz von Trocken-TMR in der Kälberaufzucht, wenn der Kraftfutteranteil in der TMR nicht zu hoch gewählt wird. Auch wenn sich beim Vergleich zur Vorlage von Einzelkomponenten nicht immer Steigerungen in der Futteraufnahme und der Zuwachsleistung darstellen lassen (LVVG Aulendorf, 2003; Löhnert et al., 2005) kann die TMR-Fütterung im Kälber- und Fresserbereich vor allem wegen der Vermeidung einer überhöhten Kraftfutteraufnahme als sichere Fütterungsstrategie empfohlen werden.

Da sich während der Tränkephase in vorliegender Untersuchung keine Unterschiede bei der Futteraufnahme oder bei den täglichen Zunahmen zwischen den Gruppen zeigten, ergibt sich, dass der Einsatz einer Trocken-TMR bei Fresserkälbern während der Tränkephase im Vergleich zu maissilagebasierten Verfahren keine Nachteile in Hinblick auf Futteraufnahme und Leistung bringt, wenn die Energie- und Nährstoffgehalte bedarfsgerecht sind. Allerdings ergeben sich auch keine positiven Effekte. Demgegenüber berichten Trautwein et al. (2007) von positiven Auswirkungen des Einsatzes einer Trocken-TMR auf Futteraufnahme und Wachstum von DH-Bullenkälbern. Allerdings können in dieser Untersuchung auf Grund der Versuchsanstellung die Effekte der getrennten Vorlage der Futterkomponenten und die Effekte der Art der Grobfutterkomponenten nicht zugeordnet werden.

Tabelle 4: Futter-, Energie- und Rohproteinaufnahme in den einzelnen Versuchsphasen

	Versuchsgruppe	
	Maissilage-TMR	Trocken-TMR
Tränkeperiode		
Futteraufnahme, kg TM/Tag	1,61	1,71
ME-Aufnahme, MJ/Tag	21,5	22,2
XP-Aufnahme, g/Tag	268	290
Nach dem Absetzen		
Futteraufnahme, kg TM/Tag	4,30	4,16
ME-Aufnahme, MJ/Tag	50,4	48,7
XP-Aufnahme, g/Tag	551	532
Gesamt		
Futteraufnahme, kg TM/Tag	3,15	3,11
ME-Aufnahme, MJ/Tag	38,0	37,4
XP-Aufnahme, g/Tag	430	428

Ähnlich wie in einem früheren Versuch zum Einsatz einer Trocken-TMR in der Fresseraufzucht (Ettle und Obermaier, 2013) blieb die Futteraufnahme auch in vorliegendem Versuch nach dem Absetzen bis zum Versuchsende in beiden Versuchsgruppen hinter den Erwartungen zurück. Dementsprechend liegt die Rohprotein- und die Energieaufnahme auf einem recht niedrigen Niveau. Da dieser Effekt in beiden Gruppen gleichermaßen auftrat, lassen sich daraus keine Rückschlüsse auf eventuelle Effekte der Umstellung von Trocken- auf Mais-TMR nach dem Absetzen ziehen. Warum die Zuwachsleistung nach dem Absetzen und im gesamten Versuch in beiden Gruppen trotz der gegenüber den Versorgungsempfehlungen (LfL, 2012; GfE 1995, 1999) niedrigeren XP-Aufnahmen auf einem zu früheren Versuchen (Ettle et al., 2010a, b; Ettle und Obermaier, 2012) vergleichbaren, hohen Niveau lagen, bleibt ungeklärt.

Tabelle 5: Gewichtsentwicklung und tägliche Zunahmen

	Versuchsgruppe	
	Maissilage-TMR	Trocken-TMR
Lebendmasse (kg)		
Beginn	76,7±4,2	76,8±4,5
Absetzen	118±11	119±10
Ende	204±16	201±15
Tägliche Zunahmen (g)		
Tränkephase	988±183	997±172
nach Absetzen	1524±142	1477±153
gesamter Versuch	1295±132	1271±135

Insgesamt ergibt sich, dass auch bei einem hohen Leistungsniveau von annähernd 1300 g Zuwachs/Tag der Einsatz einer Trocken-TMR auf Basis Kraftfutter und Heu während der Tränkeperiode von männlichen Fresserkälbern ohne Einbußen in der Leistung möglich ist. Der Einsatz der Trocken-TMR kann dabei arbeitswirtschaftliche Vorteile mit sich bringen. Allerdings ergibt die Kalkulation der Rationskosten mit aktuell anzunehmenden Preisen für die Ration Trocken-TMR mit 24 €/dt Trockenmasse leicht höhere Kosten als für die Ration Maissilage-TMR mit 22 €/dt Trockenmasse. Diese Mehrkosten sind in der Praxis für die Entscheidung für eines der dargestellten Fütterungsverfahren zu berücksichtigen.

Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass in der Fresseraufzucht sowohl mit Maissilage-TMR als auch mit Trocken-TMR sehr gute Ergebnisse erzielt werden können. Dementsprechend kann die TMR-Fütterung im Kälber- und Fresserbereich vor allem wegen der Vermeidung einer überhöhten Kraftfutteraufnahme als sichere Fütterungsstrategie empfohlen werden. Den verfahrenstechnischen Vorteilen bei Verfütterung einer Trocken-TMR im Vergleich zur Verfütterung einer Maissilage-TMR sind die höheren Rationskosten gegenüber zu stellen.

Literatur

Ettle, T., Obermaier, A. (2012): Einsatz von Leinextraktionsschrot in der Fresseraufzucht. Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung, Fulda. Verband der Landwirtschaftskammern, Bonn [Hrsg.], 53-56.

Ettle, T., Obermaier, A. (2013): Einsatz einer Trocken-TMR in der Fütterung von Fresserkälbern. 125. VDLUFA-Kongress, Kurzfassung der Referate, 89.

Ettle, T., Obermaier, A., Danier, J., Spiekers, H. (2010a): Zum Einsatz von Weizenschlempe mit Lysinergänzung in der Fresseraufzucht. VDLUFA-Schriftenreihe 66, 714-720.

Ettle, T., Obermaier, A., Schuster, H. (2010b): Vergleich zweier Fütterungsstrategien in der Fresseraufzucht. In: Tagungsband 9. BOKU-Symposium Tierernährung, 300-305.

GfE (1995): Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere. Nr. 6 Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Mastrinder. DLG-Verlag, Frankfurt (Main).

GfE (1999): Empfehlungen zur Proteinversorgung von Aufzuchtkälbern. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 8, 155-164.

Jilg, T. (2003): Kälberaufzucht –Erfahrungen und aktuelle Entwicklungen. 30 Viehwirtschaftliche Fachtagung zum Thema Rinderaufzucht, Milchviehfutterung, Schafhaltung, Ökonomik, 24-25 Juni 2003, BAL Gumpenstein, Irdning, Österreich, 7-12.

LfL (2012): Gruber Tabelle zur Fütterung in der Rindermast. LfL-Information. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising [Hrsg.].

Löhnert, H.-J., Ochrimenko, W.I., Neldner, S., Bremer, K., Lüdke, H. (2005): Mischrationen in der Kälberaufzucht. Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung, Fulda. Verband der Landwirtschaftskammern, Bonn [Hrsg.], 1-4.

LVVG Aulendorf (2003): Trocken-TMR in der Kälberaufzucht. Versuchsbericht 1/2003. Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung und Grünlandwirtschaft Aulendorf [Hrsg.].

Naumann, C., Bassler, R., Seibold, R., Barth, C. (1997): Methodenbuch, Band 3: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. VDLUFA-Verlag, Darmstadt.

Trautwein, J., Könnel, J., Hlawitschka, B., Dusel, G., Landfried, K. (2007): Einsatz einer Trocken-TMR in der Kälberaufzucht. Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung, Fulda. Verband der Landwirtschaftskammern, Bonn [Hrsg.], 39-42.

Van Ackeren C., Steingaß, H., Drochner, W. (2008): Verdauungsphysiologische Untersuchungen zum Einsatz von Totalmischrationen für Aufzuchtkälber:; Proceedings of the 17th Intern. Scientific Symposium on Nutrition of Domestic Animals 17, 70-80.

Autorenanschrift

Thomas Ettle
Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Grub
Prof.-Dürrwaechter-Platz 3, 85586 Poing
E-Mail: Thomas.Ettle@LfL.bayern.de

CRINA RUMINANTS
...a DSM Eubiotic

CRINA Ruminants

Mehr Milch und mehr Ertrag auf natürliche Weise

Wenn Sie nach CRINA Ruminants in Ihrem Futter fragen, dann profitieren Sie von 25 Jahren Forschung und Entwicklung mit ätherischen Ölen.

Der Zusatz von CRINA Ruminants bewirkt:

- Verbesserte Futteraufnahme
- Optimierte Pansenfermentation
- Bessere Futterverwertung
- Höhere Milchleistung
- Mehr Ertrag

DSM Nutritional Products GmbH
Animal Nutrition and Health
Im Breuel 10, D-49565 Bramsche
www.dsm.com/animal-nutrition-health

Follow us on twitter @DSMFeedTweet

HEALTH • NUTRITION • MATERIALS

DSM
BRIGHT SCIENCE. BRIGHTER LIVING.

Evaluation of the effect of a plant alkaloid product in newborn German Holstein calves

Manuela Wirth[1], Julia Schmitt[2] and Bernd Fischer[3]

[1] Hochschule für Technik und Wirtschaft, Dresden, DE
[2] Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH, Eltville, DE
[3] Landesanstalt für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau, Iden, DE

Introduction

Diarrhea is the most important disease for economic losses in young dairy calves. This includes not only the direct loss of an animal, but also increased treatment costs, rising expenses on hygiene management and possible lower weight gain of calves (NIEUWENHUIZEN, 2000). Along with bovine respiratory disease (BRD) neonatal calf diarrhea (NCD) is described as the most common cause of morbidity and mortality in young dairy cattle (WINDEYER et al., 2013). Calf diarrhea is a multifactorial disease related to a combination of host and pathogen factors. The most common pathogens found in diarrheic calves are cryptosporidium, Rotavirus, Coronavirus, Salmonella, attaching and effacing *E. coli* and F5 (K99) *Escherichia coli* (BLANCHARD, 2012). Particular attention in this matter should be paid to *Cryptosporidium parvum*. It is one of the most important diarrhea causing agents (IBEN, 2004). Together with secondary infections such as Rotavirus or pathogenic *E. coli* strains it can cause severe damage particularly in immunodeficient hosts like newborns.

Herbal feed additives are already implemented in an efficient feeding strategy for livestock since the ban of Antibiotic Growth Promoters (AGPs) in Europe in 2006 at the latest. Besides others, Quaternary Benzophenanthridine and Protopine Alkaloids (QBA+PA) belonging to the group of secondary plant metabolites originating from the plant Macleaya cordata are used in animal nutrition. The active substances are known to have anti-inflammatory effects (LENFELD *et al.*, 1981; NIEWOLD and DE BACKER, 2010), positive impact on the intestinal integrity (transepithelial resistance (TER)) and Salmonella shedding in pigs (ROBBINS *et al.*, 2013) and a general performance enhancing effect in animal fattening in different species such as poultry (Vieira et al., 2008; VUCSKITS and SCHÜTZ, 2010) or pigs (LIPINSKI K. and TYWONCZUK, J., 2008; TSCHIRNER, 2004) for example.

Little is known about the effect of those substances in calf rearing. Thus, aim of this trial was to evaluate the effect of a novel herbal complementary feed for calf rearing (Sangrovit® CS), which is also based on the active ingredients of QBA+PA.

Materials and methods

The full examination period of this trial started in September 2012 and finished in January 2013 (late autumn and winter season). The trial was conducted at the dairy cow research facility of the state institute of agriculture, forestry and horticulture Iden/Germany under practical conditions.

60 newborn female German Holstein calves housed individually in calf houses (30 animals per group) were included in this project. The single housing and trial phase was running for 21 days for each calf. Afterwards animals were transferred into a group housing system. In average mothers of the tested calves completed 2.5 parities and 28% of the mothers were heifers. For the selection of calves, newborns were randomly allocated to the control or test group.

Calves received maximum acidified colostrum intake during the first two days of live, followed by 7.5 l of acidified whole milk (pH 5.8) per animal and day up to 21 days of live, split into three portions of 2.5 l respectively (feeding around 7am, 4pm and 12pm). Whole milk was administered via milk taxi in individual bucket feeding. In case of diarrhea in both groups electrolytes and a plant fibre product were given.

The trial consisted of two treatments as follows:

I) Control* (1 x 8ml Halofuginone per animal and day; from day 6 to 12 of life, application of the full dosage in the morning portion)
II) Sangrovit® CS (2 x 1g Sangrovit® CS per animal and day; from day 3 to 21 of life; mixed into the 7am and 4pm milk portion respectively).

** Due to severe diarrhea problems in this group Halofuginone was given as a prophylaxis.*

Following parameters were recorded:

- Weight development (birth weight, weekly weighing and weight at grouping).
- Total protein and γ-globuline content in blood serum (sampling between day 2 and 5 of life).
- Time between birth and first colostrum uptake.
- Colostrum and whole milk intake.
- Faecal analyses (faecal sampling every two days, for 15 animals in each group respectively) on occurrence of path. *E. coli (k30 and K32)* (technique: bacterial culture, detection of gram negative bacteria), *Cryptosporidium sp.* (technique: colouring of Henrikson) and Rotavirus (technique: electron microscope). Analyses realized at LAV Stendal.
- Diarrhea scoring and detection of diarrhea duration and frequency (daily for each calf).

Statistical analysis was carried out with SPSS Statistics 19. For detection of statistical differences of metric data between the groups a one-way ANOVA Modell was used. For the detection of the development of measured parameters the testing method GLM with repetition of measures was realized. Results with p-values $\leq$ 0.05 were taken as statistical significant.

Results and discussion

Trial conditions at trial start were equal in both groups. In table 1 it can be seen that birth weight, time between birth and first colostrum intake and total protein and γ-globuline content in blood serum showed no significant effect between groups. Furthermore, the allocation of calves through the test months (September to January) was balanced (Figure 1). In general the month of birth showed a partly significant effect ($p<0.05$) on live weight gain during the first three weeks of life. No further significant difference was detected for the body weight at 21 days of age, being a hint for compensating growth within these first weeks of live (Table 2).

Comparing the average daily weight gain between both groups during the trial phase animals of the treatment group showed a 3% higher weight gain compared to the control ($p>0.05$) (Table 3).

Table 1: Description of calf conditions at trial start (Mean value ± sd)

	Control	**Sangrovit® CS**
Birth weight (kg)	39.9 (± 5.0)	39.6 (± 4.7)
Time between birth and first drinking (min)	42.4 (± 28.5)	44.5 (± 35.1)
Colostrum intake at first drinking (l)	1.7 (± 0.8)	1.7 (± 0.7)
Total protein in blood serum (g/l)	53.1 (± 9.5)	50.7 (± 9.5)
γ-Globuline in blood serum (g/l)	15.9 (± 6.6)	14.8 (± 6.3)

Table 2: Weight development of calves in relation to the month of birth during the first three weeks of life (Mean value ± sd)

	Live weight 21 days (kg)	**Live weight gain (kg)**	**Live weight gain (g/d)**
September	53 (± 6)	15^{b} (± 3)	688^{b} (± 134)
October	52 (± 6)	13^{ac} (± 3)	632^{c} (± 121)
November	52 (± 6)	13^{c} (± 3)	615^{c} (± 145)
December	56 (± 4)	15^{bd} (± 3)	735^{bd} (± 95)
January	52 (± 4)	11^{a} (± 2)	530^{a} (± 98)

^{a,b} $p<0.05$

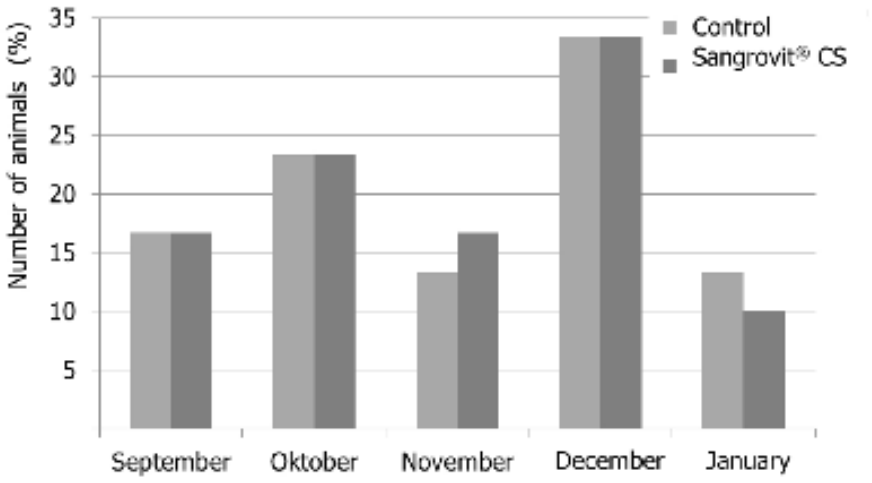


Figure 1: Number of birth per month

For the detection of milk intake, an important factor for health management of calves, also no statistical differences between the groups were visible. On average calves in the control as well as in the Sangrovit® CS group had a whole milk intake of 6.5 liters per day (Table 3).

From daily documentation of diarrhea, an average diarrhea duration of 4.8 days for control animals and 4.3 days for treatment calves was observed ($p>0.05$). No significant difference also could be stated for the average duration of the diarrhea scores two and three (2 = low viscosity, thin faeces; 3 = aqueous faeces) in this matter (Table 4). Furthermore a clear peak of calves suffering from diarrhea could be seen in the second week of life. Highest number of infected calves was measured at day 11 for the Sangrovit® CS animals and at day 13 for the control. The number and development of diarrhea incidents in general was equal in both groups (Figure 2).

Table 3: Average daily weight gain and milk intake of calves in the first 3 weeks (Mean value ± sd)

	Control	**Sangrovit® CS**
Weight gain - Life week 1-3 (single housing) (g/d)	650 (± 122)	671 (± 142)
Milk intake - Life week 1 (l/d)	5.7 (± 0.7)	5.8 (± 0.7)
Milk intake - Life week 2 (l/d)	6.7 (± 0.8)	6.6 (± 0.6)
Milk intake - Life week 3 (l/d)	7.2 (± 0.6)	7.2 (± 0.6)
Milk intake - Life week 1 - 3 (l/d)	6.5 (± 0.4)	6.5 (± 0.4)

Table 4: Diarrhea rating and average duration (Mean value ± sd)

	Control	**Sangrovit® CS**
Diarrhea duration - rating 2* (d)	2.65 (± 1.82)	2.45 (± 1.19)
Diarrhea duration - rating 3** (d)	1.67 (± 0.91)	1.86 (± 1.03)
Diarrhea total duration (d)	4.8 (± 3.9)	4.3 (±3.0)

Diarrhea rating: 1 = still pasty faeces, * 2 = low viscosity, thin faeces; **3 = aqueous faeces

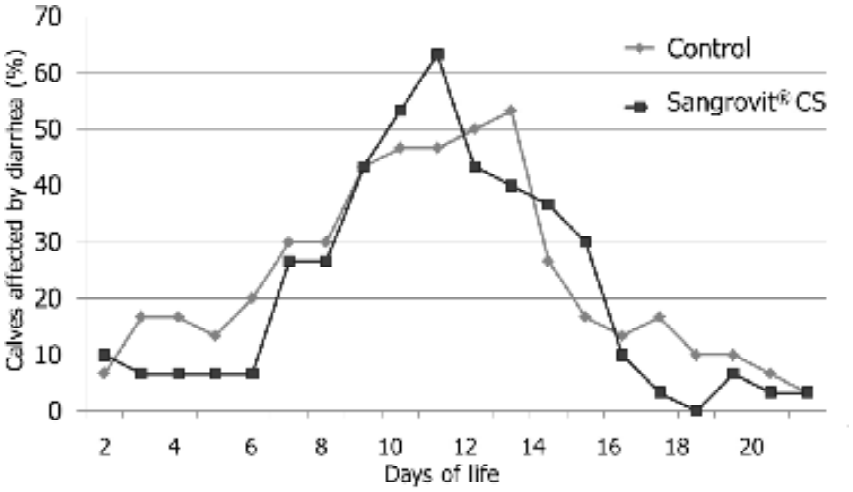


Figure 2: Development of systemic diarrhea during the first 3 weeks of life

For the quantification of infected calves with selected pathogens (Figure 3) a direct relation to the occurrence of diarrhea could be made. Particularly the levels of calves detected positive on Rotavirus and Cryptosporidia increased in week number two (peak phase of diarrhea affected calves) in both groups. Even though there was no difference measured for Rotavirus, pathogenic *E. coli* or Cryptosporidium, there were more calves detected positive on the later pathogen in the Sangrovit® CS group in week two. Nevertheless, at day 21 this effect was not visble anymore. In fact, no calf in the treatment group was positive on cryptosporidia any longer at this stage. As discribed above, this effect was not accompanied by symptoms of higher diarrhea or poor drinking behaviour in the treatment group.

There was a higher tendency for calves being detected positive on pathogen *E. coli* in the control group ($p>0.05$).

After all, the limited number of calves used for the faecal sheeding needs to be considered and interpretation should be taken with care.

Halofuginone is known to reduce Cryptosporidia and thereby associated diarrhea in calves (VILLACORTA *et al.*, 1990), if applied in the recommended dosage. Thus it can be expected, that the health status of control calves may have been more negatively affected in case of renouncement of this medication. Sangrovit® CS fed calves showed comparable performance levels as control animals, which can be considered as a positive impact of this complementary feed on these animals. For future examinations on the effect of QBA+PA substances in calves a negative control besides a positive control would be desirable, in order to assign detected effects to the tested substances more clearly and to allow a deeper interpretation of data.

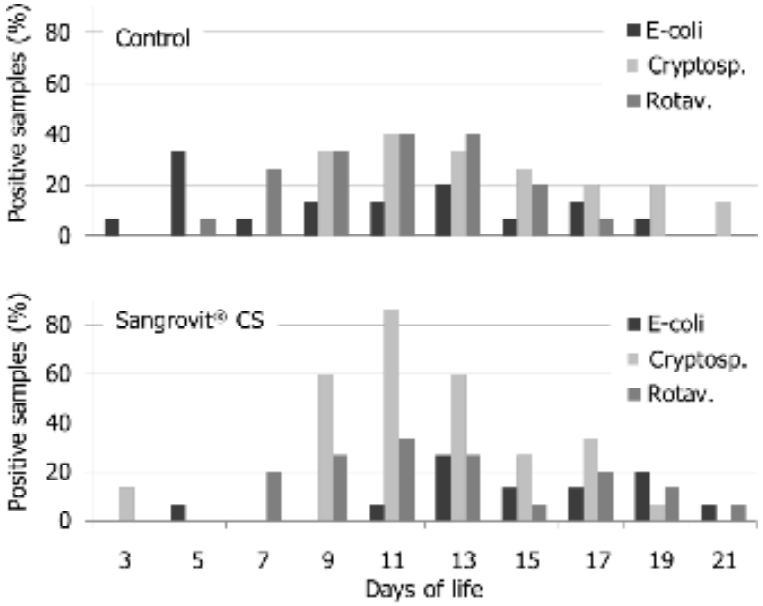


Figure 3: Percentage of faecal samples detected positive on path. *E. coli*, *Cryptosporidium* and Rotavirus in calves

Conclusion

Although good colostrum supply, hygiene and care management are important prerequisites of a healthy calf rearing, feed additives can be a beneficial support for this early phase of life.

The results of this trial show that both treatments had a similar effect on milk intake, growth and health parameters with no significant difference. Also during phases of increased occurrence of diarrhea and associated pathogens, calves kept up milk intake in both groups (Halofuginone and Sangrovit® CS). This ensured a good supply of nutrients and energy, which is essential to keep the performance and health of infected calves up.

The QBA+PA complementary feed Sangrovit® CS presented similar effects on calf drinking behavior and diarrhea incidence as the control and thus can be considered as a managing tool for sensitive phases in calf rearing.

References

Blanchard, P.C. (2012): Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.. 2012 Nov;28(3): 443-464.

Iben, B. (2004): Kryptosporidien im Kälberstall. Witzenhausen: Großtierpraxis 5: 1, 20-27.

Lenfeld, J. *et al.* (1981): Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from Chelidonium majus. Planta Medica: 43:161- 165.

Lipinski K. and Tywonczuk, J. (2008): Testing the Efficiency of Macleaya Cordata as Feed Additive in Pigs. Konferencja Kowno.

Niewold, T.A. and de Backer, K. (2010): The *in vitro* anti-inflammatory property of Sanguinarine containing extracts is consistent with enhanced in vivo performance in production animals. Poster Session II, XIIIth European Poultry Conference, Tours, France.

Nieuwenhuizen, H.M.M. (2000): Präventions- und Therpiemaßnahmen (2.Teil): Tiergesundheitsmanagement und Durchfallerkrankungen von Kälbern. Großtierpraxis1: 3, 16-21.

Robbins, R.C. *et al.* (2013): Effects of quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids on growth performance, shedding of organisms, and gastrointestinal tract integrity in pigs inoculated with multidrug-resistant *Salmonella* spp. Am J Vet Res. 2013 Dec;74(12):1530-1535.

Tschirner, K. (2004): Untersuchungen zur Wirksamkeit und zum Nachweis des pflanzlichen Alkaloids Sanguinarin beim Schwein. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.

Vieira, S. L.*, et al.* (2008): Studies with Sanguinarine as feed additive in broiler diets. Brazilian Journal of Poultry Science; v.10, n.8, 9-13.

Villacorta, I *et al.* (1991): Efficacy of Halofuginone Lactate against Cryptosporidium parvum in calves. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 35 (2), p 283-287.

Vucskits, A.V. and SCHÜTZ, J**.** (2010): Effect of QBA and PA on protein metabolism and performance of broilers. Boku Symposium, Vienna.

Windeyer M.C. *et al.* (2013): Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. Prev Vet Med.. Epub 2013 Nov 1.

Corresponding author

Julia Schmitt
Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH
Wallufer Str. 10a, D-65343 Eltville
E-mail: j.schmitt@phytobiotics.com

Effects of phytogenic feed additives on the growth performance and health of beef calves under commercial conditions

Carina Schieder[1], Martin Friedrichkeit[2] and Tobias Steiner[1]

[1] BIOMIN Holding GmbH, Herzogenburg, AT
[2] Commercial farm, Reisenberg, AT

Abstract

Fifty-three beef calves with an average initial body weight of 93.2 kg were assigned to either a control or experimental group based on their initial body weight and breed (Simmental and Belgian Blue). Calves were housed in groups of 26 and 27 animals per pen, respectively. Control calves received a standard non-medicated calf milk replacer (CMR) and calf starter. Experimental calves received CMR and starter feed supplemented with two different phytogenic feed additives (PFAs) including herbs, spices and plant extracts [Digestarom® Milk in CMR (500 g/t) and Digestarom® Calf in calf starter (300 g/t), BIOMIN Phytogenics GmbH, Stadtoldendorf, Germany]. CMR feeding was restricted during the first three weeks. Calf starter was offered semi *ad libitum*. Calves were weighed individually on d 1, 21, 42 and 56. Feed intake was determined per group on a weekly basis. Medical treatments were recorded throughout the trial. Data for body weight and weight gain were statistically analyzed using the independent *t* test (IBM SPSS 19.0). Calves offered CMR and starter feed containing PFA were superior in average daily weight gain (1.33 vs. 1.23 kg; $p = 0.06$) and exhibited a significantly higher average final body weight (168.1 vs. 161.2 kg; $p = 0.02$). PFA addition resulted in a slightly higher average dry matter intake (2.46 vs. 2.41 kg) and improved feed efficiency (feed conversion ratio 1.86 vs. 1.97). Moreover, PFA supplementation positively influenced the health status of calves, as indicated by a reduced number of animals treated for health problems (fever and diarrhea). This led to reduced medication costs and higher farm profits. In conclusion, PFA supplementation in the CMR and calf starter is a suitable tool to improve growth rates and reduce medication costs in commercial beef calves.

Introduction

Morbidity and mortality of calves in the rearing period have a major financial impact on the economic viability of dairy operations (Lorenz et al., 2011). The primary causes for financial losses are direct costs due to mortality as well as treatment expenses and indirect costs due to the negative long term effects of suboptimal performance (NAHMS, 2010; Oliveira et al., 2010).

Common traditional methods for improving calf performance and health have included the application of antibiotics in feeds (Heinrichs et al., 2003). It has been estimated that production costs would increase by 3.5 to 5.0% if antibiotics are eliminated from ruminant feed (Soltan, 2009). However, the occurrence of bacterial resistance increased public and scientific concerns, resulting in the ban of antibiotics in some countries (Jouany and Morgavi, 2007).

Driven by the ban of sub-therapeutic antibiotic growth promoters in the European Union in 2006 (1831/2003 EEC), several new strategies have been introduced to optimize animal production and health. Phytogenic feed additives (PFAs) gained considerable attention in livestock production as PFAs exert strong anti-inflammatory, antioxidative and antimicrobial activities, all of which offer potential

benefits for improving performance and preventing intestinal disorders (Franz et al., 2010; Jouany and Morgavi, 2007).

The aim of the study was to evaluate the efficacy of PFAs on growth performance, feed efficiency and number of medical treatments in calves under commercial farm conditions.

Materials and methods

Animals and Housing. The present study was conducted on a commercial beef fattening farm in Lower Austria. During the trial period of 56 days, a total of 53 beef calves were assigned to either control (n=26) or experimental group (n=27). Calves were divided according to their initial body weight and breed. The genotype of the calves was either Simmental or Belgian Blue. Control as well as experimental calves were housed in groups in an open-front shelter.

Experimental Diet and Feeding. Calves were fed twice a day with diets as described in table 1. The formulation is based on the average of 56 days. Calf milk replacer (CMR) was fed in the first three weeks and CMR intake was subsequently restricted. Cereals were provided during the first week and calves received calf starter with soybean meal and partly ground corn and rapeseed meal in the following weeks. Hay was offered during the whole trial period while corn silage was provided from the fourth week onwards. Differences in feed intake between groups were covered by higher intakes of corn silage and ground corn in equal amounts.

Experimental calves received CMR and starter feed supplemented with two different mixtures of PFAs including herbs, spices and plant extracts. Control calves were provided a standard diet without PFAs. Calves had free access to water during the whole trial period.

Table 1: Formulation and composition of the experimental diet

	Formulation in %	DM (%)	MJ ME/kg DM	g CP/kg DM
CMR	5.2	95.0	14.0	180
Cereals	7.5	90.0	12.0	175
Calf starter	17.2	90.0	10.6	160
Rapeseed meal	7.6	88.0	10.6	330
HP soybean meal	8.5	90.0	12.1	480
Corn	18.7	90.0	13.0	106
Corn silage	28.8	37.8	4.2	26
Hay	6.6	88.0	8.5	119
Premix*	1.4	98.0		

*including vitamins, macro and trace minerals

Measurements and Statistical Analysis. The calves were weighed individually on d 1, 21, 42 and 56. Feed intake per group was determined weekly. Health status and medical treatments were observed and recorded daily throughout the experiment.

Data for body weight and weight gain were statistically analyzed using the independent *t* test (IBM SPSS 19.0). Differences between means were considered significant when probability was $p < 0.05$. Probabilities of $p < 0.10$ were considered as tendencies towards statistical significance.

Results

Body weight development is shown in figure 1. Calves receiving PFAs in CMR and calf starter had a slightly, but not significantly higher initial body weight (+1.3 kg) compared to the average weight of control calves.

However, calves receiving PFAs showed a tendency towards a higher average daily weight gain (1.33 kg) compared to control calves (1.23 kg; p = 0.06) resulting in significantly increased body weight by 4.0 and 4.2% on d 42 (p = 0.03) and d 56 (p = 0.02), respectively.

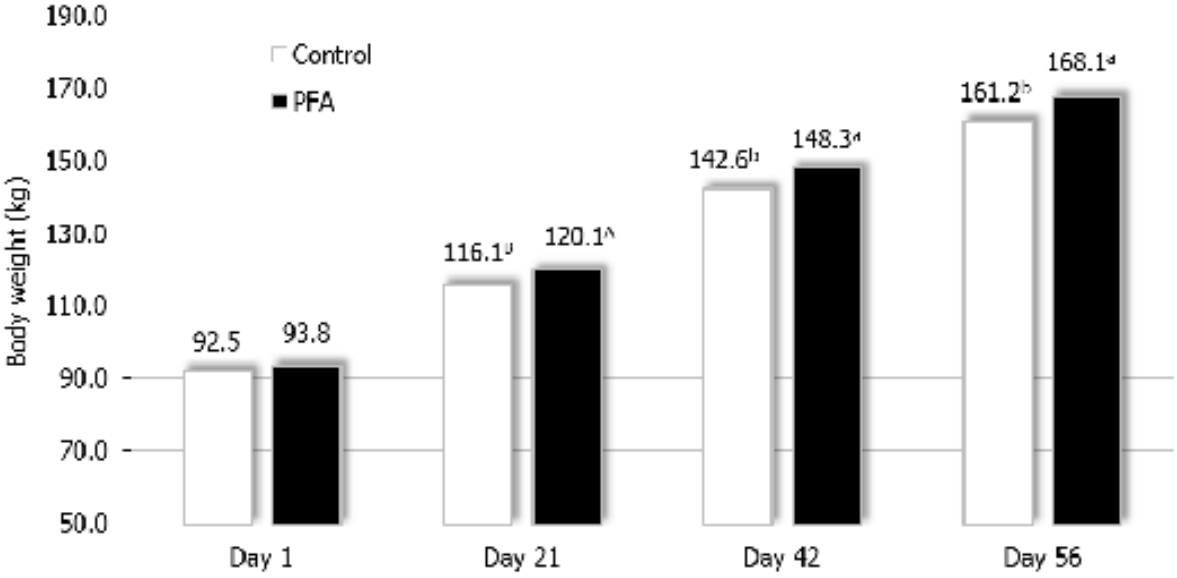


Figure 1: Effect of PFAs in CMR and calf starter on body weight development. [a,b]Significant difference between groups (p < 0.05); [A,B]Tendency towards a significant difference (p < 0.10)

Average daily dry matter intake increased slightly with the addition of PFAs in the CMR and calf starter compared to control calves (2.46 vs. 2.41 kg). Feed conversion ratio (FCR) differed between groups (1.86 vs. 1.97) representing an improvement by 5.6% through supplementation with PFAs. Results regarding zootechnical parameters are shown in table 2.

Table 2: Overall performance throughout the trial with and without PFA supplementation*

	d 1-21	d 22-42	d 43-56	d 1-56
Average body weight gain (kg/d)				
Control	1.12^{b}	1.26^{B}	1.33	1.23^{B}
PFA	1.25^{a}	1.34^{A}	1.41	1.33^{A}
Average DM intake (kg/d)				
Control	1.41	2.96	3.10	2.41
PFA	1.46	3.01	3.15	2.46
FCR				
Control	1.25	2.35	2.33	1.97
PFA	1.17	2.24	2.22	1.86

*Means with different superscripts differ between groups. [a,b] p < 0.05; [A,B] p < 0.10

PFA supplementation in feeds of calves resulted in fewer health disorders (reduced number of calves suffering from fever and diarrhea) as shown in table 3. Fever lasted on average 1.5 days in both groups; however, calves in the experimental group had 50% fewer recorded incidences compared to the control calves. Treatment costs were lower for calves receiving PFAs (1.04 vs. 1.21 Euro per calf). None of the calves died throughout the trial period.

Table 3: Effects of PFA supplementation in CMR and starter feed on health status compared to control

	Calves suffering from		Mortality
	fever	diarrhea	
Control	6	5	-
PFA	3	1	

Discussion

In the current study, PFA supplementation in CMR and calf starter resulted in significantly higher daily weight gains. The positive effect of increased daily weight gain is reflected in significantly greater body weight at the end of the trial on d 56. Superior growth performance in calves receiving a diet including PFAs compared to control calves was recorded throughout the whole trial period even though feed intake was slightly higher in the experimental group. These findings are in agreement with Miller et al. (2012) who reported enhanced growth rates and improved FCR in heifer calves fed PFAs in the CMR.

High weight gains combined with moderately different feed intake entailed consistently enhanced feed efficiency at any time of the trial. Differences in feed efficiency between groups were substantial.

Overall, fewer clinical observations in terms of calves suffering from diarrhea or fever were recorded. Due to the properties of the particular PFA, enhanced feed efficiency can partly be attributed to the stimulation of digestive secretions. The fewer cases of illness can be accredited to the positive impacts of PFAs on animal health, particularly to favorable effects in the gastro-intestinal tract (Franz et al., 2010; Windisch et al., 2008). A positive influence of PFA supplementation in CMR on intestinal health resulting in reduced diarrhea incidence and duration was also reported by Miller et al. (2012).

Conclusion

In the present trial, PFA supplementation (Digestarom® Milk and Digestarom® Calf) significantly improved body weight gain and enhanced feed efficiency in calves. Hence PFAs act as natural growth promoters and additionally have a positive influence on calf health indicated by a reduction in medical treatments and medicinal costs in commercial beef calves.

References

Franz C, Baser K H C, Windisch, W (2010) Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. Flavour and Fragrance Journal 25, 327 - 340

Heinrichs A J, Jones C M, Heinrichs B S (2003) Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. Journal of Dairy Science 86, 4046 - 4069

Jouany J-P, Morgavi D P (2007) Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. Animal 1, 1443 - 1466

Lorenz I, Mee J F, Earley B, More S J (2011) Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. Irish Veterinary Journal 64, 1 - 8

NAHMS – National Animal Health Monitoring System (2010) Dairy 2007, Heifer calf health and management practices on U.S. dairy operations, 2007. United States Department of Agriculture

Miller B L, Earleywine, T J, Johnson T E (2012) The effect of essential oil/botanical product on performance and health of calves. Journal of Dairy Science 95, Suppl. 2

Oliveira R A, Narciso C D, Bisinotto R S, Perdomo M C, Ballou M A, Dreher M, Santo J E (2010) Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves. Journal of Dairy Science 93, 4280 - 4291

Soltan M A (2009) Effect of essential oils supplementation on growth performance, nutrient digestibility, health condition of Holstein male calves during pre- and post-weaning periods. Pakistan Journal of Nutrition 8, 642 - 652

Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A (2008) Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. Journal of Animal Science 86, E140 – E148

Corresponding author

DI Carina Schieder
BIOMIN Holding GmbH
Industriestrasse 21
A-3130 Herzogenburg
E-mail: carina.schieder@biomin.net

Evaluation of transgenic Bt maize in fattening bulls

Silvia Pomikalová, Mária Chrenková, Ľubica Chrastinová, Mária Polačiková, Zuzana Formelová and Matúš Rajský

National Agricultural and Food Centre, Research Institute for Animal Production Nitra, Lužianky, SK

Introduction

Transgenic crops have been grown commercially for about 18 years, with a continuous increase of the cultivated area, and now they represent a significant proportion of the total world production for the major GM crops: soybean, maize, rapeseed and cotton. These crops are used directly or preserved in animal nutrition or as by-products from the processing industry such as distillers grain, extracted oil meal, sugar beet pulp, *etc*. Therefore, nutritional and safety assessments of feeds from GMP are one of the key questions. Most animal studies were conducted for the nutritional assessment of feeds. Flachowsky et al. (2005) and Chrenková et al. (2007) summarized the effects on the nutrients digestibility, feed intake, health and performance of animal as well as effects on the quality of food of animal origin. In the European context, Slovakia ranks among other 7 EU countries which have practical experience in Bt maize cultivation (Křistková, 2009; James, 2011). Maize MON 810 contains the Cry1Ab protein protecting the crop against certain lepidopteran insect pests, including the European Corn Borer (Ostrinia nubilalis) and pink borers (Sesamia spp.).

The aim of this work was to verify substantial equivalence of maize MON 810 in feeding value and animal performance.

Materials and methods

A feeding trial was carried out with 40 Holstein bulls, which were randomly distributed into 4 groups, with 10 bulls each, in boxes. Bulls were fed TMR diet for ad libitum intake.

The diets were fed twice daily at 6.00 and 16.00 h in two equal doses. Water was provided ad libitum. The experiment lasted for 258 days.

The results were quoted as mean ± standard deviation (SD); statistical evaluation of the results was performed by the one-way ANOVA and Tukey test.

Table 1: Ingredient and chemical composition of the TMR diet

Item (kg/d)	Daily feed intake	Nutrients in diet	Per 1 kg dry matter
Maize silage	10.5	Crude protein	139.84 (g)
Lucerne silage	5.0	NEF	6.45 (MJ. kg^{-1})
Meadow hay	1.0	Crude fibre	155.30 (g)
Wheat	0.6	Starch	264.47 (g)
Rape meal	0.5	Fat	28.80 (g)
Vitamin- mineral mix[1]	0.2	Ca	9.21 (g)
Crimped maize grain	2.8	P	3.67 (g)

The supplement vitamin- mineral mix provided (per kg of additive): calcium carbonate, wheat, monocalcium phosphate, sodium chloride, zinc chelate and amino acid n-hydrate, sugar beet molasses, vit. A, D3, E, copper sulphate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$), dioxide magnesia

Results and discussion

The diet consisted of maize silage, lucerne silage, meadow hay, wheat, rape meal, minerals and crimped isogenic maize grain or transgenic maize (Table 1). Water was provided ad libitum. The nutrient compositions of diets revealed no major differences. The TMR contained 139.84 $g.kg^{-1}$ crude protein, 155.3 $g.kg^{-1}$ crude fibre, 264.47 $g.kg^{-1}$ starch, fat 28.8 $g.kg^{-1}$, Ca 9.21 $g.kg^{-1}$, P 3.67 $g.kg^{-1}$ and energy value NEF its 6.45 MJ in kg dry matter (AOAC,1995).

Table 2: Content of nutrients and mycotoxins in crimped isogenic maize grain and crimped transgenic maize grain ($g.kg^{-1}$ original matter)

Parameter	Crimped isogenic maize grain (DKC5143)	Crimped transgenic maize grain MON 810
Dry matter	642.24	616.65
Crude protein	68.36	65.67
Fat	33.38	25.35
Crude fibre	9.58	16.64
Starch	438.08	435.16
ADF	17.79	23.59
NDF	87.30	75.75
pH	4.54	4.41
Acetic acid	0.89	1.01
Propionic acid	0.62	0.77
Butyric acid	0.03	0.08
Lactic acid	3.48	3.05
Total amount of acid	5.17	5.15
Alcohol	0.05	0.05
Fumosidines (FUM) *	1250	trace

*Total were of quantification in $\mu g.kg^{-1}$

Table 3: Performances of bulls in response to dietary supplementation of isogenic maize and transgenic maize ($\bar{x} \pm SD$)

Parameters (n=20)	Control group	Experimental group
Initial weight (kg)	298	298
Final weight (kg)	620	622
Dairy weight gain ($kg.day^{-1}$)	1.25±0.221	1.26±0.065

P >0.05

Increased content of mycotoxins was observed in isogenic maize (1250 $\mu g.kg^{-1}$). All samples were contaminated by toxins under the EU limit.

The feeding trial was conducted with 2 x 20 growing bulls, Holstein breed, from average live weight 298 kg to the average slaughtering weight 620 kg in control and 621.6 kg in experimental group (Figure 1). The live weight gain was 1.248 kg/d and 1.255 kg/d. The existing studies, which compare the substantial equivalence between conventional and transgenic plants, applied usually to the production of fodder mixture for farm animals, were used in this research (Flachowsky et al., 2005; Sampietro et al, 2011; EFSA, 2008). Metabolism and performance data revealed no significant differences between the bulls that received the TMR with conventional, non-modified maize, and those that received the TMR with modified maize diets.

No significant differences were found among experimental groups in feed intake and body weight in the fattening experiment (Table 3). It had no adverse effects on feed conversion, growth performance and health status. The transgenic maize in TMR has no deleterious or unintended effects in this study.

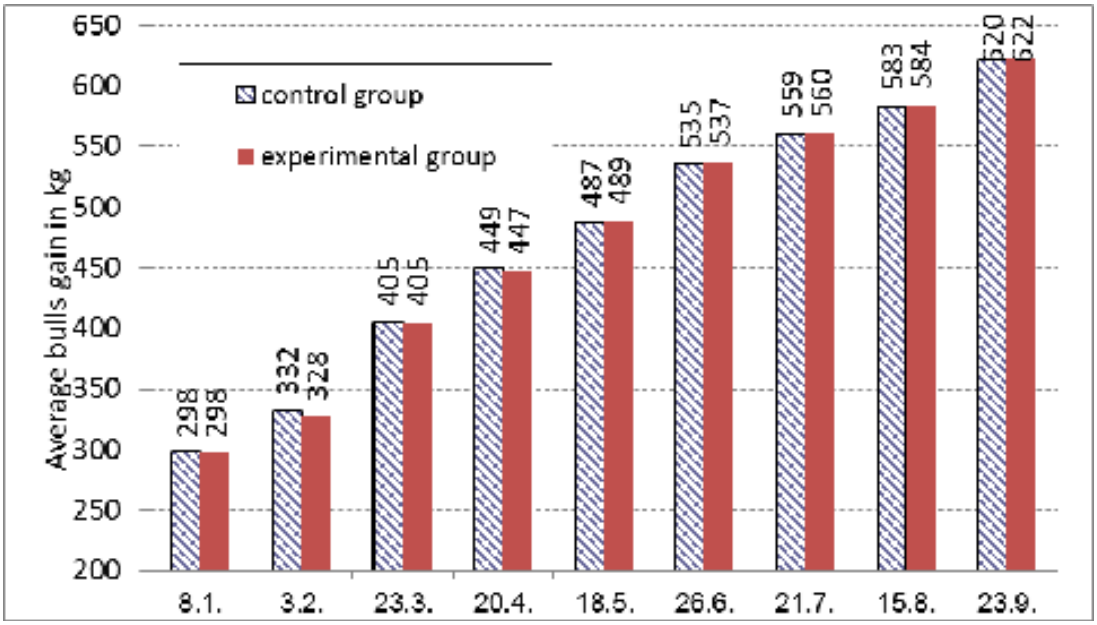


Figure 1: Comparison of body weight gain; the fattening experiment bulls were fed TMR with content of isogenic maize and transgenic maize

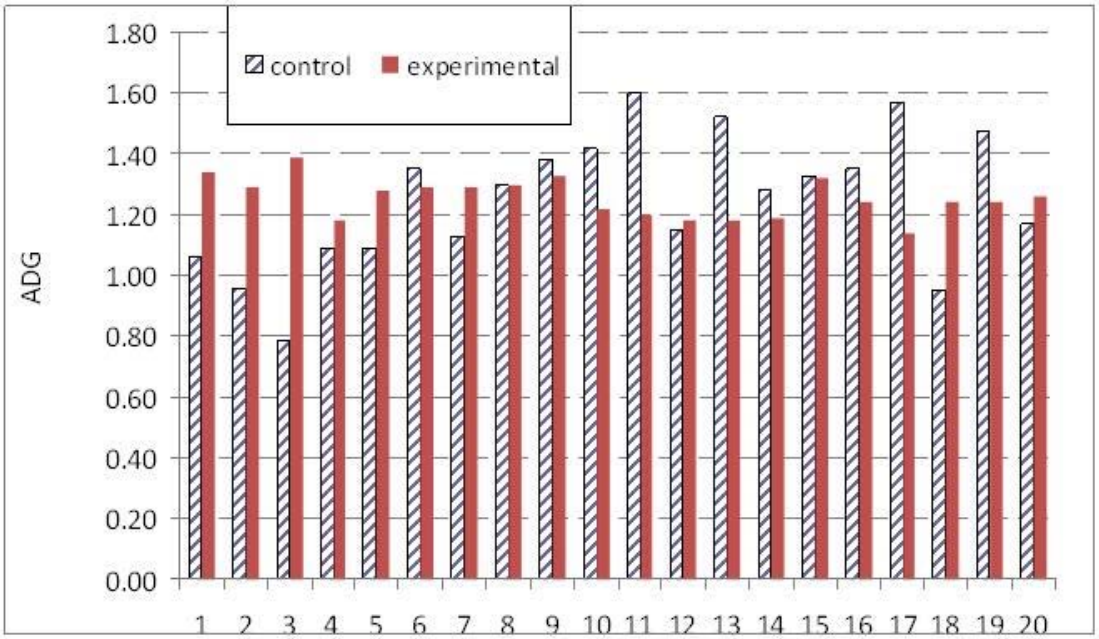


Figure 2: Comparison of daily weight gain in the fattening experiment, bulls (1-20) were fed TMR with content of isogenic maize or transgenic maize

The effect of addition of crimped isogenic maize grain or crimped transgenic maize to TMR is shown in figure 2. Average daily gain during the experiment in the control group was 1.248 kg.day^{-1} and the values ranged from 0.791 kg.day^{-1} to 1.597 kg.day^{-1}. Average daily gains in the experimental group were at 1.255 kg.day^{-1}, the range we have seen from 1.14 kg.day^{-1} to 1.39 kg.day^{-1}. In this group the variability was not significant. The health conditions are evaluated subjectively. As neither in experimental nor in control block were noticed troubles with hygienic conditions in beast, the weight gains were on adequate levels.

Conclusion

Feeding TMR with GM maize MON 810 and isogenic maize to bulls did not influence biochemical and zootechnical parameters, as well as it had no negative effect on health status and growth performance of animals. Only small differences were found between the individual nutrients which corresponded with the results of live weight in slaughter bulls.

Acknowledgments

This work was supported by the project "BELNUZ No. 26220120052" supported by the Operational Programme Research and Development funded from the European Regional Development Fund.

References

AOAC (1995): Official Methods of Analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1018

CHRENKOVÁ M., CHRASTINOVÁ Ľ., ČEREŠŇÁKOVÁ Z., RAFAY J., FLACHOWSKY G.,MIHINA Š. (2007): Assessment of nutritive value of Bt-maize using rats and rabbits. In: EAAP 2007, Books of Abstracts of 58th Annual meeting of the European association for animal production, Dublin, Ireland, August 26th-29th, 2007, Session 20, Poster 11, s. 178.

EFSA (2008): Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. Food Chem Toxicol 46: S2–S70. (http://www.plosone.org/article/findcited/4677873)

FLACHOWSKY G., CHESSON A., AULRICH K. (2005): Animal nutrition with feeds from genetically modified plants. Arch. Anim. Nutr., 59, 1, 1-40.

JAMES, C. (2011): Global status of commercialized biotech/GM crops: 2011. ISAAA

KŘÍSTKOVÁ M.(2009): Dosavadní zkušenosti s pěstováním geneticky modifikované Bt kukuřice v ČR 2005−2009. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2009. 44s. ISBN 978-80-7084-871-5. [online]. [cit. 2010-3-12]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/eagri/file/42167/Dosavadni_zkusenosti_Bt_kukurice_v_CR_2005_2009.pdf

SAMPIETRO D.A., DIAZ C.G., GONZALEZ V., VATTUONE M.A., PLOPER L.D., CATALAN C.A., WARD T.J. (2011): Species diversity and toxigenic potential of Fusarium graminearum complex isolates from maize fields in northwest Argentina, Int. J. Food Microbiol. 145, 2011, 359-264.

Corresponding author

Dr. Mária Chrenková
National Agricultural and Food Centre,
Research Institute for Animal Production Nitra,
Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovak Republic
E-mail: chrenkova@cvzv.sk

the nature network®

Martin Bauer Group

Plantextrakt
Natural solutions for animal nutrition

Plant extracts with its active components and functions are a natural and effective solution for a variety of applications in animal feed.

- Digestion promotor
- Immune stimulant
- Antioxidative properties
- Growth promotor
- Antiviral activity
- Antimicrobial activity
- Relaxation properties

Plantextrakt is one of the leading suppliers of herbal and tea extracts worldwide.

- Experience in the world of plants for more than 100 years.
- Over 120 different extracts standardized on parameters such as catechins, polyphenols, anthocyanins or essential oils.
- Registered feed supplier.
- Holistic, controlled supply chain management.
- Large strategic safety stocks.
- Quality controls by our independent and accredited specialist laboratory PhytoLab with focus on plant and plant extracts.

Contact:
Plantextrakt GmbH & Co. KG
Dutendorfer Strasse 5–7
91487 Vestenbergsgreuth
Germany
Tel.: +49 9163 88-149
christian.einicke@plantextrakt.de
www.martin-bauer-group.com

E-mail contact:

Influence of growth stage of grasses and clover on dry matter intake of silages in heifers

Oldřich Látal[1], Jan Pozdíšek[1] and Marie Štýbnarová[2]

[1] Research Institute for Cattle Breeding, Ltd., Rapotín, CZ
[2] Agrovýzkum Rapotín Ltd., CZ

Introduction

Testing of Voluntary intake (VI) belongs to one of the presumptions for the assessment of the effects of given feedstuffs parameters (e.g. nutritive value, physical characteristics etc.) and their relations to animal production. Using such results we can more effectively and economically utilise the feeds in the feeding rations for cattle. The forage quality reflexes the wide complex of interactions between the sward (fodder crop) and the animal (Míka *et al.*, 1997).

The growth stage determinates the proportion and the composition of the cell wall carbohydrates. Whereas the rumen microbes can degrade the fibre carbohydrates (cellulose, hemicelluloses) to a certain degree depending on lignifications, lignin itself is indigestible and the most significant factor limiting the availability of plant cell walls to herbivores (Gruber *et al.,* 2011). It is the most significantly influenced by the concentration of crude fibre which is changing together with other plant compounds under ongoing plant tissues lignifications. With increasing crude fibre concentration the organic matter digestibility decreases. The crude fibre content is also limiting factor of the voluntary intake (Gruber *et al.*, 2000; Givens *et al.*, 2002; Gruber *et al.*, 2011). Taking into consideration the animals´ requirements there is evident, that the higher animals´ performance signifies the higher demand for the forage quality (Míka *et al.*, 1997). The forage from the following cuts has the higher concentration of crude protein, ash and mineral substances, and the lower concentration of crude fibre (Míka *et al.*, 1997; Kohoutek and Pozdíšek, 2005).

The nutritive value is changing significantly with the plants maturity. The energy concentration in the first spring growth of grasses decreases weakly by 0.25 – 0.30 MJ/kg DM (dry matter), and subsequently the crude fibre concentration increases (Kohoutek and Pozdíšek, 2005). Gruber *et al.* (2011) found on average of three growths during 7 weeks of vegetation, the NDF content increase from 542.0 g/kg DM to 608.0 g/kg DM and the organic matter digestibility decrease from 77.3 % to 63.8 %. The forage intake was reduced from 25.80 g/kg body weight (BW) to 18.10 g/kg BW. Krizsan and Randby (2007) found out the values of VI between 17.90 – 26.50 g/kg BW by the ADF concentration 325.0 – 383.0 g/kg DM in heifers of the Norway red cattle breed. Pozdíšek and Kohoutek (1998) tested VI of four grass varieties conserved by freezing (190.6 – 268.5 g/kg DM of CF) at the level of VI 24.80 – 30.60 g/kg BW in heifers (mean 300.0 kg BW – tie stall housing) from milk cross breeder cows.

The aim of this work was assessment of VI of silages made from two perspective intergeneric grass hybrids *Festulolium* (Hykor and Perun) and red clover var. Amos (4n) from two different harvests in heifers from suckler cow rearing system.

Materials and methods

In experiments, there were chosen two perspective intergeneric grass hybrids *Festulolium* (Hykor and Perun) and red clover var. Amos (4n). Pilot plant plots (area of 1 ha) for the silage production utilised

for feeding trials were established on the holdings of the Haná Agricultural Company plc. Experiment was established in 2010 using spring barley as a cover plant that was harvested in time for GPS. In the first crop year (2011) there were conducted harvests of intergeneric grass hybrids *Festulolium* Hykor, Perun, red clover var. Amos at two different dates: **I** [at the end of the grass shooting growth stage – 19/20 May 2011; stage R1, Míka *et al.*, 1997] and **II** [with the time postponement by ca 14 days; 3/4 June 2011]. The swards were fertilized in the spring with the dose of N_{60}+$P_{35}K_{100}$ (pure nutrients). After the forage was harvested, left wilted and chopped to the standard chop length using the chopping technology for the round bale silage making (high pressure forage baler) it was wrapped with plastic and transported to the Research Institute for Cattle Breeding, Ltd. for its storage and for feeding trials.

Six experiments were conducted from 2012 to 2013 on six heifers (Czech Fleckvieh with 25 % meat breeds – Limousine from a suckler cow rearing system (300 ± 15 kg BW). Heifers were housed in loose-box housing (four automatic roughage intake control troughs RIC management 1.7, Insentec B.V.). Each experiment was divided into a habituation period (14 d) and a testing period (10 d) according the certified method Látal and Pozdíšek (2010).

The spectrum of nutrients (crude protein – CP, crude fibre – CF, ash, fat, neutral detergent fibre – NDF and acid detergent fibre – ADF in silages were analyzed in accordance with the EU Commission Regulation 152/2009 and the valid Czech legislation 91/1996 "On Feeds" as amended. The *in vitro* organic matter digestibility (OMd) was determined by the *in vitro* procedure of Tilley & Terry according the certified method Štýbnarová and Pozdíšek (2009). The energy content (NEL) was predicted by means of a regression equation (Pozdíšek *et al.*, 2003). The value of PDIN and PDIE was calculated according Jarrige *et al.* (1989). For the statistical evaluations of VI a linear regression model was used with mixed effect (using statistical program R, level of significance $P<0.05$).

Results and discussion

By different harvest date of grasses inscribed as I and II (see tables 1 and 2) it was observed the decrease of NEL concentration from max. 6.07 MJ/kg DM to min. 4.53 MJ/kg DM, crude protein concentration from max. 95.7 g/kg DM to min. 57.1 g/kg DM and organic matter digestibility from max. 71.2 % to min. 57.3 %). On the other hand increased as I and II the value of NDF content rose from min. 415.5 g/kg DM to max. 700.7 g/kg DM and the CF content rose from min. 213.8 g/kg DM to max. 396.5 g/kg DM.

Table 1: Nutrient content of silages

Species	CP g/kg DM	Fat g/kg DM	CF g/kg DM	NFE g/kg DM	Ash g/kg DM	ADF g/kg DM	NDF g/kg DM
Hykor I	95.7	24.3	269.6	514.4	96.0	320.6	556.3
Perun I	85.3	21.4	213.8	617.8	61.7	254.3	415.5
Amos I	227.2	33.2	234.1	400.3	105.2	281.7	373.5
Hykor II	68.2	21.1	396.5	430.2	84.0	429.4	700.7
Perun II	57.1	21.4	367.2	482.8	71.5	413.9	626.8
Amos II	140.6	20.3	341.4	394.9	102.8	410.9	512.1

I or II = harvesting day, CP – crude protein, CF – crude fibre, NFE – nitrogen free extract, DM – dry matter

By different harvest date of red clover inscribed as I and II (see tables 1 and 2) it was observed the decrease of NEL concentration from 6.01 MJ/kg DM to 4.88 MJ/kg DM, crude protein concentration from 227.2 g/kg DM to 140.6 g/kg DM and organic matter digestibility from 74.4 % to 62.2 %).

On the other hand increased as I and II the value of NDF content rose from 373.5 g/kg DM to 512.1 g/kg DM and the CF content rose from 234.1 g/kg DM to 341.4 g/kg DM.

The same tendencies were reported by Pozdíšek *et al.* (2010) and Gruber *et al.* (2010, 2011). The ratio PDIN:PDIE, was near the value 1, as mentioned Pozdíšek (2008), in red clover Amos II (1.090).

Table 2: Nutrient content and voluntary intake of silages by different harvesting day

Species	OMd	BW	NEL	PDIN/ PDIE	Voluntary dry matter intake			
					Mean per harvest		Mean per test	
	%	kg	MJ/kg		Mean	SE	Mean	SE
					g/kg BW			
Hykor I	68.9	295	5.59	0.758	24.02	2.43	23.45	2.55
Perun I	71.2	300	6.07	0.600			24.55	2.35
Amos I	74.4	305	6.01	1.560			23.86	2.86
Hykor II	57.3	285	4.53	0.647	18.48	2.56	16.77	2.56
Perun II	58.3	290	4.70	0.554			18.44	2.44
Amos II	62.2	295	4.88	1.090			19.86	2.58

I or II = harvesting day, BW = mean body weight in group; SE = standard error per group; OMd – organic matter digestibility

The statistical analyses confirmed the higher VI ($P<0.05$), see table 2, in I (24.02 g/kg BW, SE = 2.43) than in II (18.48 g/kg BW, SE = 2.56 g/kg BW). The value of VI of silages in the first harvest date ranged from min. 23.45 g/kg BW, SE = 2.55 (Hykor I) to max. 24.55 g/kg BW, SE = 2.35 (Perun I). In the second harvest date the value of VDMI ranged from min. 16.77 g/kg BW, SE = 2.56 (Hykor II) to max. 19.86 g/kg BW, SE = 2.58 (Amos II). Our results are in line with Gruber *et al.* (2011) who studied average of three growths during 7 weeks of grassland vegetation and they found that the forage intake was reduced from 25.80 g/kg BW to 18.1 g/kg BW in dairy cows.

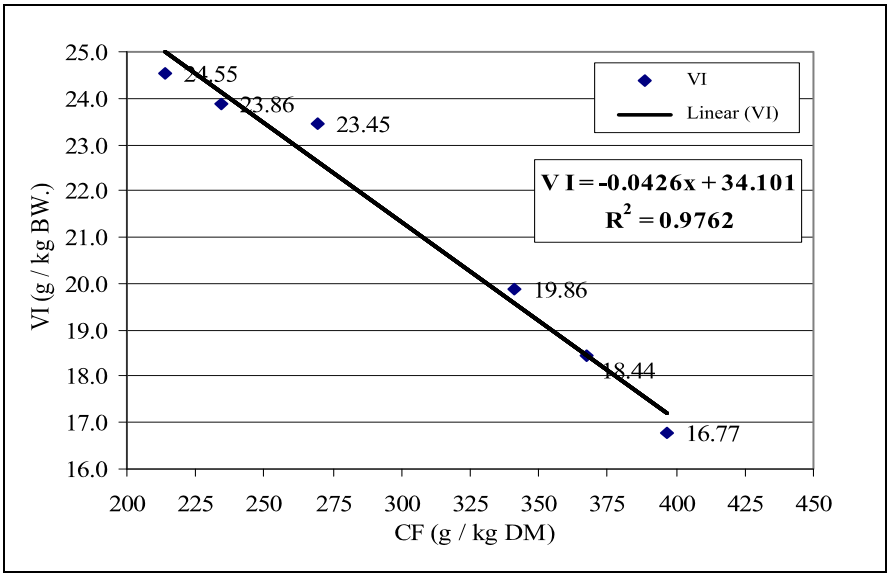


Figure 1: Relationship between VI and CF content

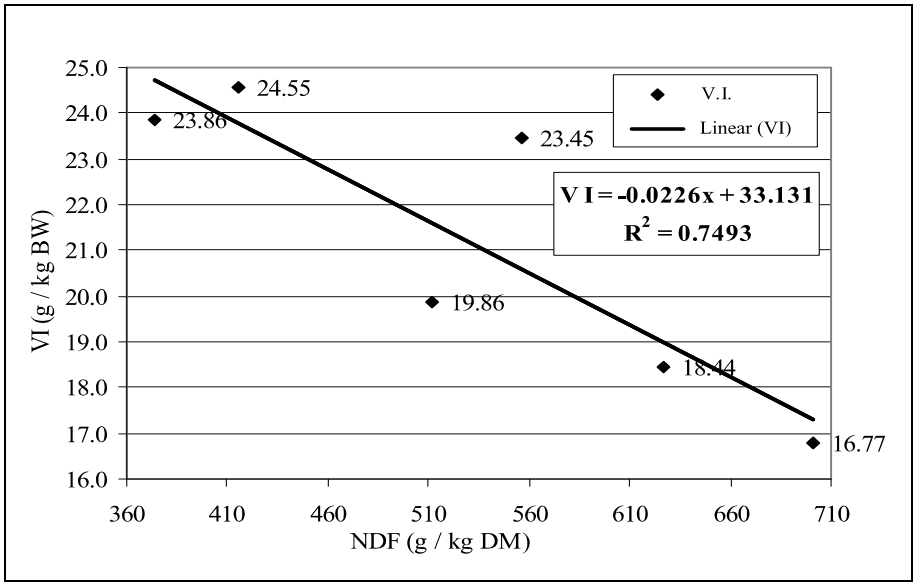


Figure 2: Relationship between VI and NDF content

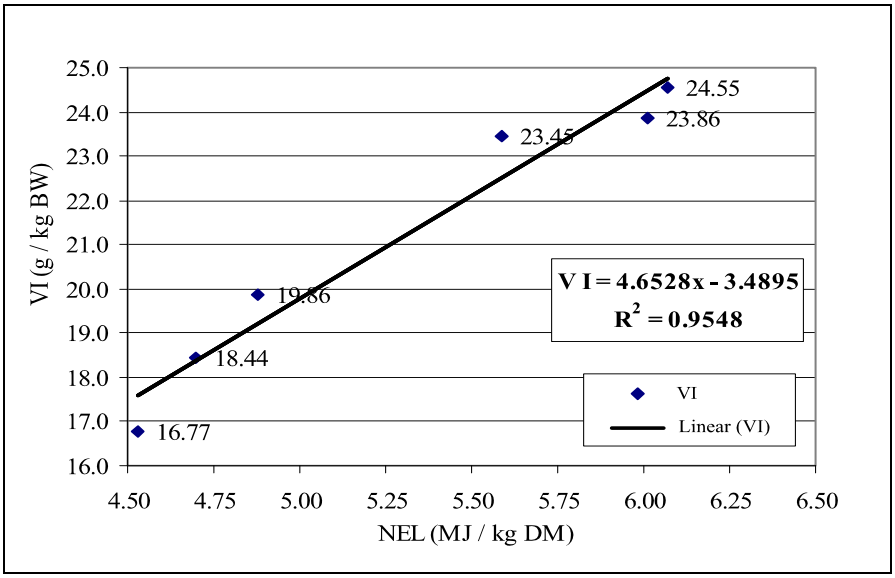


Figure 3: Relationship between VI and NEL concentration

Krizsan and Randby (2007) found VI of grass silages form 17.90 g/kg BW to 26.50 g/kg BW at level of ADF from 325.0 g/kg DM to 383.0 g/kg DM in heifers. Pozdíšek and Kohoutek (1998) tested VI of four grass varieties conserved by freezing 24.80 – 30.60 g/kg BW at level of CF between 190.6 g/kg – 268.5 g/kg DM in milk cross breeder heifers (mean 300.0 kg BW). Givens *et al.* (2002); Gruber *et al.* (2000, 2002, 2011); Míka *et al.* (1997); Zeman *et al.* (2006) found that the CF content and nutritive value are also limiting factors of the VI.

There was a negative correlation (r = -0.98; $P<0.05$) between VI and the CF (see figure 1). This negative correlation was reported also by Míka *et al.* (1997). There was found negative correlation (r = -0.86; $P<0.05$) between VI and NDF concentration (see figure 2). Givens *et al.* (2002) con-

firmed a negative correlation between VI and NDF concentration. There was a positive correlation (r = 0.98; *P<0.05*) between VI and the NEL (see figure 3).

Conclusion

We found out in our experiments higher VI (P<0.05) in the first harvest date (24.02 g kg^{-1} BW, SE = 2.43) than in the second harvest date (18.48 g/kg BW, SE = 2.56). By different harvest dates of forages inscribed as I and II, it was observed the weekly decrease of VI by 2.00 g/kg BW in red clover and by 3.20 g/kg BW in grasses. The same tendencies we confirmed in NEL concentration, the value weakly decreased by 0.61 MJ/kg DM in grasses and by 0.56 MJ/kg DM in clover. On the other hand (from I to II) the value of NDF content weekly increased by 69.3 g/kg DM in clover and 88.9 g/kg DM in grass and the CF content increased by 53.7 g/kg DM in clover and by 70.1 g/kg DM in grasses. Based on our results we can conclude, that it is important to keep optimal harvest date (the end of the shooting growth stage) to have better voluntary intake and better nutritive value of feeds in ruminant nutrition.

Acknowledgement

The work was supported by the institutional support for the long-term conceptual development of the research organisation, Ministry of Agriculture Decision No. RO0313 from the date 28th February 2013, and by the project NAZV No. QI101C199.

References

Anonym (1996): *Zákon „O krmivech".* Sbírka zákonů ČR. Zákon číslo 91/1996 Sb. ze dne 25.4.1996 ve znění pozdějších předpisů. Ministerstvo vnitra Praha.

Anonym (2009): *Metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv.*Nařízení komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009.

Givens, D. I. (ed.) (2002): *Forage evaluation in ruminant nutrition*. CABI publishing, 2002. ISBN: 0-85199-344-3.

Gruber, L., Steinwidder, A., Guggenberger, T., Schauer, A., Häusler, J., Steinwender, R., Steiner, B. (2000): *Einfluss der Grünlandbewirtschaftung auf Ertrag, Futterwert, Milchezeugung und Nährstoffausscheidung..* In: *Bericht 27. Viewirtschaftliche Fachtagung*, BAL Gumpenstein 6.–8. 6. 2000, s. 41–88. ISBN 3-901980-43-1.

Gruber, L., Steinwidder, A., Greimel, M. (2002): *Vliv obhospodařování travních porostů na výnos, krmnou hodnotu, produkci mléka a koloběh živin.* In *Chov a šlechtění skotu pro konkurenceschopnou výrobu a obhospodařování drnového fondu*. VÚCHS Rapotín, 2002, s. 62-68.

Gruber, L. (2010): *NDF zur Beschreibung der Struktur der Futterration und der Pansenfermentation.* In: *37. Viehwirtschaftliche Fachtagung*, 13.–14. April 2010, Bericht LFZ Raumberg-Gumpenstein, s. 7–22. ISBN 978-3-902559-42-5

Gruber, L., Schauer, A., Häusler, J., Adelwöhrer, A., Urdl, M., Südekum, K.H., Wielscher, F., Jäger, R. (2011): *Einfluss des Vegetationsstadiums von Wiesenfutter auf Verdaulichkeit, Futteraufnahme und Milcherzeugung.* In: 38. Viehwirtschaftliche Fachtagung, 13.-14. April 2011, Bericht LFZ Raumberg-Gumpenstein, s. 43-65. ISBN 978-3-902559-59-3

Jarrige, R. (ed.) (1989): *Ruminant nutrition – recommended allowances & feed tables*. INRA/John Libbey Eurotext-Editions Medicine-Sciences, Montrouge. 390 p.ISBN 978-0861962471

Kohoutek, A., Pozdíšek, J. (2005): *Vliv obhospodařování travních porostů na výnos, kvalitu a konverzi píce skotem.* In: Sborník z mezinárodní vědecké konference *„Kvalita píce z travních porostů*", VÚRV Praha-Ruzyně, 9. 11. 2005, s. 19–32. ISBN 80-86555-75-5

Krizsan, J., Randby, A. T. (2007): The effect of fermentation duality on voluntary intake of grass silage by growing cattle fed silage as the sole feed. *J. Anim. Sci*. 2007, 85, pp. 984–996. ISSN 0021-8812.

Látal, O., Pozdíšek, J. (2010): *Provádění testů dobrovolného příjmu sušiny objemných krmiv pro jejich využití ve výživě přežvýkavce*. 1. vyd. Rapotín: Agrovýzkum Rapotín s.r.o., 2010. 62 s. Applied certified method.

Míka, V., Harazim, J., Kalač, P., Kohoutek, A., Komárek, P., Pavlů, V., Pozdíšek, J. (1997): Kvalita píce. ÚZPI, Praha, 227 s. ISBN 80-96153-59-2

Pozdíšek, J., Kohoutek, A. (1998): Voluntary intake of fresh forage of selected grass species conserved by freezing in cattle. *Czech J. Anim. Sci.*, 1998, 43 (8), pp. 349–354. ISSN 1212-1819.

Pozdíšek, J., Loučka, R., Machačová, E. (2003): Digestibility and nutrition value of grass silages. Czech J. Anim. Sci., 48, 2003 (9): 359 – 364. ISSN 1212-1819

Pozdíšek, J. (2008): *Možnosti uplatnění travních porostů ve výživě dojnic.* In: Sborník z mezinárodní vědecké konference „Výživa dojnic", VÚCHS Rapotín, 49-57. ISBN 978-80-260-0713-5

R Development Core Team (2008): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.

Štýbnarová, M., Pozdíšek, J., (2009): *Stanovení stravitelnosti organické hmoty objemných krmiv (trvalých travních porostů a víceletých pícnin) modifikovanou in vitro metodou podle Tilley a Terry.* (uznána dne 23. 11. 2009 Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským a schválená a zařazená do RIV dne 7. 12. 2009 Odborem výzkumu a vývoje MZe).

Zeman, L., Doležal, P., Kopřiva, A., Mrkvicová E., Procházková, J., Ryant, P., Skládanka, J., Straková, E., Suchý, P., Veselý, P., Zelenka, J. (2006): *Výživa a krmení hospodářských zvířat.* Profi Press, Praha. 360 s. ISBN 80-86726-17-7

Corresponding author

Ing. Oldřich Látal, Ph.D.
Research Institute for Cattle Breeding, Ltd.
Vyzkumniku 267, 788 13 Vikyrovice, Czech Republic
Tel: +420 583 392 151
E-mail: oldrich.latal@vuchs.cz

Parameter der ruminalen Fermentation pansenfistulierter Rinder bei Wechsel von energie- und rohfaserreicher Fütterung

Carmen Fahn, Dorothea Hörndl und Wilhelm Windisch

Lehrstuhl für Tierernährung, Technische Universität München, DE

Einleitung

Der Pansen stellt ein vorwiegend anaerobes Ökosystem dar, in welchem sich bis zu 7 kg Bakterienfrischmasse (cellulolytische, proteolytische, lipolytische und amylolytische Bakterien), Protozoen, Pilze sowie Archaeen befinden (Kirchgeßner, 2011). Für das Wirtstier sind nur die Bakterien lebensnotwendig (Löffler und Gäbel, 2009). Die Pansenmikroben schließen zwischen 65 und 85 % der verdaulichen Futtertrockenmasse im Pansen auf wobei flüchtige Fettsäuren, Kohlendioxid und Methan als quantitativ erfassbare Endprodukte dieser Fermentationsprozesse anfallen. Dabei kommt es zu diversen Interaktionen innerhalb des ruminalen Mirkobioms wie auch zwischen Metagenom und Wirtsgenom (Gürtler et al., 1989). Welche Arten bzw. Gattungen der Mikroorganismen im Pansen vertreten sind, hängt unter anderem von der Rationszusammensetzung ab. Dies zeigt sich sehr deutlich beim Vergleich des Acetat:Propionat-Verhältnisses nach rohfaser- bzw. stärkereicher Fütterung, das sich entweder zugunsten der Essigsäure oder der Propionsäure verschiebt. Demgegenüber stimulieren Saccharose bzw. Glucose in der Ration die Buttersäurebildung. Die Messung solcher (bio)chemischen Endpunkte stellt ein wichtiges Werkzeug dar, um ein tieferes Verständnis für die Interaktionen zwischen Pansenmikrobiom und Umwelt (Fütterung) zu gewinnen.

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, inwiefern sich ein Wechsel von einer rohfaserreichen (Heu) zu einer energiebetonten Ration (Maissilage) und umgekehrt auf die Fermentationsprodukte sowie auf die Mikroorgansimen im Pansen auswirkt. Hierbei war insbesondere der Grad und die Dauer der Response in der Umstellphase Gegenstand der Untersuchungen. Gemessen wurden der pH-Wert im Pansensaft, die Konzentrationen an Ammoniak und flüchtigen Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat) sowie die Gesamtheit der Bakterien im Pansensaft mittels qPCR.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen standen acht pansenfistulierte (Bar Diamond Inc., Parma, Idaho, USA; 10 cm Durchmesser), nicht-laktierende Milchkühe der Rasse Holstein Friesian mit einer Lebendmasse von ca. 650 kg zur Verfügung. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Stall gehalten. Die Fütterung erfolgte täglich um 7 und 16 Uhr sowie auf dem Niveau des energetischen Erhaltungsbedarfs mit einer täglichen Futteraufnahme von ca. 6,5 kg T. Tränkwasser und Salzblöcke standen ad libitum zur Verfügung.

Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen zu je vier Kühen eingeteilt. Eine Gruppe erhielt bei Versuchsbeginn eine rohfaserreiche, die andere Gruppe eine energiebetonte Futterration. Die rohfaserreiche Ration bestand aus 50 % Heu und 50 % Grassilage bezogen auf T und enthielt 5,6 MJ NEL pro kg T sowie ca. 28 % Rohfaser. Die energiebetonte Ration setzte sich aus 49 % Maissilage, 15 % Grassilage, 20 % Körnermais, 6 % Sojaextraktionsschrot (SES, 44 %) und 10 % Heu bezogen auf T zusammen. Pro kg T enthielt diese Ration 6,8 MJ NEL und 19 % Rohfaser.

Nach einer Adaptionsphase an die Futterrationen von 21 Tagen wurde als Kontrollwert eine Pansensaftprobe über die Pansenfistel entnommen. Anschließend erfolgte die Umstellung der Ration, so dass die Gruppe mit der rohfaserbetonten Ration nun die energiereiche Ration erhielt und umgekehrt. Nach

weiteren 28 Tagen wurden die Fütterungsgruppen wieder auf die jeweilige Ausgangsration zurückgetauscht und für weitere 4 Wochen gefüttert. Während der gesamten Versuchsperiode erfolgte die Entnahme des Pansensaftes (ca. 200 ml) jeweils um 7 Uhr vor der Fütterung im folgenden Zeitintervall: 0 Tage (Tag der Umstellung), 1, 2, 4, 7, 14, 21 sowie 28 Tage nach jeder Rationsumstellung.

Ein Teil des entnommenen Pansensaftes wurde sofort für die Messung des pH-Wertes (pH-Meter SCHOTT GC 842, Schott AG, Mainz, Deutschland) verwendet.

Für die anschließende Bestimmung von Ammoniak wurde der Pansensaft bei 9000 *g* für 15 Minuten zentrifugiert. Von der flüssigen Phase wurden 10 ml zur Fettsäurenanalyse abgenommen. Der restliche Überstand wurde in Polyflaschen zur Ammoniakanalytik abdekantiert und eingefroren. Ein weiterer Teil des Pansensaftes wurde für die Bestimmung der bakteriellen DNA mittels qPCR sofort tiefgefroren, gefriergetrocknet und anschließend in einem gereinigten Porzellanmörser vermahlen und homogenisiert.

Die Ammoniakmessung fand an einem Spektralphotometer UVmc2 (SAFAS Monaco, Monaco) bei einer Wellenlänge von 340 nm statt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Testkits „Ammonia Enzymatic UV – Method" (RANDOX Laboratories Limited, Crumlin, United Kingdom) nach Herstellerangaben. Als Referenzprobe diente Wasser. Alle Proben wurden im Doppelansatz gemessen.

Zur Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren (FFS) wurden 10 ml des zentrifugierten Pansensaftes mit 1,5 ml Phosphorsäure (25 %) und 0,5 ml konzentrierter Ameisensäure gemischt und anschließend nochmals 20 Minuten bei 9000 *g* zentrifugiert. Die flüssige Phase wurde in Polyflaschen abgefüllt und eingefroren. Die Messung erfolgte an einem Gaschromatographen der Marke Clarus 580 (Perkin Elmer, Waltham, USA), ausgestattet mit einem Flammen–Ionisationsdetektor (FID). Es wurden die On Column-Einspritz-Methode und ein externer Standard verwendet. Der Standard setzte sich aus 250 µl „Free Fatty Acids Test Standard" (Restek Corporation, Bellefonte, United States) und 850 µl Metaphosphorsäure zusammen. Als Verdünner wurde Metaphosphorsäure (2 %) verwendet. Für die Probe wurden 850 µl Metaphosphorsäure, 125 µl Wasser und 125 µl aufgetauter Pansensaft vermischt und durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm aus Teflon) gefiltert. Als Trägergas diente Stickstoff. Die Injektortemperatur betrug 95 °C, die Detektortemperatur 275 °C. Gemessen wurden Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure und Iso–Buttersäure.

Die Extraktion der bakteriellen DNA aus dem Pansensaft erfolgte mittels Phasentrennung nach Zugabe der Reagenzien Qiazol (Qiagen, Deutschland) und Chloroform. Die qPCR wurde mit dem SensiFast SYBR, No-ROX Kit (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer (10 pM/µl) zum Nachweis der allgemeinen Bakterien wurden aus der Literatur übernommen (Denmann und McSweeny, 2006) und von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Der verwendete Mastermix bestand pro Reaktion aus 7,5 µl SYBR Green, 0,6 µl Primer forward, 0,6 µl Primer reverse, 4,8 µl Nuklease-freiem Wasser und jeweils 1,5 µl DNA-Extrakt. Die Messung erfolgte auf einer 96-well Platte im Doppelansatz. Die qPCR wurde mit dem Mastercycler Gradient (Eppendorf, Deutschland) nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: Aktivierung der Polymerase (2 min, 95 °C), anschließend 40 Zyklen mit Denaturierung (5 s, 95 °C), Annealing (10 s, 60 °C) und Elongation (8 s, 72 °C). Die Proben wurden mittels Standardkurve absolut quantifiziert.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SAS-Software (SAS 9.3, Cary, USA). Es wurden Varianzanalysen sowie ein Mittelwertvergleich nach Student-Newman-Keuls mit einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen im Folgenden signifikante Unterschiede innerhalb einer Ration.

Ergebnisse

Die nachfolgende Abbildung (Abbildung 1) stellt den Verlauf des pH-Wertes in der Umstellungsphase dar. Hierbei stieg der pH-Wert bei der Umstellung von der energiereichen Ration auf die rohfaserrei-

che Ration bis 14 Tage nach der Umstellung langsam an und sank anschließend bis zum 28. Tag wieder auf den Ausgangswert ab (p<0,01). Bei der Umstellung von der rohfaserreichen Ration auf die energiebetonte Ration fiel dagegen der pH-Wert am ersten Tag nach der Umstellung signifikant ab und stieg anschließend wieder an, erreichte aber nicht den Ausgangswert (p<0,01).

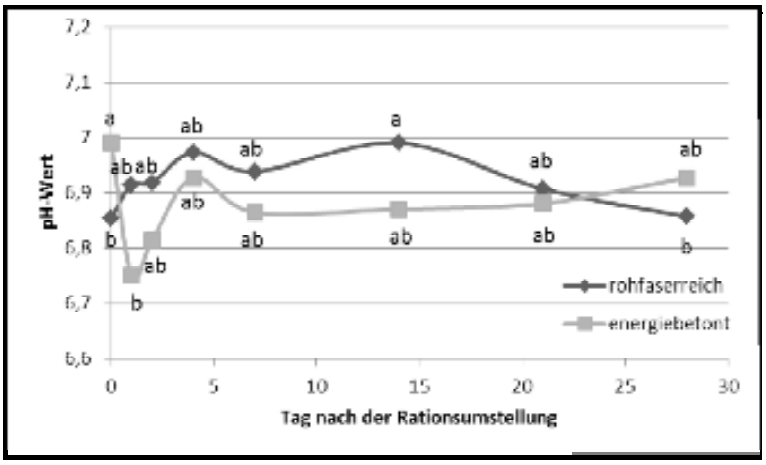


Abbildung 1: Verlauf des pH-Wertes im Pansensaft bei rohfaserreicher und energiebetonter Fütterung an verschiedenen Tagen nach der Futterumstellung (n=8). Multiple Range Test nach Student-Newman-Keuls (p≤0,05).

Bei der Umstellung von rohfaserreicher Fütterung zur energiebetonten Fütterung bzw. umgekehrt unterschieden sich die im Pansensaft gemessenen Ammoniakgehalte weder innerhalb einer Ration (rohfaserreich: p=0,16; energiebetont: p=0,40) noch zwischen den beiden Rationen signifikant (p=0,21).

Bezüglich der Essigsäure gab es zwischen den beiden Rationen keine statistisch signifikanten Unterschiede (p=0,16). Bei der Umstellung von der rohfaserreichen Ration zur energiebetonten Ration war ein Trend hin zu abnehmenden Gehalten zu erkennen (p<0,1). Die Umstellung auf die rohfaserreiche Ration hatte nach etwa 7 Tagen einen statistisch signifikanten Abfall des Essigsäuregehaltes im Pansen zur Folge, der bis Tag 14 anhielt und anschließend bis Tag 28 wieder signifikant stieg (p<0,01). Die Propionsäure verhält sich bei der Rationsumstellung ähnlich der Essigsäure. So zeigten sich auch hier zwischen den beiden Rationen keine statistisch signifikanten Unterschiede (p=0,38). Ebenso war die Umstellung zur energiebetonten Ration mit keinen signifikanten Veränderungen des Propionsäuregehaltes im Pansensaft verbunden (p=0,15). Bei der Umstellung auf die rohfaserreiche Ration verhielt sich der Propionsäuregehalt analog zum Essigsäuregehalt (p<0,01) (Abbildung 2). Bei der Umstellung auf eine energiereiche Ration zeigte sich sowohl bezogen auf die Essigsäure als auch auf die Propionsäure ein oszillierender Verlauf in den ersten Tagen nach der Umstellung.

Bezüglich des Buttersäuregehaltes gab es sowohl zwischen den beiden Rationen als auch innerhalb beider Rationen statistisch signifikante Unterschiede (p<0,01). Die Umstellung auf die rohfaserreiche Ration hatte ca. bis zum 14. Tag einen Abfall des Buttersäuregehaltes im Pansen zur Folge, der bis Tag 28 wieder stieg. Bei der Umstellung auf die energiebetonte Ration zeigte sich ein oszillierender Verlauf, wobei sich der Buttersäuregehalt nach 7 Tagen nach der Umstellung auf ein konstantes Niveau einpendelte (Abbildung 3).

Die nachfolgende Abbildung (Abbildung 4) zeigt die Entwicklung der ruminalen Bakteriendichte im Zeitverlauf nach der Rationsumstellung. In der Umstellungsphase von energiereicher zu rohfaserreicher Fütterung war eine signifikante Reduktion der DNA-Kopien bereits einen Tag nach der Futterumstellung erkennbar (p<0,01). Von Tag 1 bis 28 nach der Futterumstellung blieb die Bakteriendichte

konstant. Entgegengesetzt dazu verhielt sich die Bakterienpopulation bei der Umstellung von rohfaserreicher zu energiebetonter Fütterung. Hier stieg die Bakteriendichte bereits 24 h nach der Umstellung signifikant an ($p<0,01$) und blieb anschließend weitestgehend auf gleichem Niveau.

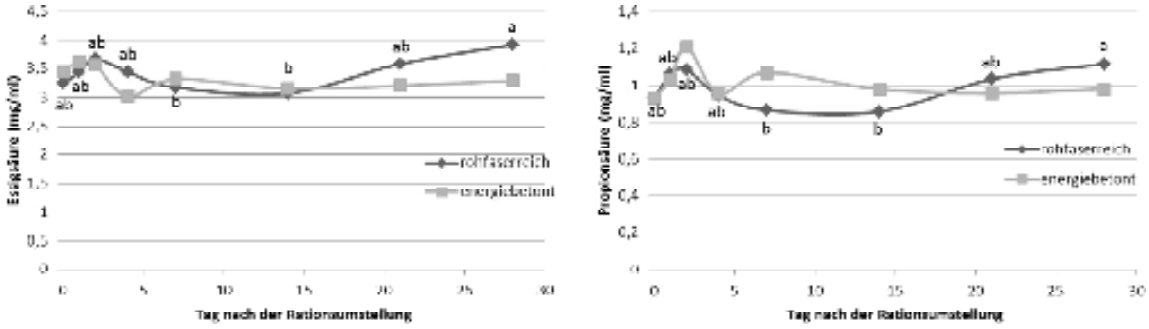


Abbildung 2: Verlauf des Essigsäuregehaltes (links) sowie des Propionsäuregehaltes (rechts) im Pansensaft bei rohfaserreicher und energiebetonter Fütterung an verschiedenen Tagen nach der Futterumstellung (n=8). Multiple Range Test nach Student-Newman-Keuls ($p\leq0,05$).

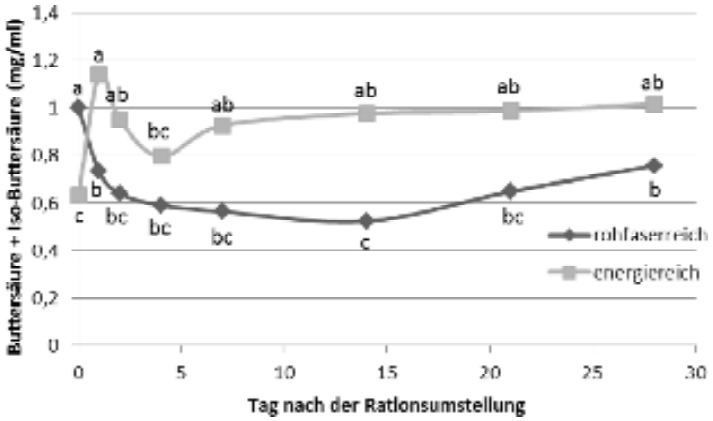


Abbildung 3: Verlauf des Buttersäure- und Iso-Buttersäuregehaltes im Pansensaft bei rohfaserreicher und energiebetonter Fütterung an verschiedenen Tagen nach der Futterumstellung (n=8). Multiple Range Test nach Student-Newman-Keuls ($p\leq0,05$).

Diskussion

Es zeigte sich, dass die Umstellung bezogen auf die Parameter der ruminalen Fermentation (pH-Wert, Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure + Isobuttersäure) von einer heureichen Ration auf eine maissilagebetonte Ration nach ca. 4-7 Tagen nahezu abgeschlossen war, wohingegen die Anpassung in die umgekehrte Richtung bis zu Tag 28 nach der Umstellung andauerte. Weiterhin wies insbesondere die Anpassung von der rohfaserreichen auf die maissilagebetonte Ration innerhalb der ersten Tage nach der Umstellung einen ausgeprägten oszillierenden Verlauf auf.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, war auch in dieser Studie die mittlere Dichte der Bakterien-DNA bei rohfaserreicher Ration deutlich geringer (etwa um Faktor 10^2) als bei der energiebetonten Ration (Kirchgeßner, 2011). Diese Änderung war bereits 1 Tag nach der Umstellung abgeschlossen und zwar unabhängig von der Richtung der Umstellung. Die Zusammensetzung innerhalb der Bakteri-

enpopulation, also die Dichte an cellulolytischen, proteolytischen und amylolytischen Bakterien, könnte sich allerdings auch noch im weiteren Verlauf nach der Umstellung geändert haben.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Menge der Fermentationsprodukte nicht nur von der Anpassung der Mikroorganismen abhängt, sondern auch durch physiologische Reaktionen des Wirtstieres beeinflusst wird (z.B. Wiederkauverhalten, Synthese von Transportern für die Absorption flüchtiger Fettsäuren bzw. Sekretion von Bicarbonatanionen).

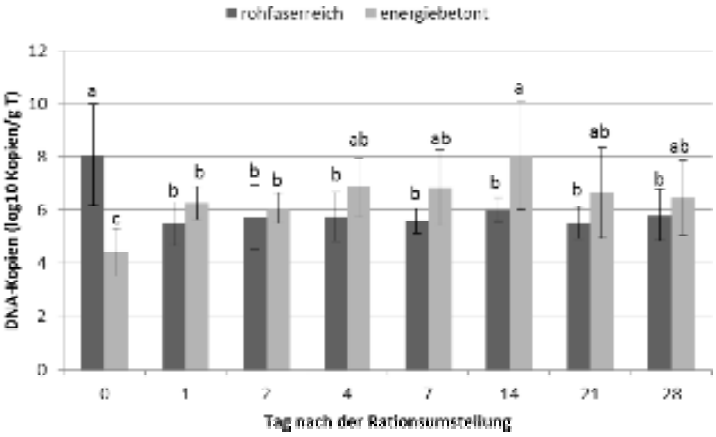


Abbildung 4: Entwicklung der Population an Bakterien (Gesamtsumme) im Pansensaft (log10 DNA-Kopien/g T) bei rohfaserreicher und energiebetonter Fütterung an verschiedenen Tagen nach der Futterumstellung (n=8). Multiple Range Test nach Student-Newman-Keuls (p≤0,05).

Schlussfolgerung

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Adaption an eine neue Futterration stark variiert. Zudem implizieren die Ergebnisse, dass sich nicht nur die Bakterienpopulation an eine neue Futterration anpasst und so die Menge der Fermentationsprodukte beeinflusst. Vielmehr scheint auch das Wirtstier die Gehalte der Fermentationsprodukte durch physiologische Prozesse zu beeinflussen.

Literatur

Denman, S.E. und McSweeney, C.S., 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. FEMS Microbiol Ecol 58, 572–582

Kirchgeßner, M., 2011. Tierernährung. Frankfurt am Main. DLG-Verlag GmbH

Gürtler, H., Ketz, H.-A., Kolb, E., Schröder, L. und Seidel, H., 1989. Lehrbuch der Physiologie der Haustiere. Stuttgart. New York. Gustav Fischer Verlag

Löffler, K. und Gäbel, G., 2009. Anatomie und Physiologie der Haustiere. Stuttgart (Hohenheim). UTB.

Autorenanschrift

Dr. Carmen Fahn
Lehrstuhl für Tierernährung; Technische Universität München
Liesel-Beckmann-Straße 2; 85354 Freising (Weihenstephan), Deutschland
E-Mail: carmen.fahn@wzw.tum.de

XTRACT®

GUT PROVED EFFECTS

- Standardized combinations of active substances naturally occurring in aromatic plants and spices, selected for their proven in-vivo effects
- The tool to promote performance and defence across many animal species
- Micro-encapsulation technology ensuring superior stability and consistent product performance

Vertrieb Österreich / Distribution Austria:
BonAgro
Campus 21, Businesspark Wien-Süd
Liebermannstrasse F05/302/6
2345 Brunn am Gebirge
Tel. +43(0)18907785
Email: office@bonagro.at

www.pancosma.com

Pancosma
makes sense

A protected blend of phytonutrients is a natural alternative to monensin in beef feedlot diets

C. Oguey[1], F. M. Hagg[2], L. J. Erasmus[3], R. H. van der Veen[2], E. Haasbroek[3] and B. Viel[1]

[1] Pancosma SA, Geneva, CH
[2] Allied Nutrition, ZA
[3] University of Pretoria, ZA

Introduction

The use of feed additives such as ionophore antibiotics (MON, monensin) has proven to be a very successful approach to improving production efficiency of beef animals (Duffield et al., 2012) However, the use of antibiotics to promote productive performance of farm animals has been highly criticized, and banned in EU. Therefore alternatives to these drugs have been developed in order to maintain animal efficiency, minimize economic losses for the actors if the sector, and limit any increase in the meat price. Previous studies have demonstrated that a standardized protected blend of cinnamaldehyde, eugenol and capsicum oleoresin (XT, XTRACT® 7065, Pancosma) improved feed efficiency of beef cattle fed high concentrate diets (Bravo et al., 2009). However, up to now, no direct comparison between XT and MON was available. Therefore the objective of this study was to evaluate the use of XTRACT® 7065 as an alternative feed additive to monensin in beef feedlot diets.

Materials and methods

The study was organized in 2 trials in South Africa. For both trials, the same 2 dietary treatments were tested: 1) MON: basal diet supplemented with Monensin at 21-33 mg/kg DM (Rumensin 20, Elanco), and 2) XT: basal diet supplemented with XTRACT® 7065 at 1.0-1.2 g/hd/d. The diets were fed in 4 feeding periods, and were iso-caloric and iso-nitrogenous for both treatments (10.6-11.7 MJ/kg DM of ME and 13.1-13.7% CP).

In trial 1 (experimental trial), 120 male Bonsmara cattle (200-250 kg BW) were randomly allocated to 12 pens of 10 animals each and to one of the two treatments (6 pens per treatment). In trial 2 , representing a typical commercial context, a total of 780 male beef cattle (200-250 kg BW) were randomly allocated to one of the two treatments (3 pens per treatment; 130 animals per pen).

In both trials, performance parameters per pen were monitored including feed intake, body weight, average daily gain (ADG), and feed conversion ratio. In trial 2, the following health parameters were evaluated after slaughter, in collaboration with a veterinarian: mortality, health status and rumen damage.

All data were subjected to one-way analysis of variance, except dry matter intake (DMI) for which a linear mixed model repeated measures analysis was used. A t-test was used to determine the effect of treatment on variance in DMI.

Results and discussion

The effect of the treatments on performance is detailed in table 1.

Table 1: Effect of the treatments on beef performance in trials 1 and 2

	Trial 1			Trial 2		
	MON	XT	*P*-VALUE	MON	XT	*P*-VALUE
Initial BW (kg)	227.40	226.40	0.08	225.60	225.40	0.89
Final BW (kg)	439.90	429.70	0.27	417.50	429.30	0.01
ADG (kg)	1.82	1.79	0.60	1.70	1.77	0.04
Days on Feed	118.9	119.7	n/a	113.1	115.0	n/a
DMI (kg/d)	8.60	8.87	0.50	8.96	10.05	0.09
F:G (kg/kg)	4.73	4.94	0.19	5.26	5.67	0.26

Results show that on the overall, animals fed XT performed at least as well as those fed MON. In addition compared to MON, in trial 2, XT tended to increase DMI by 1.09 kg/hd/d ($P = 0.09$), without affecting F:G ratio ($P = 0.26$). As a result, in a typical commercial context (trial 2), XT increased ($P < 0.05$) ADG and final BW of cattle versus MON.

This is in agreement with the results of two meta analyses evaluating the effect of these products on top to a basal diet on performance of beef cattle. One was performed on MON (Duffield et al., 2012), the other one on XT (Bravo et al., 2009). A comparative analysis of the effect sizes suggested that XT should improve DMI compared to MON, but that both additives should permit a similar feed efficiency. The results of the present trial confirm that this effectively occurred under commercial conditions.

In addition, in trial 2, XT reduced intake variability from one day to another (see figure 1; variance in DMI of respectively 1.10 and 0.80 for MON and XT, $P < 0.01$).

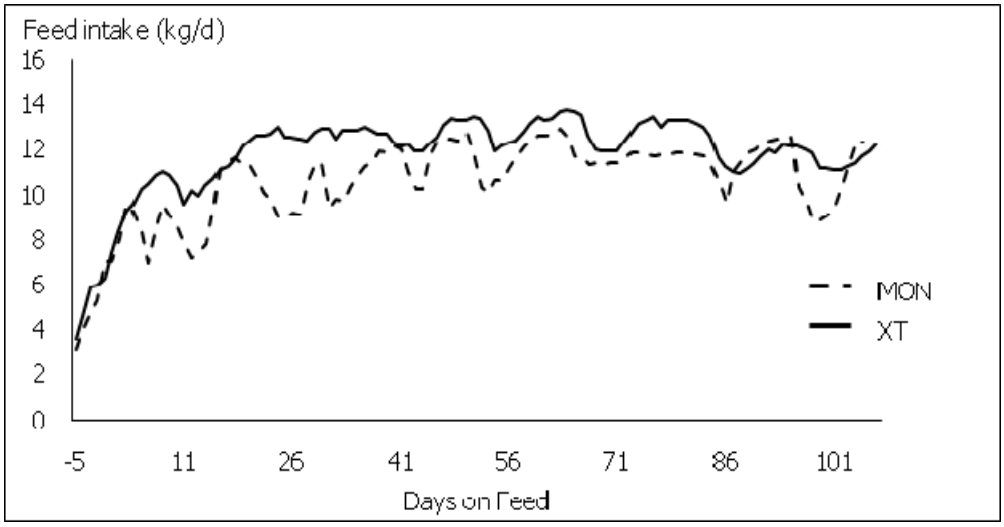


Figure 1: Effect of the treatments on feed intake variation in trial 2

These results are in line with the effect of capsicum present in XT on the fractionation of feed intake pattern in feedlot cattle fed high concentrate diets (Rodriguez-Prado et al., 2008). This beneficial effect of XT on feeding behavior can explain the better rumen health of beef compared to MON (see table 2).

Table 2: Effect of the treatments on beef health in trial 2

		MON	XT	*P*-value
Rumen Damage (%)	Damage	72.9	23.7	< 0.01
	No damage	27.1	76.3	
Health (%)	Healthy	78.1	82.3	0.17
	Pulls	21.9	17.7	
Type of pulls (%)	None	78.1	82.3	0.03
	Digestives	6	5.8	
	Respiratory	15.7	9.9	
	Other	0.3	2	

XT significantly reduced rumen damage of beef at slaughter compared to MON. This suggests that XTimproves rumen integrity and function.

In addition, the type of pulls was affected by the treatment and more specifically, animals fed XT were less treated for respiratory disorders compared to those supplemented with MON. In monogastrics, the phytonutrients present in XT were shown to positively local and systemic immune modulation, which could explain the present observations (Lee et al., 2011; Liu et al., 2013; Wlodarska et al., 2012). However, further studies are needed to confirm this in ruminants.

Conclusion

The substitution of monensin by a standardized protected blend of cinnamaldehyde, eugenol and capsicum oleoresin can be successfully applied in beef cattle fed high concentrate diet without impairing animal performance. In addition, this was also shown to enhance rumen and animal health.

References

Bravo, D., N. A. Pyatt, P. H. Doane, and Cecava M. 2009. Meta analysis of the effect of a blend of eugenol, cinnamaldehyde and capsicum oleoresin on the performance of growing beef cattle . J. Anim Sci. 87:374.

Duffield, T. F., J. K. Merrill, and R. N. Bagg. 2012. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. J. Anim Sci. 90:4583-4592.

Lee, S. H., H. S. Lillehoj, S. I. Jang, K. W. Lee, M. S. Park, D. Bravo, and E. P. Lillehoj. Cinnamaldehyde enhances *in vitro* parameters of immunity and reduces in vivo infection against avian coccidiosis. British Journal of Nutrition 106, 862-869. 2011.

Liu, Y., T. M. Che, M. Song, J. J. Lee, J. A. S. Almeida, D. Bravo, W. G. Van Alstine, and J. E. Pettigrew. 2013. Dietary plant extracts improve immune responses and growth efficiency of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Anim Sci.

Rodriguez-Prado, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, J. Zwieten, L. Gonzalez, and D. Bravo. Effects of cinnamaldehyde-eugenol and capsicum on rumen fermentation and feeding behavior in beef heifers fed a high concentrate diet. Journal of Animal Science 86[E2], 588. 2008.

M. Wlodarska1, B. B. Finlay1, and D. Bravo*2. 2012, Phytonutrients affect the integrity of the mucus layer and susceptibility to enteric pathogens. J. Anim. Sci 90 (Suppl 3): 265

Corresponding author

Clémentine Oguey
PANCOSMA
Voie des Traz 6
1218 Le Grand-Saconnex
Switerland
E-mail: bastien.viel@pancosma.ch

Untersuchungen zum Einsatz von Esparsettesilage in der Milchviehfütterung

Thomas Ettle, Johannes Ostertag und Anton Obermaier

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft, DE

Einleitung

Aufgrund des hohen Gehaltes an anthelmintisch wirksamen kondensierten Tanninen in der Esparsette (Barrau et al., 2005) wird derzeit diskutiert, ob die Verfütterung beim Schaf (Weidevieh) geeignet ist, Endoparasiten zurückzudrängen. Gleichzeitig kann ein hoher Tanningehalt auch zu einem besonders hohen UDP-Gehalt führen, was sich in der Milchviehfütterung günstig auswirken könnte. Vor diesem Hintergrund sollte in vorliegendem Milchviehfütterungsversuch die Einsatzwürdigkeit der Esparsettesilage im Vergleich zur Luzernesilage überprüft werden.

Material und Methoden

An der Versuchsstation Grub der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) wurde ein Fütterungsversuch mit 38 Fleckviehkühen über eine Versuchsdauer von 8 Wochen hinweg durchgeführt. Zu Versuchsbeginn befanden sich die Kühe am 145 ± 85 Laktationstag der 2. Laktation. Es wurden 20 Jungkühe in den Versuch mitaufgenommen. Die Kühe wurden in einem Offenfrontstall mit Liegeboxen und automatischem Melksystem (AMS) gehalten. Die Aufteilung der Tiere erfolgte unter Berücksichtigung von Laktationsstand, Leistung und Milchinhaltsstoffen auf zwei Versuchsgruppen („Luzerne" (Kontrollgruppe) und „Esparsette"). Zusätzlich zu einer ad libitum angebotenen Teilmischration (PMR), wurde ab einer Milchleistung von 25 kg/Tier und Tag Leistungskraftfutter (LKF) nach Leistung verabreicht. Erstlingskühen wurde auf Grund der geringeren Futteraufnahmekapazität ab einer Milchleistung von 23 kg/Tag LKF zugeteilt.

Die PMR in der Gruppe Luzerne basierte auf Maissilage, Grassilage, Maiskornsilage, Heu und Kraftfutter (Tabelle 1). Die in dieser Ration enthaltene Luzernesilage (12,9 % der TM) wurde in der PMR der Gruppe Esparsette vollständig gegen Esparsettesilage ausgetauscht. Das in der PMR enthaltene Ausgleichskraftfutter wurde für beide Versuchsgruppen gleich gestaltet (% der TM: Weizen, 26,0; Rapsextraktionsschrot, 26,0; Sojakuchen, 42,0; Mineralstoffe und Vitamine, 6,0).

Für die PMR der Gruppe Luzerne ergab sich auf Grund der niedrigeren Energiegehalte der Luzernesilage im Vergleich zur Esparsettesilage (Tabelle 2) ein um 0,2 MJ NEL/kg TM niedrigerer Energiegehalt als in der PMR Esparsette. Die Gehalte an Rohnährstoffen und nXP waren zwischen den Rationen vergleichbar.

Bei der Luzerne handelte es sich um einen 2. Schnitt der Sorte Filla im Ansaatjahr. Die Ernte erfolgte am 14.08.2012. Der Aufwuchs wurde mit einem selbstfahrenden Mähaufbereiter auf 7 cm Höhe geschnitten und als Schwad abgelegt. Nach zwei Tagen Feldphase wurde mittels Feldhäcksler unter Zusatz eines chemischen Siliermittels mit den Wirkstoffen Natriumnitrit und Hexamethylentetramin geerntet. Bei der Esparsette stand ein erster Schnitt aus dem Ansaatjahr zur Verfügung. Das Ernteverfahren entsprach dem der Luzerne und wurde am 19.10.2012 mit dem Pressen von Quaderballen abgeschlossen. Auch bei der Esparsette wurde das bei der Luzerne applizierte Siliermittel verwendet.

Von den Einzelkomponenten der Rationen wurden regelmäßig Proben gezogen. Die Rohnährstoff- bzw. Energiegehalte wurden an Mischproben der eingesetzten Futtermittel nach Weender analysiert (Naumann et al., 1997) bzw. mit dem Programm „Zifo" unter Nutzung der hinterlegten Verdaulichkeiten berechnet. Der Gehalt an kondensierten Tanninen (Flavanole) wurde mittels HPLC-MS/MS bzw. HCl-Butanol-Methode bestimmt und betrug < 0,01% bzw. 1 % der TM. Die tägliche Energie- und Nährstoffaufnahme wurde aus den am Futtermischwagen erfassten tatsächlichen Einwaagen der Futtermittel und deren analysierten Gehalten berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket SAS (Varianzanalyse, Mittelwertsvergleich). Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) wurden mit unterschiedlichen Hochbuchstaben gekennzeichnet.

Tabelle 1: Zusammensetzung (% der TM), Rohnährstoff-, nXP- und Energiegehalte der PMR

Futtermittel	Luzerne	Esparsette
	% der TM	
Grassilage	14,7	14,7
Maissilage	42,2	42,3
Luzernesilage	13,0	-
Esparsettesilage	-	12,9
Gerstenstroh	3,27	3,28
Maiskornsilage	9,54	9,55
Ausgleichskraftfutter	17,2	17,3
Inhaltsstoffe (Rationskalkulation)		
NEL, MJ/kg TM	6,6	6,8
XP, g/kg TM	148	146
nXP XP, g/kg TM	146	148
RNB, g	0,2	-0,3
XF, g/kg TM	182	174
XS+XZ, g/kg TM	271	272

Tabelle 2: Rohnährstoff- und Energiegehalte der eingesetzten Futtermittel

Futtermittel	TM	XA	XP	XL	XF	nXP	RNB	NEL
	g/kg	g/kg TM						MJ/kg TM
Esparsettesilage	335	85	202	32	226	147	9	5,92
Luzernesilage	363	105	182	32	321	123	9	4,61
Maissilage	359	32	68	35	177	132	-10	6,81
Grassilage	349	109	166	52	288	129	6	5,52
Maiskornsilage	687	17	84	45	27	160	-12	8,69
Gerstenstroh	946	54	40	14	494	78	-6	3,68
Ausgleichskraftfutter	894	114	337	57	71	227	18	7,71
Leistungskraftfutter	885	74	236	37	83	196	6	7,78

Ergebnisse und Diskussion

Die Futteraufnahme lag in der Gruppe Esparsette etwas niedriger, als in der Kontrollgruppe (Tabelle 3), wobei sich die Unterschiede auch durch einen unterschiedlichen Abruf bzw. Zuteilung an Leistungskraftfutter ergeben. Für die Luzerne werden verschiedentlich positive Auswirkungen auf die Futteraufnahme beschrieben (Bulang et al. 2006, Ettle et al. 2011). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Luzernesilage eine erhöhte Abbaurate der Trockenmasse je Zeiteinheit aufweist (Flachowsky et al. 1992), und damit eine höhere Passagerate im Pansen (Hoffmann et al. 1998). Demgegenüber lag die Aufnahme an TM auch in der Luzernegruppe in vorliegender Untersuchung auf einem im Vergleich zu früheren Versuchen an derselben Einrichtung (Ettle et al., 2012) relativ niedrigen Niveau.

Hierbei ist allerdings der hohe Anteil an Erstlingskühen in vorliegendem Versuch zu berücksichtigen, die eine vergleichsweise niedrige Futteraufnahmekapazität haben (DLG, 2006). In der Gruppe Esparsette lag die Futteraufnahme um 0,8 kg TM/Tag nominal niedriger als in der Gruppe Luzerne, wodurch sich auch eine etwas erniedrigte Energie- und nXP-Aufnahme ergab. Während in der Literatur bei Lämmern positive Auswirkungen von Esparsetteheu auf die Futteraufnahme beschrieben wurden (Podstatzky und Gallnböck, 2009), wurden beim Milchvieh teils keine aber auch negative Effekte beschrieben (Dohme et al., 2008, Arrigo und Dohme, 2009, Scharenberg et al., 2009). Da der Aufwuchs in vorliegender Untersuchung stark mit Lamium purpureum (Purpurrote Taubnessel) durchsetzt war, ist ein Einfluss dieses Beikrauts nicht auszuschließen.

Tabelle 3: Futteraufnahme, Energie- und Nährstoffaufnahme

	Versuchsgruppe	
	Luzerne	Esparsette
TM-Aufnahme, kg/Tag	20,5 ± 1,9	19,7 ± 1,8
NEL-Aufnahme, MJ/Tag	138 ± 13	136 ± 13
XP-Aufnahme, g/Tag	3199 ± 347	3079 ± 363
nXP-Aufnahme, g/Tag	3164 ± 313	3080 ± 320

Die Milchleistung lag in der Gruppe Esparsette nominal um 1 kg/Tier und Tag unter der Vergleichsgruppe, was sich mit der Futter- und Nährstoffaufnahme deckt. Über die Auswirkungen des Einsatzes von Esparsettesilage in der Milchviehfütterung liegen kaum Untersuchungen vor. In einer Untersuchung von Scharenberg et al. (2009) ergaben sich ebenfalls nur tendenziell negative Effekte der Verfütterung von Esparsetteheu auf die Milchleistung. Der Milchfettgehalt lag in vorliegender Untersuchung insgesamt auf einem relativ niedrigen Niveau. Wie auch beim Milcheiweißgehalt ergaben sich jedoch keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Unterschiede im Milchharnstoffgehalt lassen sich nicht vollständig durch die kalkulierte RNB erklären. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bezüglich der Energiebewertung bei Esparsette, die wesentlich die Einschätzung des nXP-Gehaltes und folglich der RNB beeinflusst, Unklarheit besteht. Hinweise auf durch kondensierte Tannine verursachte besonders hohe UDP-Gehalte ergeben sich aus dem erniedrigten Milchharnstoffgehalt jedoch nicht.

Tabelle 4: Milchleistung und Milchinhaltsstoffe

	Versuchsgruppe	
	Luzerne	Esparsette
Milchleistung, kg/Tag	29,4 ± 7,2	28,3 ± 6,9
Milchfettgehalt, %	3,75 ± 0,43	3,75 ± 0,33
Milcheiweißgehalt, %	3,52 ± 0,28	3,46 ± 0,28
ECM, kg/Tag	28,6 ± 6,2	27,5 ± 5,7
Milchharnstoffgehalt, mg/l	204 ± 35[a]	178 ± 28[b]

Fazit

Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Verfütterung von Esparsettesilage beim Milchvieh nur geringe Auswirkungen auf die Futteraufnahme hat und bei gegebenen Rationsanteilen ein hohes Leistungsniveau erlaubt. Ob sich diese Ergebnisse bei höheren Anteilen an Esparsette in der Ration bestätigen, sollte weiter überprüft werden.

Literatur

Arrigo, Y., Dohme, F (2009):Einfluss der Zufütterung von tanninhaltiger Esparsette auf den Proteinumsatz von weidenden Milchkühen. Werte - Wege - Wirkungen: Biolandbau im Spannungsfeld zwischen Ernährungssicherung, Markt und Klimawandel. Beiträge zur 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, ETH Zürich, 11.-13. Februar 2009, 140-143

Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H. (2005): Effect of bioactive compounds from sainfoin (Onobrychis viciifolia scop.) on the *in vitro* larval migration of Haemonchus contortus: role of tannins and flavonol glycosides. Parasitology 131, 1-8

Bulang, M., Kluth, H., Engelhard, T., Spilke, J., Rodehutscord, M. (2006): Zum Einsatz von Luzernesilage bei Kühen mit hoher Milchleistung. J. .Anim. Phys. Anim. Nutr. 90, 89-102

DLG (2006): Schätzung der Futteraufnahme bei der Milchkuh. DLG-Information 1/2006

Dohme, F., Scharenberg, A., Kreuzer, M. (2008): Bietet tanninhaltige Esparsette eine bessere Alternative zur Weidefütterung als Heu ? Schriftenreihe Institut für Nutztierwissenschaften, Ernährung-Produkte-Umwelt, ETH Zürich H 30: 151-154.

Ettle, T., Obermaier, A., Weinfurtner, S. (2011): Luzernesilage im Austausch gegen Grassilage beim Milchvieh. VDLUFA-Schriftenreihe, VDLUFA-Schriftenreihe 67, 588-594

Ettle, T., Obermaier, A., Steyer, M., Spiekers, H. (2012): Untersuchungen zum Austausch von Mais- und Grassilage durch Luzernesilage in Milchviehrationen. In: Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung, Fulda 2012, Herausgeber: Verband der Landwirtschaftskammern, Bonn, 49-52.

Flachowsky, G., Ranft, S., Koch, H. (1992): Abbau von Luzerne und Weidelgras im Pansen von Schafen und Ziegen. Luzerne-Kolloquium, Halle (Saale), 130-133

Hoffmann, P.C., Combs, D.K., Casler, M.D. (1998): Performance of lactating dairy cows fed alfalfa silage or perennial ryegrass silage. J. Dairy Sci. 81, 162-168

Podstatzky, L., Gallnböck, M. (2009): Einsatz von Esparsette bei mit Haemonchus contortus infizierten Lämmern. Werte - Wege - Wirkungen: Biolandbau im Spannungsfeld zwischen Ernährungssicherung, Markt und Klimawandel. Beiträge zur 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, ETH Zürich, 11.-13. Februar 2009. 140-143

Scharenberg, A., Kreuzer, M., Dohme, F. (2009): Suitability of Sainfoin (Onobrychis viciifolia) Hay as a Supplement to Fresh Grass in Dairy Cows. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 22, 1005 - 1015

Autorenanschrift

Thomas Ettle
Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Grub
Prof.-Dürrwaechter-Platz 3, 85586 Poing
E-Mail: Thomas.Ettle@LfL.bayern.de

Influence of dietary cation-anion balance on pH of rumen fluid in lactating dairy cattle

Eva Mrázková, Eva Mrkvicová, Ladislav Zeman, Zuzana Jakubcová and Martina Fröhdeová

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, CZ

Introduction

The rumen of individual sections of forestomach greatest importance for digestion. You are hereby diluted mixes and sorts food, which is further shifted to other sections of the digestive tract. Rumen pH should be between 6,2 to 7,3 (Jelinek 2003) and can be monitored in various ways. Measurement of pH probe inserted in the rumen allows continuous shooting ruminal pH content throughout the day, without having to remove rumen fluid. The risk of repeated sampling of rumen fluid with esophageal probes are various injuries in the introduction. Determination of the pH of the rumen fluid collected with the probe may also not always be accurate, it is dependent on environmental factors.

The aim study was to monitor changes in pH in the rumen of cows during the day with the addition of limestone with the established boluses SmaXtec.

Why do we bother to calculate DCAB and what does it mean to the animal? The direct answer is apparently quite simple. These four minerals (Na, Mg, Cl, Ca) are intricately involved in the acid base status of the animal; not rumen acids and bases, but systemic (blood) acids and bases. Sodium and K^+ are thought to be alkalogenic in that their metabolism and excretion leads to an elevation of blood buffering capacity via bicarbonate retention (HCO_3^-) and an increase of blood pH (acid). Metabolism of $Cl^-$and $S^=$ lead to a decrease of blood buffering capacity (lower HCO_3^-) and a reduced blood pH; therefore, $Cl^-$and $S^=$ are considered to be acidogenic. A high DCAB would, therefore, indicate that a feed or diet will promote a high blood buffering capacity and a low DCAB would promote a reduced blood buffering capacity. In the extreme case of a negative DCAB (Na + K) is less that (Cl + $S^=$) a mild acidosis can occur in the blood. The specific effects of DCAB on organs such as kidney, liver and bone and on enzyme and hormone functions appear to all be related back to this effect on acid-base status (Block, 2009). For example the rumen acidosis, mainly occurring as subacute rumen acidosis (SARA), is characterized by abnormally low rumen pH. SARA is a widely spread problem in high yielding dairy cows and also in grazing cattle (Kleen et al., 2003, Bramley et al., 2008). Measurements of pH in the rumen can contribute to the understanding of the microbiological activity and dynamics of fermentation (Broberg, 1957). The repeated collection of ruminal fluid to diagnose SARA is accompanied by potential risks for conditions such as peritonitis related to rumenocentesis due to a trocar and esophageal and ruminal injuries induced by oro-ruminal probe extraction. Moreover, the reliability of the data depends on the skill of the operator and the locations of the sampling sites within the rumen (Duffield et al. 2004). Problem solving how to measure the pH in the rumen is using indwelling bolus for monitoring ruminal pH. The sensor system benefits from the fact that data can be collected continuously. The sensor system was evaluated by a comparison with standardized pH-dilutions (pH 4, pH 7). The sensor system has proven to be an accurate and reliable instrument (r = 0.9984) and it represents an innovative system for answering scientific questions in terms of rumen physiology and rumen pathology (Schneider et al., 2010). In our experiment with dairy cows we monitored the changes of ruminal pH during day by using rumen boluses (smaXtec Animal Care, Austria).

Materials and methods

Eight dairy cows of Fleckvieh breed in the second lactation were chosen to monitoring pH. Cows were housed in groups of 35 heads. Housing was loose pit with bedding of straw. There were two automatic drinkers available. Feed was served on a feeding table twice a day as a total mixed ration (TMR). Composition of TMR followed: 22 kg maize silage, 12 kg alfalfa hay, wheat straw, 1.4 meadow hay, beet pulp 6 kg, 7 kg fresh barley grains and 9.2 kg production mixture. The total weight of TMR was 58.1 kg. Weights are indicated in the original matter. Determination of dry matter feed was 23.1 kg. Production mixture contained – 27 % corn, 35.7 % wheat, 11 % extracted rapeseed meal, 17 % soybean meal, 0.8 % natriumcarbonate, 0.4 % feed salt, 0.5 % urea compound, 3 % Megalac. Selected cows obtained adition of limestone 50 g twice a day (100 g per day).

Table 1: Content of anions and cations in the ration on the day following

Minerals	kation/ anion	molecular weight	konstant number	Content g/kg
Na^{+}	+	22,99	0,0434972	**2,78**
K^{+}	+	39,1	0,0255754	**11,74**
Mg^{++}	+	24,31	0,0822707	**3,5**
Ca^{++}	+	40,8	0,0490196	**10,62**
Cl^{-}	-	35,45	0,0282087	**1,7**
SO_4^{--}	-	32,06	0,062383	**2,38**
PO_4^{---}	-	30,97	0,0968679	**4,13**

Outside temperature was measured using thermohydrograph Comet brand. Cows were milked twice a day in the milking parlor. Every day was also recorded individual milk yield. DACB was calculated using the formula: DCAB (meq/kg dry matter) = (meq Na+ /kg dry matter + meq K+/kg dry matter) - (meq Cl -/kg dry matter + meq SO4 --/kg dry matter) (NRC, 1989).

The timetable for dairy cows

The diet was fed as a TMR and divided into two equal portions given at 5:00 a.m. and 5:00 p.m. At 6:00 a.m. cows were exaggerated in the parlor. They left the parlor at 7:00 a.m. around 9:00 a.m. is the stable normal bustle associated with moving the cows to milking. It is performed push feed at 1:00 p.m. At 6:00 p.m. dairy cows are transferred to the evening milking and at 7:00 p.m. they are back in the barn. At this time, is currently implementing the second push feed. At 9:00 p.m. starts peace in the barn, which is broken up at 4:30 a.m. with push feed. During the experiment this schedule was identic every day.

An indwelling measuring sensor (bolus smaXtec Animalcare) was used for continuous measurement of the ruminal pH-value. The wireless radio transmission system consisted of a pH sensor, a data measurement receiver, a mobile reader, and a personal computer (PC) with special software (smaXtec, Austria). Shape and size of the sensor allow oral placement of the system in adult cattle. The pH sensor weighs 219 g is in 132 mm length with diameter of 35 mm. It is attached to a small glass electrode on one side. We used a special balling gun to insert the smaXtec® pH Bolus into the rumen after activation and calibration. The resulting data (10 - minute measuring interval) were saved in a unit (A/D-converter, memory chip) and sent to an external receiver via ISM-band (433 MHz). This receiver unit was connected with an internet server, which analyzed data and created graphics with the help of a specifically created software.

Data were processed using MICROSOFT EXCEL® (USA) and STATISTICA.CZ Version 10.0 (Czech Republic).

Results and discussion

The test objective was to determine the variation of the DACB adding lime and whether this influenced the addition of pH change. The experiment was changed DACB adding 100 g of limestone from 77.1 to 89.2 therefore 15.7%. We found the pH in the control group 5.82 ± 0.178 (n = 1010) and by adding limestone was found pH 5.85 ± 0.238 (n = 1010). This means that the change DACB 15.7% pH value changed by only 0.5%. We assume that the buffering capacity of the rumen could suppress the changes caused by mineral nutrition. The use of limestone increased positive numbers miliequivalent titration. Response in dairy cows was surprisingly lower. Buffering capacity of the rumen will probably eliminate changes in the feed ration. Calcium thus had a large influence on the change of pH. Submission of limestone brought great changes DACB but did not bring changes in the physical measurement of pH in the rumen.

Table 2: Comparison DACB with used limestone and control

Minerals	kation/ anion	molecular weight	konst number	Content g/kg	konst numb.	**Limestone**	**Control**
Na^{+}	+	22,99	0,0434972	2,78	1	**63,9**	**63,9**
Mg^{++}	+	24,31	0,0822707	3,5	0,30	**12,8**	**12,8**
Ca^{++}	+	40,80	0,0490196	10,62	0,38	**82,3**	**70,2**
Cl^{-}	-	35,45	0,0282087	1,7	1	**60,3**	**60,3**
SO_4^{--}	-	32,06	0,062383	2,38	0,25	**9,5**	**9,5**
DACB						**89,2**	**77,1**

Conclusions

Increasing the ratio of cation - anion balance has slightly increased alkalinity of the the diet, but the pH in the rumen has not changed. Probably consequently the rumen operates phosphate and carbonate buffers. Served amount of limestone was quite dramatic change and therefore would recommend the next time you try to increase the amount of limestone.

Acknowledgement

This project was supported by IGA MENDELU BRNO No: TP 3/2014

References

BRAMLEY, E. – LEAN, I.J. – FULKERSON, W.J. – STEVENSON, M.A. – RABIEE, A.R. – COSTA, N.D., 2008, The definition of acidosis in dairy herds predominantly fed on pasture and concentrates. Journal of Dairy Science, 2008, 91, p. 308-321.

BLOCK, E., 2009, Dietary Cation-Anion Balance in Dairy Cow Nutrition, Dept. of Animal Science Macdonald Campus, McGill University, http://www.wcds.ca/proc/1997/ch17-97.htm

BROBERG, G., 1957, Measurements of the redox potential in rumen contents. I. *In vitro* measurements on healthy animals. Nordisk Veterinaer Medicin, 9, 918–931.

DUFFIELD, T. – PLAIZIER, J. C. – FAIRFIELD, A. – BAGG, R. – VESSIE, G. – DICK, P. – WILSON, J. – ARAMINI, J. – MCBRIDE, B., 2004, Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, 87, p. 59 – 66.

GASTEINER, J. – FALLAST, M. – ROSENKRANZ, S. – HÄUSLER, J. – SCHNEIDER, K. – GUGGENBERGER, T., 2009, Measuring rumen pH and temperature by an indwelling and data transmitting unit and application under different feeding conditions. Proceedings Livestock Precision Farming, Wageningen Publishers, p. 127-133.

Kleen J.L., Hooijer G.A., Rehage J., Noordhuizen J.P.T.M., 2003, Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. Journal of Veterinary Medicine, Series A 50, p. 406 - 414.

Nutrient requirements of dairy cattle. 6th rev. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1989, 100 s. Nutrient requirements of domestic animals (Unnumbered). ISBN 03-090-3826-X

SCHNEIDER, K. – GASTEINER, J. – GUGGENBERGER, T. – URDL, M. – STEINER, S. – NEIDL,A. – LINHART, N. – BAUMGARTNER, W., 2010, Vergleichende Untersuchungen zur Messung des pH-Wertes im Vormagensystem von Rindern. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 123, Heft 7/8 (2010), p. 1–16. ISSN 0005-9366

Corresponding author

Ing. Eva Mrázková
Mendel University in Brno
Zemědělská 1; 613 00
E-mail: xmrazko1@mendelu.cz

Effect of selenium supplementation in the diet of cows and heifers at the drought on the content of Ig G in serum

Martina Fröhdeová, Eva Mrázková and Petr Doležal

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Mendel University in Brno, CZ

Introduction

Due to the multi-layered placenta (placenta epitheliochorialis) in ruminants, transplacental exchange of immunoglobulins is not possible. Calves are born without innate immune protection, but they are immediately confronted by various micro-organisms situated in a stable. In order for them to be protected during this first period of calves, it is vital to deliver them maternal antibodies from colostrum as soon as possible after the birth, because the content of Ig G decreases with the number of breast-feeding (Heinzlová, 2013, Šlosárková et al., 2011). Soon after the birth of calves there is an incursion of *E. coli* bacteria from the colon into the small intestine, which is in almost five hours literally colonized. Colonization also leads to the formation and to the release of bacterial toxins and inflammation of the intestinal mucosa. Immunoglobulin molecules easily penetrate the mucosa of the small intestine and in the case of an early administration it may actively inhibit the action of the bacterial micro-flora. The penetration capability of immunoglobulins of the intestinal mucosa decreases significantly, hour after hour, as well as decreases their content in colostrum itself. Today it is known over 37 different factors of immunity of bovine colostrum, which includes 5 basic immunoglobulins, lactoferrin further, rich peptide peroxidase leukocyte interferon, cytokines, lysosym, trypsin inhibitors and protease inhibitors and many others. If the body does not get these immunoglobulins in time and in sufficient doses, it does not have the sufficient immunity to overcome various diseases.

If the calf does not get colostrum in a timely manner and at sufficient dose these immunoglobulins do not have sufficient immunity to overcome various diseases.

The most common form of the disease of calves colostrum eating disorders are septicemia and diarrhea. Also in case of lack of vitamins and minerals appear functional disorders of metabolic processes and immune (Pavlata et al., 2012).

Selenium is one of the essential substances that affect the protection of cells, because along with other substances can maintain low concentrations of reactive oxygen species in tissues. We also have a great influence on achieving optimal reproductive performance. Its deficiency is also manifested reproductive disorders and adverse effects on the immune system (Marcinková and Beran, 2013).

The aim of this study was to map the development of serum Ig G in the course of the experiment with cows and compare Ig G in the serum of cows that were done on the ration and cows receiving a feed supplement Alkosel.

Materials and methods

Our experiment involved 28 Czech Fleckvieh cattle. Cows were divided into control and experimental group that received premix Alkosel containing selenium in the form of selenomethionin in yeast *Saccaromyces cerevisiae* addition to the existing ration the amount 3 mg Se/h/d. Experimental and control group were further divided according to the age of 7 heifers in kontrol group and 7 heifers in experimental group and the same distribution in cows. Cows received an identical ration. The feeding

supplements contained Alkosel only once during the morning feeding. Studied cows come from breeding located in the Pardubice region.

The groups were monitored during their pre-parturition stanchion housing. All monitored dairy cows were kept in the same compartment of the stable and their moisture and temperature conditions in the stable were identical too. Blood was sampled twice during the experiment:

I.- The first blood sample was taken from the high-pregnant cows and heifers ca. 23 days before the expected parturition. The blood was collected by the veterinarian from *vena coccygea* and the sample was designated as (-23).

II.- Up to 24 hours after birth the cow's second blood sampling performed. Designation of collection (+2).

All blood samples were taken by the veterinarian into the Hemos sampling tubes used for the sampling of beef cattle blood. All samples were taken at the same daytime to eliminate disturbance of the time schedule and feeding times of the experimental animals. The blood was transported to the Hospital in Svitavy where the serum was separated on the laboratory centrifuge at 3,500 rpm for 10 minutes. Labelled serum samples were kept in a freezer. Upon the completion of the whole set, the samples were brought to the laboratory of LABtechnik Brno which was assayed for bovine Ig G antibody. Research results were statistically processed by using Microsoft Excel and the Statistica 10.0 programme with the Tukey HSD test (Snedecor and Cochran, 2012).

Results and discussion

The level of serum immunoglobulin class G should be in healthy adult cows around 17.6 to 22.9 g/l (Bárta et al., 2008), agree with this Jelínek et al. (2003), which gives the value of immunoglobulins class G 17.9 g/l. In other works, states ranging from 16.2 to 26.0 g/l of Ig G (Dvořák et al., 2005) and Bouda and Jagoš (1979) investigating the activity of proteins and enzymes in the blood high-pregnant cows and their fetuses represents the value 22.6 ± 5.3 g/l Ig G.

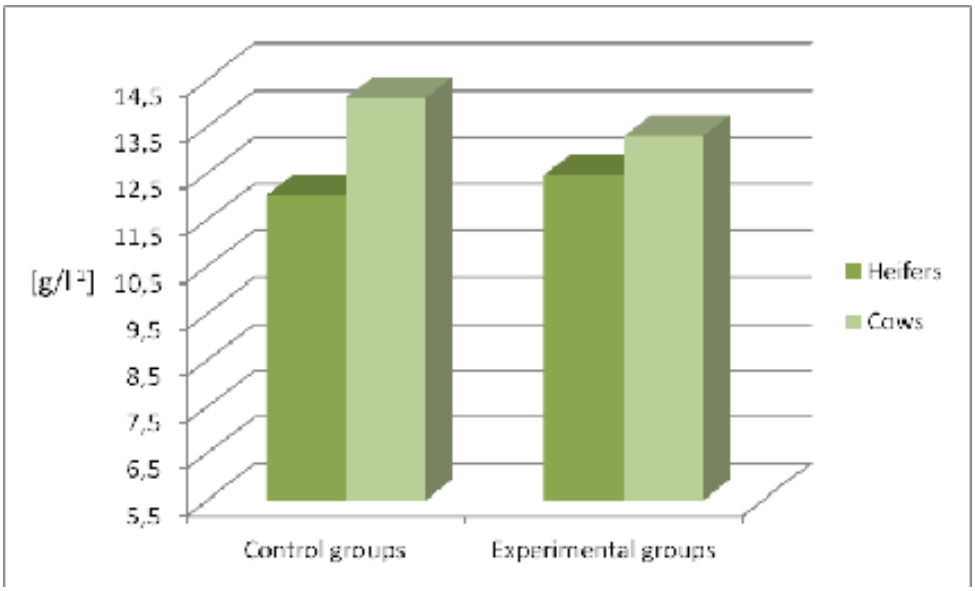


Figure 1: Effect of supplementation of feed supplement on the concentration of serum Ig G high-pregnant cows for the collection (+2).

For heifers in the control group reached values 10.43 ± 3.479 Ig G g/l for sampling before feeding the feed supplement (-23) and take postpartum values 12.03 ± 3.048 Ig G g/l (+2). The experimental group heifers reached values 12.05 ± 1.884 Ig G g/l for sampling before feeding the feed supplement (-23) and take postpartum values 12.47 ± 2.587 Ig G g/l (+2). For cows in the control group reached values 16.68 ± 4.912 Ig G g/l for sampling before feeding the feed supplement (-23) and take postpartum values 14.13 ± 6.072 Ig G g/l (+2). The experimental group cows reached values 17.08 ± 3.548 Ig G g/l for sampling before feeding the feed supplement (-23) and take postpartum values 13.31 ± 3.001 Ig G g/l (+2).

Bárta et al. (2008) reported that a somewhat lower value Ig G for cows, as in the control group and the test may be due to physiological immunosuppression during the period around birth, when the mother's immune response reduces reasons still little known causes, which is confirmed by results of our experiment. From these results it is clear that the experimental group was cows compared with the control group at the second sampling (+2) slight increase in the concentration of Ig G. However, this increase was not statistically significant (P> 0.05).

Conclusion

In conclusion, we can state that the concentration of serum Ig G cows involved in our experiment is in a satisfactory way, given that lower concentrations of Ig G in cows is physiological. In the first sampling (-23) at the concentration of heifers in the control group 10.43 ± 3.479 g/l Ig G and heifers in the experimental group the same sampling 12.05 ± 1.884 g/l Ig G. In the first sampling (-23) at the concentration of cows in the control group 16.68 ± 4.912 g/l Ig G and cows in the experimental group the same sampling 17.08 ± 3.548 g/l Ig G .The second collection (+2) the concentration in the heifers control group 12.03 ± 3.048 g/l^{-} Ig G and heifers experimental group 12.47 ± 2.587 g/l Ig G. The second collection (+2) the concentration in the cows control group 14.13 ± 6.072 g/l Ig G and cows experimental group 13.31 ± 3.001 g/l Ig G. In the age group of heifers was an increase in serum Ig G, while the cow was a slight decrease in the level of Ig G. There was however confirmed a statistically significant difference between the experimental and control groups for the collection +2.

The importance of high-quality colostrum for the successful rearing of calves is undeniable. Despite the fact that in our experiment occurred statistical relevance of the effect of selenium added to the ration, we believe that the consequent deficiency in nutrition high-pregnant cows should result in increased morbidity and their calves due to immune weakness.

Acknowledgments

This project was supported by IGA MENDELU BRNO No: IP 4/2013.

References

Bárta, O., Codner, E. C., Pickett, J. P., Shell, L. G., 2008: Veterinary clinical immunology: immune diseases of domestic animals. 1st Edition . Brno: Academic Publishing CERM, 322 pp., ISBN 978-80-7204-553-2.

Bouda, J., Jagoš, P., 1979: Proteins and enzyme activities in the blood of cows in late pregnancy and in their foetuses. Brno: Acta Veterinaria, 48: 15-18.

Dvořák, R., Doležal, P., Frydrych, Z., Herzig, I., Kutal, J., Mikyska, F., Pavlata, L., Pechová, A., Přikryl, J., Straková, E., Suchý, P., Veselý, P., Zeman, L., 2005: Cattle nutrition in terms of production and preventive medicine, Brno: Department of Ruminant FVL VFU Brno, 117 pp. ISBN 80-86542-08-4.

Heinzlová I., 2013: Immunoglobulins IgY from egg yolk: Caring for the young. Brno: Veterinary, 63(7): p. 527 – 531. ISSN 0506-8231.

Jelínek P., Koudela K., Doskočil, J., Illek, J., Kotrbáček, V., Kovářů, F., Kroupová, V., Kučera, M., Kudláč, E., Trávníček, J., Valent, M., 2003: Physiology of farm animals, Brno: Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, 409 pp. ISBN 80-7157-644-1.

Marcinková A., Beran O., 2013: Search for natural solutions. Praha: Profi Press, Krmivářství 2013/1, p. 24 – 26. ISSN 1212-9992.

Pavlata, L., Podhorský, A., Pechová, A., 2012: Metabolism calves as a cause of increased morbidity. Brno: Veterinářství, 62(5): p. 307-311. ISSN 0506-8231.

Snedecor, G. W., Cochran, W.G., 2012: Snedecor and Cochran's Statistical Methods, 6th Edition, Blackwell Pub, 576 pp. ISBN 978-0813808642.

Šlosárková, S., Fleischer, P., Pěnkava, O., Skřivánek, M., 2011: Provision of colostral immunity in newborn calves of dairy cattle and verification of its level in the breeding and veterinary practices. Certified methodology. Brno: Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, 24 pp. ISBN 978-80-7305-601-8.

Corresponding author

Ing. Martina Fröhdeová
Mendel University in Brno
Zemědělská 1
613 00 Brno
E-mail: xfrohdeo@mendelu.cz

Effect of a patented combination of plant extracts on milk productivity and milk persistency of dairy cows

Christine Gerard[1], Marie Laurence Le Ray[2], Caroline Quelennec[2] and Danièle Marzin[2]

[1] Invivo NSA R&D department, Saint Nolff, FR
[2] NEOVIA feed additives, Saint Nolff, FR

Abstract

Recent publications highlight that in intensive production as high milking, deviation of ingested energy and nutrients towards inflammation processes can reach up to 30% and impairs performance and profitability of dairy cows (dc). A Patented combination of plant extracts selected for their antioxidant and anti-inflammatory properties has been tested in a large scale study to evaluate its ability to improve milk productivity and persistency in dairy cows.

The study involved 10 field trials in French farms, in different conditions but with steady ration and limited access to pasture, representing a total of 800 cows (mainly Holstein and Montbéliardes). The performances of dairies from field trials were recorded 2 months before addition of the product (20 g/dc/d) and 2 months after. The study first focused on the effect on the whole herds' production and secondly, on the effect on mid-end lactating cows to evaluate the potential to improve milk persistency which is a real profitability challenge. In parallel, a study done in R&D facilities was set up to evaluate the effect of the product on oxidative stress (SOD, GPX) and inflammation (haptoglobin, amyloid A serum) markers in early lactating cows (8 days after calving) to investigate one of the potential mode of action of the product. In this trial, cows were divided into 2 groups receiving either control feed or additive supplemented feed (20g/dc/d).

When all the animals are taken into account, a significant improvement of milk production (+1.2kg/d, $p<0.001$) is obtained with plant extract combination compared to control. Concerning mid-end lactating cows, +2.2 kg milk/d ($p<0.001$) have been observed with the plant extracts, suggesting a great improvement of the milk persistency and thus of the profitability. Quality of milk was not affected by the addition of the product, as the milk solids were increased by 3 to 5% compared to control. On early lactating cows, haptoglobin and amyloid serum levels were reduced by respectively 28 and 34% while SOD and GPX levels were respectively increased by 3.6 and 37%.

By reducing oxidative stress and down-regulating inflammatory process, more energy and nutrients can be allocated to milk production, optimizing genetic potential through better ration valorization. This leads to significant improvement of performance of dairy cows and offers new perspectives of profitability for farmers. Based on the milk production results of these trials, the calculated return on investment of such natural solution was 9 for 1 invested.

Introduction

For dairy cows, total milk production per lactation is largely influenced by the shape of the lactation curve, which can be described through 2 main parameters: peak yield and milk persistency after the peak. These two parameters are mostly negatively correlated. Hence, finding nutritional strategies improving milk persistency could be a way to enhance productivity of dairy herds.

Inflammation and oxidative stress are 2 major physiological phenomenons that dairy cows are facing. They can be linked to the high level of milk production and to inflammatory events (calving, lactation, …), generating lack of performance and profitability. Indeed, the recent literature describes that up to 30% of the ingested energy can be deviated to manage these processes.

Consequently, a patented combination of plant extracts selected for their antioxidant and anti-inflammatory properties has been tested in a large scale study to evaluate its impact on milk productivity and milk persistency.

The study, ran on field conditions in a total of 10 French farms gathering about 800 cows, in different conditions but with steady ration and limited access to pasture, focused first on the effect on the whole herds' production. Secondly, the effect on mid-end lactating cows was measured to evaluate the potential to improve milk persistency which is a real profitability challenge.

In parallel, a study done in R&D facilities was set up to evaluate the effect of the product on oxidative stress (SOD, GPX) and inflammation (haptoglobin, amyloid A serum) markers in early lactating cows (8 days after calving) to investigate one of the potential mode of action of the product.

Materials and methods

Farms & animals:

The studies conducted in 2012 and 2013 involved 10 field trials in French farms, and 1 trial in R&D facilities, representing a total of 810 cows (mainly Holstein and Montbéliardes).

Field farms: The 10 farms have been selected to have a steady ration, with limited access to pasture, and to be able to control milk production and milk fat/protein content. Performance were followed first without the additive (control period) and then with the additive (test period) as in field conditions do not allow to differentiate the ration between 2 groups of cows.

R&D facilities trial: The R&D trial was conducted in a French farm where 10 Holstein cows were allocated to 2 groups of 5 cows in end of gestation to follow blood parameters after calving.

Feeding:

In the field trials and in the R&D trials, cows received either Control diet (without any additive) or Experimental diet containing 20 g / dairy cow / day of the patented combination.

Trial duration and performance records in field trial:

The performances of dairies from field trials were recorded 2 months before addition of the product (20 g/dc/d) and 2 months after.

The effects of the product on the production of the whole herds were analyzed, and a special focus on the effect on mid-end lactating cows was made to evaluate the potential to improve milk persistency.

Oxidative stress and inflammation markers analysis:

In R&D trial, the product was distributed to the 5 tests cows around calving while 5 other cows were not supplemented.

Oxidative stress (Super oxide dismutase (SOD), Gluthathion peroxidase (GPX) and inflammation (Haptoglobin, Amyloid A serum)) markers were analyzed in blood 8 days after calving on 5 animals of each group.

Statistics:

Concerning the field trial data, within each farm milk production during the control / supplemented period of each cow was compared by correcting the data by the lactation stage, according to the model proposed by Rulquin, 2007 Stage-corrected milk production, milk fat production or milk protein production were then compared by ANOVA.

Concerning the R&D trial on the blood markers, no specific statistical analysis was done, as the number of data per treatment (5) was quite low.

Results

Field trials:

Addition of the combination of plant extracts significantly increased milk production in 9 farms out of 10 *(p<0.001).* In average, it improved milk production by 1.2 kg/DC/d when all cows were included (figure 1).

Milk fat/protein content has been also significantly *(p<0.001)* increased by the product in these trials, by 4.4% and 3.1% respectively for exported protein and fat.

Regarding mid-end lactating cows, the product proved to improve milk persistency as supplemented cows produced 2.2kg/cow/day *(p<0.001)* more milk compared to control (figure 2).

R&D trial: Oxidative stress and inflammation markers:

Both inflammation markers blood's levels (haptoglobin and Amyloid A serum) were numerically lower in the treated group, respectively by 28 and 33%, suggesting better metabolic management of the calving for supplemented cows (figure 3).

In the opposite, the antioxidant enzymes (SOD, GPX) blood's levels were also both numerically higher in treated group suggesting a higher antioxidant status for supplemented cows.

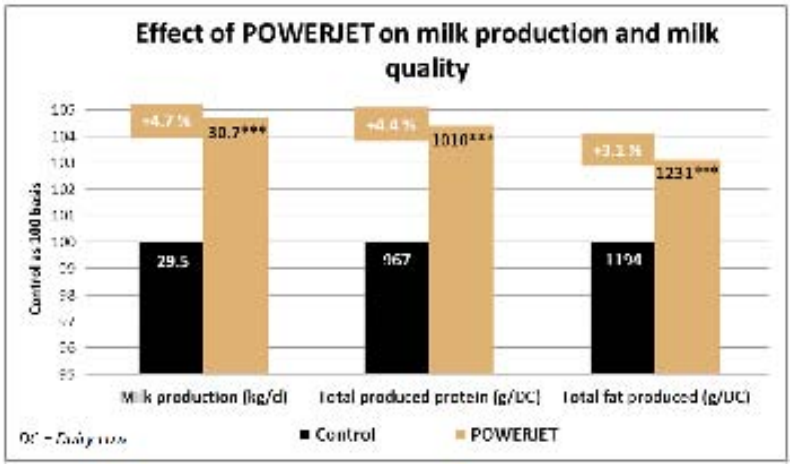


Figure 1: Performance of all cows

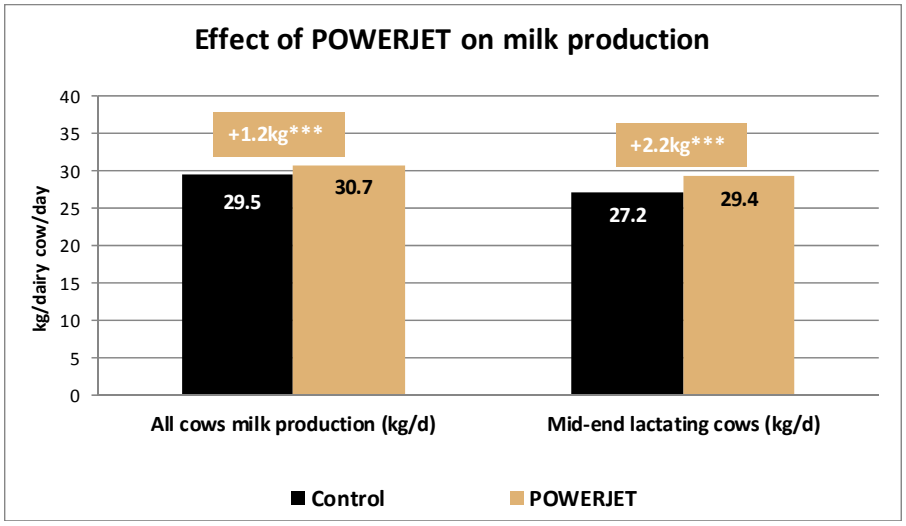


Figure 2: Milking performance of mid-end lactating cows

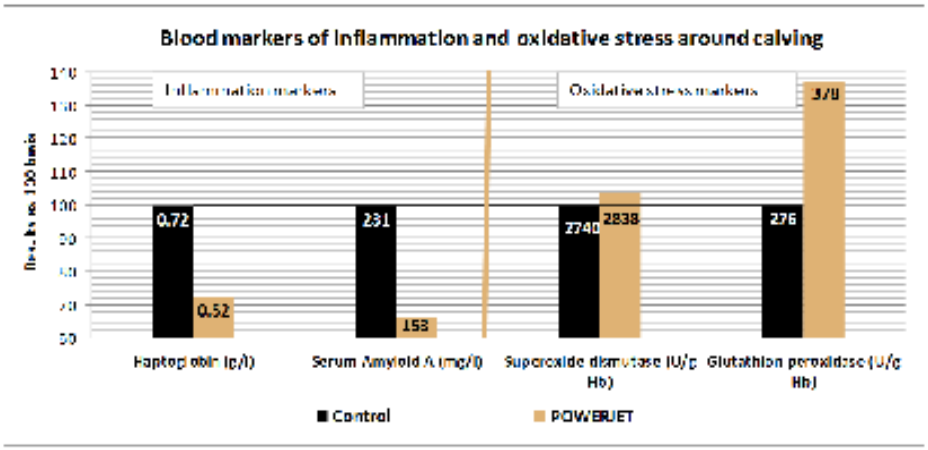


Figure 3: Blood markers of inflammation and oxidative stress around calving

Conclusion

This field study showed that the use of specific plant extracts could improve milk production in different conditions (+1.2kg/DC/d; *p<0.001*), without degrading milk quality. Total milk solids were significantly improved by around 4%.

Combination of plant extract have also the potential to maintain a better milk persistency after the peak (+2.2kg/DC/d; *p<0.001)* a major key parameter to improve herd profitability.

Moreover, the R&D trial ran in parallel on cow's blood parameters 8 days after calving showed a reduction of inflammation markers and a better oxidative status of the animals.

Consequently, reducing oxidative stress and down-regulating the inflammatory process, could be related to more allocation of energy and nutrients to milk production, optimizing genetic potential through better ration valorization. This leads to significant improvement of performance of dairy cows and offers new perspectives of profitability for farmers. Based on the milk production results of these trials, the calculated return on investment of such natural solution was 9 for 1 invested.

References

RULQUIN, 2007. Alimentation des vaches laitières. Dans : Alimentation des bovins, ovins et caprins, Editions Quae.

Corresponding author

Danièle MARZIN
NEOVIA feed additives
56250 SAINT NOLFF
E-mail: dmarzin@invivo-nsa.com

Improving performance of high-yielding cows with live yeast during early lactation

Nicola Denise Walker[1], Svetlana Peganova[1] and Birgit Keimer[2]

[1] AB Vista Feed Ingredients, Marlborough, UK
[2] Biochem Zusatzstoffe Handels- und Produktionsgellschaft mbH, Lohne, DE

Introduction

Ruminants evolved to efficiently convert grass and forages into meat and milk. Today, in order to meet increased production demands and higher energy requirements, higher levels of concentrates or rapidly fermentable carbohydrates are fed, which can lead to dietary stress and issues with SARA (Sub-Acute Ruminal Acidosis). The increase in fermentable carbohydrates and starch causes a shift in the rumen microbial population and an increase in fermentation leading to accumulation of VFAs and a drop in rumen pH. If rumen pH drops below pH 5.8 for any length of time, the animal is said to have entered a state of SARA. Fibre digestion is impaired due to a decrease in the activity and number of fibre digesting microorganisms, which are particularly sensitive to a drop in rumen pH. The longer the time spent in a sub-acute acidotic state, the greater the negative effects on fibre digestion. More acidic conditions in the rumen can also cause damage to the rumen wall and cause death and lysis of the normal microflora (Khafipour et al, 2009). When some of these organisms die and lyse, they release endotoxins which can stimulate an inflammatory response in the rumen epithelia (Gozho et al, 2005). Damage to the rumen wall also facilitates the passage of these toxins into the bloodstream, further stimulating an inflammatory response from the host.

As a consequence of SARA, animal performance, rumen and host health and host fertility can be negatively affected and it has been estimated that the cost of SARA to the Dairy farmer is in excess of 200,000 €/year in terms or lost revenue and performance (Stone, 2004). Visible signs of SARA include reduced feed intake, decreased performance and poor manure consistency, with undigested grains and fibre being present in the manure. Reduced butterfat content in the milk due to reduced fibre digestion is also another good indicator of issues with SARA. When animals are experiencing SARA due to dietary stress, they are also unable to deal with other stress factors and infections or health issues as effectively. This can be reflected in increased somatic cell counts and incidence of mastitis. There is also a link between the incidence of lameness in the herd caused by inflammation and endotoxin release and the incidence of SARA, with affected herds showing a higher incidence of laminitis (Gozho et al, 2005).

Live yeast is effective at stabilising rumen pH and reducing the effects of SARA, thus improving performance and herd health (Thrune et al, 2009). The live yeast works in two ways to help increase and stabilise rumen pH. Firstly, the live yeast will compete for sugars against lactic acid producing bacteria in the rumen eg *S. bovis* and lactobacilli, thus reducing their growth and the production of lactic acid which has a high acidotic potential (Chaucheyras et al 1996; Pinloche et al 2013). Secondly, live yeast is also a good source of nutrients and metabolites which have been shown to increase the growth and numbers of organisms which can utilise lactic acid eg *S. ruminantium* and *M. elsdenii* and which can stimulate microbial growth. Thus the addition of live yeast to the diet is very effective at manipulating the rumen flora and raising and stabilising rumen pH thus reducing the incidence of SARA (Thrune et al, 2009).

The aim of this 10 week study was to demonstrate the benefits of live yeast during early lactation on both animal performance and overall health.

Materials and methods

The experiment was carried out as a randomised block design with two treatments. Treatments were Control and live yeast (VistaCell®, Yeast). Sixty cows (including 22 heifers) were assigned to either control or treatment group based on parity, expected milk yield and calving date. A basal diet was fed twice daily ad libitum and supplemented with concentrates according to a fixed scheme based on age and days in milk. Concentrates were fed in three equal portions per day. The basal diet consisted of (DM basis) 33% grass silage, 51% corn silage, 9% pressed beet pulp, 7% soybean meal and 100 grams of a start lactation mineral mixture. The calculated composition and feeding value of the diet is presented (Table 1). Live yeast (VistaCell® 4 g/d, equivalent to 50 billion CFU/day, mixed in 50 g meal) was top-dressed once daily on the concentrates. Animals were loose-housed and individual daily feed intake through Calan gates and daily milk yield were measured for a period of 10 weeks. Animals were milked twice daily. Milk composition samples were collected on four separate occasions weekly and analysed by NIR for fat, protein, lactose, somatic cell count (SCC) and urea. Animals were weighed when milked, and body condition score was evaluated using a 5 point scale in weeks 0, 3 and 10 after calving. Health parameters were also monitored with particular attention being focussed on the somatic cell count and the incidence of mastitis in the herd.

Table 1: Calculated composition and feeding value of the diets per treatment (g/kg DM)

Composition	Total Diet	Nutritive values	Total Diet
Ash	73	VEM (Net Energy)	1003
Crude Protein	178	TMP (True Metabolable Protein)	102
Crude Fat	39	RPB (Rumen Protein Balance)	17
Crude Fibre	168	BST (Bypass Starch)	57
NDF	359	PSW (Structure value)	127
ADF	201	RFCP (Rapidly Fermentable Crude Protein)	62
ADL	20	TFCP (Total Fermentable Crude Protein)	102
Starch	168	RFCH (Rapidly Fermentable Carbohydrates)	151
Sugar	53	TFCH (Total Fermentable Carbohydrates)	427
		TMMet (True Metabolisable Methionine)	2.11
		TMLys (True Metabolsiable Lysine)	5.76
		GN (Glucogenic Nutrients)	125

Daily measurements of feed intake, milk production, milk composition and body weight were averaged to weekly averages. Average values were calculated per period: week 1-3, week 4-6, week 7-10 and week 1-10. With these periods statistical analysis was carried out by ANOVA with the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + Treat_i + Block_j + \varepsilon_{ij}$$

Where: Y_{ijk} = response parameter
μ = average
$Treat_i$ = effect of treatment (i = 1, 2)
$Block_j$ = effect of block (j = 1 …. 30
ε_{ij} = whole plot error

Results and discussion

Results (Table 2) showed that even in a well-managed herd fed a balanced, quality ration, supplementation with live yeast led to an improvement (+0.8 kg/d) in fat and protein corrected milk (FPCM) and an increase in DMI of the forage (+0.7 kg/d, $P < 0.08$).

Table 2: Effect[1] of supplementation with live yeast on feed intake and milk production parameters, body condition, weight and growth of early lactation dairy cows

Treatment:	Control	Yeast	lsd[4]	P-value[3]
Feed intake				
Basal diet[2] (kg DM/d)	13.7	14.4	0.81	0.078+
Concentrate (kg DM/d)	8.0	7.9	0.12	0.249
Total (kg DM/d)	21.7	22.3	0.79	0.100
Milk production				
Milk (kg/d)	38.7	39.4	2.15	0.525
FPCM (kg/d)	39.3	40.1	1.75	0.375
Fat (%)	4.16	4.13	0.16	0.765
Protein (%)	3.29	3.30	0.08	0.717
Lactose (%)	4.62	4.59	0.04	0.116
Urea (mg/dl)	22.4	22.0	1.45	0.585
Body weight and condition				
Body weight week 1-10 (kg)	650	663	26.8	0.327
Growth wk 1-10 (kg/wk)	0.8	1.1	2.01	0.735
BCS week 0	2.7	2.7	0.14	1.000
BCS week 10	2.7	2.6	0.23	0.223
Efficiency parameters				
VEM-coverage (%)	91.3	91.8	4.21	0.797
TMP-coverage (%)	105.2	103.5	3.74	0.369
Feed efficiency (kg/kg)	1.81	1.79	0.09	0.699
N efficiency (%)	33.6	33.7	1.67	0.956

[1] Figures within the same row with different superscript differ significantly ($P < 0.05$)
[2] Basal diet is inclusive the protein supplement
[3] Differences are statistically significant if $P < 0.05$, trends ($P < 0.1$) are indicated by +
[4] lsd = least significant difference

The extra production was not coming from the utilisation of body reserves; indeed yeast supplemented cows gained weight more quickly after calving, indicating better energy balance than the control group. Somatic cell count was significantly decreased upon yeast supplementation during weeks 4 to 6 (log 1.65 vs log 1.87, $P < 0.02$, figure 1) and over the 10 week course of the trial, SCC were numerically decreased (log 1.75 vs 1.86, $P = 0.11$). The incidence of treated cases of mastitis was also significantly reduced with yeast supplementation (5 cases vs 1, $P < 0.001$), indicating health benefits in addition to performance benefits.

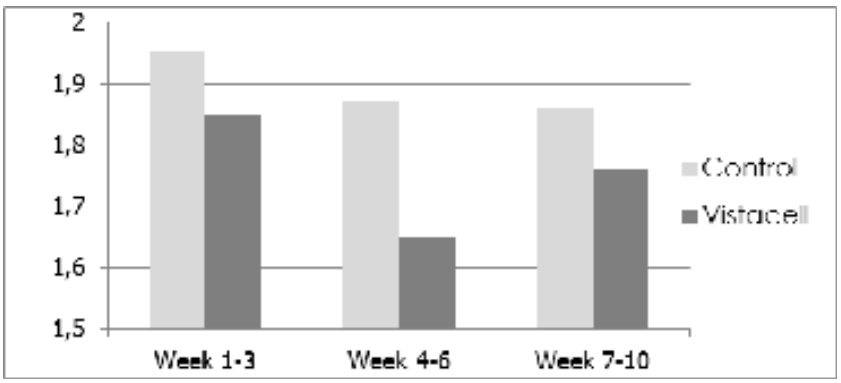


Figure 1: Log somatic cell count over the duration of the trial for weeks 1 to 3, 4-6 and 7 to 10

Table 3: Effect[1] of supplementation with live yeast on feed intake and milk production parameters, body condition, weight and growth of early lactation heifers

Treatment:	Control	Yeast	lsd[4]	P-value[3]
Feed intake				
Basal diet[2] (kg DM/d)	11.5	12.0	1.363	0.411
Concentrate (kg DM/d)	6.6	6.5	0.221	0.159
Total (kg DM/d)	18.1	18.5	1.348	0.551
Milk production				
Milk (kg/d)	29.9	31.5	4.05	0.374
FPCM (kg/d)	28.9	31.6	3.47	0.110
Fat (%)	3.82	3.92	0.31	0.492
Protein (%)	3.26	3.27	0.18	0.878
Lactose (%)	4.72	4.68	0.08	0.305
Ureum (mg/dl)	21.8	21.9	3.76	0.956
Body weight and condition				
Body weight week 1-10 (kg)	574	576	22.8	0.820
Growth wk 1-10 (kg/wk)	2.2	1.9	2.68	0.797
BCS week 0	2.7	2.6	0.18	0.736
BCS week 10	2.6	2.7	0.19	0.352
Efficiency parameters				
VEM-coverage (%)	97.0	93.2	10.27	0.412
TMP-coverage (%)	111.7	106.9	7.67	0.193
Feed efficiency (kg/kg)	1.61	1.70	0.22	0.377
N efficiency (%)	31.0	32.4	3.76	0.403

[1] Figures within the same row with different superscript differ significantly ($P < 0.05$)
[2] Basal diet is inclusive the protein supplement.
[3] Differences are statistically significant if $P < 0.05$, trends ($P < 0.1$) are indicated by +
[4] lsd = least significant difference

The greatest effects of live yeast on productivity and health were seen in first lactation heifers (Table 3), with an increase in FPCM of 2.7 kg/d ($P = 0.11$) and a numerical improvement in feed efficiency of 5.6% (1.70 vs 1.61). The increase in FPCM was driven by a significant increase in fat yield (1248 g/day vs 1131 g/day; $P < 0.08$). Better fat yield is generally an indicator of better fibre digestion leading to more acetate production and a more balanced fermentation and potentially less issues with SARA. Somatic cell counts were significantly decreased in heifers over the course of the trial (log 1.71 vs log 1.92, $P < 0.03$), indicating some further health benefits.

Heifers are under greater stress than multiparous cows, particularly in a group-fed situation. Along with having to deal with SARA and dietary stress, heifers have to generate enough energy for production whilst still growing by supplementing with live yeast.

Conclusion

In conclusion, by supplementing daily with live yeast (VistaCell®), animals were better able to cope with dietary stress as demonstrated by better performance and positive effects on health.

References

Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, J. M. Salmon and P. Gouet (1996): Effects of a strain of Saccharomyces cerevisiae (Levucell SC1), a microbial additive for ruminants on lactate metabolism *in vitro*. Can. Jnl. Microbiol. 42, 927 – 933.

Gozho G. N., J. C., Plazier, D. O. Krause, A. D. Kennedy and K. M. Wittenberg (2005): Sub acute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. J. Dairy Sci. 88, 1399 -1403.

Khafipour, E., S. Li, J. C. Plaizier and D. O. Krause (2009): Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. Appl. and Environ. Microbiol. 75, 7115-7124.

Stone, W. C. (2004): Nutritional approaches to minimize Subacute Ruminal acidosis and laminitis in Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 87, E13 – E26.

Pinloche, E., N. McEwan, J. P. Marden, C. Bayourthe, E. Auclair and C. J. Newbold (2013): The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. Plos One 8 (7).

Thrune, M., A. Bach, M. Ruiz-Moreno, M. D. Stern, J. G. Linn. (2009): Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: Yeast supplementation on rumen fermentation. Livestock Science 124, 261-265.

Corresponding author

Dr. Svetlana Peganova
AB Vista Feed Ingredients
2/3 Woodstock Court, Blenheim Road, Marlborough Business Park
Marlborough, Wiltshire SN8 4AN
United Kingdom
E-mail: Svetlana.Peganova@abvista.com

PULTE

Futtermittel

einzeln

zusätzlich

ergänzend

für:

- R Rind
- S Schwein
- G Geflügel
- HT Heimtier
- PF Pflanzen

PUCOFERM Probiotikum

natürliches Betain

Süßmolkenpulver

PUCOSIL Siliermittel

PUCOVIT

PUCOCID Futtersäuren

PUCOFLITZ

Magnesiumoxid

PUCOPHYT
Phytogene Produkte

PUCOSAN

Enzyme

CALVOSAN

Futtermittelsalz

PUCOALGAL

PUCORAL

Reducing the incidence of Sub-Acute Ruminal Acidosis (SARA) by use of live yeast

Nicola Denise Walker[1], Svetlana Peganova[1] and Birgit Keimer[2]

[1] AB Vista Feed Ingredients, Marlborough, UK
[2] Biochem Zusatzstoffe Handels- und Produktionsgellschaft mbH, Lohne, DE

Introduction

SARA (Sub-acute ruminal acidosis) is a digestive disorder that occurs when ruminants are fed rations high in concentrate and low in physical effective fibre. With increased fermentable carbohydrate in the diet, rumen fermentation is increased leading to the accumulation of VFAs and rumen pH drops. Changes in the rumen microflora also occur, with an increase in numbers of bacteria which degrade starch and produce lactic acid as the end point of fermentation and a shift in the fermentation profile is also observed with higher levels of propionate, butyrate and lactate being produced from the fermentation of carbohydrates, and a decrease in acetate production due to lower fibre digestion. Due to the acidotic potential of lactic acid which is ten times that of propionate, even small amounts of lactate production can have a significant impact on reducing rumen pH. When rumen pH drops below pH 5.8, fibre digestion is reduced because the fibre digesting bacteria are sensitive to decreases in pH. If rumen pH drops below pH 5.5, the normal Gram negative rumen flora are also affected and die and lyse. When these bacteria lyse, they release endotoxin LPS (lipopolysaccharide), which can cause inflammation of the rumen epithelia (Khafipour et al, 2009). Damage to the rumen wall during SARA can also facilitate the passage of LPS across the wall into the bloodstream, further stimulating an inflammatory response (Gozho et al, 2005). Thus the minimum pH reached, time spent below pH 5.8, the number and frequency of bouts and recovery time are key in determining the impact of SARA. Generally animals experiencing an issue with SARA reduce their feed intake and can exhibit issues with lameness. Thus SARA can have a negative effect on animal health and performance.

Live yeast has been shown to be effective at helping to increase and stabilise rumen pH during SARA (Thrune et al, 2009). The mode of action of live yeast in helping to reduce the impact of SARA has been well described (Chaucheyras-Durand et al, 2009). Basically, live yeast exert a probiotic effect on the rumen flora causing changes in the microbial population with less bacteria present which produce lactic acid and more bacteria which utilise lactic acid (Pinloche et al, 2013). Dead or inactivated yeast have been described as having a prebiotic effect, by acting as a source of nutrients and metabolites for the rumen flora. However, to date, no-one has compared the effects of live and dead yeast in vivo, especially using the same strain and dose rate, the only difference in the viability of the cells.

This study was conducted to determine whether yeast could affect rumen pH and reduce the effects of SARA when animals were fed 1) a non-challenge diet or 2) SARA challenge diet and 3) whether the yeast needed to be viable to be effective at stabilising rumen pH after a SARA challenge.

Materials and methods

Six fistulated non-lactating beef heifers were used in a replicated 3x3 latin square and fed a non-challenge diet of 40% barley silage, 10% hay and 50% barley, the nutrient composition of which is described in Table 1. Treatments were (T1) Viable live yeast (VistaCell®) 4 g/d providing 50 billion cfu; (T2) Non-viable autoclaved live yeast (VistaCell®) 4 g/d, providing 2000 cfu; (T3) Control, no

yeast addition. The adaptation period lasted 2 weeks, then 1 week of the non-challenge diet (day 15 – day 21) where measurements were taken and in the final week's period (day 22 to day 28) the SARA challenge was imposed on day 21 by withholding 50% of the feed for 24h, followed by adding 5 kg barley directly into the rumen. Normal feeding was then resumed. Rumen pH was measured continuously using in-dwelling pH probes.

Data analyses were conducted on measurements collected during day 15 to day 21. Daily average ruminal pH (mean, nadir, maximum, range; difference between nadir and maximum) were analyzed using the mixed model procedure of SAS (PROC MIXED, SAS Institute, 1998) to account for the effects of square, period within square, animal within square and treatments (control, T1, T2). Treatment was considered a fixed effect; while square, period within square and animal within square were considered as random effects. Sampling time was considered a repeated effect for variables.

Table 1: Ingredient composition of the total mixed ration and MGA supplement

Item	DM %
Ingredient	
Barley silage[1]	40.0
Chopped grass hay[2]	10.0
Barley grain, dry rolled[3]	42.5
Supplement[4]	5.0
Canola meal	4.100
Barley, ground	3.517
Canola oil	0.057
Limestone	0.300
Salt	0.050
Urea	0.400
Molasses	1.500
Vitamin E (500,000 IU/kg)	0.006
Feedlot premix[6]	0.050
MGA[5]	2.5
MGA-100 premix	0.013
Barley, ground	2.428
Molasses, dried	0.057
Flavoring, cattle	0.002
Chemical composition	
DM, %	50.7 ± 2.23
OM, % of DM	91.8 ± 0.79
CP, % of DM	12.4 ± 0.75
NDF, % of DM	39.9 ± 4.23
ADF, % of DM	19.5 ± 4.19
Starch, % of DM	33.8 ± 4.48

[1] Composition (mean ± SD; % DM basis): 33.8 ± 2.14 DM, 88.9 ± 6.08 OM, 11.4 ± 1.36 CP, 55.2 ± 7.91 NDF, 30.3 ± 9.04 ADF, 16.3 ± 1.73 starch

[2] Composition (mean ± SD; % DM basis): 91.2 ± 0.62 DM, 93.4 ± 0.67 OM 6.47 ± 0.45 CP, 67.2 ± 4.79 NDF, 40.4 ± 0.86 ADF, 3.66 ± 0.49 starch

[3] Composition (mean ± SD; % DM basis): 91.9 ± 0.95 DM, 97.8 ± 0.16 OM 13.2 ± 1.26 CP, 20.2 ± 0.64 NDF, 5.97 ± 0.89 ADF, 49.2 ± 6.83 starch

[4] Composition (mean ± SD; % DM basis): 95.0 ± 0.69 DM, 63.3 ± 4.05 OM 18.2 ± 0.65 CP, 21.5 ± 4.19 NDF, 6.21 ± 0.52 ADF, 42.3 ± 2.06 starch

[5] Composition (mean ± SD; % DM basis): 91.6 ± 1.68 DM, 96.7 ± 0.48 OM 12.5 ± 1.48 CP, 15.8 ± 3.17 NDF, 6.57 ± 1.60 ADF, 56.0 ± 3.28 starch

[6] Feedlot premix provided an additional 14g/kg Ca, 103 mg/kg Zn, 26 mg/kg Cu, 47 mg/kg Mn, 1 mg/kg I, 0.50 mg/kg Se, 0.33 mg/kg Co, 17187 IU/kg vitamin A, 859 IU/kg vitamin D_3 and 24 IU/kg vitamin E of the diet DM

Table 2: DM intake and Ruminal pH profile of beef heifers fed a diet supplemented with a strain of yeast as live cells (T1) and dead yeast cells (T2) during the non-challenge baseline period

	Treatment[5]				
Variables	**Control**	**T1**	**T2**	**SEM**	**P-value**
DMI, kg/d	11.26	11.29	11.72	0.720	0.07
DMI, % of BW	1.51	1.50	1.57	0.096	0.07
pH					
Mean	6.05[a]	6.27[b]	6.26[b]	0.131	0.04
Nadir	5.47[a]	5.64[b]	5.66[b]	0.086	<0.01
Maximum	6.76	6.83	6.77	0.034	0.17
Range[1]	1.26[a]	1.18[ab]	1.10[b]	0.060	0.02
SARA<5.8, h/d[2]	7.03[a]	3.54[b]	3.65[b]	2.248	<0.01
AUC<5.8, pH x min/d[3]	474	71	47	218.7	0.27
Bout frequency, no./d	9.52[a]	4.88[b]	6.27[b]	1.586	0.05
Long bout (>3h) frequency, no./d[4]	0.69[a]	0.25[b]	0.33[b]	0.284	0.01
SARA<5.6, h/d	4.41[a]	2.47[b]	1.91[b]	1.364	<0.01
AUC<5.6, pH x min/d	42	37	14	13.3	0.09
Bout frequency, no./d	7	4	4	1.7	0.07
Long bout (>3h) frequency, no./d[4]	0.44	0.13	0.11	0.215	0.12

[a,b] Values within a row with different letters differ (P ≤ 0.05)
[1] Range = maximum ruminal pH – minimum ruminal pH
[2] SARA=Subacute ruminal acidosis measured as duration below the pH threshold (5.6 or 5.8)
[3] AUC = Area between the pH threshold (5.6 or 5.8) and the pH profile of the cow
[4] Only long bouts duration (> 3h) were considered
[5] Treatments were no yeast (Control), live yeast cells (T1), and dead yeast cells (T2)

The severity of SARA was determined using 2 thresholds: 5.8 for total SARA as described by Dohme et al. (2008) and 5.6 for severe SARA according to Nagaraja and Lechtenberg (2007). Ruminal pH bouts data were summarized by day and the total bout duration, the total area (pH units × min, defined as area under curve, AUC) and, the frequency of daily bouts (no/d) were analyzed. The long bouts of SARA under the pH threshold of 5.8 and 5.6 for more than 3 h were used to estimate the frequency of aggressive SARA.

The restricted maximum likelihood method was used for estimating the variance components. Denominator degrees of freedom were estimated using the Kenward-Roger's option in the model statement. Time-series covariance structure was modeled using the options of autoregressive order-one, compound symmetry, and unstructured order-one. The lowest Akaike and Bayesian information criteria were considered to select the best time-series covariance structures. The effects of sampling time, period and individual animal were examined. Data are presented as least squares means ± standard error of the means. Statistical significance was declared at $P \leq 0.05$ and trends were discussed at $P \leq 0.10$.

Results

During the non-challenge period (Table 2), both yeast treatments increased mean pH compared to control (6.27 vs 6.26 vs 6.05, P = 0.07) and decreased the time (h/d) spent below pH 5.8 (3.54 vs 3.65 vs 7.04, P < 0.01). Immediately after the SARA challenge (Table 3), DMI was maintained in T1; however DMI was significantly reduced in the control and T2 (-0.5 kg & -1.7 kg respectively, P < 0.01). Mean pH was numerically higher with T1 (5.86 vs 5.70 vs 5.69, P = 0.13), and time spent below pH 5.8 was numerically reduced (10.40 h/d vs 12.65 vs 13.12, P = 0.11). Due to large animal variation in response to SARA, and due to the limited number of animals tested, only numerical differ-

ences were observed. Live yeast supplementation allowed the animal to recover more quickly in the days following the acidosis challenge and reduced the frequency of periods when pH was below 5.8.

Table 3: DM intake and Ruminal pH profile of beef heifers fed a diet supplemented with a strain of yeast as live cells (T1) and dead yeast cells (T2) one day after a grain challenge to induce SARA

	d 1 Post-challenge (0h – 24h)[6]				
	Treatment				
Variables	**Control**	**T1[5]**	**T2[5]**	**SEM**	**P Value**
DMI, kg/d	10.71	11.22	10.01	1.111	0.90
DMI, % of BW	1.43	1.49	1.48	0.153	0.91
pH					
Mean	5.69	5.86	5.70	0.183	0.13
Nadir	4.85	4.98	4.77	0.255	0.25
Maximum	6.89	7.00	7.05	0.058	0.32
Range[1]	2.04	2.02	2.28	0.277	0.25
SARA<5.8, h/d[3]	13.12	10.40	12.65	2.666	0.25
AUC<5.8, pH x min/d[4]	487	347	508	211.9	0.11
Bout frequency, no./d	11.50	7.83	7.83	4.203	0.28
Long bout (>3h) frequency, no./d[2]	1.00	1.00	1.00	0.325	1.00
SARA<5.6, h/d	10.67	8.44	11.04	3.169	0.32
AUC<5.6, pH x min/d	344	233	366	178.4	0.15
Bout frequency, no./d	9.66	8.00	6.50	2.450	0.66
Long bout (>3h) frequency, no./d[2]	1.16	0.66	1.00	0.336	0.33

[1] Range = maximum ruminal pH – minimum ruminal pH
[2] Only long bouts duration (> 3h) were considered
[3] SARA=Subacute ruminal acidosis measured as duration below the pH threshold (5.6 or 5.8)
[4] AUC = Area between the pH threshold (5.6 or 5.8) and the pH profile of the cow
[5] Treatments were no yeast (Control), live yeast cells (T1), and dead yeast cells (T2)
[6] Effect of period x square interaction ($P < 0.05$)

Discussion

SARA was successfully induced using this model as demonstrated by the decrease in mean rumen pH, the nadir reached and the increase in number and frequency of acidotic bouts when comparing the challenge period with the baseline non-challenge period.

This study also investigated the effects of a strain of yeast on rumen pH under both non-challenge and SARA challenge conditions. Under non-challenge conditions, the viability of the yeast was not an important factor as both live and dead cells significantly increased rumen pH compared with control and reduced the time spent below pH 5.8. However, under SARA challenge conditions it was demonstrated that the viability of the yeast was an important factor when animals were faced with a sudden increase in readily fermentable carbohydrates.

By using the same strain, the same dose rate, but comparing live cells versus dead cells, it was possible to show that viability of the yeast is a key factor in reducing the impact of SARA. In order to increase rumen pH, reduce the time spent below pH 5.8, and reduce the number and frequency of bouts of SARA and to maintain dry matter intake during a SARA challenge, it would appear that live yeast cells have a greater positive effect than dead yeast cells. One reason why live cells are possibly more effective under challenge conditions is that they act as a probiotic and cause shifts and changes in the rumen microbial populations and work to stabilise rumen pH by both competing for sugars against organisms which produce lactic acid and they also increase the number of bacteria which utilise lactic acid (Chaucheyras et al, 1996). Whereas dead yeast act as a prebiotic and only increase the

number of lactate utilising bacteria by supplying nutrients to improve their growth (Chaucheyras et al, 1996). Further work to examine the effect on the rumen microbial populations will be carried out to determine whether there were any differences in the microbial population between the different treatments and challenge periods.

Conclusion

In conclusion, in a non-challenge situation, supplementation with yeast led to an increase in rumen pH and viability of the yeast cells was not an important factor. However, during a SARA challenge, the yeast had to be alive and viable to be able to stabilise DMI and rumen pH, and to allow the rumen to recover more quickly.

References

Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, J. M. Salmon and P. Gouet (1996): Effects of a strain of Saccharomyces cerevisiae (Levucell SC1), a microbial additive for ruminants on lactate metabolism *in vitro*. Can. Jnl. Microbiol. 42, 927 – 933.

Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker, and A. Bach 2008: Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. Anim. Feed Sci. Technol. (145), 5-26.

Dohme, F., T. J. DeVries, and K. A. Beauchemin (2008): Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: ruminal pH. J. Dairy Sci. 91 (9), 3554-3567.

Gozho G. N., J. C., Plazier, D. O. Krause, A. D. Kennedy and K. M. Wittenberg (2005): Sub acute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. J. Dairy Sci. 88, 1399 -1403.

Khafipour, E., S. Li, J. C. Plaizier and D. O. Krause (2009): Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. Appl. and Environ. Microbiol. 75, 7115-7124.

Stone, W. C. (2004): Nutritional approaches to minimize Subacute Ruminal acidosis and laminitis in Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 87: E13 – E26.

Nagaraja, T. G. and K. F. Lechtenberg (2007): Acidosis in Feedlot Cattle. Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice 23 (2), 333-350.

Pinloche, E., N. McEwan, J. P. Marden, C. Bayourthe, E. Auclair and C. J. Newbold (2013): The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. Plos One 8 (7).

Thrune, M., A. Bach, M. Ruiz-Moreno, M. D. Stern, J. G. Linn (2009): Effects of Saccharomyces cerevisiae on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: Yeast supplementation on rumen fermentation. Livestock Science 124, 261-265.

Corresponding author

Dr. Svetlana Peganova
AB Vista Feed Ingredients
2/3 Woodstock Court, Blenheim Road, Marlborough Business Park
Marlborough, Wiltshire SN8 4AN
United Kingdom
E-mail: Svetlana.Peganova@abvista.com

Untersuchungen zum Einfluss der Brunst auf die Futteraufnahme von Milchkühen

Kathrin Halli[1], Christian Koch[2], Franz-Josef Romberg[3] und Steffen Hoy[1]

[1] Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, DE
[2] Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung Hofgut Neumühle, DE
[3] Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Westpfalz (DLR), DE

Einleitung

Während der Brunst ist das Verhalten von Rindern, wie zum Beispiel die Bewegungsaktivität, deutlich verändert. So steigt durch erhöhtes Interesse am Artgenossen die Aktivität der Tiere während der Brunst an, wodurch gleichermaßen die Gesamtruhezeit verkürzt ist. Die visuelle Brunsterkennung erfordert viel Erfahrung und Arbeitsaufwand. Allerdings gibt es seit einiger Zeit technische Hilfsmittel, wie Pedometer oder am Halsband befestigte Aktivitätsmessgeräte (Respaktoren), die diesen Parameter elektronisch erfassen und somit einen wichtigen Beitrag zur Brunsterkennung leisten können. In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte außerdem nachgewiesen werden, dass auch die Wiederkaudauer von der Brunst beeinflusst wird. Dieser Einfluss drückt sichdurch einen bereits am Tag vor der Brunst beginnenden,signifikanten Rückgang der Wiederkaudauer aus. Dabei wird angenommen, dass dies durch eine geringere Futteraufnahme bei gleichzeitig gesteigerter Unruhe und Bewegungsaktivität der Tiere verursacht werden könnte.

Die vorliegende Untersuchung befasst sich mit der Frage nach dem möglichen Zusammenhang zwischen Brunst und elektronisch erfasster, täglicher und individueller Futteraufnahme. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich ein eventueller Rückgang der Futteraufnahme zum Zeitpunkt der Brunst auch auf die Milchleistung am Folgetag auswirkt.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden mit 100 Milchkühen der Rasse Dt. Holstein schwarzbunt am DLR Westpfalz, Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung, Hofgut Neumühle in Münchweiler an der Alsenz durchgeführt. Mittels 30 elektronischer Futter-Wiegetröge der Firma Insentec B.V. (RoughageIntakeControl-System), die dort seit Mitte 2009 im Einsatz sind, werden automatisch die Futteraufnahmedauer, -menge und die Anzahl der Futtertrogbesuche auf individueller Basis gemessen und gespeichert. Die Wiegetröge befinden sich im Untersuchungsbereich des mit 60 Tiefboxen ausgestatteten Laufstalles. Das Tier-Fressplatz-Verhältnis beträgt demnach 2:1. Nach vorangegangener Resteentleerung werden die Futter-Wiegetröge 1x täglich (ca. 6:30 Uhr) mit etwa 80 – 85 kg einer TMR mit 46,5 % Trockenmasseanteil befüllt. Die TMR setzt sich wie in Tabelle 1 beschrieben zusammen. Während des Befüllens sind die Tröge für eine Dauer von 20 – 30 Minuten geschlossen, was bedeutet, dass die Tiere während dieser Zeit kein Futter aufnehmen können. Frisches Wasser steht jederzeit ad libitum zur Verfügung. Über die Futter-Wiegetröge wurden die folgenden Parameter erfasst: „Tägliche Futteraufnahmemenge (kg)", „Tägliche Futteraufnahmedauer (min)" und „Anzahl Futtertrogbesuche pro Tag".

2x täglich werden die Tiere in einem kombinierten 8er Fischgräten-Melkstand und 10er Side-by-Side-Melkstand der Firma GEA Farm Technologies gemolken. Die Melkzeiten fallen dabei im Regelfall auf

5:00 Uhr morgens und 15:30 Uhr nachmittags. Die tägliche Milchleistung (kg) wird über das Herdenmanagement-Programm Dairy Planner C21 der Firma GEA gespeichert und ausgelesen.

Die Brunsterkennung erfolgte sowohl visuell als auch über Pedometer-basierte Aktivitätsmessung. Insgesamt bestand der Datensatz aus 138 Brunstzyklen. Um sicherzustellen, dass es sich bei den beobachteten Zeiträumen tatsächlich um eine Brunst gehandelt hat, wurden ausschließlich Brunsten mit erfolgreicher Besamung in die Untersuchung mit aufgenommen. Dabei stammten 32 Brunstzyklen von Tieren der ersten Laktation (n = 672 Tage). Die 106 weiteren ausgewerteten Zyklen stammten von Tieren höherer Laktationen (2 – 6) (n = 2.226 Tage). Von den 100 Kühen waren 37 Tiere mit zwei Laktationen vertreten, eine sogar mit drei. Der Parameter „Milchleistung (kg)" basiert aufgrund lückenhafter Datensätze auf einer Anzahl von 25 ausgewerteten Brunstzyklen (n = 525 Tage), die von insgesamt 24 Tieren stammten. Ein Tier war hierbei demnach mit zwei Laktationen vertreten.

Um mit der Statistik-Software SPSS 20.0 den möglichen Einfluss der Brunst auf die genannten Parameter unter Berücksichtigung der Laktationsnummer zu untersuchen, wurde der Tag der Brunst (Tag 0) den übrigen Zyklustagen (Referenzperiode) (n = 20) gegenübergestellt. Dabei wurde die Referenzperiode auf 10 Tage vor der Brunst und 10 Tage nach der Brunst aufgeteilt. Außerdem wurde untersucht, ob die Brunst die Tagesmilchmenge (kg) beeinflusst.

Tabelle 1: Zusammensetzung der TMR in % der Trockenmasse

TMR	% der Trockenmasse
Pressschnitzelsilage	18,0
Gras (1. Schnitt 2012)	21,5
Stroh & Heu	3,2
Maissilage	21,4
K-Mais	10,1
EM-Gerste	8,1
Sojaextraktionsschrot	4,0
Rapsextraktionsschrot	12,2
Salz	0,3
Harnstoff	0,5
Kalk	0,2
Mineralfutter	0,5

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigten eine durchschnittliche Frischmasseaufnahme von 42,5 kg, was bei einem Trockenmasseanteil von 46,5 % in der TMR einer Trockenmasseaufnahme von 19,8 kg/Tag entspricht. Pro 24 h verbrachten die Tiere im Mittel 190,8 Minuten mit der Futteraufnahme am Wiegetrog. Diese Dauer wurde auf durchschnittlich 48,5 Besuche pro Tag am Futtertrog aufgeteilt. Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Einfluss der Brunst auf die Futteraufnahmemenge (kg) und die Futteraufnahmedauer (min) ($p < 0,001$). Die Tiere nahmen am Tag der Brunst 4,6 kg weniger Futter auf (-10,3 %) und verbrachten 44,2 Minuten weniger Zeit am Trog (- 20,8 %) als im Mittel der anderen Tage. Auch die Anzahl der Futtertrogbesuche war am Tag der Brunst um 9,1 % reduziert. Dieser Rückgang war allerdings nicht signifikant.

Die Laktationsnummer hatte auf alle drei Parameter einen signifikanten Einfluss ($p < 0,001$) (Tabelle 2). Es zeigte sich, dass erstlaktierende Kühe im Schnitt mehr Zeit mit der Futteraufnahme verbrachten (205,3 Minuten/Tag) als ältere Kühe (Laktation 2-6) (176,3 Minuten/Tag). Außerdem kamen sie mit 53,3 Besuchen/Tag häufiger zum Futtertrog als ältere Tiere (43,7 Besuche/Tag). Allerdings nah-

men sie dabei mit 39,2 kg Frischmasse (18,3 kg Trockenmasse) weniger Futter auf als Kühe höherer Laktationsnummer (45,8 kg Frischmasse bzw. 21,3 kg Trockenmasse).

Der Einfluss der Brunst auf die drei untersuchen Parameter war bei Tieren höherer Laktationsnummer deutlich stärker ausgeprägt als bei erstlaktierenden Kühen (Tabelle 3). Der prozentuale Rückgang der Futteraufnahmemenge am Tag 0 lag bei älteren Kühen bei 13,2 % Frisch- bzw. 13,5 % Trockenmasse. Bei den erstlaktierenden Kühen betrug der prozentuale Rückgang der Futteraufnahmemenge lediglich 6,9 % (FM, TM). Der Effekt der Brunst war für beide Laktationsgruppen statistisch abzusichern ($p < 0,05$). Ähnlich stellen sich die Ergebnisse der Futteraufnahmedauer (min) und der Anzahl der Futtertrogbesuche dar. Im Mittel war die Futteraufnahmedauer am Tag der Brunst bei älteren Kühen um 24,6 % und bei erstlaktierenden um 17,4 % reduziert. Die Anzahl der Futtertrogbesuche wurde von älteren Tieren um 12,4 % reduziert, während erstlaktierende die Anzahl der Besuche lediglich um 6,2 % verringerten. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

Die mittlere Milchleistung lag bei 43,8 kg/Tier/Tag. Allerdings waren die Tagesdurchschnittswerte über den Zeitraum des Zyklus durch starke Schwankungen charakterisiert. Aus diesem Grund konnte kein statistisch signifikanter Einfluss der Brunst auf diesen Parameter nachgewiesen werden (Abbildung 1). Auffällig ist jedoch die am Tag eins nach der Brunst um 4,1 % abfallende Leistung, welche am darauf folgenden Tag wieder um 7,3 % ansteigt.

Tabelle 2: Einfluss der Laktationsnummer (Erstkalbinnen im Vergleich zu älteren Kühen) auf die Futteraufnahme. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind mit *** gekennzeichnet.

	Parameter				
	Anzahl Tage (n)	Frischmasseaufnahme (kg/d)	Trockenmasseaufnahme (kg/d)	Futteraufnahmedauer (min/d)	Anzahl Trogbesuche/d
Ø	2898	42,5	19,8	190,8	48,5
Laktations-Nr.:					
1	672	39,2	18,3	205,3	53,3
≥ 2	2226	45,8	21,3	176,3	43,7
Differenz (abs.)		6,6	3,0	29,0	9,6
Differenz (%)		14,4***	14,1***	14,1***	18,0***

Tabelle 3: Auswirkung der Brunst auf die Futteraufnahme bei Erstkalbinnen und älteren Kühen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

		Parameter							
		FM-Aufnahme (kg/d)	Diff. (kg/d) %	TM-Aufnahme (kg/d)	Diff. (kg/d) %	Futteraufnahmedauer (min/d)	Diff. (min/d) %	Anzahl Trogbesuche/d	Diff. (abs.) %
Lakt.-Nr.:	**Status**								
1	a	37,8	2,8*	17,6	1,3*	185,8	39,1	51,6	3,4
	b	40,6	6,9*	18,9	6,9*	224,9	17,4	55,0	6,2
≥ 2	a	42,6	6,5*	19,8	3,1*	151,6	49,4	40,8	5,8
	b	49,1	13,2*	22,9	13,5*	201,0	24,6	46,6	12,4

a = Tag der Brunst; b = Referenzperiode

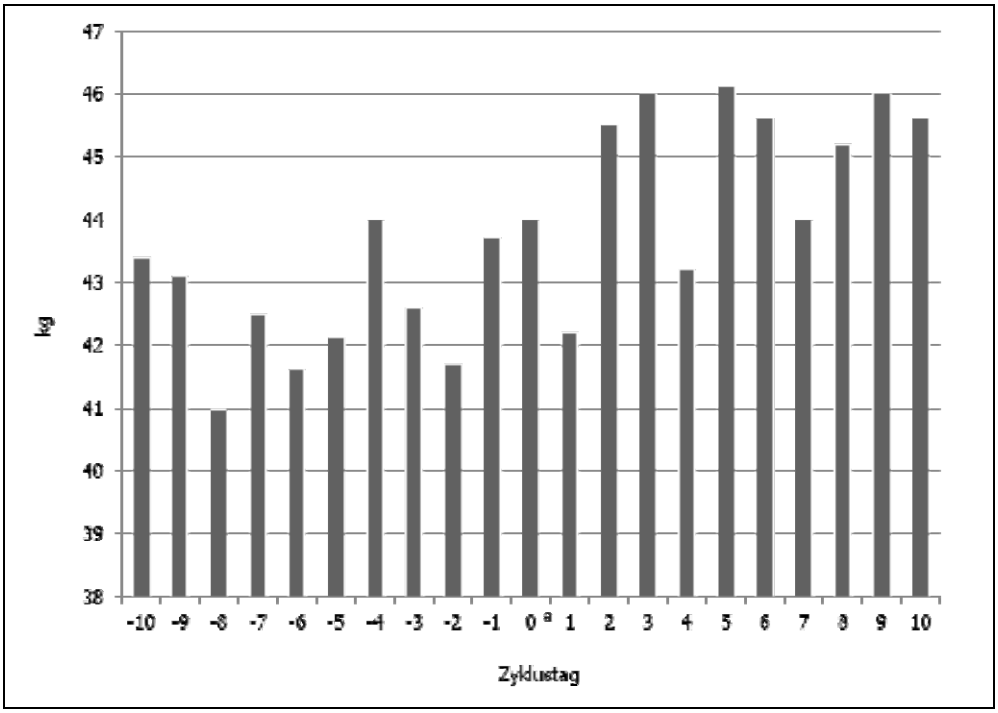


Abbildung 1: Durchschnittliche tägliche Milchleistung (kg) über den Zeitraum des Zyklus von 21 Tagen (n = 525Tagesgemelke); [a]Tag der Brunst

Diskussion

Die am Tag der Brunst reduzierten Werte der in der vorliegenden Studie untersuchten Parameter könnten durch einen Anstieg der Aktivität kurz vor und während der Brunst verursacht sein. Dieser wurde bereits in mehreren Studien, unter anderem von Arney et al. (1994); Hurnik et al. (1975) oder Kiddy (1977) nachgewiesen.In der Studie von Reith und Hoy (2012) konnte außerdem bewiesen werden, dass die Brunst einen reduzierenden Effekt auf die Wiederkauaktivität von Kühen hat. Ihre Ergebnisse zeigten eine um 17 % (74 Minuten pro Tag) verringerte Wiederkauaktivität am Tag der Brunst im Vergleich zur Referenzperiode (drei Tage vor und drei Tage nach der Brunst). Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung zur reduzierten Futteraufnahmemenge am Tag der Brunst erklärt die reduzierte Wiederkauaktivität der Untersuchung von Reith und Hoy (2012).

Die Laktationsnummer wirkte sich auf alle drei untersuchten Parameter der Futteraufnahme signifikant aus. Das Ergebnis der niedrigeren Futteraufnahmemenge bei gleichzeitig längerer Futteraufnahmedauer und häufigeren Futtertrogbesuchen, das bei den erstlaktierenden Tieren im Vergleich zu älteren Kühen beobachtet wurde, bestätigt die Resultate von Proudfoot et al. (2009). Über ähnliche Ergebnisse berichteten Dado und Allen (1994), die jedoch neben einer niedrigeren Futteraufnahmemenge bei mehr Trogbesuchen der Erstkalbinnen eine höhere Futteraufnahme bei Tieren höherer Laktation fanden. Ulbrich et al. (2004) beschrieben eine höhere Futteraufnahmegeschwindigkeit bei älteren Tieren im Vergleich zu jüngeren. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie könnten dadurch erklärt werden.

Aufgrund starker Schwankungen der Tagesmittelwerte über den Zeitraum des Zyklus von 21 Tagen konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Einfluss der Brunst auf die tägliche Michleistung nachgewiesen werden. Das Ergebnis der reduzierten Milchmenge am Tag eins nach der Brunst mit anschließendem Wiederanstieg am Tag zwei kommt den Ergebnissen früherer Studien jedoch nahe. So fanden Horrell et al. (1985) eine reduzierte Milchleistung beim ersten Melken nach Beginn der

Brunst, gefolgt von einem Wiederanstieg beim Melkvorgang danach. In der Untersuchung von Schofield et al. (1991) wurde eine signifikant reduzierte Milchleistung am Tag der Brunst nachgewiesen und Lewis und Newman (1984) wiesen einen leichten Rückgang der Milchleistung am Tag vor der Brunst bis zwei Tage nach der Brunst nach. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ein Rückgang der Milchleistung im brunstnahen Zeitraum erwartet werden.

Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Untersuchung konnte ein teilweise signifikanter Einfluss der Brunst auf das Futteraufnahmeverhalten von Milchkühen nachgewiesen werden. Bei Kühen höherer Laktationsnummer (2 - 6) war dieser Einfluss deutlich stärker ausgeprägt als bei erstlaktierenden Kühen. Der Einfluss der Laktation war für alle untersuchten Futteraufnahme-Parameter signifikant. Die tägliche Milchleistung war durch starke Schwankungen charakterisiert. Es konnte kein signifikanter Einfluss der Brunst auf diesen Parameter ermittelt werden. Es deutete sich allerdings ein Rückgang der mittleren Tagesmilchleistung um etwa 4 % am Tag nach der Brunst mit anschließendem „Überschießen" um 7,3 % am Folgetag an. Dieser Verlauf kann mit einem brunstbedingten Rückgang der Futteraufnahme mit anschließendem Wiederanstieg am Tag nach der Brunst in Zusammenhang gebracht werden.

Weitere, bereits laufende Untersuchungen auf Hofgut Neumühle sollen untersuchen, ob die Wiederkauaktivität in direktem Zusammenhang zur Futteraufnahme steht und ob diese Parameter auch im Herdenmanagement sinnvoll eingesetzt werden können.

Literatur

Arney, D.R., Kitwood, S.E., Phillips, C.J.C. (1994): The increase in activity during oestrus in dairy cows. Appl. Anim. Behav. Sci 40, 211-218.

Dado, R.G., Allen, M.S. (1994): Variation in and relationships among feeding, chewing and drinking variables for lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 77, 132-144.

Horrell, R.I., Macmillan, K.L., Kilgour, R., Bremner, K. (1985): Changes in milk yield and composition at oestrus in dairy cows. J. Dairy Sci. 52, 9-16.

Hurnik, J.F., King, G.J., Robertson, H.A. (1975): Estrous and related behaviour in postpartum Holstein cows. Appl. Anim. Ethol. 2, 55-68.

Kiddy, C.A. (1977): Variation in physical activity as an indication of estrus in dairy cows. J. Dairy Sci. 60, 235-243.

Lewis, G.S., Newman, S.K. (1984): Changes throughout estrous cycles of variables that might indicate estrus in dairy cows. J. Dairy Sci. 67, 146-152.

Proudfoot, K.L., Veira, D.M., Weary, D.M., vonKeyserlingk, M.A.G. (2009): Competition at the feed bunk changes the feeding, standing, and social behaviour of transition dairy cows. J. Dairy Sci. 92, 3116-3123.

Reith, S., Hoy, S. (2012): Relationship between daily rumination time and estrus of dairy cows. J. Dairy Sci. 95, 6414-6420.

Schofield. S.A., Phillips, C.J.C., Owens, A.R. (1991): Variation in the milk production, activity rate and electrical impedance of cervical mucus over the oestrus period of dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 24, 231-248.

Ulbrich, M., Hoffman, M., Drochner, W. (2004): Fütterung und Tiergesundheit. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

Autorenanschrift

Kathrin Halli
Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
Justus-Liebig-Universität Gießen
Leihgesterner Weg 52, 35392 Gießen
E-Mail: Kathrin.Halli@agrar.uni-giessen.de

Ausnutzung der Abfallbiomasse aus Bäumen in der granulierten Futtermischung für Rotwild

Miroslav Vodnansky[1], Matúš Rajský[2], Mária Chrenková[2], Zuzana Formelová[2] und Zuzana Mlyneková[2]

[1] Mitteleuropäisches Institut für Wildtierökologie, Wien, Brno, Nitra; Institut für Wildtierökologie der Veterinärmedizinischen u. Pharmazeutischen Universität Brünn, CZ
[2] Nationales Landwirtschaft- und Ernährungszentrum, Forschungsinstitut für Tierproduktion Nitra: Institut für Tierernährung, SK

Einleitung

Testen der Ausnutzung der Abfallbiomasse aus Bäumen in Rotwildernährung hatte zwei Gründe. Der erste ist die Wiederverwendung der Abfallbiomasse, die beim Hieb in den Waldbeständen produziert wird. Der zweite Grund ist produktive Ausnutzung der Abfallbiomasse in der Rotwildfütterung mit dem Ziel die Waldbestände vor übermäßigen Wildschäden zu schützen. Waldgehölze repräsentieren natürliche Nahrung von Rotwild, sie werden intensiv verzehrt. Dabei entstehen durch Schälaktivität oft markante Schäden für die Forstwirtschaft. Waldgehölze, als Ergänzungsmittel in der Futtermischung, werden deswegen dem Rotwild direkt im Futter natürliche Nahrung bieten, die außer vielen Nährstoffen auch für die Wiederkäuer bedeutende strukturierte Faser beinhaltet, die gewöhnlich in den üblichen konzentrierten Ergänzungsfuttermischungen fehlt.

Das Ziel der Arbeit war diese granulierte Futtermischung für Rotwild mit Waldgehölzeinhalt zu entwerfen und zu erzeugen, die Verdaulichkeit dieser Futtermischung zu ermitteln und den Einfluss dieses Futters mit Abfallbiomasse aus Bäumen auf den Wildschäden durch Rotwild in Modellbedingungen zu überprüfen.

Material und Methoden

In den Fütterungs- und Bilanz- Versuchen wurde eine Futtermischung für Rotwild getestet, die als einen wesentlichen Bestandteil die Verarbeitungsrückstände der Holzernte in der Forstwirtschaft enthielt. Die Zusammensetzung dieser Futtermischung im Bezug auf die Trockensubstanz war wie folgt: Zweige von Laub- und Nadelgehölzen 30 %, Getreide 33 %, Heu 21 %, Diffusionsschnitzel 14 %, Mineral- und Vitaminergänzungsfuttermittel 2 %. Bei der Futterzusammensetzung wurde der Erhaltungsbedarf für Rotwild in Wintersaison berücksichtigt. Das Granulat hatte einen Durchmesser bis zu 14 mm, deswegen war es ermöglich Fraktionen von Zweigen bis 8 mm zu verwenden.

Das durchschnittliche Gehalt an Nährstoffen in granulierter Futtermischung zeigt Tabelle 1.

Die Ermittlung der scheinbaren Verdaulichkeit von Nährstoffen beim Rotwild erfolgte während der Winterperiode (Jänner – Februar). Der Fütterungsversuch wurde mit 4 Stück Rotwild durchgeführt, die während der Untersuchungsperiode einzeln in den Stoffwechselboxen eingestellt waren. Der zweite Untersuchungsschwerpunkt war die Überprüfung der Eignung dieses Futter für das Rotwild bei dem Einfluss auf Schälenintensität der Fichtenrinde. Diese Untersuchungsphase wurde in zwei Gruppen von Tieren, je drei Tiere, durchgeführt – zusammen waren es sechs gravide Tieren. Futterration der ersten Gruppe bestand nur aus Wiesenheu, das gewöhnlich in den Jagdrevieren mit Rotwild benutzt wird. Die

zweite Gruppe hatte nicht nur Wiesenheu aber auch das testete Granulat mit Zweigen aus Bäumen zur Verfügung.

Jeden Tag waren frische Fichtenbaustämme mit Durchschnitt 6-20 cm gewechselt. Täglich haben wir planimetrisch geschälte Fläche von Rinde und Futteraufnahme gemessen. Umrechnung auf Gewichteinheiten haben wir in der Beziehung 100 cm^2 = 26 g durchgeführt.

Tabelle 1: Durchschnittliche Zusammensetzung der granulierten Futtermischung mit Abfallbiomasse ($g.kg^{-1}$)

Nährstoff	in Frischmasse	in Trockensubstanz
Trockensubstanz	900.30	-
Wasser	99.7	-
Rohprotein	100.29	111.40
Rohfaser	180.15	200.10
Rohfett	27.13	30.13
Rohasche	84.74	94.12
N-freie Extraktstoffe	508.01	564.27
Organische Masse	815.56	905.88
Ca	12.15	13.50
P	3.08	3.42
Mg	0.91	1.01
Na	0.74	0.82
K	9.07	10.07

Anmerkung: Bei der Futterzusammensetzung wurde der Erhaltungsbedarf für Rotwild in Wintersaison berücksichtigt.

Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse bei 4 Versuchstieren zeigten folgende Verdaulichkeitswerte der granulierten Futtermischung mit Gehalt von Abfallbiomasse aus Bäumen in der Winterperiode von Januar bis Februar: Organische Masse bei 61,41 %, Rohprotein bei 49,73 %, Rohfett bei 67,54 %, Rohfaser 26,35 %, N – freie Extraktstoffen bei 74,67 %. Die Unterschiede der festgestellten Verdaulichkeitswerte bei einzelnen Versuchstieren waren nicht signifikant.

Im zweiten Versuch, der auf Überprüfung des Einflusses von granuliertem Futter mit Waldgehölzeinhalt orientiert wurde, wurde der Einfluss von Zusammensetzung der Futterration auf Schälaktivität bestätigt. In der ersten Gruppe mit Rotwild, das nur mit Weideheu gefüttert wurde, betrug der durchschnittliche Schälenintensität der Fichtenrinde 1053 g, die Wiesenheuaufnahme betrug 2245 g pro Tier und Tag (Abbildung 1). In der zweiten Gruppe wurde Heu und granulierte Futtermischung mit Waldgehölzeinhalt verfüttert. Da betrug die Schälenintensität der Fichtenrinde 20 g pro Tier und Tag, das ist nur 1,9 % im Vergleich zur Gruppe, die nur mit Heu gefüttert wurde. Es handelt sich um einen statistisch hochsignifikanten Unterschied. Aufnahme des Versuchsgranulates betrug 2712 g und Heuaufnahme nur 314 Gramm pro Rotwildindividuum und Tag.

Aus den Resultaten geht auch hervor, dass die gesamte Trockensubstanzaufnahme (Gesamtaufnahme von Trockensubstanz aus Rinde und Futter) umgerechnet auf ein Tier und Tag betrug in der Gruppe, die mit Heu und granulierten Futtermischung gefüttert wurde, 2729 g und in der Gruppe, die nur mit Heu gefüttert wurde, nur 2354 g.

Abbildung 1: Schälaktivität in der ersten Gruppe mit Rotwild, die nur mit Wiesenheu gefüttert wurde

Diskussion

Die Bilanzversuche mit 4 Rottieren in Stoffwechselkäfigen während der Winterperiode in den Monaten Dezember bis Februar ergaben 61,41 % Verdaulichkeit der organischen Substanz. Neben der guten Verwertbarkeit ist ein weiterer Vorteil dieser Futtermischung, dass sie neben fein gemahlenen Partikeln auch eine physiologisch ausreichende grobe Struktur aufweist, was für den physiologischen Ablauf der Verdauung bei den Wiederkäuern sehr wichtig ist. Bei Vorlagen eines solchen wiederkäuergerechten Futters mit ausreichender geschmacklicher Attraktivität ist zu erwarten, dass die Wildschäden aufgrund der verringerten Verbiss- und Schälaktivität des Rotwildes herabgesetzt oder sogar vermieden werden können. Nach Vodnansky et al. (2011) sind Kenntnisse über Futtermittelpräferenz bei der Schalenwildfutterung sehr bedeutsam. Futtermittelpräferenz hängt mit Geschmack und Nährwert des Futters zusammen.

Nach Vorlegung geschmacklich mehr attraktiven Futters, werden es die Tiere in erhöhtem Ausmaß aufnehmen. Zugabe von granulierter Futtermischung mit Abfallbiomasse aus Bäumen hat sich auf der Aufnahme umsetzbarer Energie ausgewirkt. Bei der Konsumation von Heu allein und gleichzeitigen Rindenschälen hat ein Individuum der Rotwildes durchschnittlich insgesamt 19,4 MJ/Tag eingenommen. Bei Zugabe von granulierter Futtermischung mit Abfallbiomasse aus Bäumen zu dem Heu und der Rinde ist die Aufnahme von umsetzbarer Energie auf 23,6 MJ/Tag aufgestiegen.

Rajský und Rajčáková (2013) haben auch auf die Möglichkeiten der Ausnutzung von Waldgehölzen bei der Futtermittelproduktion für Rotwild auf dem Beispiel der aus Waldbäumezweigen hergestellten Silage hingewiesen.

Literatur

Vodnansky, M., Rajský, M., Foltys, V., Bencová, E. (2011): Eignung der silierten Zuckerrübenpressschnitzel als Zusatzfutter für das Rotwild. In. Tagungsband 10. BOKU - Symposium Tierernährung, Gesunde Tierernährung Qualität vom Futtermittel bis zum Nahrungsmittel, 28. April, 2011, Universität für Bodenkultur Wien, 226 – 230, ISBN 978-3-900962-94-4.

Rajský, M., Rajčáková, Ľ.: Quality of maize silage with supplement of forest tree – potentional supplemental feed for red deer (Cervus elaphus) and other wild ruminant species. In. Proceedings of 15 th International Conference Forage Conservation, High Tatras, Hotel Atrium, Nový Smokovec, Slovak Republic, 24.-26.09.2013, 135-136, ISBN 978-80-89418-29-9.

Autorenanschrift

Dr. Miroslav Vodnansky, PhD.
Mitteleuropäisches Institut für Wildtierökologie, Wien, Brno, Nitra
Erzherzog Karlstrasse 33/2/82, A-1220 Wien
E-Mail: vodnansky@chello.at

Ing. Matúš Rajský, PhD., Ing. Mária Chrenková, CSc., Ing. Zuzana Formelová, PhD., Ing. Zuzana Mlyneková, PhD.
Nationales Landwirtschaft- und Ernährungszentrum
Forschungsinstitut für Tierproduktion Nitra
Institut für Tierernährung
Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slowakei
E-Mail: rajsky@vuzv.sk

Der Gehalt an resistenter Stärke verschiedener Gerstensorten und seine Beeinflussung durch organische Säuren und Pullulanase

Hauke Harder[1], Annabella Khol-Parisini[1], Jutta Werner[2], Lisa Schmidt[2], Patrick Weinmann[2] und Qendrim Zebeli[1]

[1] Institut für Tierernährung und Funktionelle Pflanzenstoffe, Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien, AT

[2] HBLVA für chemische Industrie Rosensteingasse, Wien, AT

Einleitung

Gerste wird weltweit in der Humanernährung und der Futtermittelindustrie eingesetzt. Sie ist reich an Proteinen und enthält viel Stärke, welche für den Energiegehalt verantwortlich ist und die Gerste zu einem wertvollen Futtermittel macht (NIKKHAH, 2012). Der Verzehr großer Mengen an schnell verdaulicher Stärke kann jedoch dazu führen, dass es bei Mensch (KWAK et al. 2012) und Tier (REGMI et al. 2011) zu metabolischen Störungen kommen kann. Dies betrifft insbesondere die Stärke von Gerste, welche schnell in den oberen Darm Sektionen abgebaut wird (NIKKHAH, 2012). Beim Menschen führt dies unter anderem zu den sogenannten Zivilisationskrankheiten wie Fettleibigkeit und Diabetes Mellitus Typ 2 (ENGLYST und ENGLYST, 2005). Im Allgemeinen wird Stärke in schnell verdauliche, langsam verdauliche und resistente Stärke (RS) eingeteilt. Resistente Stärke zeichnet sich dadurch aus, dass sie der Wirkung pankreatischer Amylasen standhält und in den Dickdarm zur Fermentation gelangt (FUENTES-ZARAGOZA et al. 2011). Eine Veränderung der Stärkestruktur und eine damit verbundene Erhöhung des Gehaltes an resistenter Stärke könnte gegebenenfalls das Risiko metabolischer Störungen verringern. So konnten an Schweinen positive Auswirkungen einer Verfütterung von RS-reichen Rationen auf deren Stoffwechsel- und Darmgesundheit gezeigt werden (REGMI et al. 2011). Bei Hähnchen wurde ein verbesserter Fettstoffwechsel festgestellt (SUNDBERG et al. 1998) und Wiederkäuer hatten ein geringeres Risiko einer Pansenstoffwechselerkrankung (SILVEIRA et al. 2007). Die Verlangsamung des Stärkeabbaus im Pansen führte zu einer Stabilisierung des pH-Wertes und verhinderte dadurch ein Ansäuern des Pansens. Im Vergleich zu anderen Getreidearten enthält Gerste hohe Mengen an Amylopektin-Stärke, die schnell abgebaut (CAMPLING 1991, LJØKEL et al. 2003) und als nicht resistente Stärke (NRS) bezeichnet werden kann. Der Umfang des Stärkeabbaus eines Futtermittels hängt insbesondere davon ab, wie die amylolytischen Bakterien in der Lage sind die Stärke zu fermentieren (MCALLISTER et al., 1990). Frühere Studien konnten zeigen, das Behandlungen mit Milchsäure den Anteil an resistenter Stärke bei Gerste erhöhen konnten, jedoch bisher maximal auf RS Gehalte in der Trockenmasse von 3% (DECKARDT et al. 2013). Auch Iqbal et al. (2009) konnten zeigen, dass sowohl die Gesamtkonzentration der flüchtigen Fettsäuren als auch die Inzidenz der subakuten Pansenazidose bei Kühen in der späten Laktationsphase verringert wurde. In der Regel wurden die Stärkemoleküle vor einer Säurebehandlung durch eine Hitzebehandlung zunächst gelatiniert und durch ein anschließendes Abkühlen retrogradiert. Dadurch kam es bei der Amylose zu einer starken Kristallisation, die für die Retrogradierung der Stärke verantwortlich ist (HARALAMPU, 2000). Ein hoher Gehalt an Amylose erhöht in diesem Fall auch den Anteil an Retrogradierter Stärke. Im Gegensatz zu nativer Stärke kann die gelatinierte Stärke nach einer Säurebehandlung einfacher hydrolysieren (MUN und SHIN, 2006). Die Säurebehandlung führt dazu, dass das Amylopektin aus der Stärke hydrolysiert wird, die Stärkemoleküle entzweigt werden und vermehrt

lineare Stärkemoleküle entstehen. Diese linearen Stärkemoleküle haben eine höhere Affinität zur Bildung von RS. In einer Arbeit von Zhao et al. (2009) konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Maisstärke mit Zitronensäure zu einem Anstieg von RS führte. Auch hier hydrolysierte die Zitronensäure die Amylopektin-Moleküle. In anderen Studien führte eine Behandlung von Stärke mit dem Enzym Pullulanase, welches die Entzweigung der α-1,6-glucosidischen Bindungen an den Stärkeketten bewirkt, zu erhöhten RS-Gehalten.

Ziel dieser Studie war es den Effekt verschiedener chemischer und thermischer Behandlungsmethoden auf den Gehalt an resistenter Stärke und die physikalische Struktur der Stärke in Gerste zu erörtern. Dazu wurden unterschiedliche Behandlungen mit Milchsäure, Zitronensäure, Pullulanase sowie mit und ohne Wärme durchgeführt. Es wurde auf eine vorherige Retrogradierung der Stärke verzichtet, um die Behandlung für den Einsatz in der praktischen Tierernährung mit möglichst wenig Aufwand durchführen zu können. Auch ein Monitoring verschiedener Österreichischer Gerstesorten hinsichtlich ihres Gehaltes an RS wurde durchgeführt. Im Folgenden werden die vorläufigen Ergebnisse dieser Arbeit präsentiert, welche im Zuge eines Posterbeitrages auf der Tagung vorgestellt werden sollen.

Material und Methoden

Es wurden 8 Gerstensorten, d.h. Beta, Susi, Evelina, Espinosa, Sunshine, Calcule, Felicitas und Arcanda untersucht. Zudem wurden an einigen Sorten Behandlungen mit Milch- und Zitronensäure, dem Enzym Pullulanase, sowie mit unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Dafür wurden 50 g der Gerstensorten für 24 Stunden in 5% Milchsäure-, Zitronensäure- oder Pullulanaselösung bei Raumtemperatur (RT) oder bei 50°C inkubiert. Die Behandlung mit Pullulanase wurde bei 46°C durchgeführt. Anschließend wurden sie auf den Gehalt an resistenter und abbaubarer Stärke analysiert.

Drei repräsentativ gezogene Proben jeder Gerste wurden vermahlen (0,5 mm Sieb) und auf RS und Gesamtstärke (Megazyme, Wicklow, Irland), untersucht. Mit dem verwendeten Stärkekit wurden die Gerstenproben zunächst in einem Schüttelwasserbad mit pankreatischer α-Amylase und Amyloglucosidase (AMG) für 16 Stunden bei 37°C zu D-Glucose hydrolysiert. Durch die Zugabe von Ethanol wurde diese Reaktion abgebrochen und die RS wurde als Pellet nach erfolgter Zentrifugation (10 Minuten, 1500g) gewonnen. Das Pellet wurde anschließend in zwei Durchgängen mit 50% v/v Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde anschließend der Gehalt nicht resistenter Stärke gemessen. Der Pellet in welchem die RS enthalten ist, wurde in einem Eiswasserbad unter der Zugabe einer 2 molaren KOH und unter Rühren durch einen Magnetrührer gelöst. Die Lösung wurde im Anschluss mit einem Acetatpuffer neutralisiert und die Stärke quantitativ mit AMG zu Glucose hydrolysiert. D-Glucose wurde mittels eines GOPOD Reagens (Glucose-Oxidase/Peroxidase) gemessen und für die Bestimmung des Gehaltes an RS in der Probe herangezogen. Die Bestimmung des Gehaltes an NRS erfolgte auch mit der Messung des D-Glucose-Gehaltes mittels GOPOD, nachdem der Überstand der Proben gepoolt und auf ein Volumen von 100 ml angeglichen wurde. Zudem wurde der Gehalt an Rohprotein, der NDF sowie der organischen Masse der Gerstenprobe ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

Der höchste Gehalt an RS wurde für die Sorte Calcule beobachtet. Im Vergleich zu den anderen Sorten war der RS-Gehalt um das 2- bis 7-fache erhöht. Auch die chemische Zusammensetzung der Gerstensorten (insb. Rohprotein) unterschied sich.

Die Behandlung mit Milchsäure konnte die RS-Gehalte insbesondere bei der Sorte Susi auf ein vielfaches der nativen Konzentration erhöhen. Bei den anderen Gerstensorten erhöhte sich der RS-Gehalt nach einer Milchsäurebehandlung nur mit einer gleichzeitigen Wärmebehandlung deutlich. Auch die Zitronensäure konnte die Gehalte an RS bei der Sorte Susi steigern. Bei der Sorte Espinosa konnte die

Zitronensäure den RS-Gehalt verdoppeln. Eine gleichzeitige Wärmebehandlung konnte bei der Sorte Calcule den RS-Gehalt ebenfalls verdoppeln. Der Einsatz von Pullulanase in Kombination mit Wärme bei der Sorte Susi, konnte den Gehalt an RS am stärksten erhöhen. Eine Steigerung um das 18-fache der nativen Konzentration konnte hier beobachtet werden. Die Verwendung von Wärme während der Behandlungen konnte die Gehalte an RS bei den Sorten Arcanda und Calcule verdoppeln. Wie auch aus anderen Studien hervorgeht scheinen die Behandlungen mit organischen Säuren bzw. Pullulanase als auch mit Wärme einen positiven Effekt auf den Gehalt an RS zu haben. In unserer Arbeit wurde ersichtlich, dass eine Säurebehandlung von Stärke ohne eine vorherige Gelatinierung, die RS-Gehalte weniger deutlich erhöhen konnte. Eine Erhöhung der RS-Gehalte in Futtermitteln sollte daher idealerweise mit einer vorherigen Retrogradierung der Stärkemoleküle verbunden sein. Es bleib dann allerdings die Frage zu klären, ob dieser Aufwand in einem wirtschaftlich sinnvollen Verhältnis zum Nutzen steht.

Einfluss der Gerstensorte auf den Anteil resistenter Stärke

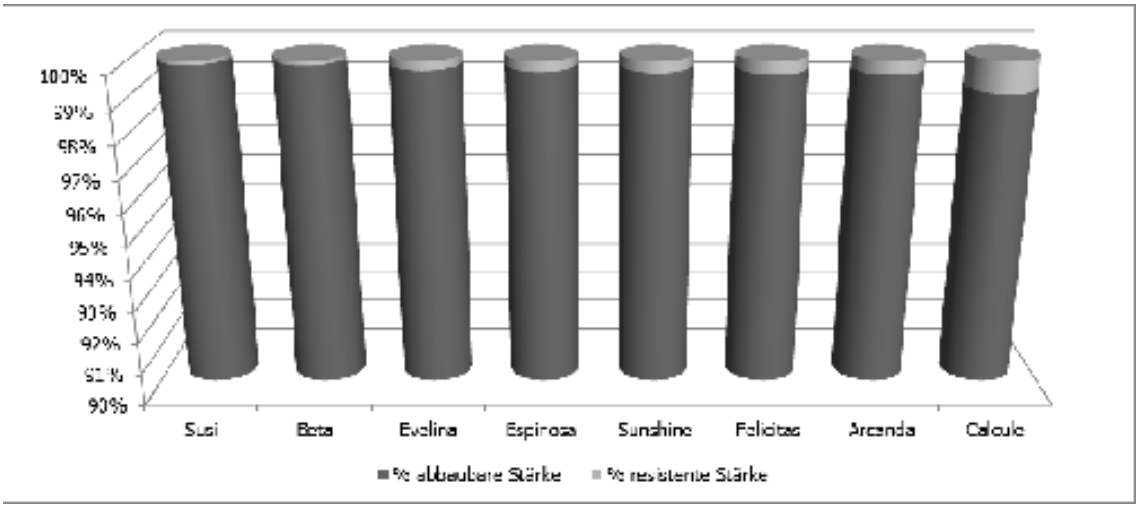


Abbildung 1: Darstellung der Anteile an RS und NRS verschiedener Gerstensorten

Einfluss der Säurebehandlungen von Gerste auf den Anteil resistenter Stärke

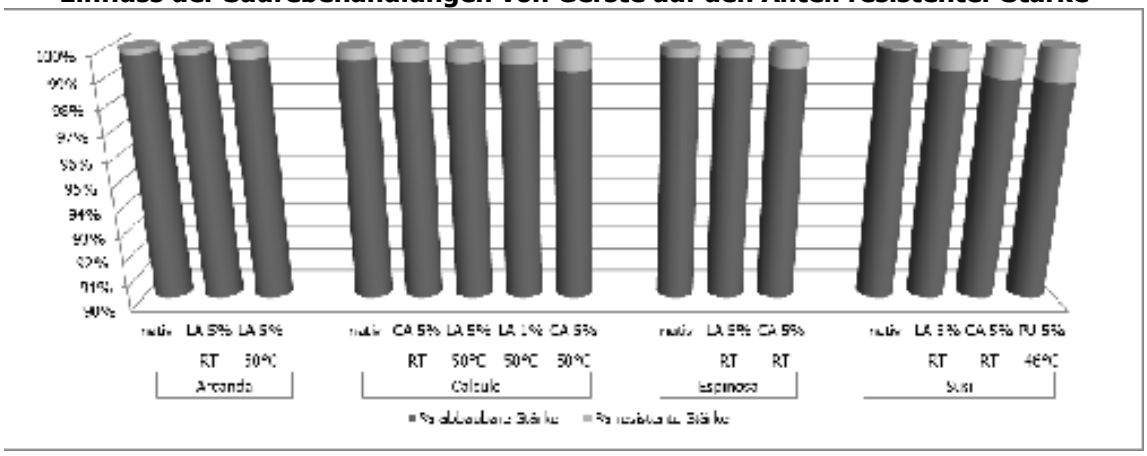


Abbildung 2: RS und NRS der Gerstensorten Arcanda, Calcule, Espinosa und Susi nach Behandlung mit Milchsäure, Zitronensäure und Pullulanase über 24 Stunden bei Raumtemperatur (RT) und Wärme (50°C bzw. 46°C)

Schlussfolgerungen

Hinsichtlich des RS-Gehaltes und des Futterwertes machen die Ergebnisse dieser Studie deutlich, dass es große Unterschiede zwischen den untersuchten Gerstensorten gibt. Die Behandlung mit Milch- und Zitronensäure sowie dem Enzym Pullulanase zeigte vielversprechende Ergebnisse, deren praktische Relevanz aber in vivo untersucht werden muss, bevor endgültige Aussagen gemacht werden können.

Danksagung

Das Projekt wurde von „Sparkling Science" einem Forschungsprogramm des Bundesministeriums für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft unterstützt.

Literatur

Englyst, K.N., Englyst, H.N. (2005): Carbohydrate bioavailability. Br J Nutr 94:1-11.

Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E. et al., (2011): Resistant starch as prebiotic: A review. Starch/Stärke, 63, 406 – 415.

Deckardt, K.; Ratchaneewan, K-A.; Grausgruber H.; Zebeli, Q. (2013): Evaluation of various chemical and thermal feed processing methods for their potential to enhance resistant starch content in barley grain. Starch, 65, 1 – 8

Haralampu S.G. (2000): Resistant starch—a review of the physical properties and biological impact of RS3. Carbohydr Polym 41(3):285–292

Kwak, J.H., Paik, J.K., Kim, H.I., Kim, O.Y. et al., (2012): Dietary treatment with rice containing resistant starch improves markers of endothelial function with reduction of postprandial blood glucose and oxidative stress in patients with prediabetes or newly diagnosed type 2 diabetes. Atherosclerosis, 224, 457 – 464.

McAllister, T.A.; Cheng, K.-J.; Rode, L.M.; Forsberg, C.W. (1990): Digestion of Barley, Maize, and Wheat by Selected Species of Ruminal Bacteria. Appl Environ Microbiol. 56(10): 3146–3153.

Mun S.H., Shin M. (2006): Mild hydrolysis of resistant starch from maize. Food Chem 96(1):115–121

Nikkhah, A., (2012): Barley grain for ruminants: A global treasure or tragedy. J. Anim. Sci. Biotechnol., 3, 22.

Regmi, P.R., Metzler-Zebeli, B.U., Gänzle, M.G., Van Kempen, T.A.G., Zijlstra, R.T., (2011): Starch with high amylose content and low *in vitro* digestibility increases intestinal nutrient flow and microbial fermentation and selectively promotes bi fi dobacteria in pigs. J. Nutr., 141, 1273 – 1280.

Regmi, P.R., Van Kempen, T.A.G., Matte, J.J., Zijlstra, R.T., (2011): Starch with high amylose and low *in vitro* digestibility increases short-chain fatty acid absorption, reduces peak insulin secretion and modulates incretin secretion in pigs. J. Nutr., 141, 398 – 405.

Silveira, C., Oba, M., Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., (2007): Selection of barley grain affects ruminal fermentation, starch digestibility, and productivity of lactating dairy cows. J. Dairy Sci., 90, 2860 – 2869.

Sundberg, B., Xue, Q., Newman, R. K., Newman, C. W., (1998): Glycaemic responses and hypocholesterolaemic effects of high-amylose barley diets on broiler chicks. J. Sci. Food Agric., 76, 457 – 463.

Zhao, X.H., Lin,Y. (2009): Resistant starch prepared from high-amylose maize starch with citric acid hydrolysis and its simulated fermentation *in vitro*. Eur. Food Res. Technol. 228, 1015–1021

Autorenanschrift

Univ.-Prof. Dr.sc.agr. Qendrim Zebeli
Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1; 1210 Wien
T +43-1-25077-3200; F +43-1-25077-3290
E-Mail:qendrim.zebeli@vetmeduni.ac.at

The nutritional analysis of different wheat genotypes grown in Lithuania

Vilma Kliseviciute[1], Romas Gruzauskas[1], Asta Raceviciute-Stupeliene[1], Saulius Bliznikas[1] and Claire Relandeau[2]

[1] Lithuanian University of Health Sciences Institute of Animal Science of Veterinary Academy, Baisiogala, Radviliskis district., LT
[2] Adisseo France SAS, Antony, FR

Introduction

Wheat is the most important stable food crop for more than one third of the world population and contributes more calories and proteins to the world diet than any other cereal crops (Adams et al 2002, Shewry 2009). It is nutritious, easy to store and transport and can be processed into various types of food. Wheat is considered a good source of protein, minerals, B-group vitamins and dietary fiber (Shewry 2007, Simmonds 1989) although the environmental conditions can affect nutritional composition of wheat grains with its essential coating of bran, vitamins and minerals; it is an excellent health-building food. Wheat flour is used to prepare bread, produce biscuits, confectionary products, noodles and vital wheat gluten or seitan. Wheat is also used as animal feed, for ethanol production, brewing of wheat beer, wheat based raw material for cosmetics, wheat protein in meat substitutes and to make wheat straw composites (Simmonds 1989).

Nutritional value of wheat depends on many factors such as genotype, conditions of climate and fertilization.

A lot of data are available in literature about protein, amino acids and fatty acids amount in various wheat varieties, but only a few studies has reported the content of trace elements, phenolic acids, flavanoids, total and phytic acids in local grown wheat varieties.

The aim of the analysis is to determine the nutritional value of wheat grown in Lithuania.

Materials and methods

Clean and uncontaminated samples of eleven cultivars of wheat (*Triticum spp.*) (*Zentos, Alma DS, Milda DS, Akteur, Agil, Lucius, Anthus, Türkis, Brilliant, Kovas DS, Mulan*) were taken for nutritional value analyses. All cultivars were grown in Kaunas Research Station of Plant Sorts (Muniskiu village, Lithuania) in 2011. The fertilization of wheat was NPK 12-32-49, additional - N 34+N 51. The total amount of microelements (cooper, manganese, zinc, iron, selenium), total and phytin phosphorus, flavonoids and phenolis acids compounds (Vanillic acid, p-coumaric acid, Ferulic acid, Sinapic acid, p-hydroxybenzencarboxylic) were determined.

Methods of the analysis. 11 different genotypes of wheat, with their growth conditions known were analysed by the methods: trace elements (cooper, manganese, zinc, iron, selenium) – by AA spectrometric; P – by spectrophotometry method; flavonoids (Tricin) and phenolic acids (Vanillic acid, Sinapic acid, p-coumaric acid, Ferulic acid, p-hydroxybenzoic acid) – by high performance liquid chromatography (HPLC) system were determined.

Statistical Analyses. The results of the experiment were analyzed using the 1-way ANOVA test, and significant differences between groups were determined by Duncan's multiple range test. Statistica 8.0. for Windows TM software was used. Differences were considered significant at $P<0.05$.

Results

The trace elements cooper content of wheat cultivars grown in Lithuania (Table 1) an average was 0.86 mg/kg (min 0.10 mg/kg DM, max 1.86 mg/kg DM). The highest content of trace elements cooper was determined in wheat cultivars of *Milda DS* (1.86 mg/kg DM), *Akteur* (1.34 mg/kg DM) and *Kovas DS* (1.29 mg/kg DM), whereas the lowest was in *Türkis* (0.10 mg/kg DM), Lucius (0.42 mg/kg DM) and *Anthus* (0.43 mg/kg DM).

The amount of trace elements manganese in the analyzed wheat an average was 16.75 mg/kg DM (min 12.63 mg/kg DM, max 19.84 mg/kg DM). The highest content of mention trace elements manganese was determined in wheat cultivars of *Brilliant* (19.84 mg/kg DM) and *Agil* (19.62 mg/kg DM), whereas *Anthus* (12.63 mg/kg DM), *Türkis* (13.09 mg/kg DM), *Zentos* (14.31 mg/kg DM) had lower amount of trace elements manganese.

Trace elements zinc content of wheat varieties grown in Lithuania an average was 15.66 mg/kg DM (min 13.43 mg/kg DM, max 17.88 mg/kg DM). The highest amount of this trace elements was determined in wheat cultivars of *Mulan* (17.88 mg/kg DM) and *Brilliant* (17.47 mg/kg DM), while in *Agil* (13.43 mg/kg DM), *Zentos* (13.76 mg/kg DM) and *Kovas DS* (14.74 mg/kg DM) the amount of trace elements zinc was lower.

Trace elements iron in wheat cereals are predominated between trace elements. Analyzed wheat cultivars an average had 32.91 mg/kg DM (min 28.12 mg/kg DM, max 37.88 mg/kg DM) of trace elements iron. The highest amount of microelements iron was determined in the cultivars of *Milda DS* and *Brilliant* and compound 37.88 mg/kg DM and 35.43 mg/kg DM, respectively in comparison with others cultivars of wheat. While in *Türkis, Kovas DS* and *Agil* was correspondingly less 28.12 mg/kg DM, 29.23 mg/kg DM and 29.24 mg/kg DM respectively in comparison with others cultivars of wheat.

The trace elements selenium content of wheat cultivars grown in Lithuania an average was 0.10 mg/kg DM (min 0.06 mg/kg DM, max 0.19 mg/kg DM). The highest content of trace elements selenium was determined in wheat cultivars of *Brilliant* (0.19 mg/kg DM) and *Mulan* (0.18 mg/kg DM), whereas the lowest was in *Agil*, *Anthus*, *Türkis and Kovas DS* (0.06 mg/kg DM).

Table 1: Total amount of trace elements in different wheat genotypes

Different denotypes	**Microelements (mg/kg) DM**				
	Cooper	**Manganese**	**Zinc**	**Iron**	**Selenium**
1. Zentos	0.98	14.31	13.76	34.18	0.09
2. Alma DS	0.71	17.33	15.77	34.91	0.10
3. Milda DS	1.86	17.80	16.35	37.88	0.09
4. Akteur	1.34	18.10	14.87	33.96	0.10
5. Agil	1.30	19.62	13.43	29.24	0.06
6. Lucius	0.42	17.78	15.39	33.72	0.10
7. Anthus	0.43	12.63	16.03	30.99	0.06
8. Türkis	0.10	13.09	16.52	28.12	0.06
9. Brilliant	0.57	19.84	17.47	35.43	0.19
10. Kovas DS	1.29	15.70	14.74	29.23	0.06
11. Mulan	0.49	18.03	17.88	34.30	0.18
Average	**0.86**	**16.75**	**15.66**	**32.91**	**0.10**

The amount of total phosphorus in analyzed cultivars of wheat an average compound 0.28% (min 0.26%, max 0.31%). The highest amount of total phosphorus was determined in wheat cultivars of *Milda DS* (0.31%), while in *Brilliant* (0.26%) the amount of total phosphorus was the lowest. Several wheat varieties: Zentos, Akteur, Agil total phosphorus was the same 0.28%.

The amount of phytin phosphorus in analyzed cultivars of wheat an average compound 0.24% (min 0.22%, max 0.25%). The highest amount of total phosphorus was determined in wheat cultivars of *Zentos, Anthus, Türkis* (0.25%), while in *Agil, Kovas DS, Mulan* (0.22%) the amount of phytin phosphorus was the lowest.

By analyzing the composition of flavonoids (Tricin) in the Lithuanian grown wheat cultivars there were observed, that the amount of Tricin was from 0.11 µg/g till 0.48 µg/g. The highest amount of Tricin was determined in wheat cultivars of *Kovas DS* (0.48 µg/g), *Mulan, Türkis and Anthus* (0.36 µg/g), while in *Agil* (0.11 µg/g), *Zentos* (0.13 µg/g) and *Lucius* (0.14 µg/g) the amount of Tricin was the lowest.

The Vanillic acid analysis showed some variability (3.49 - 4.41 mg/kg) among 11 cultivars of wheat grown in Lithuania. The highest content of Vanillic acid was determined in wheat cultivars of *Milda DS* (4.41 mg/kg), *Türkis* (4.34 mg/kg) and *Akteur* (4.17 mg/kg), whereas the lowest was in *Zentos* (3.45 mg/kg) and *Alma DS* (3.49 mg/kg).

The amount of p-coumaric acid in the analyzed wheat an average was 9.64 mg/kg (min 6.00 mg/kg, max 18.28 mg/kg). The highest content of mention phenolic acid was determined in wheat cultivars of *Kovas DS* (18.28 mg/kg), *Anthus* (11.36 mg/kg) and *Akteur* (11.23 mg/kg), whereas *Agil* (6.00 mg/kg), *Türkis* (6.01 mg/kg), *Zentos* (6.91 mg/kg) had lower amount of p-coumaric acid.

Ferulic acid in wheat cereals are predominated between phenolic acids. Analyzed wheat cultivars an average had 496.12 mg/kg (min 440.89 mg/kg, max 659.03 mg/kg) Ferulic acid. The highest amount of Ferulic acid was determined in the cultivars of *Kovas DS*, *Brilliant* and *Milda DS* and compound 659.03 mg/kg, 546.64 mg/kg and 518.44 mg/kg, respectively in comparison with others cultivars of wheat. While in *Agil* and *Alma DS* was correspondingly less 440.89 mg/kg and 444.07 mg/kg in comparison with others cultivars of wheat.

The analysis of Sinapic acid content showed a high variation among the seed cultivars, e. g. 4.10 mg/kg to 74.95 mg/kg. The highest amount of this acid was determined in wheat cultivars of *Kovas DS* (74.95 mg/kg), *Mulan* (58.58 mg/kg) and *Akteur* (58.00 mg/kg), while in *Brilliant* (4.10 mg/kg), *Türkis* (4.16 mg/kg) and *Anthus* (4.20 mg/kg) the amount of Sinapic acid was lower.

p-hydroxybenzencarboxylic acid of wheat varieties an average was 2.00 mg/kg (min 1.23 mg/kg, max 2.48 mg/kg). The highest amount of p-hydroxybenzencarboxylic acid was determined in wheat cultivars of *Türkis* (2.48 mg/kg), *Kovas DS* (2.47 mg/kg) and *Anthus* (2.45 mg/kg), whereas *Zentos* (1.23 mg/kg) and *Alma DS* (1.42 mg/kg) had the lowest amount.

Discussion

Wheat (Triticum aestivum L. ssp. aestivum) is one of the most important agricultural commodities worldwide. Due to an enhanced health consciousness during the last years, natural antioxidants gained substantial attention. In this regard phenolic compounds such as phenolic acids or flavonoids in wheat have been coming into the focus of research (Durackova 2010, Gonzalez and Riboli 2010, Rodríguez Vaquero et al 2010).

The quality of wheat yield is the effect of the interaction of genetic (variety-related) and environment-related factors during plant vegetation. The type and amount of fertilizers used are regarded as being of decisive importance for the cereal yield and the content of fundamental chemical compounds. Wheat cultivation commonly involves use of nitrogen-phosphorus-potassium (NPK) fertilizers, whose

Precise
Nutrition
Evaluation
Adisseo NIR service
Rovabio®
Der nächste Schritt
zu höherer
Wirtschaftlichkeit
Steigern Sie
Ihren Ertrag durch
die Kombination
von Rovabio, dem
Multi-Enzym und PNE,
dem NIR-Service von Adisseo
Ansprechpartner in Österreich:
Reisenberger GmbH
A-2380 Perchtoldsdorf
Stuttgarterstraße 2
office@reisenberger.com
Tel.: +43 1 869 92 41- 0
Fax: +43 1 869 92 41-21
www.reisenberger.com
ADISSEO
A Bluestar Company

purpose is to ensure the right ratio of N:P:K in the soil at about 150:60:110 kg/ha^{-1}. A positive correlation between the amount of NPK fertilizers used and the yield of grain and its quality has been confirmed by many researchers Ishaq et al 2001, Cabrera-Bosquet et al 2009).

The grain of modern high-yielding common wheat (*Triticum aestivum L.*) varieties is generally characterized by a decreasing content of essential nutrients and microelements (Fan et al 2008). The concentrations of trace elements and vitamins that are valuable for human nutrition steadily decrease with an increase in yield, which has adverse consequences, including 'hidden hunger' (Cakmak et al 2010). Triticum species other than common wheat have attracted a growing scientific interest due to the nutritive and dietary value and unique taste attributes of their grain (Stallknecht et al 1996).

The amount of microelements selenium ranged average 0.10 mg/kg DM in analyzed wheat genotypes, lowers results was obtain by Lachman et. al. (2011), which reported in spring varieties selenium content ranged from 29.8 to 39.9 µg/kg DM. Selenium content is important because some soils are poor in selenium that is a trace mineral essential to human with beneficial impact on health and possess also antioxidant activity (Lachman et al 2012).

Zinc is known to have an important role either as a metal component of enzymes or as a functional, structural or regulatory cofactor of a large number of enzymes (Grotz and Guerinot 2006). In analyzed wheat genotypes the amount of microelements zinc ranged from 13.43 mg/kg DM till 17.88 mg/kg DM in analyzed wheat genotypes. But some researches determined, that content of microelements zinc in different cereals can varies and is about 35 mg/kg in wheat (Suchowilska et al 2012).

The content of iron in the analyzed wheat samples rangeg from 28.12 till 37.88 mg/kg DM. This content is near to the normal iron content in wheat 46 µg/g as stated by Kent and Everes (1990). Al-Gahri and Almussali (2008) indicated from 51.06 till 60.54 µg/g of microelements iron.

The amount of total phosphorus and phytin phosphorus ranged average 0.28% and 0.24% in analyzed wheat genotypes and were analogous to the ones found in scientific literature by Ahmad et. al. (2003), which reported 0.28% and 0.18% of total and phytin phosphorus in analyzed wheat genotypes.

The health effects of flavonoids in human diet have attracted wide attention during these years. Many studies attempted to characterize potential cancer chemopreventive properties of various extract ingredients from plants and reported positive effects of flavonoids on cancer prevention (Ross and Kasum 2002, Galati and O'Brien 2004). Among these pharmacologically identified active agents, there is an important flavone aglycone, that is, tricin (5,7,4′-trihydroxy-3′,5′-dimethoxyflavone). Tricin occurs in its glycosidic form in rice bran and other grass species such as wheat, barley, and maize (Cai et al 2005). The amount of flavonoids Tricin ranged average 0.26 µg/g DM in analyzed wheat genotypes.

Phenolic acids are a group of natural products commonly found in many cereal grains. The health benefits of cereal grains have significant implications for the improvement of food quality, particularly through applications in functional foods and nutraceuticals (Truswell 2003). There are mainly two groups of phenolic acids in cereal bran: benzoic and cinnamic acid derivatives. Ferulic acid and other hydroxycinnamic acids (caffeic and p-coumaric acid derivatives) have been found to have good antioxidant activities (Rondini et al 2004, Vitaglione et al 2008). Whole grain wheat products reduce cardiovascular diseases, coronary artery diseases and coronary heart diseases (He et al 2010). Mpofu et. al. (2006) which reported that the phenolic acid content ranged from 7.60 µg/g to 441.69 µg/g, ferulic acid predominated and 89–98% of phenolic acids were present in a bound form. However in our analyzed wheat cultivars the amount of vanillic acid was by 3.92 mg/kg, p-coumaric acid – 9.64 mg/kg, Ferulic acid – 496.12 mg/kg, sinapic acid – 38.56 mg/kg, p-hydroxybenzencarboxylic acid – 2.00 mg/kg. Other researchers reported the higher concentrations of phenolic acids. Kanopka et al. (2012) indicated an average 538.8 µg/g of ferulic, 45.4 µg/g of p-coumaric, 86.1 µg/g of sinapic, 10.8 µg/g of vanillic, 5.7 µg/g of p-hydroxybenzoic acid of wheat.

Acknowledgement

Finansing by the ministry of Agriculture of the Republic of Lithuania project MT 11/30.

References

Adams M.L., Lombi E., Zhao F.J., McGrath S.P. (2002): Evidence of low selenium concentrations in UK bread-making wheat grain. J. of the Sc. of Food and Agric. 82, 1160-1165.

Ahmad I., Javed K. and Sattar A. (2003): Effect of phytate contents of cereals on bioavailability of total phosphorus in poultry. Pakistan Vet. J. 23, (3).

Al-Gahri M.A. and Almussali M.S. (2008): Microelement contents of locally produced and imported wheat grains in Yemen. E-Journal of Chemistry. 5(4), 838-843.

Cabrera-Bosquet L., Albrizio R., Araus J.L. and Nogués S. (2009): Photosynthetic capacity of field-grown durum wheat under different N availabilities: A comparative study from leaf to canopy. Environ. Exp. Bot. 67, 145-152.

Cai H., Al-Fayez M., Tunstall R.G., Platton S., Greaves P., Steward W.P. and Gescher A.J. (2005): The rice bran constituent tricin potently inhibits cyclooxygenase enzymes and interferes with intestinal carcinogenesis in Apc^{Min} mice. Mol. Cancer Ther. 4, 1287-1292.

Cakmak I., Pfeiffer W.H. and McClafferty B. (2010): Biofortification of durum wheat with zinc and iron. Cereal Chem. 87, 10-20.

Durackova Z. (2010): Some current insights into pxidative stress. Physiol. Res. 59, 459-469.

Fan M.S., Zhao F.J., Fairweather-Tait S.J., Poulton P.R., Dunham S.J. and McGrath S.P. (2008): Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. J. of Trace Elements in Medic. and Biolog. 22, 315-324.

Galati G. and O'Brien P.J. (2004): Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. Free Radic. Biol. Med. 37, 287-303.

Gonzalec C.A. and Riboli E. (2010): Diet and cancer prevention: Contributions from the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. Eur. J. Cancer. 46, 2555-2562.

Grotz N. and Guerinot M.L. (2006): Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. Biochim. Biophys. Acta. 1763, 595-608.

He M., Van Dam R.M., Rimm E., Hu F.B. and Qi L. (2010): Whole grain, cereal fiber, bran, and germ intake and the risk of all-cause and cardiovascular diseasespecific mortality among women with type 2 diabetes mellitus. Circulation. 121, 2162-2168.

Ishaq M., Ibrahim M. and Lal R. (2001): Tillage effect on nutrient uptake by wheat and cotton as influenced by fertilizer rate. Soil Till. Res. 62, 41-53.

Kent N.L. and Everes A.D. (1990): Technology of cereals: An Introduction for students of food science and agriculture, 4th Ed. Pergamon press, New York.

Konopka I., Tańska M., Faron A., Stępień A. and Wojtkowiak K. (2012): Comparison of the phenolic compounds, carotenoids and tocochromanols content in wheat grain under organic and mineral fertilization regimes. Molecules. 17, 12341-12356.

Lachman J., Miholová D., Pivec V., Jírů K. and Janovská D. (2011): Content of phenolic antioxidants and selenium in grain of einkorn (*Triticum monococcum*), emmer (*Triticum dicoccum*) and spring wheat (*Triticum aestivum*) varieties. Plant, Soil and Environment. 57, 235-243.

Lachman J., Orsák M., Pivec V. and Jírů K. (2012): Antioxidant activity of grain of einkorn (*Triticum monococcum L.*), emmer (*Triticum dicoccum* Schuebl [Schrank]) and spring wheat (*Triticum aestivum L.*) varieties. Plant, Soil and Environment. 58, 15-21.

Mpofu A., Sapirstein H.D. and Beta T. (2006): Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. J. Agric. Food Chem. 54, 1265-1270.

Rodríguez Vaquero M.J., Aredes Fernández P.A., Manca De Nadra M.C., Strasser De Saad A.M. (2010): Phenolic compound combinations on coli viability in a meat system. J. Agric. Food Chem. 58, 6048-6052.

Rondini L., Peyrat-Maillard M.N., Marsset-Baglieri A., Fromentin G., Durand P., Tomé D., Prost M. and Berset C. (2004): Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. J. Agric. Food Chem. 52, 4338-4343.

Ross J.A. and Kasum C.M. (2002): Dietary flavonoids: Bioavailability,metabolic effects, and safety.Ann. Rev. Nutr. 22, 19-34.

Shewry P.R. (2009): The HEALTHGRAIN programme opens new opportunities for improving wheat for nutritionand health. Nutr. Bulletin. 34(2), 225-231.

Shewry P.R. (2007): Improving the protein content and composition of cereal grain. J. of Cereal Sc. 46, 239-250.

Simmonds D.H. (1989): Inherent Quality Factors in Wheat. Wheat and Wheat Quality in Australia. Australia Wheat Board, Melbourne. pp. 31-61.

Stallknecht G.F., Gilbertson K.M. and Ranney J.E. (1996): Alternative wheat cereals as food grains: Einkorn, emmer, spelt, kamut, and triticale. In: Janick J. (ed.): Progress in New Crops. ASHS Press, Alexandria. 156–170

Suchowilska E., Wiwart M., Kandler W. and Krska R. (2012): A comparison of macro- and microelement concentrations in the whole grain of four Triticum species. Plant soil environ. 58, (3) 141-147.

Truswell A. S. (2003): Cereal grains and coronary heart disease. European J. of Clinic. Nutr. 56, 1-14.

Vitaglione P., Napolitano A. and Fogliano V. (2008): Cereal dietary fiber: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. Trends Food Sci. Tech. 19, 451-463.

Corresponding author

Vilma Kliseviciute
Lithuanian University oh Health Sciences Veterinary Academy
Kaunas, Lithuania
E-mail: kliseviciute@lva.lt

Effect of fermented and extruded wheat bran on *in-vitro* enzy-matic digestibility of dry mass in pigs

Manuel Kraler[1], Karl Schedle[2], Konrad J. Domig[3], Daniel Heine[4], Herbert Michlmayr[1] and Wolfgang Kneifel[1]

[1] Christian Doppler Research Laboratory for Innovative Bran Biorefinery, Department of Food Science and Technology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, AT
[2] Institute of Animal Nutrition, Products, and Nutrition Physiology, IFA-Tulln, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, AT
[3] Institute of Food Science, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna
[4] Bühler AG, Uzwil, CH

Introduction

After corn, wheat is the most cultivated crop worldwide. Twenty-eight percent of all cereal grains used originate from wheat, whereby *Triticum aestivum* represents 95% of all grown types. Wheat bran represents the outer shell of the wheat kernel and is separated during the milling process. It is some natural barrier that protects the inner kernel. The composition of the bran, which has 15-20% of the total mass, is largely determined by the efficiency of the milling technology (Rauter et al., 2010). Approximately 60% of all feeding stuffs used for pig and poultry feeding could be also applied in human nutrition. As the competition for foodstuffs between humans and animals is getting increasingly important, research is being focused on finding alternative resources to make them accessible for feeding purposes (Kirchgeßner et al., 2008). Since bran possesses valuable ingredients, it is desirable to use this by-product of the food industry in a more efficient way. Hence, the aim of the present study was to investigate fermented and extruded wheat bran samples for their applicability as animal feed.

Materials and methods

Wheat bran served as raw material and originated from VonWiller mill (Schwechat, Austria), had feed grade quality (product ID 6011) and was stored at room temperature (21°C) until further processing. The bran had a dry mass (DM) of 912 g kg^{-1} and a bulk density of 200-250 g L^{-1}.

The extrusion trials were conducted at Bühler AG (Uzwil, Switzerland) using the following equipment: Twin-screw extruder BCTL 42/20D; Predconditioner BCTC-10; Dryer OTW-50; Distribution finger type BCTL-10589 / BCTL-10473-010-00 / BCTL-10588-01001; Dryer temperature 100 °C; Used die holes 2; Preconditioner dwell time (if used) 240s; Temperature preconditioner (if used) 95°C. In total 12 different parameter sets were applied.

The ensilage experiments were carried out at BOKU (Vienna, Austria) using several 6 L lab scale PE wide-neck kegs (UdoBär, Austria) which can be closed under air tight conditions to simulate a silo environment. Five different strains of lactobacilli have been tested: LB 1 - *Lactobacillus kukeei* (FF 30-6); LB 2 - *Fructobacillus fructosus* (FF 14-1); LB 3 - *Lactobacillus kukeei* (FF 33-4); LB 4 - *Lactobacillus plantarum* (Lac 900); LB 5 - *Lactobacillus paracasei* (Lac 034). LB 1-3 originated from Dr. Akihito Endo (Functional Foods Forum, University of Turku, Finland) while LB 4-5 were provided by Lactosan GmbH & Co KG (Kapfenberg, Austria). Initially 1 kg of bran was mixed with 0.5 L of tap water and bacterial

suspension. Bacterial cultures were reactivated from a cryo-culture and grown overnight in MRS broth (30°C, under anaerobic conditions). The inoculated bran was ensiled into the barrels, closed and fermented for one month at 21°C. After the fermentation process the wheat underwent some mild drying procedure at 40°C and 0% RH.

Chemical analysis were performed according to the official methods of VDLUFA (Naumann and Bassler, 2012). Prior to *in-vitro* analysis all samples have been milled with a cyclone mill (Retsch, Germany) and a mesh size of <1 mm. The *in-vitro* enzymatic digestibility of dry mass (EDDM) was analyzed according to (Boisen and Fernández, 1997). All samples have been analyzed in duplicate.

Table 1: Chemical composition of the raw material (dry matter basis)

Parameter	**Native wheat bran**
Dry matter (g kg^{-1})	911.5
Crude protein (g kg^{-1})	193.9
Total ether extract (g kg^{-1})	53.9
Crude fiber (g kg^{-1})	108.0
Starch (g kg^{-1})	107.4
Sugar (g kg^{-1})	52.2
Raw ash (g kg^{-1})	71.1
Phosphorus (g kg^{-1})	15.4
Calcium (g kg^{-1})	1.7
Gross energy (MJ kg^{-1})	18.8

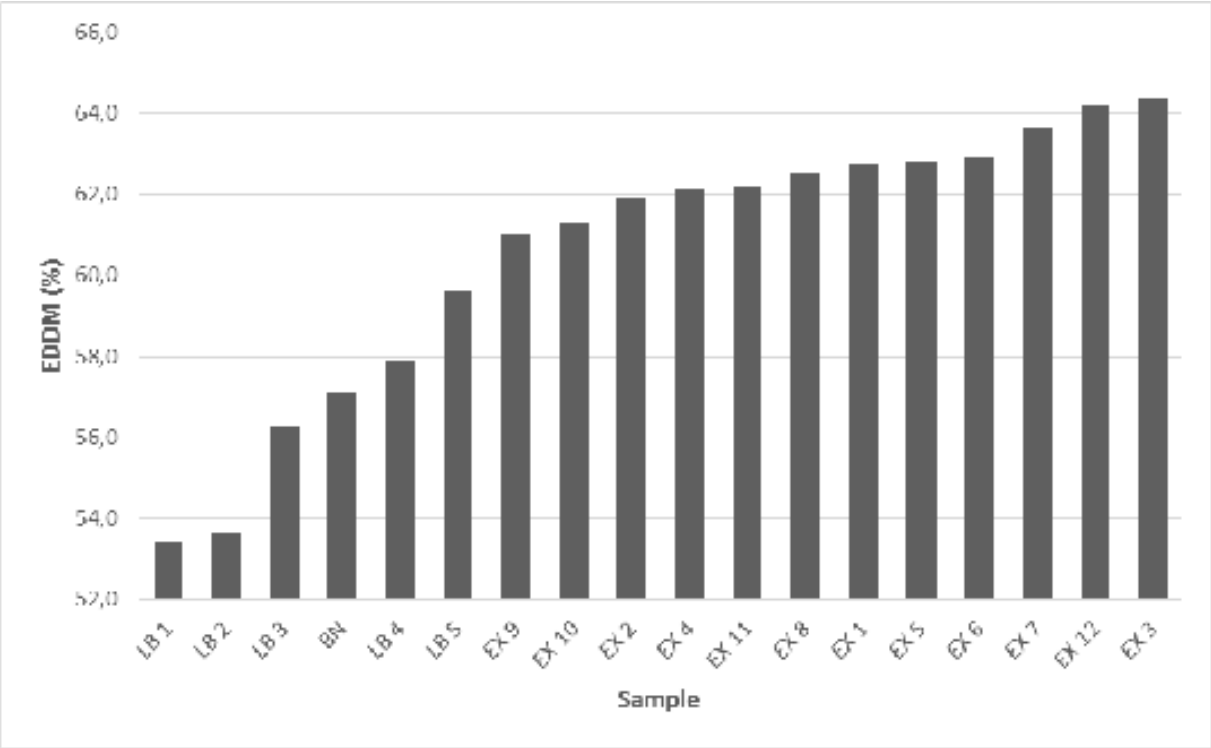


Figure 1: Results of the *in-vitro* enzymatic digestibility of dry mass for native, fermented and extruded wheat bran (dry matter basis, sorted ascending)
Abbreviations: LB, *Lactobacillus* strain; EX, Extrusion parameter set; BN, Bran native; EDDM, *in-vitro* enzymatic digestibility of dry mass

Results and discussion

The chemical composition of the native bran can be seen in table 1.

Figure 1 shows the results of the enzymatic digestibility of dry mass of all samples. They range between 53.4% (LB1) and 64.4% (EX3). All extruded variants showed an increase in digestibility. In addition the different extrusion parameters seem to have an influence on the EDDM when looking at EX9 with 61.0% and EX3 with 64.4%. Obviously, and according to earlier studies, the thermal and mechanical energy input during the extrusion process exert some strong effect (Hou et al., 2003). The authors found out, that it is impossible to destroy the polymer structure of dietary fiber, but the forces in the extruder aid in melting or breaking down connection keys, which partially transform the insoluble fraction to water-soluble polymers. On the other hand, also fermentation induces positive effects on digestibility (Humer et al., 2013) although an increase in EDDM was not observed with all lactobacilli strains. The results suggest, that the EDDM strongly depends on the strain used. Furthermore the *in-vitro* method by (Boisen and Fernández, 1997) was developed for several common feedstuffs, but fermented variants were not tested and validated. Nevertheless, it has also to be taken into account that *in-vitro* results only may serve as an indicator but proven statements can only be verified under *in-vivo* conditions.

Conclusion

Extrusion of wheat bran increases the *in-vitro* enzymatic digestibility of dry mass, while the effect with fermentation strongly depends on the lactobacilli stain used. However, further fermentation trials using other strains are needed to give some clear statement. In addition, other effects (e.g. microbial phytases, organic acids) may also influence the digestibility of nutrients and minerals, at least based on *in-vivo* digestibility trials.

Acknowledgement

The authors want to thank the H. Wilhelm Schaumann foundation (Hamburg, Germany) for granting a PhD scholarship to Manuel Kraler. Special thanks are also expressed to Lactosan GmbH & Co KG and to Dr. Akihito Endo, Turku, for providing the lactobacilli cultures.

References

Boisen, S., Fernández, J.A., 1997. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. Anim. Feed Sci. Technol. 8401, 277–286.

Hou, H., Zhang, J., Dong, H., 2003. Extrusion modification of wheat bran fiber and its application in bread. Cereal Feed Ind. 5, 36–38.

Humer, E., Wetscherek, W., Schwarz, C., Schedle, K., 2013. Effect of maize conservation technique and phytase supplementation on total tract apparent digestibility of phosphorus, calcium, ash, dry matter, organic matter and crude protein in growing pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 185, 70–77.

Kirchgeßner, M., Roth, F.X., Schwarz, F.J., Stangl, G.I., 2008. Tierernährung, 12th ed. DLG Verlag, Frankfurt.

Naumann, C., Bassler, R., 2012. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. VDLUFA Verlag, Darmstadt.

Rauter, A.P., Vogel, P., Queneau, Y., 2010. Carbohydrates in sustainable development I - Renewable resources for chemistry and biotechnology. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Corresponding author

DI Manuel Kraler, Bakk. techn.
University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna
Muthgasse 18; A-1190 Wien
E-mail: manuel.kraler@boku.ac.at

Nitrogen fractions and RUP according to CNCPS in selected feedstuffs

Mária Chrenková[1], Zuzana Čerešňáková[1], Zuzana Formelová[1] and Martin Riis Weisbjerg[2]

[1] Research Institute for Animal Production Nitra, NAFC, Lužianky, SK
[2] Dep.of Animal Science, Aarhus University, Research Centre Foulum, Tjele, DK

Introduction

Methods *in vivo* and *in situ* are the main reference methods used in European systems for estimation of potential crude protein degradability, rumen undegraded protein (RUP) and rates of degradation in the rumen (Hvelplund and Weisbjerg, 2009). These systems estimate rumen degradable protein and separate requirements to the needs of microorganisms and the needs of the animal. Utilizable protein is defined as the true protein absorbed in the intestine, supplied by microbial protein and undegraded intake protein. The methods require many resources to be appropriate for running calibrations; therefore, chemistry laboratory methods would be a prerequisite for a feed analysis programme. Some different procedures to determine soluble and insoluble protein in water or buffers have been published (Crooker, B.A. et al., 1978; Krishnamoorthy et al., 1982). In the last years there seems to approach consensus on the use of phosphate buffer solubility as estimate for immediately or very quickly accessible protein (Licitra et al., 1996, Åkerlind et al, 2011). The Cornell Net Carbohydrate and Protein System (Sniffen et al., 1992) is using the N solubility in buffer and detergent solutions for calculation of RUP value of feedstuffs.

The aim of this work was to determine nitrogen fractions according to Cornell Net Carbohydrates and Protein System (CNCPS) in selected protein feeds commonly used in cattle rations and calculated the values of RUP and/or RDP that are important protein value of feeds.

Materials and methods

Samples of oilseeds by-products (linseed meal n=2, rapeseed meal n=3, soya meal n=3, sunflower meal n=3) were used in this study. The analysed samples were standard feedstuffs used in rations for feeding.

Samples were milled on hammer mill with a 1 mm screen for chemical and solubility analysis. Nitrogen (Kjeldahl method), ash and dry matter were determined according to the Wende analysis (STN, 1985), and NDF, ADF, lignin were determined by Van Soest procedures (Lutonská and Pichl, 1983).

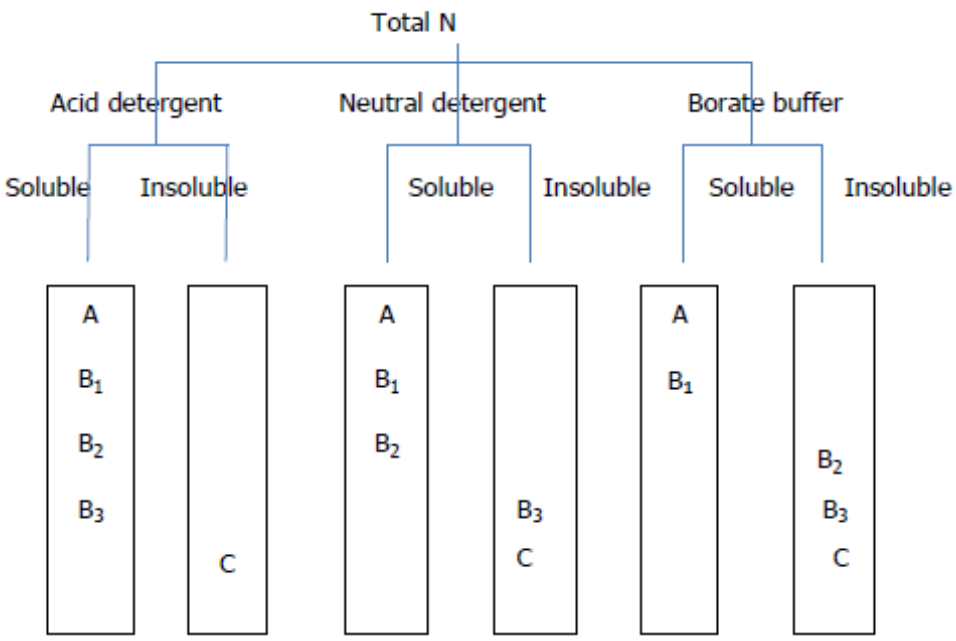
Proteins of feeds were fractionated into three major fractions: NPN (A), true protein (B) and unavailable protein (C). Fraction B was subsequently fractionated into subfractions B_1, B_2 and B_3. Nitrogen fractionation was based on solubility in borate-phosphate buffer and in detergent solutions (Scheme 1). The choice of method for NPN determination depends on the desired objectives. The most common precipitants are tungstic acid and trichloracetic acid (Licitra et al., 1996). Tungstic acid was used in this experiment.

The RDP value was calculated according to NRC (2001) as:

$$RDP = A + B_1 [kdB_1 / (kdB_1 + kp)] + B_2 [kdB_2 / (kdB_2 + kp)] + B_3 [kdB_3 / (kdB_3 + kp)]$$

Where fraction A (NPN) is the percentage of CP that is instantaneously solubilized at time zero, estimated as soluble in borate-phosphate buffer but not precipitated with the protein denaturant TCA; $\mathbf{B_1}$ = Fraction B_1 is the percentage of total CP soluble in borate phosphate buffer and precipitated with TCA; $\mathbf{B_2}$ = Fraction B_2 is the remaining CP and is calculated as total CP minus the sum of fractions A, B_1, B_3, and C; $\mathbf{B_3}$ =Fraction B_3 is calculated as the difference between the portions of total CP recovered in NDF (i.e., NDIN) and ADF (i.e., fraction C); kdB_1, kdB2, kdB_3 = rates of degradation of fraction B_1, B_2 and B_3 in the rumen; kp = rate of passage from the rumen. Degradation rate and passage rate of individual N fractions were available from CNCPS version 5.0 (2003). The degradation rates used for linseed meal are kdB_1 = 200 h^{-1}, kdB_2 =25 h^{-1}, kdB_3 =12 h^{-1}; for rapeseed meal kdB1 = 200 h^{-1}, kdB_2 =20 h^{-1}, kdB_3 =14 h^{-1}; for soybean meal kdB_1 = 200 h^{-1}, kdB_2 =25 h^{-1}, kdB_3 =12 h^{-1}; for sunflower meal kdB1 = 200 h^{-1}, kdB_2 =20 h^{-1}, kdB_3 =14 h^{-1}; kp = 0.08%.h^{-1} .

The undegraded protein passing to the small intestine was calculated: RUP = 100 – RDP



Scheme 1: Nitrogen fractionation based on solubility in detergent solutions and borate-phosphate buffer (Tham et al., 2008). Fraction A-soluble in buffer and tungstic acid; fraction B_1-soluble in buffer and precipitated by tungstic acid; fraction B_2-insoluble in buffer but soluble in neutral detergent; fraction B_3-soluble in acid detergent but insoluble in neutral detergent; fraction C-insoluble in acid detergent.

Results and discussion

The Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) has a submodel that predicts rates of feedstuff degradation in the rumen and the passage of undegraded feed protein that is available to the animal (Sniffen et al., 1992). Protein requirements for high productive ruminants cannot be met from microbial synthesis in the rumen. Supplementation with high quality rumen undegraded protein is required. Oilseeds by-products as extracted meals – soybean meal, linseed meal, rapeseed meal and sunflower meal – are important sources of high quality protein. These are common components of rations for high-producing animals. Therefore, it is necessary to set a parameter that enables to predict the proportion of non-degraded in the rumen protein's feed.

Table 1 shows the nutrients content in analysed feeds. A wide range of NDF, ADF and lignin values was observed. The highest content of NDF and ADF was in sunflower meal. The amount of nitrogen bound to NDF was relatively high in linseed meal and rapeseed meal. AD insoluble protein was higher in rapeseed meal (11.6%) than the other feedstuffs.

Buffer soluble protein in those feeds was from 11.7% of total CP to 59.2% of total CP (in linseed meal). NPN fraction in all feeds was low but soluble true protein (B_1) varied in a wide range from 8.7 to 49.7% of total CP. Soybean meal is characterised with the lowest soluble protein fractions (A and B_1) and with the highest fraction B_2 (82.6% of total CP) that corresponds to the protein fraction of intermediate degradability. Low proportions of A fraction (3.2%) in soybean meal have also been commented by Van Amburgh et al. (2012).

Oilseed meals (rapeseed meal, sunflower meal, soya bean meal) were significantly different ($P<0.01$) in fraction B_1 (Table 2); fraction B_1 was only 8.7% of total N in soya bean meal. As a proportion of total N, the B_2 fraction varied over a wide range, from 23 % for oilseeds to 82.6 % for soybean meal. The results in table 2 also show the significant difference among crude protein feeds in fraction B_2. The fraction B_2 represented the largest proportion of the total protein in oilseed meals.

Table 1: Nutrients content in oil seed by-products (the averages of the analysed samples)

Feedstuffs	Nutrients ($g.kg^{-1}$ DM)					
	Crude protein	NDF	NDIN[1]	ADF	ADIN[2]	Lignin
Linseed meal	400.1	242.2	17.7	152.6	7.2	65.3
Rapeseed meal	335.1	214.1	14.1	189.9	11.6	84.9
Soybean meal	509.4	100.4	5.5	73.3	4.7	12.0
Sunflower meal	352.4	395.6	8.4	316.4	6.9	104.3

[1]NDIN – nitrogen insoluble in neutral detergent (% of total N), [2]ADIN – nitrogen insoluble in acid detergent (% of total N)

Table 2: Comparison of crude protein content and protein fractions (% of CP) between oilseed by-products

Feeds	CP ($g \cdot kg^{-1}$DM)	Protein fraction (% of total N)				
		A	B_1	B_2	B_3	C
	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$
Linseed meal	400.1	19.7	49.7	23.1	10.5	7.2
Rapeseed meal	366.2^{a}	6.6	19.2^{a}	60.4^{a}	2.5^{a}	11.6^{a}
Sunflower meal	353.2^{a}	8.9^{a}	38.4^{b}	44.3^{b}	1.6^{b}	6.9^{b}
Soybean meal	512.5^{b}	3.2^{b}	8.7^{c}	82.6^{c}	1.4^{bc}	6.5^{bc}

The means with different superscript in the same column are significantly different at $P<0.05$
ISCP – buffer insoluble protein

Table 3: The parameters of protein quality of feeds for ruminants

Parameters	Linseed meal	Rapeseed meal	Soyabeen meal	Sunflower meal
RUP (%)	40.9	43.5	42.8	52.7
ID (%)	80.3	73.6	98.6	74.1
DUP	32.8	32.0	42.2	39.0

ID – intestinal digestibility of undegraded protein in rumen

Fraction B3 was relatively low in all tested feedstuffs (about 2% of total CP) except linseed meal and declined with increasing ADIN concentration in feeds. Unavailable fraction C represents insoluble protein fraction that is undegradable in rumen and undigestible in the intestinum. Nitrogen of fraction C determined as ADIN was higher in rapeseed meal (11.6% of total CP) than in sunflower and soybean

meals (6.9% and 6.5% of total CP, resp.). Shannak et al., (2000) observed the values for N fractions in protein concentrates in similar range than are our results. Important characteristic for feedstuffs is digestible undegraded protein of feed (DUP = intestinal digestibility x RUP/100). This value (Table 3) indicates how much feed protein is digested in the small intestine and their amino acids can be resorbed. Soybean meal has the highest proportion of digestible undegraded protein (42), followed by rapeseed and linseed meals and sunflower meal (approx. 32 - 39). According to Chrenková et al. (unpubl.) the lowest value of the DUP from oil seed by-products has the rapeseed cake (19).

Chrenková et al. (2014) found significant correlation between subfraction B_2 and *in situ* potential degradable fraction "b" (r = 0.90), and between effective CP degradation (r = - 0.64) for extracted oil seeds. The relationship between in situ parameter "b" and protein subfraction B_2 was: $"b" = 24.54 + 0.852^{*}B_2$; ($R^2$=0.802).

Conclusion

Oil seed by-products are standard sources of protein for ruminants. Estimated values show that rumen undegraded protein (RUP) and digestible undegraded protein (DUP) of those feedstuffs are relatively low (from 32.0 for linseed meal to 42.2 for soybean meal). Proteins have high content of degradable N fractions that provide nitrogen for ruminal bacteria and passage of undegraded protein from the rumen is about 50 %. Very important finding is the high intestinal digestibility of RUP in those feeds (74-99 %).

Acknowledgement

This work was supported by the Commission of the European Communities, FP7, KBB-2007-1.

References

Åkerlind, M., Weisbjerg, M.R., Eriksson, T., Thøgersen, R., Uden, P., Olafsson, B.L., Harstad, O.M. & Volden, H. (2011): 5. Feed analysis and digestion methods. In: Volden, H. (ed.) Norfor – The Nordic feed evaluation system. EAAP publication No. 130. Wageningen Academic Publishers. 41-54.

Crooker, B.A. Sniffen, C.J. Hoover, W.H., Johnson, L.L. (1978): Solvents for soluble nitrogen measurements in feedstuffs. J. Dairy Sci., 61, 437-447.

Chrenková, M., Čerešňáková, Z., Weisbjerg, M.R., Formelová, Z., Poláčiková, M., Vondráková, M. (2014): Characterization of proteins of feeds according to CNCPS and comparison to *in situ* parameters. Czech J. Anim. Sci., accepted.

Hvelplund T., Larsen M., Lund P., Weisbjerg M.R. (2009): Fractional rate of degradation (kd) of starch in the rumen and its relation to in vivo rumen and total digestibility. South African Journal of Animal Science, 39 (Suppl. 1), 133-136.

Krisnamoorthy U., Muscato T.V., Sniffen C.J., Van Soest P.J. (1982): Nitrogen fractions in selected feedstuffs. Journal of Dairy Science. 65, 217-255.

Licitra, G., Hernandez, T.M., Van Soest, P.J. (1996): Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol., 57, 347-358.

Shannak, S., Südekum, K.-H., Susenbeth, A. (2000): Estimating ruminal crude protein degradation with in situ and chemical fractionation procedures. Anim. Feed Sci. Technol., 85, 195-214.

Van Amburgh M.E., Ross D.A., Higgs R.J., Recktenwald E.B., Chase L.E. (2012): Balancing for Rumen Degradable Protein and Post-Ruminal Requirements for Lactating Cattle Using the CNCPS as a Basis for Evaluation. *http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2012/2VanAmburghRNS2012.pdf*

Corresponding author

Dr. Mária Chrenková
National Agricultural and Food Centre, Research Institute for Animal Production Nitra
Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovak Republic
E-mail: chrenkova@cvzv.sk

Stabilität von Flavonoiden in Traubentrestern

Miriam Würzbach, Monika Korzekwa, Elisabeth Holl und Bernhard Eckel

Dr. Eckel GmbH, Niederzissen, DE

Einleitung

Die Lebensmittelerzeugung wird von vielen Faktoren beeinflusst. Eine sichere Nahrungskette spielt für den Zwischen- sowie den Endverbraucher eine große Rolle. Hohe Transparenz in der Lebensmittelverarbeitung und eine stabile Produktqualität sind für alle Verbraucher eine Grundvoraussetzung.

Der Einsatz pflanzlicher Rohstoffe stellt dabei eine Herausforderung für die Qualitätssicherung dar: Umweltfaktoren wie Sonneneinstrahlung, Regen oder Kälte führen über die Vegetationsperiode der Pflanzen zu Variationen der gewünschten Inhaltsstoffe. Wir kennen dies aus der Weinproduktion.

Die produzierte Menge eines Wirkstoffes in der Pflanze ist für deren Wert nach der Ernte ausschlaggebend. Der Wirkstoff muss anschließend auch bei der Verarbeitung weitgehend konstant bleiben. Die Quantität der wertbestimmenden Bestandteile muss also u.a. während der Verarbeitung und Lagerung stabil bleiben.

Nachfolgende Untersuchung soll Aufschluss über die Verarbeitungs- und Lagerstabilität pflanzlicher Inhaltstoffe am Beispiel von Flavonoiden im Traubentrester (Anta®Ox E, Dr. Eckel GmbH, Niederzissen, Germany) liefern.

Flavonoide

Flavonoide sind Pflanzenfarbstoffe (Phenylpropan-Derivate) und in allen höheren Pflanzen zu finden. Zahlreiche Lebensmittel und Getränke wie Obst, Gemüse, Tee, Kakao und Wein enthalten beträchtliche Flavonoid-Konzentrationen (Römpp, 2013). Sie sind aber nicht nur die Farbgeber für rote Früchte und Gemüse, z.B. Kirschen, Himbeeren oder Auberginen und Rotkohl (Anthocyanidine) oder für Blüten mit gelber Farbe (lat. *flavus* gelb). Quercetin/Kämpferol schützen die Pflanze u.a. auch vor UV-Strahlung (Rozema et al. 2002; Yaginuma et al. 2002) und Isoflavonoide dienen als Schutz vor Fraßschäden und Mikroorganismen (Tsukaho et al. 1985). Diese Einflüsse wirken häufig von außen auf die Pflanze ein und daher befinden sich die Flavonoide meist vermehrt in den äußeren Schichten.

Die Flavonoide werden mit anderen phenolischen Verbindungen unter der Sammelbezeichnung „Polyphenole" zusammengefasst. Die Flavonoide bilden eine der größten Untergruppen und sind in der menschlichen Ernährung von den Phenolen am wichtigsten. Je nach Oxygenierung des Grundkörpers werden die Flavonoide weiter unterteilt (siehe Abbildung 1) (Papagiannopoulus, 2007).

Flavonoide zeigen antioxidative Eigenschaften und sind somit wirksame Nahrungsbestandteile. Hoher Flavonoid-Konsum wird von Crozier et al. (2009) mit erhöhtem Schutz vor verschiedenen Volkskrankheiten assoziiert, z.B. Diabetes und Krebserkrankungen.

Gessner et al. (2013) untersuchten in *in vitro* und *in vivo* Studien entzündungshemmende Eigenschaften der Polyphenole aus Traubentrestern (Anta®Ox E). Dabei konnten *in vivo* an Ferkeln signifikant positive Ergebnisse in Bezug auf die Entzündungshemmung nachgewiesen werden. Diese gingen einher mit verbesserter Leistungsfähigkeit. Des Weiteren konnten zum Teil signifikante histologische Veränderungen im Darmgewebe gemessen werden (Fiesel et al, 2013). Der Einsatz von Traubentrestern (Anta®Ox E) bietet somit eine hervorragende Flavonoidquelle für die Tierernährung.

Weitgehend unbekannt ist jedoch die Verarbeitungs- und Lagerstabilität des Produktes.

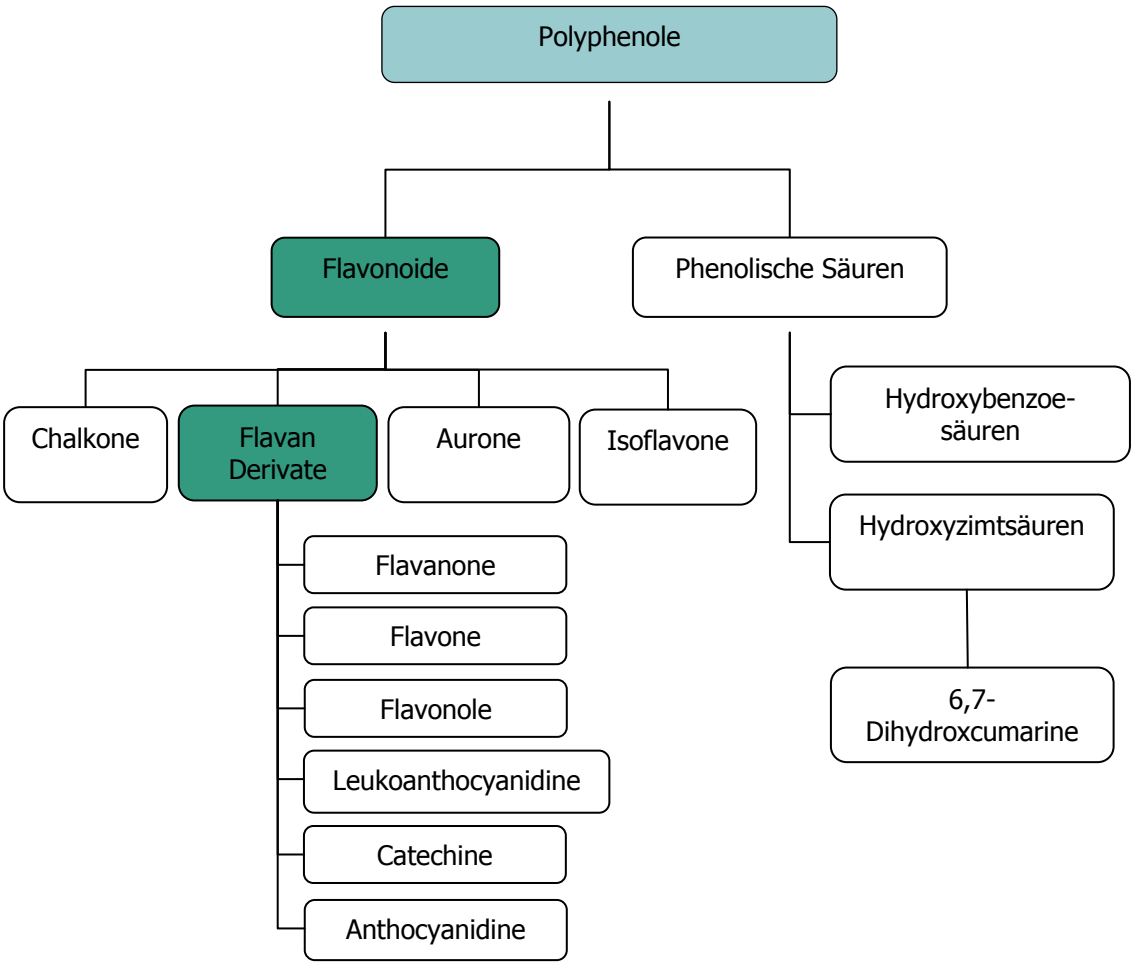


Abbildung 1: Gliederung der Stoffklassen unter der Sammelbezeichnung Polyphenole

Material und Methoden

Untersucht wurde der Einfluss von Lagerzeit, Verpackungsart und Hitzestress auf die Stabilität der Flavonoide in Anta®Ox E.

Der Flavonoidgehalt wurde mittels Folin-Ciocalteu-Methode ermittelt, es erfolgte die Erfassung aller phenolischen Substanzen (Gesamtflavonoidgehalt), berechnet aus Catechin.

Ein weiterer entscheidender Punkt besteht darin, die Faktoren zu identifizieren, die die Stabilität von Flavonoiden negativ beeinflussen können. Hierzu wurden entsprechende Proben konfektioniert und unterschiedlich eingelagert. Da die Verpackung (Verpackungsqualität/Verpackungsmaterial) einen entscheidenden Einfluss haben kann, erschien es sinnvoll, den Vergleich in Säcken, welche mit Naht verschlossen oder offen an einen kühlen bis raumtemperierten Ort gestellt wurden, durchzuführen. Die Analytik zu den jeweiligen Mustern fand in einem Zeitabstand von drei Monaten statt. Um einen Lichteinfluss auszuschließen, wurden Proben in durchsichtigen Behältern im Tageslicht und in Dunkelheit gelagert.

Ergebnisse und Diskussion

Bisher zeigte eine Studie von Schwarz et al. (2009), dass es beim Nachernteverfahren (Lagerung und weitere Trocknung) zu einer Steigerung von Flavonoidgehalten kommen kann. Eine der wichtigsten Funktionen von Flavonoiden ist der Schutz der Pflanze vor schädigender UV-B Strahlung. Steigende Sonneneinstrahlung kann laut Schwarz et al. zu einer Erhöhung der Flavonoidkonzentration insbesondere in Blättern führen. Bei der Lagerung kann ebenfalls eine Steigerung der Flavonoidgehalte in der Pflanze erzielt werden. Hierbei ist davon auszugehen, dass die Lagerung und Trocknung zu einer Stresssituation im pflanzlichen Gewebe führt. Schwarz et al. vermuten hier, dass dies eine Änderung der Molekülstruktur bewirkt oder durch Matrixeffekte eine Modulation der Verfügbarkeit erreicht werden kann.

In den durchgeführten Versuchen wurde in der Ausgangsprobe von Anta®Ox E ein Wert von 11,0 % gemessen, der während der Lagerung um absolut circa 4 Prozentpunkte anstieg. Die in der Produktspezifikation garantierten Werte liegen deutlich unter den analysierten Werten und geben damit eine sehr hohe Sicherheit. Die Verpackungsart zeigte keine Auswirkungen. In Abbildung 2 sind die Flavonoidgehalte von Anta®Ox E nach drei, sechs und neun Monaten Lagerung dargestellt.

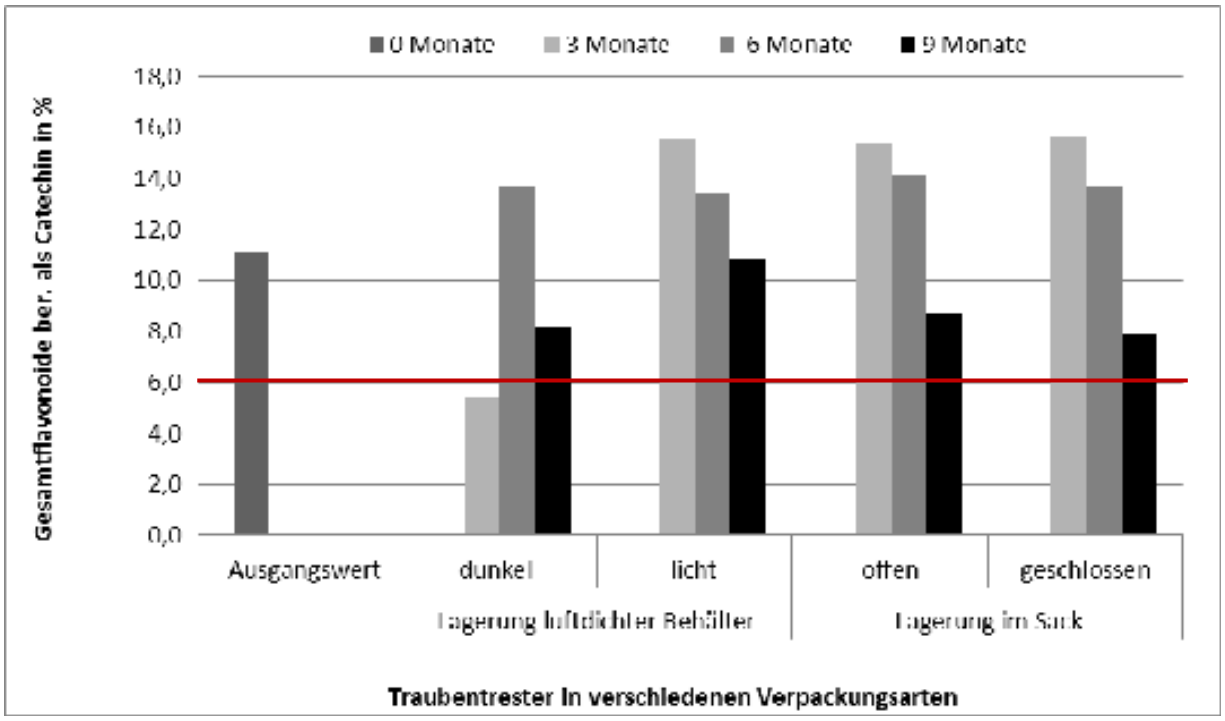
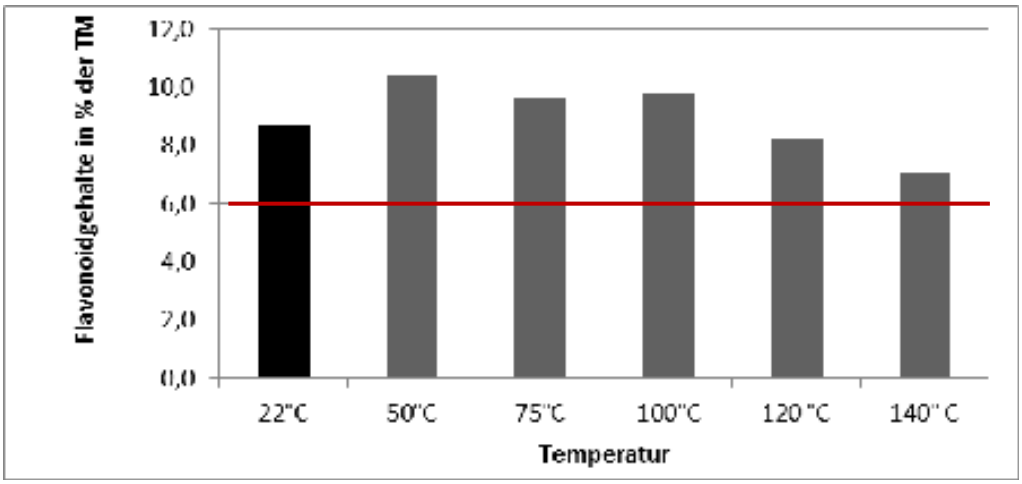


Abbildung 2: Flavonoidgehalte von Traubentrester in Abhängigkeit von Lagerort und -zeit

Die Flavonoide sind nach drei Monaten Lagerung stabil beziehungsweise – bis auf einen Ausreißer – in konzentrierterer Form (bis zu 15,60 %) als zu Beginn der Testreihe (ca. 11,00 %) nachgewiesen worden. Dies zeigt einen Anstieg der Flavonoidgehalte, welcher durch Isomerisierung entstehen kann. Nach sechs Monaten Lagerung ergaben die Analysen für alle Lagerungsarten Werte zwischen 13,40 und 14,10 %.

Nach neun Monaten ergaben sich niedrigere Werte als drei Monate zuvor. Während die Proben, die im Dunkeln gelagert waren, ob geschlossener Behälter oder Sack, Werte zwischen 7,90 und 8,70 % zeigten, war die Probe, die dem Licht ausgesetzt war, mit 10,80 % Flavonoiden am höchsten konzentriert.

Auch der Einfluss der Verarbeitungstemperatur auf den Flavonoidgehalt ist ein wesentlicher Aspekt für einen sicheren Einsatz von Produkten. In mehreren Testreihen wurde die Stabilität von Flavonoiden in unterschiedlichen Temperaturbereichen getestet. In der Lebens- und Futtermittelindustrie werden die aktiven Substanzen im Verarbeitungsprozess Temperaturen von bis zu 120°C ausgesetzt. Der untersuchte Testbereich lag deshalb zwischen Raumtemperatur und 140°C über einen Zeitraum von vier Stunden. Der Einfluss der Temperatur auf die Flavonoidstabilität in Traubentrester ist in Abbildung 3 wiedergegeben.



Garantierter Wert von 6 % Flavonoiden nicht unterschritten

Abbildung 3: Flavonoidgehalte in Anta®Ox E in Abhängigkeit von der Temperatur

Bei Temperaturen von 50°C, 75°C und 100°C lagen die Flavonoidgehalte über dem Ausgangswert. In allen Fällen wurden Flavonoidgehalte ermittelt, die über den garantierten Werten für Anta®Ox E liegen.

Schlussfolgerung

Die Testreihen zu Lager- und Hitzestabilität von Flavonoiden in Anta®Ox E zeigen, dass die Lagerung bis zu drei Monaten oder Hitzeeinwirkung bis 120°C keinen oder einen positiven Einfluss auf die Konzentrationen hat. Aus diesen Untersuchungen kann abgeleitet werden, dass die pflanzliche Komponente Anta®Ox E mit hohem Flavonoidgehalt ohne Qualitätseinbußen oder Unsicherheiten in Bezug auf die Verarbeitung erfolgreich eingesetzt werden kann.

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

PT Innovationsförderung.
PROJEKTTRÄGER IN DER BLE

Literatur

Crozier, A., IB., Jaganath, MN Clifford (2009): Dietary phenolics: chemistry, bioavailabilty and effects on health. Nat. Prod. Rep. 2009 Aug; 26(8):1001-43.

Fiesel, A., D.K. Gessner, E. Most und K. Eder (2013): Wirkung polyphenolreicher Futterzusätze auf die Verdaulichkeit von Nährstoffen, Darmmorphologie und Darmgesundheit von Absatzferkeln; in: Zeyner et al., 12. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, Lutherstadt-Wittenberg; ISBN 978-3-86829-575-7; S. 141-143.

Gessner D.K., A. Fiesel, J. Dinges, R. Ringseis, G. Wen, K. Eder (2013): Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-kB) and nuclear factor E2- related factor 2 (Nrf2) in duodenal mucosa of piglets by a grape seed and grape marc meal extract. DLG-Verlag GmbH, pp. 184.

Papagiannopoulus, M. (2007): Optimierte Anlayse von Flavonoiden mit HPLC-MS. Diss. Universität Bonn.

Römpp: http://www.roempp.com/prod/ [Stand: 24.07.2013].

Rozema, J., L.O. Björn, J.F. Bornman, A. Gaberscik, D.-P. Häder, T. Trost, M. Germ, M. Klisch, A. Gröniger, R.P. Sinha, M. Lebert, Y.-Y. He, R. Buffoni-Hall, N.V.J. de Bakker, J. van de Staaij and B.B. Meijkamp (2002): The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems- an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. J.Photochem. Photobiol. B: Biology 66: 2-12.

Schwarz (2009): Technologische Konzepte zur Anreicherung bioaktiver Lebensmittelzusatzstoffe. 67. Fei-Jahrestagung.

Tsukaho, H. and O. Yoshimoto (1985): Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase activation and isoflavone glucoside accumulation in suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*, by phytoalexin elicitors, vanadate, and elevation of medium pH. Plant Cell Physiol. 26(6): 1101 - 1110.

Yaginuma, S., T. Shiraishi, H. Ohya and K. Igarashi (2002): Polyphenol increases in safflower and cucumber seedlings exposed to strong visible light with limited water. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(1): 65-72.

Autorenanschrift

Miriam Würzbach
Dr. Eckel GmbH
Product Management and Development
Im Stiefelfeld 10, 56651 Niederzissen, Germany
Phone +49 (0) 2636 9749 16
E-Mail: m.wuerzbach@dr-eckel.de
www.dr-eckel.de

Anta®Phyt

Feed Green!

Anta®Phyt – die natürliche Alternative in der Tierernährung

Für die innovative Tierernährung bieten wir jetzt eine rein pflanzliche Lösung. Anta®Phyt: Dank zukunftsorientierter Technologie von Dr. Eckel fein abgestimmt auf die Bedürfnisse unserer Nutztiere. Schnell Infos anfordern. Wir beraten Sie gerne!

Anta®Phyt Aqua

A

Anta®Phyt BLT

B L T

Anta®Phyt MO

MO

Anta®Phyt RU

RU

AllAboutFeed
Innovation Award
FIAAP Asia 2012
Gold

Aquafeed
Innovation Award
VICTAM Asia 2012
Silver

DLG
Innovation Award
EuroTier 2012
Silver

Dr. Eckel GmbH, Postfach 20, D-56649 Niederzissen
Telefon +49 2636 9749-0, www.dr-eckel.de

Anta®Phyt
www.dr-eckel.de

DR. ECKEL
creative solutions

Differences between grape extract, grape pomace and grape seeds

Nicolas Tessier[1], Roser Pallissé[1], Paul Engler[1], Susana Chamorro[2], Agustín Brenes Payá[2] and Fabiola Daubner[3]

[1] Nor-Feed Sud, Angers, FR
[2] Departamento de Metabolismo y Nutrición, ICTAN, CSIC, Madrid, ES
[3] Pulte GmbH & Co. KG, Grünwald, DE

Introduction

Over the last 10 years, polyphenols have demonstrated their antioxidant activity in nutrition and are essential to control oxidative stress. One of the best known sources bringing these polyphenols is grape. It can be supplied via raw materials, by-products or standardised extracts. Grape Pomace (GP) and Grape Seed (GS) are the solid remaining materials obtained after grapes are pressed and the juice is collected. Most frequently, Grape Pomace (also known as Grape Marc) has a very low level of active compounds, contained in skins, seeds and stems which have undergone distillation. Despite this, compared to other plant materials, they contain considerable non-standardized amounts of polyphenols. Grape Extract (GE), as an extract of these two raw materials, is a standardised product which means that it will ensure a constant antioxidant activity despite different harvest years or origin. Therefore, the aim of the present study was to analyse the antioxidant potential of samples of each kind.

Materials and methods

In order to measure the antioxidant efficiency of GE and GP, a first assay was conducted by Chamorro et al. (2012), using DPPH method following the one proposed by Brand-Williams et al. (1995). Results are reported in table 1.

To confirm previous results, a new DPPH assay was conducted on these products and GS.

Reagents:

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ethanol 90% were purchased at Sigma Aldrich. GP, GS and GE were obtained from Nor-Feed Sud (France) respectively.

DPPH assay:

- Determination of the efficient concentration (EC50):

The EC50 is the concentration of product required to reduce 50% of the DPPH, it is expressed in mg of product/g DPPH. In order to determine the EC50 of each product tested, a range of 8 concentrations were prepared for each product in water (except for GE) and in 70% aqueous ethanol (0,1g/l; 0,2g/l; 0,5g/l; 1g/l; 2g/l; 5g/l; 7,5g/l and 10g/l). Solubilisation was obtained by exposure of the solutions to ultrasounds for 10 minutes. These solutions were then put in disposable spectrophotometer cuvettes at 30°C, in contact with 3ml of an 90% aqueous ethanol solution of 60mg/l of DPPH at a volumetric ratio of 1:43 (product : DPPH). The evolution of the absorbance at 515nm was monitored

with a spectrophotometer (Jenway7315) and when it reached a plateau, it was considered as finished. The CE50 was then determined according to the results of the range of concentrations.

- Determination of the T_{EC50} and the EAR:

The T_{EC50} is the reaction time needed to obtain 50% of DPPH reduction at a concentration EC50. The formula [1] was then used to translate the CE50 from $mg_{product}/g_{DPPH}$ to $mg_{product}/l$.

[1] $$CE50\left(\frac{mg_{product}}{l}\right) = \frac{EC50\left[\frac{mg_{product}}{g_{DPPH}}\right] \cdot 0{,}000587}{0{,}000225}$$

With 0,000587 as the mass of DPPH dissolved in 10ml of ethanol and 0,000225 as the volume of anti-oxidant solution to be added to 10ml of DPPH solution to obtain a volumetric ratio of 1:43 (product : DPPH). Once it was determined for each product, an assay was conducted in order to identify their respective T_{CE50} value. A solution of product at a concentration of CE50 was dissolved for 10 minutes using ultrasounds. It was then put in a disposable spectrophotometer cuvette at 30°C, in contact with 3ml of an 90% aqueous ethanol solution of 60mg/l of DPPH at a volumetric ratio of 1:43 (product : DPPH). The evolution of the absorbance at 515nm was monitored with a spectrophotometer (Jenway7315) programmed on "kinetic" mode for 30minutes. The TCE50 was then determined, corresponding to the moment, in minutes, where the absorbance value reached 50% of the initial one.

With these values, the anti-radical efficiency (ARE, [2] Popovici et al. 2010) was defined to compare the efficiency between the three products. Results are reported in table 2.

[2] $$EAR = \frac{1}{EC50\left(mg_{product}/g_{DPPH}\right) \cdot T_{CE50}\,(min)}$$

Results

Results of the first experiment (Table 1) showed that the concentration of phenolic compound was much higher in GE than in GP. Moreover, GE evidenced a better antioxidant activity than GP, with a 200 ratio. Results also showed that it is possible to increase antioxidant activity in GE using an enzymatic treatment (tannase, results not shown). However this treatment was not effective on GP.

Results of the second experiment (Table 2) showed that depending on extraction conditions, GE is 12.4 to 31.6 times more efficient than GS and 64.7 to 310.2 times more efficient than GP.

Table 1: Phenolic composition of GE and GP. Individual phenolic compounds (mg/100g dry matter), and antioxidant activity (µmol Trolox equivalent/g dry matter).

	GE	**GP**	**Ratio**
Gallic Acid	336	5.74	59
Gallocatechin	5.1	0.028	182
Epigallocatechin	14.09	0.075	188
Catechin	823	2.96	278
Epicatechin	648	2.03	319
Procyanidin B1	903	4.63	195
Procyanidin B2	530	2.62	202
Epicatechin O-gallate	157	0.029	5414
Antioxidant activity	3299	16.5	200

Table 2: Kinetic parameters of the reduction of DPPH

	EC50	TEC50	EAR*10-6	Ratio GE/Product
GS in aqueous ethanol	600	15.08	110	12.4
GS in acidified water	1 600	14.48	43	31.6
GP in aqueous ethanol	2 400	19.76	21	65.0
GP in acidified water	11 900	19.11	4.4	310.2
GE in aqueous ethanol	100	7.33	1364	

Discussion

According to the available data, at an equal given concentration, GE antioxidant activity is 200 times higher than the GP one and it could maybe be even higher if an enzymatic treatment was to be considered. Moreover, when looking into the efficiency of the anti-radical activity, that is to say the efficient concentration of the product and its reaction time, it appears that GE is more efficient than GP and GS respectively ranging from 12.4 (aqueous ethanol) to 31.6 (acidified water) times and from 65.0 (aqueous ethanol) to 310.2 (acidified water) times.

The best efficiency of the antiradical activity in GE could be justified by the presence of polyphenols in free form compared with those polyphenols bounded or linked to other structures in the case of GP and GS. Polyphenols may behave differently in mixture when they occur individually.

Conclusion

The better antioxidant capacity and antiradical efficiency of GE, linked with its higher concentrations in active compounds, evidence the fact that it seems to be a better source of active antioxidants than GP or GS.

References

Chamorro S., Viveros A., Alvarez I., Vega E., Brenes A. – Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment – Food Chemistry 133 (2012) 308-314.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E. and Berset C. – Use of a free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity – Lebensm. - Wiss. U.-Technol., 28, 25-30 (1995).

Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. - Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH- revue de génie industriel ISSN 1313-8871.(2010).

Corresponding author

Nicolas Tessier
Norfeed Sud
3 Rue Amedeo Avogadro
49070 Beaucouze, France
E-mail: nicolas.tessier@nor-feedsud.fr

In vitro Studie zur Eignung von getrockneten Mangoschalen (*Mangifera indica* L.) als Futtermittelzusatzstoff

Lisa Brucker[1], Christian H. Geerkens[2], Reinhold Carle[2] und Jürgen Zentek[1]

[1] Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin, DE
[2] Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim, DE

Einleitung

In der Tierernährung ist der Einsatz von sogenannten Abfallprodukten aus der Lebensmittelindustrie angesichts der zunehmenden Futtermittelknappheit und der durchaus noch wertvollen Inhaltsstoffe dieser Produkte keine Neuheit.

Mit einer globalen Produktion von knapp 39 Millionen Tonnen im Jahr 2011 repräsentiert die Mango eine der wesentlichen tropischen Früchte, die hauptsächlich in Asien, Amerika und Afrika produziert wird (FAOSTAT 2014). In einigen Teilen der Welt ist sie ein wichtiger Bestandteil der dortigen humanen Ernährung und ist im Allgemeinen eine weltweit konsumierte Frucht (RIBEIRO & SCHIEBER 2010).

Die Abfall- oder Nebenprodukte, die bei der Verarbeitung der Mangos entstehen, sind der Kern und die Schalen. Der Anteil von Schale an der Gesamtfrucht variiert von 15 – 20 % (BEERH *et al.* 1976, AJILA *et al.* 2007). Dabei ist die Entsorgung des Abfalls bei der steigenden weltweiten Produktion ein zunehmendes Problem (DORTA *et al.* 2012).

Mangoschalen zeichnen sich durch einen hohen Polyphenolgehalt (70 g/kg), einen hohen Anteil löslicher Ballaststoffe (281 g/kg) sowie eine starke Wasserbindungskapazität (11,4 g/g Trockensubstanz) aus (RIBEIRO & SCHIEBER 2010). Weitere Studien zeigten auch, dass Mangoschalen einen erheblichen Gehalt an Pektin und Polyphenolen aufweisen (BERARDINI *et al.* 2005, SIRISAKULWAT *et al.* 2008), die eine starke antioxidative Aktivität besitzen (LARRAURI *et al.* 1997).

Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden Mangoschalen und deren Nebenprodukte in mehreren *in vitro* Ansätzen untersucht, die nachfolgend beschrieben sind.

Kurzzeitinkubation

Bei der Kurzzeitinkubation handelt es sich um eine modifizierte Variante der Hungate Technik (HUNGATE 1950), welche bakterielles Wachstum unter anaeroben Bedingungen in gasdichten Glasbehältern ermöglicht. Für den Versuchsansatz wurde der Kot von Sauen als Inokulum gewählt, welcher jeweils mit den pflanzlichen Testsubstraten Apfelpektin, Mangopektin, integrale Mangoschale und phenolischer Extrakt der Mangoschale über 24 Stunden inkubiert wurde. Als Positivkontrolle wurde Glukose als zusätzliches Substrat gewählt.

Bei der Kurzzeitinkubation wurde nachfolgender PRAS-Puffer (Prereduced Anaerobe Sterilized Medium) eingesetzt (g/l Aqua bidest.): Cysteinhydrochlorid 5,0; KH_2PO_4 0,5; K_2HPO_4 0,5; $NaHCO_3$ 5,0; NaCl 1,0; $CaCl_2$ x 2 H_2O 0,1324; $MgSO_4$ x 7 H_2O 0,1; Resazurin 0,001. Der pH-Wert des Puffers lag in den fünf Versuchsansätzen bei 6,46 ± 0,18.

Für die Kotsuspension wurde die Verdünnungsstufe 1:10 gewählt, welche im Inkubationsgefäß zu einer Gesamtverdünnung von 1:100 führt. Die Testsubstanzen lagen im Inkubationsgefäß in einer 0,2 %igen Konzentration vor.

Nach erfolgter Inkubation (24 h, 39 °C, 180 rpm) wurde direkt der pH-Wert bestimmt und Proben des flüssigen Überstandes in 2 ml Eppendorfgefäßen überführt und bis zur Analyse der Parameter (Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren, Laktat- und Ammonium-Gehalt) bei -20 °C gelagert.

Semikontinuierliche Langzeitinkubation

Bei der angewandten Langzeitinkubation handelt es sich um ein geschlossenes, semi-kontinuierliches Durchfluss-System. Die Colon-Simulationstechnik (COSITEC) wurde in Anlehnung an das RUSITEC-System (Rumen-Simulations-Technik), welches von CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE (1977) entwickelt wurde, für die Inkubation mit Dickdarminhalt von DREYER (1990) modifiziert.

Der Puffer setzt sich wie folgt zusammen (in mmol/L Aqua bidest.): NaCl 115,0; KCl 10,0; $MgCl_2$ x 6 H_2O 2,5; $CaCl_2$ x 2 H_2O 2,5; NaH_2PO_4 x H_2O 2,0; Na_2SO_4 1,0; NH_4Cl 5,0; $NaHCO_3$ 25. Dieser wies über den gesamten Versuchszeitraum einen pH-Wert von 7,39 ± 0,04 auf.

Bei den Spendertieren für die Langzeitinkubation handelt es sich um 65 Tage alte Absetzferkel (Deutsche Landrasse) gemischten Geschlechts mit einem durchschnittlichen Gewicht von 23 kg. Durch Gaze-Filtration (Porengröße 50 µm) wurde der frische Caecuminhalt in flüssige Phase und Partikelphase getrennt. Für den täglichen Austausch der Nylonbeutel über die gesamte Versuchsdauer wurde ein Anteil des Caecuminhalts in einem Gefriertrockner lyophilisiert, mittels Mörser zerkleinert und homogenisiert. Die zu testenden Substanzen waren getrocknete integrale Mangoschalen der Sorte Totapuri, die auf 0,5 mm fein gemahlen wurden, sowie Apfelpektin in Pulverform.

Während der Äquilibrierung- und der Kontrollphase wurden jedem Fermenter 1 g gefriergetrockneter Caecuminhalt in den Nylonbeuteln hinzugefügt. In der Versuchsphase erhielten jeweils zwei der sechs Fermenter in einem Nylonbeutel 900 mg gefriergetrockneten Caecuminhalt und in einem weiteren Nylonbeutel 100 mg der zu testenden Substanz. Zwei Fermenter erhielten weiterhin 1 g gefriergetrockneten Caecuminhalt als Kontrollgruppe. Während eines kompletten Versuchsdurchgangs wurden täglich die Bedingungen im Fermenter kontrolliert, Proben entnommen und die Nylonbeutel ausgetauscht. Der pH-Wert und das Redoxpotential wurden dabei direkt gemessen und die zu analysierenden Proben des Fermenterinhaltes bis zur Bestimmung der Parameter (Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren und Ammonium-Gehalt) jeweils in 2 ml Eppendorfgefäßen bei -20 °C tiefgefroren.

Infektionsversuche mit einer permanenten Zelllinie – IPEC J2

Bei der für die Infektionsversuche gewählten Zelllinie handelt es sich um die permanente Zelllinie IPEC-J2 (Intestinal Porcine Epithelial Cells - Jejunal 2). Dies ist eine nicht-transformierte jejunale Epithelzelllinie neugeborener, nicht gesäugter Ferkel (SCHIERACK *et al.* 2006). Dabei wurden über die Versuchsdauer von insgesamt drei Tagen die Extrakte der pflanzlichen Testsubstanzen (Integrale Mangoschale, Apfelpektin, Mangopektin und phenolischer Extrakt der Mangoschale) in verschiedenen Verdünnungen auf die IPEC-J2 Zellen aufgegeben. Anschließend wurden diese mit fluoreszenzmarkierten *Escherichia coli* (*E. coli*) Erregern infiziert. Bei jeder Zellkulturplatte wurde auch eine Positivkontrolle bestimmt, bei der nur Zellkulturmedium auf die Zellen aufgebracht und mit *E. coli* infiziert wurde. Nach erfolgter Infektion wurde die Fluoreszenz der Zellen und somit die Anzahl der infizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Kurzzeitinkubation sind in Tabelle 1 dargestellt. Hierbei handelt es sich um die Mittelwerte der Fünffachbestimmung der bakteriellen Metabolite und deren Standardabweichung, sowie die jeweilige statistische Signifikanz.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Inkubation mit Apfelpektin als auch die mit Mangopektin zu einem erhöhten Gehalt an Essigsäure führt. Den stärksten pH-Wert Abfall zeigte, neben der Positivkontrolle, der Ansatz mit Mangopektin.

Die Isoformen der Buttersäure sowie der Valeriansäure wurden nur vermehrt bei den Ansätzen mit Glukose und dem phenolischen Extrakt der Mangoschale gebildet. Der höchste Laktatgehalt wird beim Ansatz mit Glukose erzielt, aber auch beim Ansatz mit Mangoschalen wird Laktat gebildet.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Langzeitinkubation (Cositec) in Tabelle 2 aufgeführt. Auch hierbei sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der bakteriellen Metabolite, die dazugehörige Standardabweichung und die statistische Signifikanz dargestellt. Die Laktatgehalte der Proben lagen hierbei jedoch unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Zugabe von Apfelpektin eine vermehrte Essigsäure-Bildung im Vergleich zur Kontrollgruppe auftritt und dabei der niedrigste pH-Wert erzielt wurde.

Tabelle 1: Bakterielle Metabolite nach 24h Inkubation mit verschiedenen Testsubstanzen (0,2 %) n = 15

Parameter	Glukose (Positiv-kontrolle)	Apfelpektin	Mangopektin	Mangoschale	Phenolischer[1] Extrakt der Mangoschale
Kurzkettige FS [mmol/L]					
Essigsäure	8,06 ± 0,59^{c}	9,44 ± 2,1^{d}	10,28 ± 2,83^{d}	5,76 ± 1,91^{a,b}	6,2 ± 1,96^{b}
Propionsäure	2,01 ± 0,72^{b}	1,86 ± 0,36^{b}	2,25 ± 0,61^{b}	1,07 ± 0,5^{a}	1,28 ± 0,35^{a}
i-Buttersäure	0,49 ± 0,61^{a,b}	0,11 ± 0,07^{a}	0,13 ± 0,09^{a}	0,1 ± 0,08^{a}	0,47 ± 0,35^{b}
n-Buttersäure	0,57 ± 0,12^{b}	0,27 ± 0,11^{a}	0,33 ± 0,11^{a}	0,47 ± 0,29^{a,b}	0,24 ± 0,02^{a}
i-Valeriansäure	0,2 ± 0,2^{a,b}	0,13 ± 0,06^{a}	0,11 ± 0,06^{a}	0,14 ± 0,1^{a}	0,31 ± 0,19^{b}
n-Valeriansäure	0,07 ± 0,05^{a,b}	0,05 ± 0,01^{b}	0,05 ± 0,01^{b}	0,04 ± 0,02^{a,b}	0,05 ± 0,02^{b}
Gesamtfettsäuren	11,24 ± 1,27^{b}	12,16 ± 2,46^{b,c}	13,77 ± 3,2^{c}	8,58 ± 2,83^{a}	8,54 ± 1,83^{a}
Gesamtlaktat [mmol/L]	8,38 ± 2,43^{d}	0,41 ± 0,24^{a}	0,76 ± 0,27^{b}	2,58 ± 0,93^{c}	0,34 ± 0,12^{a}
NH_4^+-Gehalt [mmol/L]	4,86 ± 0,73^{a}	5,4 ± 0,83^{a,b,c}	5,03 ± 1,02^{a,c}	5,84 ± 1,03^{b,c}	7,35 ± 0,82^{d}
pH-Wert	6,06 ± 0,12^{a}	6,5 ± 0,06^{c}	6,36 ± 0,11^{b}	6,52 ± 0,07^{c}	6,6 ± 0,07^{d}

[1] = n = 9

[a,b,c] = Mittelwerte mit denselben Hochbuchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,05; Mann-Whitney-U-Test)

Tabelle 2: Bakterielle Metabolite nach Langzeitinkubation von Caecuminhalt mit zwei Substratquellen (0,1 %)

Parameter	Negativkontrolle	Apfelpektin	Mangoschale
Kurzkettige Fettsäuren [mmol/L]			
Essigsäure	3,09 ± 0,04^{a}	3,96 ± 0,11^{b}	3,4 ± 0,12^{a}
Propionsäure	4,08 ± 0,15	3,84 ± 0,12	3,91 ± 0,16
i-Buttersäure	2,8 ± 0,32	2,26 ± 0,15	2,49 ± 0,39
n-Buttersäure	2,47 ± 0,06^{a,b}	2,33 ± 0,07^{a}	2,63 ± 0,12^{b}
i-Valeriansäure	0,61 ± 0,05	0,54 ± 0,02	0,59 ± 0,05
n-Valeriansäure	1,41 ± 0,01^{b}	1,24 ± 0,03^{a}	1,47 ± 0,07^{b}
Gesamtfettsäuren	14,41 ± 0,48	14,38 ± 0,49	14,54 ± 0,76
NH_4^+-Gehalt [mmol/L]	7,93 ± 0,32	7,11 ± 0,19	7,58 ± 0,24
pH-Wert	6,41 ± 0,03^{b}	6,31 ± 0,01^{a}	6,35 ± 0,03^{a,b}
Redoxpotential [mV]	-279,47 ± 1,83	-267,2 ± 3,43	-277 ± 4,6

[a,b,c] = Mittelwerte mit denselben Hochbuchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,05; Tukey´s HSD test)

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Infektionsversuche mit den IPEC-J2 Zellen dargestellt. Dabei sind die Mittelwerte der Vierfachbestimmungen der pflanzlichen Substanzen, sowie die Standardabwiechungen und die statistische Signifikanz aufgeführt.

Bei Verdünnung der Testsubstanz von 1:100 unterscheidet sich nur die Beschichtung mit Mangopektin signifikant von der Positivkontrolle. Alle weiteren Verdünnungen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 3: Einfluss pflanzlicher Substanzen auf die Fluoreszenz von IPEC-J2-Zellen als Parameter der Adhäsion eines enterotoxischen *E. coli*-Stammes, dargestellt als Anzahl infizierter Zellen [%]

Substanz	Positivkontrolle	Testsubstanz
Apfelpektin	79,9 ± 13,2	68,3 ± 19,2
Mangopektin	89,9 ± 7,9[a]	41,8 ± 17,1[b]
Mangoschale	73,4 ± 17,2	55,2 ± 13,8
Phenolischer Extrakt der Mangoschale	46,9 ± 8,6	42,9 ± 14,2

[a,b,c] = Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p<0,05$; Mann-Whitney-U-Test)

Diskussion

Die Ergebnisse der Inkubationsansätze zeigen, dass in Abhängigkeit vom Substrat eine entsprechende Veränderung der Gehalte an kurzkettigen Fettsäuren, Laktat und Ammonium sowie des pH-Wertes erzielt werden konnte. Jedoch fanden bei keiner der *in vitro* Methoden Untersuchungen der Mikrobiota statt, sodass genaue Gründe für die Veränderungen der bakteriellen Metabolite nicht zu erklären sind.

Anhand der Laktat-Ergebnisse aus der Kurzzeitinkubation ist zu vermuten, dass die laktatbildenden Bakterien in Gegenwart von Glukose Milchsäure produzieren können. Da bei Zugabe von Mangoschalen im Vergleich zum Pektin ebenfalls ein höherer Gehalt an Laktat gezeigt wurde, ist dieser vermutlich auf den Anteil an Fruchtfleisch an den Schalen und damit auf den Rest-Zuckergehalt zurückzuführen. GEERKENS *et al.* (2013) wiesen bei Mangoschalen einen Zuckergehalt von 38 % der Trockenmasse nach, wohingegen Apfelpektin laut Analysenzertifikat des Herstellers einen maximalen Zuckergehalt von 16 % aufweist. Die Zugabe von Pektin erzeugte einen deutlich geringeren Laktatgehalt in den Proben. Dieser Zusammenhang wurde bereits bei ZACHARIAS *et al.* (2004) gezeigt. Jedoch stellt DROCHNER *et al.* (2004) fest, dass die genaue Rolle von Laktat bei der Fermentation von Pektinen noch unklar ist. Allerdings konnte durch die Zugabe von Apfelpektin in beiden Inkubationsansätzen eine erhöhte Bildung von Essigsäure gezeigt werden. Dieser Effekt konnte bereits in zahlreichen anderen Studien (DROCHNER *et al.* 2004) belegt werden. Bei beiden *In vitro* Systemen konnte eine Bildung der bakteriellen Metabolite in Abhängigkeit des Substrates gezeigt werden, jedoch nicht deren Absorption.

Die Ergebnisse des Infektionsversuches der IPEC-J2-Zellen zeigten deutliche Effekte der pflanzlichen Substanzen auf die Adhäsion von enterotoxischen *E. coli*-Erregern. Dabei erzielte der Zusatz von Mangopektin in Relation zur Positivkontrolle mit 53,5 % die stärkste Reduktion ($p = 0,025$) der mit *E. coli* assoziierten Zellen. Aber auch die Zugabe des Mangoschalen-Extraktes führte zu einer Reduktion um 24,8 %. Bei der Zugabe des phenolischen Extraktes der Mangoschale zu den Zellen wurde kein Effekt erzielt, jedoch war auch bereits die Infektion der Positivkontrolle bei diesen Ansätzen geringer. Aufgrund der hohen Wasserbindungskapazität des Apfelpektins und der damit verbundenen hohen Viskosität war eine 1:100 Verdünnung nicht mehr steril filtrierbar, so dass hierbei eine 1:1000 Verdünnung gewählt werden musste. Diese Verdünnung erzielte zwar nur eine Reduktion der mit *E. coli* assoziierten Zellen um 14,6 %, im Vergleich zu den anderen Substanzen zeigte Apfelpektin bei dieser Verdünnungsstufe jedoch den deutlichsten Effekt, gefolgt von Mangopektin mit 4,6 %. Die Mangoschale und der phenolische Extrakt wiesen in dieser Verdünnungsstufe keinen Effekt mehr auf. Die Verwendung eines niederveresterten Apfelpektins könnte womöglich eine 1:100 Verdünnung ermöglichen und somit den Effekt des Apfelpektins gegen eine *E. coli* Infektion der Zellen deutlicher zeigen.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der Inkubationsansätze zeigen, dass durch die Mangoschale und ihre Nebenprodukte deutliche Effekte erzielt werden konnten und daher die Eignung als Futtermittelzusatzstoff nicht auszuschließen ist. Darüber hinaus konnte anhand der Arbeit mit der Zellkultur belegt werden, dass das in der Mangoschale enthaltene Mangopektin eine schützende Wirkung gegenüber einer *E. coli* Infektion aufweist. Ob es sich bei dieser Wirkung um das Ausbilden einer Schutzschicht oder um das Prinzip des „Adhäsionsanalogons" handelt sollte in weiteren *in vitro* Studien geklärt werden. Darüber hinaus sind für den Einsatz von getrockneten Mangoschalen als geeigneter Futtermittelzusatzstoff weitere *in vivo* Studien nötig.

Literatur

Ajila, C. M., S. G. Bhat and U. J. S. P. Rao (2007). "Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties." Food Chem 102(4): 1006-1011.

Beerh, O. P., B. Raghuramaiah, G. V. Krishnamurthy and N. Giridhar (1976). "Utilization of mango waste: recovery of juice from waste pulp and peel." J Food Sci Technol 13(23): 138-141.

Berardini, N., M. Knödler, A. Schieber and R. Carle (2005). "Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics." Innov Food Sci Emerg Technol 6(4): 442-452.

Czerkawski, J. W. and G. Breckenridge (1977). "Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec)." Br J Nutr 38: 371-384.

Dorta, E., M. G. Lobo and M. Gonzalez (2012). "Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties." J Food Sci 77(1): C80-C88.

Dreyer, J. (1990). *In Vitro*-Untersuchungen mit der Colon-Simulationstechnik (COSITEC) zum mikrobiellen Stoffwechsel im Dickdarm von Schweinen. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen.

Drochner, W., A. Kerler and B. Zacharias (2004). "Pectin in pig nutrition, a comparative review." J Anim Physiol Anim Nutr 88(11-12): 367-380.

FAOSTAT (2014). "Food and Agriculture Organization of the United Nations." Abgerufen am 04.02.2014 um 11.08 Uhr, von http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E.

Geerkens, C. H., R. M. Schweiggert, H. Steingass, J. Boguhn, M. Rodehutscord and R. Carle (2013). "Influence of apple and citrus pectins, processed mango peels, a phenolic mango peel extract, and gallic acid as potential feed supplements on *in vitro* total gas production and rumen methanogenesis." J Agric Food Chem 61(24): 5727-5737.

Hungate, R. E. (1950). "The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria." Bacteriol Rev 14(1): 1-49.

Larrauri, J. A., P. Ruperez and F. Saura-Calixto (1997). "Mango peel fibres with antioxidant activity." Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung 205(1): 39-42.

Ribeiro, S. M. R. and A. Schieber (2010). Chapter 34 - Bioactive Compounds in Mango (Mangifera indica L.). Bioactive Foods in Promoting Health. R. R. Watson and V. R. Preedy. San Diego, Academic Press: 507-523.

Schierack, P., M. Nordhoff, M. Pollmann, K. D. Weyrauch, S. Amasheh, U. Lodemann, J. Jores, B. Tachu, S. Kleta, A. Blikslager, K. Tedin and L. H. Wieler (2006). "Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for *in vitro* studies of microbial pathogenesis in swine." Histochem Cell Biol 125(3): 293-305.

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

Zacharias, B., A. Kerler and W. Drochner (2004). "The influence of 5% and 10% dietary apple pectin on parameters of fermentation in faeces and caecal digesta of weaning pigs." Arch Anim Nutr 58(2): 149-156.

Autorenanschrift

Lisa Brucker
Institut für Tierernährung; Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Str. 49; 14195 Berlin
E-Mail: Lisa.Brucker@fu-berlin.de

Kultivierung von *Agrimonia procera* als Gerbstoffdroge

Gert Horn[1], Astrid Kupfer[1], Tobias Gräber[2] und Holger Kluge[2]

[1] Exsemine GmbH Salzatal, DE
[2] Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE

Einleitung

Der Große oder auch Wohlriechende Odermennig (*Agrimonia procera* Wallr., syn. *A. odorata* (Gouan) Mill.) ist eine ausdauernde krautige Pflanze und gehört zur Familie der Rosengewächse. Im Gegensatz zum Kleinen Odermennig (*A. eupatoria*), der auf halbtrockenen Standorten (Rothmaler 1976) in Deutschland weit verbreitet ist, bevorzugt der deutlich wüchsigere aromatisch duftende Große Odermennig feuchtere bzw. schattige Standorte und ist vergleichsweise selten (Hegi 1923, Schlosser u. a. 1991, Benkert u. a. 1996). Beide Arten haben ihren Verbreitungsschwerpunkt in Europa, *A. procera* eher in Mittel- und Nordeuropa (Meusel u. a. 1965). Die Gattung ist auf der gesamten Norderdhalbkugel beheimatet. Die „klettenartigen" Scheinfrüchte der Odermennig-Arten werden epizoochor verbreitet.

Agrimonia-Arten werden wohl schon seit der Zeit der Antike als Heilpflanzen verwendet (Pahlow 2001). Odermennigkraut (*Herba Agrimoniae*) wird insbesondere als Teedroge genutzt. Nach Heeger (1956), Wichtl (1997) und Pahlow (2001) gilt neben *Agrimonia eupatoria* auch *A. procera* als Stammpflanze. Die Europäische Pharmakopöe (Anonym 2002) gibt allerdings lediglich *A. eupatoria* als Stammpflanze an. Beide Arten weisen eine große morphologische Ähnlichkeit bzw. eine relativ hohe Plastizität bei unterscheidungsrelevanten Merkmalen auf, was ein sehr enges Verwandtschaftsverhältnis nahelegt. Als einziges nichtquantitatives Unterscheidungsmerkmal gilt die Rückkrümmung der Stacheln des Kelchbechers beim Großen Odermennig. Der Vergleich der Chromosomenzahlen, für *A. eupatoria* 2n=28 und für *A. procera* 2n=56 (Skalický 1962), lässt eine Entstehung von *A. procera* aus *A. eupatoria* durch Autopolyploidie vermuten (Wittmann u. a. 1987).

Als Indikationen für *Herba Agrimoniae*, das zu den Gerbstoffdrogen gezählt werden kann, werden von Wichtl 1997 (entsprechend Deutschem Arzneibuch) angegeben: mildes Adstringenz (innerlich und äußerlich), Rachenentzündungen, Gastroenteritis und Darmkatarrhe. Die Droge ist auch Bestandteil einiger Kombinationspräparate aus der Gruppe der Urologica. Die wesentlichsten Inhaltsstoffe von Odermennigkraut sind nach Wichtl (1997): Catechingerbstoffe (in den Blättern von *A. eupatoria* 4-10%) neben Ellaggerbstoff und Spuren von Gallotanninen, daneben Triterpene, darunter Ursolsäure; Kieselsäure; Flavonoide, darunter Luteolin-, Apigenin- und Kampherolglykoside. Nach dem Deutschen Arzneimittel-Codex (DAC, Anonym 1986) werden mindestens 5,5% mit Hautpulver fällbare Gerbstoffe in der Droge gefordert, die entsprechende Mindestanforderung im neueren Europäischen Arzneibuch (Anonym 2002) liegt hingegen mit 2,0% deutlich niedriger. In der Literatur liegen einige Hinweise auf vergleichende Untersuchungen zum Gerbstoffgehalt im Kraut von *Agrimonia*-Herkünften bzw. Arten vor (Péter u. a 1973, Skalický u. a. 1969, Bučková u. a. 1971, Carnat u. a. 1991, Černaj u. a. 1993). Für uns unerwartet konnten wir im Rahmen von eigenen Voruntersuchungen deutlich höhere Gerbstoffgehalte bei *Agrimonia procera* im Vergleich zu *A. eupatoria* finden. Von Skalický u. a. (1969) liegen analog Angaben zum Gerbstoffgehalt für *A. procera* von 6,74 % gegenüber Gehalten dreier Herkünfte von *A. eupatoria* in Höhe von 3,1 bis 4,2 % vor.

Odermennigkraut und andere gerbstoffhaltige Tees oder Zubereitungen finden bei unspezifischen Durchfallerkrankungen Verwendung und gelten als Antidiarrhoika. Entsprechende traditionelle Nut-

zungen sind auch aus der Tierheilkunde bekannt (Reichling u. a. 2008). Eine der Wirkungen scheint nach Rimpler u. a. (1999) die Hemmung der krankhaft erhöhten Elektrolyt- und Wassersekretion in das Darmlumen zu sein, die wohl auf adstringierende Effekte (Ionen- oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gerbstoff und Protein) zurückzuführen ist. Bekannt sind aber auch antimikrobielle Effekte von Gerbstoffen (vgl. Wagner 1999). Spezielle Hinweise für *Agrimonia*-sp.-Auszüge bzw. Extrakte auf Wirkungen gegen grampositive und -negative Bakterien, sowie auf antivirale Effekte liegen bei Péter (1969), Bae u. a. (2005) bzw. Kwon u. a. (2005) vor. Im Rahmen von eigenen *In-vitro*-Untersuchungen mit wässrigen Auszügen von Agrimonia procera-Krautdroge konnten wir an *Escherichia coli*- und *Salmonella enterica* ssp. *typhimurium*-Stämmen ausgeprägte antibakterielle Aktivitäten feststellen.

Weitere pharmakologisch relevante Wirkungen von Gerbstoffdrogen allgemein sind nach Wagner (1999): antiinflammatorische, antiexsudative, antiallergische sowie antioxidative und antitumorale. Gerbstoffhaltige Drogen werden auf Grund ihrer antiinflammatorischen Wirkungen zur Behandlung von Entzündungen des Mund- und Rachenraumes aber auch bei Entzündungen im Bereich des Magen-Darm-Traktes verwendet. Spezielle Hinweise auf antioxidative Wirkungen bzw. Radikalfängereigenschaften von Extrakten aus *Agrimonia eupatoria* und *A. procera* geben Venskutonis u. a. (2007 und 2008) und Kubínová u. a. (2012). Von besonderem Interesse ist eine Human-Interventionsstudie mit *Agrimonia eupatoria*-Tee von Ivanova u. a. 2013. Es konnten hier nach 30-tägiger Teekonsumption eine signifikante Erhöhung von HDL-Cholesterol und der antioxidativen Kapazität (TAC) sowie eine signifikante Verringerung von proinflammatorischen Cytokinen (IL-6) im Blutplasma festgestellt werden.

Nach Heeger (1956) gilt *Agrimonia eupatoria* züchterisch als „so gut wie noch nicht bearbeitet". Kulturen waren eher selten. Er weist auf eine Gruppensorte „Erfurter Spätblühender Odermennig" vom Typ *Agrimonia odorata* hin. Heeger beschreibt eine starke „Verhärtung" der Scheinfrüchte, die die Wasseraufnahme erschwert und empfiehlt eine Aussaat im Herbst bzw. ein Anritzen. Als Empfehlung für die Ernte des Krautes gilt nach Heeger (1956) ein Zeitpunkt kurz vor oder während der Blütezeit. Als wesentliche Krankheitsbilder sind Rost sowie Echter und Falscher Mehltau anzusehen.

Odermennigkraut stellt eine interessante Gerbstoffdroge für die Nutzung im Bereich der Tiergesunderhaltung dar. Wegen der deutlich höheren Wüchsigkeit und größerer Gerbstoffgehalte zogen wir *Agrimonia procera* gegenüber *A. eupatoria* für die Aufnahme von selektionszüchterischer und pflanzenbaulicher Arbeiten zur Gewinnung von Krautdroge vor.

Material und Methoden

Die Feldversuche wurden im Zeitraum von 2010 bis 2013 auf Versuchsflächen von mittlerer bis hoher Bodenbonität (diluviale und Löss-Lehmstandorte D5, Lö2, Lö1; lS, sL, L, Ackerzahl von 54 bis 98) durchgeführt. Die betreffenden Flächen befinden sich im Umland von Halle/Saale, im östlichen Harzvorland („Mitteldeutsches Trockengebiet"). Der langjährige mittlere Jahresniederschlag liegt in diesem Gebiet unter 500 mm bzw. l/m², die mittlere Jahrestemperatur bei etwa 9,0 °C (vgl. Schliephake u. a. 1999). Die Höhenlagen betragen um 100 m über NN. Alle Standorte wiesen im Untersuchungszeitraum mittlere bis höhere Versorgungsstufen an Makro- und Mikronährstoffen auf.

Die Feldversuche zur Optimierung pflanzenbaulicher Faktoren erfolgten unter Verwendung ausgewählter Akzessionen als Exaktversuche in einfaktorieller Blockanlage mit 4 Wiederholungen nach den Grundsätzen von Wagner u. a. (2007). Die überwiegende Anzahl dieser Versuche wurde entsprechend dem Charakter von *Agrimonia procera* als ausdauernde Pflanze mehrjährig prüfgliedidentisch durchgeführt. Die Sortimente an Akzessionen mussten auf Grund der geringen verfügbaren Saatgutmengen ohne Wiederholung angelegt werden. Bei den geprüften Akzessionen handelte es sich, mit Ausnahme weniger Zuchtmaterialien, um Wildherkünfte, im Wesentlichen aus Mittel-, West- und Nordeuropa.

Neben *Agrimonia procera* enthielten die Sortimente auch eine Reihe von Vertretern von *A. eupatoria* sowie einige andere Arten dieser Gattung (*A. repens, A. pilosa, A. striata*) zum Vergleich.

Die Aussaat der Feldversuche von *Agrimonia procera* wurde in der Regel als Spätherbstansaat mit Hinblick auf die erschwerte Wasseraufnahme der verhärteten Scheinfrüchte durchgeführt (der Aufgang setzt erst im darauf folgenden Frühjahr ein). Die Etablierung der *Agrimonia*-Sortimente an Akzessionen erfolgte nach Herbstansaat und Vorkultur in Pflanzpaletten unter Freilandbedingungen durch Pflanzung im Frühjahr. Die Stickstoff-Düngung wurde in Abhängigkeit vom pflanzenverfügbaren Stickstoff im Boden zu Vegetationsbeginn durchgeführt. Pflegemaßnahmen erfolgten mechanisch. Ernte- und Separationsarbeiten wurden manuell vorgenommen. Probetrocknungen für analytische Zwecke wurden in Trockenräumen bis 40 °C durchgeführt. Die Ermittlung des Wassergehaltes erfolgte mittels Trockenschrank (bei 103 °C bis zur Massekonstanz). Zur Untersuchung des Verhaltens von gemahlener Krautdroge (Schneidemühle, Sieb 1 mm) wurde ein Lagerversuch angelegt. Ziel war es dabei, den Einfluss des Lagerklimas auf den Gerbstoffgehalt und die Entwicklung der Keimzahl zu untersuchen.

Die Bestimmung des Gerbstoffgehaltes der geernteten und luftgetrockneten Krautdroge erfolgte nach DAC (Anonym 1986) bzw. der Vorschrift 2.814 des Europäischen Arzneibuches (5. Ausgabe 2005, S. 278). Die Methode gibt die Menge enthaltener Gerbstoffe wieder - als Differenz aus den photometrisch erfassten „Gesamtphenolen" und den nach Ausfällung der Gerbstoffe mittels Hautpulver durch Zweitmessung bestimmten nichtausgefällten phenolischen Verbindungen (Kalibration mit Pyrogallol).

Die Bestimmung von Keimzahlen (aerobe Keime) erfolgte nach der Methode LFGB L 00.00-88 und flankierte pflanzenbauliche Versuche, Aufbereitungs- und Lagerversuche (Trockendroge). Die Methode beinhaltet die Lösung von Probematerial in gepuffertem Peptonwasser, das Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf PCA und die Auszählung nach 72 Stunden (30 °C) Inkubation.

Die Versuchsauswertung erfolgte unter Einbeziehung von Varianzanalyse und Mittelwertvergleich unter Zuhilfenahme des multiplen t-Testes. Ausgewählte Zusammenhänge wurden korrelationsanalytisch betrachtet.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Aufnahme einer Selektionszüchtung erfolgten Untersuchungen zur natürlichen Variabilität an Hand einer größeren Anzahl von *Agrimonia procera*-Akzessionen. Es konnten erhebliche Differenzierungen in der Wüchsigkeit und im Gesamt-Polyphenol- bzw. Gerbstoffgehalt sowie in der Anfälligkeit gegenüber pilzlichen Blattkrankheiten (Falscher und Echter Mehltau) festgestellt werden. In Abbildung 1 ist die Häufigkeitsverteilung des Gerbstoff- bzw. des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Gruppen von *A. procera*-Akzessionen an Hand eines Sortimentes Kühnfeld Halle, Ernte 2012 (n=46) dargestellt. Gerbstoff- und Polyphenolgehalt zeigen eine enge Korrellation (Korrelationskoeffizient: 0,985). Die Pflanzenlänge zur Ernte zeigte in dem betreffenden Sortiment eine Schwankungsbreite von 108 bis 183 cm (Versuchsmittel: 137 cm).

Für *Agrimonia eupatoria* liegen einige jüngere HPLC-gestützte analytische Untersuchungsbefunde vor (Correia u. a. 2006, Møller u. a. 2009, Kubínová u. a. 2012, Granica u. a. 2013). Møller u. a. (2009) kalkulierten nach Ihren Untersuchungen für getrocknete *A. eupatoria*-Droge folgende Gehalte an Gerbstoff-aktiven Polyphenpolen: 0,549 % Proanthocyanidine, 0,258 % Catechin, 0,164 % Epicatechin, 0,296 % Ellagsäure, 0,028 % Gallussäure. Granica u. a. (2013) bestimmten an Hand von mehreren *A. eupatoria*-Akzessionen eine größere Anzahl von Polyphenol-Hauptkomponenten (darunter auch die wesentlichen Flavone - Luteolin- und Apigenin-Glykoside -, hier nicht dargestellt). Die Ergebnisse zeigen eine gewisse Variabilität. Für Catechin werden Gehaltsangaben (nach UV-Detektion) von 1,53-1,96 mg/g, für Procyanidin B3 (Catechin-Dimer) von 1,42-2,51 mg/g, für Procyanidin(Catechin)-Trimer von 0,58-1,3 mg/g und für Agrimoniin von 2,63-5,39 mg/g gemacht (alles bezogen auf *A. eupatoria*-

Kraut-Trockendroge). Agrimoniin ist nach diesen Untersuchungen eine der Hauptkomponenten gerbstoff-aktiver Polyphenole von Odermennigkraut. Für *Agrimonia procera* liegen uns bislang keine entsprechenden analytischen Untersuchungen vor. Lediglich bei Kubínová u. a. (2012) finden sich qualitative Angaben für Flavonoide.

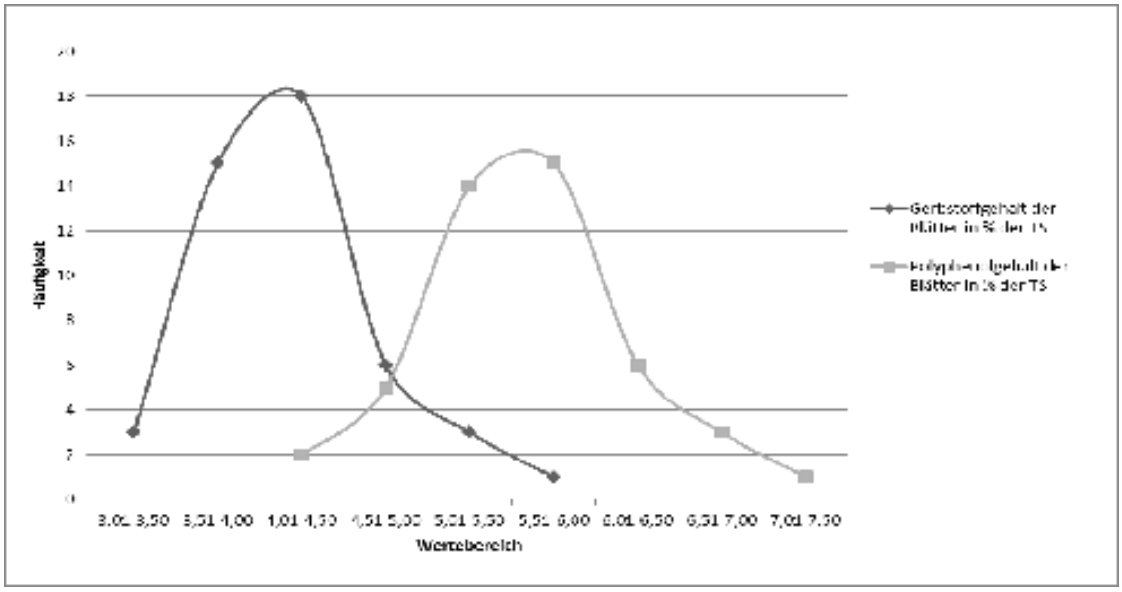


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung von Gerbstoff- und Gesamtpolyphenolgehalt in *Agrimonia procera*-Akzessionen, Kühnfeld Halle/S., Ernte 2012, (n=46, SD=0,52 und 0,60)

Tabelle 1: *Agrimonia procera*-Erntezeitenversuch, Zappendorf, Ernte 2011 (2. Nutzungsjahr)

Ernte-zeitpunkt	Pflan-zen-länge	Pflan-zen-länge	Pflan-zen-länge	Ernte	FM-Ertrag	TS	TM-Ertrag	Blatt-anteil	Gerb-stoff Blätter	Gerb-stoff Stän-gel	Gerbstoff-ertrag	Keim-zahl Blätter	Keim-zahl Stängel
	cm 22.6.11	cm 5.7.11	cm 18.7.11	Datum 2011	dt/ha	%	dt/ha (Sign)	%	% in TM	% in TM	kg/ha (Sign)	KBE/ g*10^4	KBE/ g*10^4
1. kurz nach Blühbeginn	148	-	-	23.6	437	21,9	95,7	42	4,4	1,7	267	59,0	2,10
2. zur Hauptblüte	146	170	-	6.7	450	24,3	109,3*	35	4,9	1,9	325**	19,3	1,01
3. Blüh-ende	142	167	172	18.7	455	27,0	122,9**	31	5,0	2,3	383**	170,0	8,30
Mittel	145	168	172		447	24,4	109,3	36	4,7	1,9	325	82,8	3,80

Standort: Lö2, L/sL, Ackerzahl 85
Sign=Signifikanz im Mittelwertvergleich (t-test, Bezugsbasis: 1. Ernte, * α=5%, ** α=1%)

Im Ergebnis der mehrjährigen pflanzenbaulichen Versuche lassen sich zusammenfassend folgende allgemeine Erkenntnisse festhalten. Für die mehrjährige Kultur von Großem Odermennig sollten gut versorgte Lehm-, nach Möglichkeit höherwertige Löss-Lehm-Standorte, genutzt werden. Die Etablierung eines Bestandes erfolgt durch Herbstaussaat zum Vegetationsschluss. Die Pflanzen gehen im Frühjahr des Folgejahres auf. Angestrebt wird eine Bestandesdichte von etwa 12-16 Pflanzen/m². Pflegemaßnahmen müssen mechanisch erfolgen. Die Stickstoff-Düngung orientiert sich am Entzug

durch das Ernteprodukt und ist zu teilen (Stickstoffgehalt des getrockneten Krautes: 1,56 %). Die Krauternte - zu Blühbeginn bis spätestens Blühende - (Juni/Juli) ist ab dem zweiten Vegetationsjahr möglich. In Tabelle 1 sind ausgewählte Versuchsergebnisse eines Erntezeitenversuches Zappendorf, Ernte 2012 zusammengestellt. Die Frischmasse (ganze Pflanzen) wird auf Flächenbelüftungsanlagen getrocknet. Der Biomasseertrag von *Agrimonia procera* ist hoch. Auf besseren Standorten werden mehr als 10 t Trockenmasse und Gerbstofferträge von 300-350 kg/ha erreicht. Bestände vom Großen Odermennig sind sehr ausdauernd. Mehr als 5 Nutzungsjahre sind möglich. Die Gerbstoffe sind in der Trockendroge lagerungsstabil.

Danksagung

Für die freundliche Unterstützung des Vorhabens sei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) herzlich gedankt.

Literatur

Anonym, 1986: Deutscher Arzneimittel-Codex 1986 – Ergänzungsbuch zum Arzneibuch. einschl. 1.-7. Ergänzung (1989-1995). Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.

Anonym, 2002: Europäisches Arzneibuch. Grundwerk. Deutscher Apotheker-Verlag Stuttgart, 2549-2550.

Bae, J. H.; Sohn, M. A., 2005: Effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. Extract on the Growth of Food-Borne Pathogens. Korean J. Nutr. 38, 2, 112-116.

Benkert, D.; Fukarek, F.; Korsch, H. (Hrsg.), 1996: Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen Ostdeutschlands. Gustav Fischer Verlag Jena, Karte 27-28.

Bučková, A.; Leifertová, I.; Nátherová, Ľ.; Skalický, V., 1971: Farmakobotanické studium rodu *Agrimonia*. II. Hodnocení tříslovin evropských řepíků. Československá Farmacie, XX, 4, 136-140.

Carnat, A.; Lamaison, J. L.; Petitjean-Freytet, C., 1991: L'Aigremoine: Étude comparée d'*Agrimonia eupatoria* L. et *Agrimonia procera* Wallr. Plantes médicinales et phytothérapie XXV, 4, 202-211.

Černaj, P.; Oravec, V., 1993: Variability of Active Substances in *Agrimonia* L. Species. Acta Horticulturae 330, 133-136.

Correia, H.; González-Paramás, A.; Amaral, M. T.; Santos-Buelga, C.; Batista, M. T., 2006: Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices. Biomedical chromatography 20, 88-94.

Granica, S.; Krupa, K.; Kłębowska, A; Kiss, A. K., 2013: Development and Validation of HPLC-DAD-CAD-MS³ Method for Qualitative and Quantitative Standardization of Polyphenols in *Agrimoniae eupatoriae herba* (Ph. Eur). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 86, 112-122.

Heeger, E. F., 1956: Handbuch des Arznei und Gewürzpflanzenbaues – Drogengewinnung. Deutscher Bauernverlag Berlin, 210-213.

Hegi, G., 1923: Illustrierte Flora von Mittel-Europa. Band IV, 2. Hälfte, J. F. Lehmanns Verlag München, 929-935.

Ivanova, D.; Vankova, D.; Nashar, M., 2013: *Agrimonia eupatoria* Tea Consumption in Relation to Markers of Inflammation, Oxidative Status and Lipid Metabolism in Healthy Subjects. Archives of Physiology and Biochemistry 119, 1, 32-37.

Kubínová, R.; Jankovská, D.; Bauerová, V., 2012: Antioxidant and α-Glucosidase Inhibition Activities and Polyphenol Content of five Species of *Agrimonia* Genus. Acta fytotechnica et zootechnica 2, 38-41.

Kwon, D. H.; Kwon, H. Y.; Kim, H. J.; Chang, E. J.; Kim, M. B.; Yoon, S. K.; Song, E. Y.; Yoon, D. Y.; Lee, Y. H.; Choi, I. S.; Choi, Y. K., 2005: Inhibition of Hepatitis B Virus by an Aqueous Extract of *Agrimonia eupatoria* L. Phytotherapy Research 19, 355-358.

Meusel, H. (Hrsg.); Jäger, E.; Weinert, E., 1965: Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora. Karten, Band 1. G. Fischer-Verlag Jena.

Møller Ch.; Hansen, St. H.; Cornett, C., 2009: Characterisation of Tannin-Containing Herbal Drugs by HPLC. Phytochemical Analysis 20, 231-239.

Pahlow, M., 2001: Das Große Buch der Heilpflanzen. Gräfe und Unzer München, 243-244.

Péter, H. M., 1969: Die antibiotische Wirkung von Auszügen aus *Agrimonia*-Arten. Die Pharmazie 24, 10, 632-635.

Péter, M. H.; Rácz, G., 1973: Der Gerbstoffgehalt verschiedener Agrimoniaarten. Die Pharmazie 28, 8, 539-541.

Reichling, J.; Gachnian-Mirtscheva, R.; Frater-Schröder, M.; Saller, R.; Rabinovich, M. I.; Widmaier, W., 2008: Heilpflanzenkunde für die Veterinärpraxis. Springer Berlin, Heidelberg, 129-131.

Rimpler, H. (Hrsg.); unter Mitarbeit von Franz, Ch. 1999: Biogene Arzneistoffe. Deutscher Apothekerverl. Stuttgart, 387-413.

Rothmaler, W., 1976: Exkursionsflora für die Gebiete der DDR und der BRD – Gefäßpflanzen. Volk und Wissen Volkseigener Verlag Berlin, 244.

Schliephake, W.; Garz, J.; Schmidt, L. 1999: Exkursionsführer zu den Dauerversuchen auf dem Julius-Kühn-Versuchsfeld in Halle. Inst. f. Bodenkunde und Pflanzenernährung der M.-Luther-Universität Halle/Saale.

Schlosser, S.; Reichhoff, L; Hanelt, P., 1991: Wildpflanzen Mitteleuropas. Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin, 117-118.

Skalický, V., 1962: Ein Beitrag zur Erkenntnis der europäischen Arten der Gattung *Agrimonia* L. Acta Horti Bot. Pragensis 1962, 87-108.

Skalický, V.; Leifertová, I., 1969: Farmakobotanické studium rodu *Agrimonia*. I. Zhodnocení *Agrimonia eupatoria* L. subsp. *eupatoria* a *Agrimonia procera* Wallr.. Československá Farmacie, XVIII, 7, 329-336.

Venskutonis, P. R.; Škémaité, M.; Ragažinskiené, O., 2007: Radical Scavenging Capacity of *Agrimonia eupatoria* and *Agrimonia procera*. Fitoterapia 78, 2, 166-168.

Venskutonis, P. R.; Škémaité, M.; Sivik, B., 2008: Assessment of Radical Scavenging Capacity of *Agrimonia* Extracts Isolated by Supercritical Carbon Dioxide. The Journal of Supercritical Fluids 45, 2, 231-237.

Wagner, F.; Prediger, G.; Tiggemann, B.; Schmidt, I, 2007: Der Feldversuch – Durchführung und Technik. Selbstverlag Fritz Wagner Bad Hersfeld.

Wagner, H., 1999: Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 330-341.

Wichtl, M. (Hrsg.), 1997: Teedrogen und Phytopharmaka: Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 39-41.

Wittmann, H.; Strobl, W., 1987: Untersuchungen am Artenpaar *Agrimonia eupatoria* L. - *A. procera* Wallr. im Bundesland Salzburg (Österreich). Linzer biologische Beiträge 19/1, 91-119.

Autorenanschrift

Gert Horn
Exsemine GmbH
Am Wehr 4, 06198 Salzatal OT Zappendorf
Deutschland
E-Mail: g.horn@exsemine.de

Cotyledons of fenugreek in comparison to "normal" fenugreek seeds and improved feed intake in ruminants

Tudual Tredan[1], Alexandre Budan[2], Fabiola Daubner[3] and Roser Pallissé[2]

[1] Nutral, Sainte-Marie de Beauce, FR
[2] Nor-Feed Sud, Beaucouzé, FR
[3] Pulte GmbH & Co. KG, Grünwald, DE

Introduction

Palatability has a major influence on feed intake in ruminants, and the sense of taste is well developed in cattle (Albright, 1993). Palatability enhancer are commonly used in ruminants, *e.g.* to ensure proper consumption of mineral feed or to increase the milking frequency of the visits to the robot. Fenugreek whole seeds and aroma of fenugreek are commonly used in human and animal diets to stimulate appetite and weight gain. Fenugreek contains a set of aromatic compounds (lactones) and active components like steroidal saponins. To get the most of fenugreek, Yuquina Cotyl has been formulated based on a specific part of the seeds, the cotyledons. This patented process allows to remove the galactomannans and consequently to concentrate the active components.

The objective of this study is to compare the effect of Yuquina Cotyl to the whole seed of fenugreek on feed intake in dairy cows.

Materials and methods

Characterization of saponins by thin layer chromatography

Hydroethanolic extracts (1:1 v/v) of whole seeds of fenugreek and Yuquina Cotyl (50mg/mL) were prepared. 8µl of each extract was laid on a pre-coated silica gel 60 F254 layer. Elution was carried out in a flat bottomed chamber with a mobile phase constituted of chloroform:methanol:water:acetic acid (65:35:4.5:1 v/v/v/v). 254 nm UV light and a solution of vanillin and sulfuric acid were used to detect saponins. It was hypothesized that each spot with no absorbance at 254 nm contained saponins.

Palatability trial in dairy cows

Fifty Holstein cows in lactation were used to test the effect of the addition of powder of whole seeds of fenugreek and of Yuquina Cotyl to lick blocks on their intake. The trial was conducted in a commercial farm in Britany (France). Animals were fed with a diet based on maize silage, pastured grass, grass silage, cereals silage and soybean meal (37/28/14/14/7) and had free access to fresh water. Three lick blocks of $CaCO_3$, MgO and NaCl were proposed at the same place and simultaneously to the whole group during 18 days. The lickstones differed by the addition of sepiolite, fenugreek whole seed and Yuquina Cotyl (Table 1). Lick blocks consumption was evaluated by weighing once a day, after a 3 day long period of adaptation.

Results

Characterization of saponins by thin layer chromatography

Saponins were allocated to three spots. All of the spots were found both in extracts from whole seeds of fenugreek and in Yuquina Cotyl. As shown in Figure 1, the intensity of the spots was higher in Yuquina Cotyl than in whole seeds of fenugreek, suggesting a higher concentration in saponins.

Table 1: Composition of the lick blocks (mg/g DM)

	Control lick block	**Yuquina Cotyl lick block**	**Fenugreek whole seed lick block**
Sepiolite	280	140	-
Fenugreek whole seeds	-	-	280
Yuquina Cotyl	-	140	-
NaCl	550	550	550
$CaCO_3$	90	90	90
MgO	90	90	90

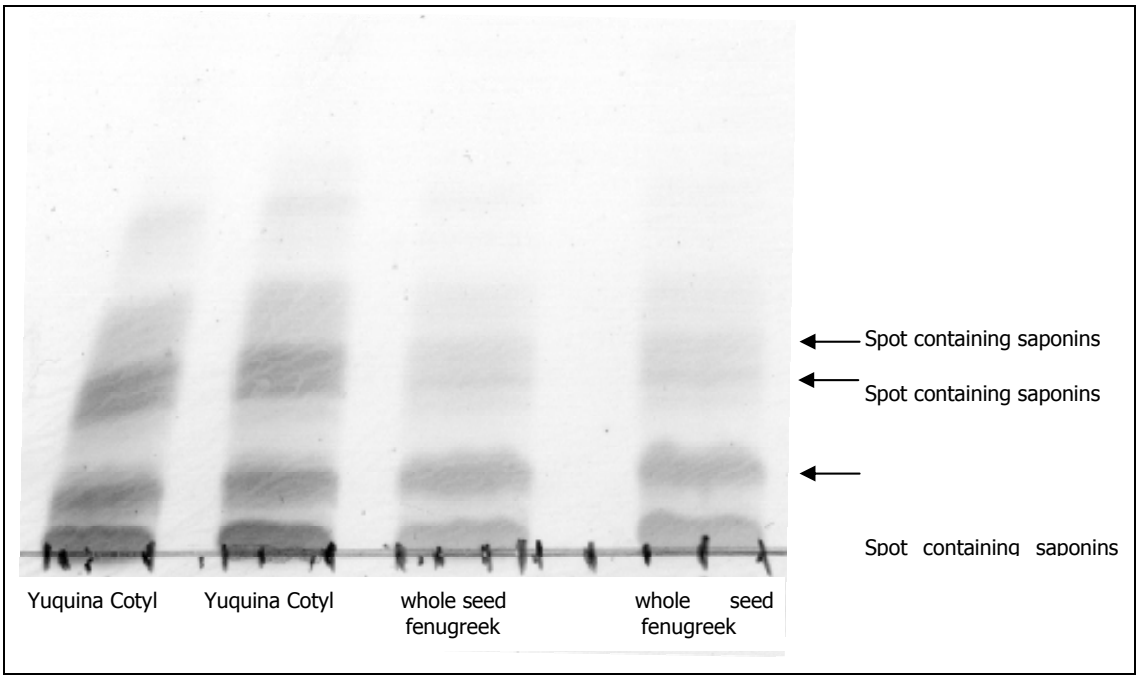


Figure 1: TLC analysis of whole seeds of fenugreek and Yuquina Cotyl

Trial with fenugreek in dairy cows

The average of lickstones intake was 21.2 g/cow/day, *ie* 10.6 g NaCl/cow/day, 8.2 g MgO and $CaCO_3$/cow/day. Feed intake for lick blocks containing fenugreek was higher than feed intake for the control lick block, +10.5% for Yuquina Cotyl, and +5.9% for whole seeds of fenugreek (Figure 2). provide results at least two times enhanced for palability, than "normal" fenugreek whole seed.

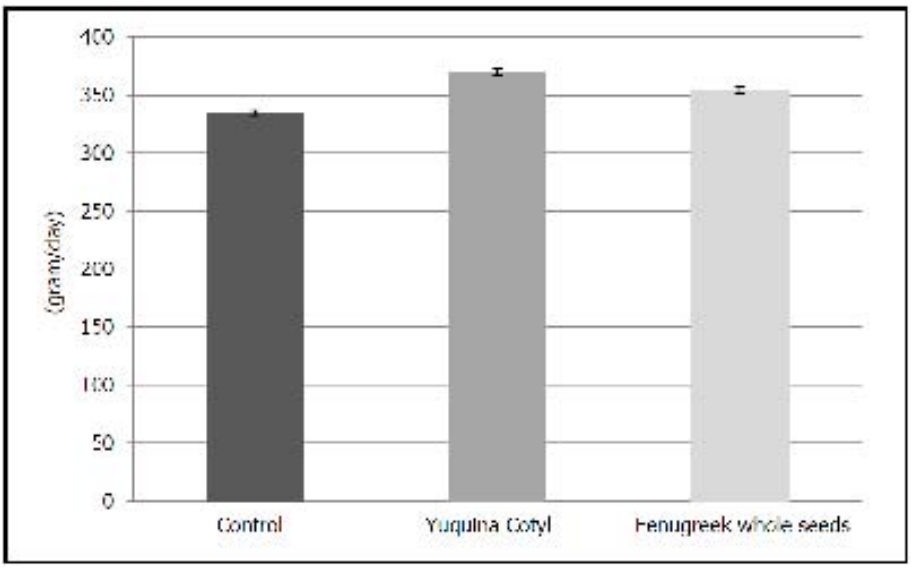


Figure 2: Lick block intake

Discussion

Despite a concentration in fenugreek two fold lower, lick block intake was higher with Yuquina Cotyl than with whole seeds of fenugreek. As shown by TLC analysis, this result can be explained by a concentration in active compounds (steroidal saponins, lactons, sotolones and others) higher in Yuquina Cotyl than in fenugreek whole seeds. Fenugreek improves the palatability by improving the taste and the smell (aromatic lactones), and the animal's experiences relative to post-ingestive consequences associated with feed (saponins) (Petit et al., 1995).

Conclusion

According to the results of this study, Yuquina Cotyl may be a good compromise between highly concentrated aroma of fenugreek and whole seeds of fenugreek which have a low concentration of active compounds. Consequently, this product may be interesting to ensure proper consumption of mineral feed or to increase the frequency of the visits to the milking robot. Further studies need to be undertaken to assess these applications.

References

Albright, J.L. *J. Dairy Sci.* 1993, *76*, 485-498.

Petit, P. R.; Sauvaire, Y. D.; Hillaire-Buys, D. M.; Leconte, O. M.; Baissac, Y. G.; Ponsin, G. R.; Ribes, G. R. *Steroids* 1995, *60*, 674–680.

Corresponding author

Roser Pallissé
Nor-Feed Sud
3 rue Amédéo Avogadro
49070 Beaucouzé, France
E-mail: roser.pallisse@nor-feedsud.fr

Positive effects of a new phytogenic additive on challenged broiler chicks

Monika Korzekwa, Malte Lohölter and Miriam Würzbach

Dr. Eckel GmbH, Niederzissen, DE

Introduction

Coccidiosis remains one of the most common diseases in global broiler production, causing huge economic losses via increased mortality and decreased zootechnical performance. The pathogenic organisms inducing coccidiosis are single-celled protozoan parasites of genus *Eimeria* that multiply in the cells of the intestinal epithelium of broiler chicks or laying hens. *E. maxima*, infecting jejunal cells, is one of the most common coccidial species of broiler chicks. Damage of the intestine caused by *Eimeria* spp. is thought to be involved in increasing the susceptibility of chickens to outbreaks of necrotic enteritis (NE) caused by *Clostridium perfringens* Type A and C (Williams et al., 2003). Cases of NE associated with *Clostridium perfringens* have increased in countries that stopped using antibiotic growth promoters (Van Immerseel et al., 2004; Williams, 2005). The acute form of NE leads to increased mortality in broiler flocks which can account for 1% mortality losses per day for several consecutive days during the last weeks of the rearing period (Van Immerseel et al., 2004). Subclinical forms of this disease decrease bird performance and induce necrotic lesions in the intestinal epithelium.

Plant-derived substances are well known to exert antimicrobial actions against important pathogens (Hammer et al. 1999) and to support animal performance. In order to study the effects of a specific phytogenic additive (Anta®Phyt MO, Dr. Eckel GmbH, Niederzissen, Germany) on performance parameters of infected chicks, an *Eimeria* challenge trial was conducted.

Materials and methods

The 35-day challenge trial was conducted in the broiler house of Alimetrics at Somero, southern Finland, in June-July 2013. 360 newly hatched male chicks (Ross 508) were divided into groups of 15 animals per pen. In addition to a negative control, two dosages (0.4 and 1.2 kg/t) of Anta®Phyt MO were tested (table 1). The basal diet was based on wheat and soy (table 2). To ensure optimal distribution of the test products in the diets, the product was blended with wheat into 5-kg premixes. The applied diets were formulated and manufactured by MTT Agrifood Research Finland. Starter diet was given on days 1-16 and grower diet on days 17-35. The dosage of the test products was the same in starter and grower diets.

Table 1: The feeding trial set-up

Treatment	Number of pens	Birds per pen	Birds per treatment
Negative control	8	15	120
0.4 kg/t Anta®Phyt MO	8	15	120
1.2 kg/t Anta®Phyt MO	8	15	120

Table 2: Feed formulation for starter and grower feed

Composition	Starter feed (day 1-16)	Grower feed (day 17-35)
Wheat (%)	57.51	67.95
Soybean meal (%)	34.70	27.09
Sunflower oil (%)	4.00	1.47
Monocalciumphosphate (%)	1.50	1.50
Limestone (%)	1.30	1.00
NaCl (%)	0.40	0.40
Mineral premix (%)	0.20	0.20
Vitamin premix (%)	0.20	0.20
Methionine (%)	0.10	0.10
Lysine (%)	0.09	0.09

Eimeria challenge. On day 10, the chicks were challenged with *Eimeria maxima* oocysts of the Weybridge strain. Each bird received 1,500 sporulated oocysts. The oocysts were pipetted directly into their mouth in 150 µl of tap water.

Performance analysis. Chicks were weighed individually on day 1, 10, 14, 16, 22, 29 and 35 (slaughter). The feed provided in each pen was weighed, and the leftovers were weighed on days 10, 14, 16 (starter diet) as well as on days 22, 29 and 35 (grower diet). Thus, feed consumption, feed conversion ratio and bird body weight gain (BWG) were measured for days 1-10 (pre-challenge), 10-16 (coccidial challenge) as well as 16-22, 22-29 and 29-35 (post-challenge). Birds that were found dead in the pens, and birds euthanized by cervical dislocation because of leg problems, injuries or other health problems were weighed, recorded and stored in a freezer until the end of the trial. A veterinarian evaluated the health status of the remaining birds on day 35. As most of the mortality during the trial was caused by coccidiosis and necrotic enteritis and the health status of the remaining chicks was considered normal, the dead birds were not subject to necropsy.

Statistical analysis. Statistical analysis consisted of two-tailed t-test for all measured parameters. The tests were performed against the treatment with no amendment just as Dunnett's post hoc test would have been used, but t-test was chosen to let the individual treatments be independent of the other treatments tested simultaneously.

Results

The challenge model aimed to induce subclinical coccidiosis, which decreases zootechnical performance but does not markedly affect mortality rate. However, there were cases of necrotic enteritis with increased mortality 6-7 days after challenge. Figure 1 shows the weight gain of broiler chicks for the entire 35-day trial period. *Eimeria* challenge adversely affected growth and feed conversion in each treatment group. Due to the impaired health status, breeding performance of ROSS 508 broilers was not achieved. However, nominal differences between the treatment groups were observed. The mean body weight of the Anta®Phyt-treated birds was increased after the *Eimeria* challenge compared to the control group (figure 2). Feed conversion ratio was improved for Anta®Phyt-treated groups compared to the control group, especially from day 22 to 35. However, the difference to the control group was not significant. Since the variation in the mean weight gain appeared to be higher within the control group from day 22-35, a F-test has been conducted to evaluate the variances. The results of the F-test showed that the mean body weight gain variance of both Anta®Phyt-treated groups was significantly smaller than of the control group ($p= 0.0009$ for lower and $p= 0.0009$ for higher dosage, respectively).

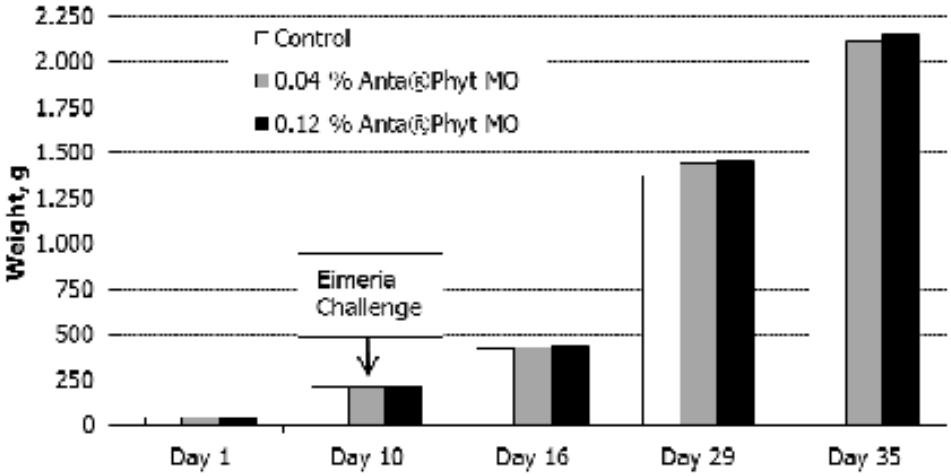


Figure 1: Weight gain of broiler chicks for the entire trial period

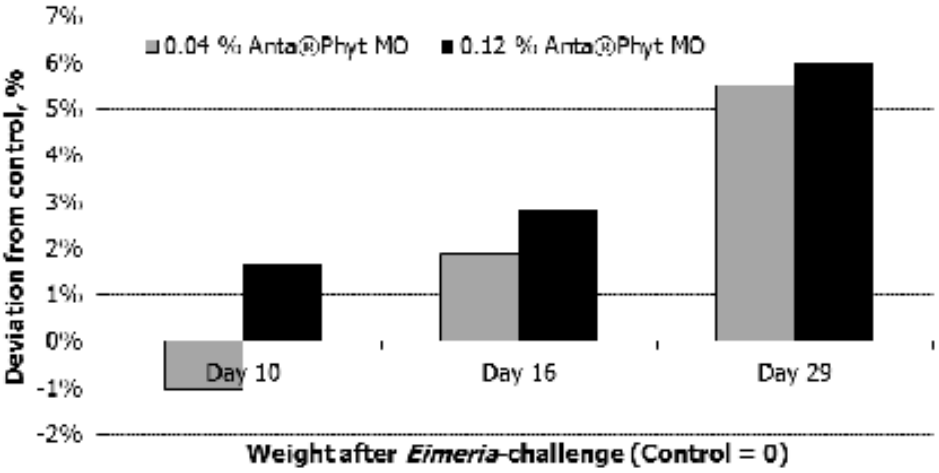


Figure 2: Body weight after *Eimeria* challenge compared to control group

Discussion

The aim of the present work was to discover whether Anta®Phyt MO (a blend of natural plant extracts, herbs, spices and Arabic gum) has an effect on the broiler chicken growth performance in an experimental *Eimeria maxima* challenge trial. Necrotic enteritis, associated with the overgrowth of *Cl. perfringens* in the small intestine, is a secondary bacterial infection that often follows coccidiosis (Long, 1973; Boussard et al. 1986). Moreover, it has been shown in experimental infection studies that *Cl. perfringens* and *Eimeria* spp. act synergistically in inducing necrotic enteritis lesions.

In a previous *in vitro* study, the abundance of *Cl. perfringens* as numbers of gene copies was quantified. Active components of Anta®Phyt MO showed a significant reduction of *Cl. perfringens* in the same way as monensin compared to the negative control. Moreover, active ingredients of Anta®Phyt MO directed ileal fermentation in the same way as monensin by significantly increasing the production of acetic and propionic acid and reducing the production of lactic acid (Blaesse et al. 2012; Holl et al. 2013). Bacteria in the chicken intestine utilize the same nutrients that are absorbed and metabolized

by the host. Therefore, the reduced bacterial load in this section of the gastrointestinal tract and consequently the decreased competition for nutrients is believed to explain the mode of action of antibiotics in improving zootechnical performance (Dibner and Richards, 2005). One possible mode of action of Anta®Phyt, as shown *in vitro*, could be the reduction of *Cl. perfringens* growth, which facilitated the recovery of the birds after *Eimeria* infection and thus reduced the variation in weight gain between the replicate birds. *Eimeria* infections cause intestinal damage, and a quick recovery is crucial for preventing further infections and to minimize performance losses.

Conclusion

These results suggest that the inclusion of Anta®Phyt in the diet accelerates the recovery of infected broiler chicks from coccidiosis and improves zootechnical performance.

References

Blaesse A.-K., E. Holl, U. Mohr and L. Durst (2012): A phytogenic feed additive positively affects animal production and ileal microflora. 50th Jahrestagung der BAT e. V.: Perspektiven einer ressourcenschonenden und nachhaltigen Tierernährung. Freising, Germany, pp. 152-155.

Broussard C. T., C. L. Hofacre, R. K. Page and O. J. Fletcher (1986): Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. Avian Dis. 30: 617-619.

Dibner J. J. and J. D. Richards (2005): Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poult. Sci, 84: 634-643.

Hammer K. A., Carson C. F. and T. V. Riley (1999): Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86, 985-990.

Holl E., A.-K. Blaesse, V. Vahjen and K. Männer (2013): Positive effects of a new phytogenic feed additive on broiler performance and microflora. 12th Boku-Symposium Tierernährung: Auf der Suche nach neuartigen Futtermitteln und Technologien in der Tierernährung. Vienna, Austria, pp. 228-232.

Long, J. R. (1973): Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. Can. J. Comp. Med. 37: 302-308.

Van Immerseel F., J. De Buck, F. Pasmans, G. Huyghebaert, F. Haesebrouck and R. Ducatelle (2004): Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. Avian Pathol. 33: 537-549.

Williams R. B., R. N. Marshall, R. M. La Ragione and J. Catchpole (2003): A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis, and anticoccidial vaccination of chickens. Parasitol. Res. 90: 19-26.

Williams R.B. (2005): Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. Avian Pathol. 34: 159-180.

Corresponding author

Monika Korzekwa
Dr. Eckel GmbH
Product Management and Development
Im Stiefelfeld 10; 56651 Niederzissen; Germany
Phone +49 (0) 2636 9749 28
www.dr-eckel.de
E-mail: m.korzekwa@dr-eckel.de

Plant-derived antimycotics in silage

Theodora Höger[1], Karin Schöndorfer[1], Roman Labuda[2], Jutta Zwielehner[3], Sigrid Pasteiner[3] and Gerd Schatzmayr[1]

[1] BIOMIN Holding GmbH, Tulln, AT
[2] ROMER LABS Division Holding GmbH, Tulln, AT
[3] BIOMIN Holding GmbH, Herzogenburg, AT

Introduction

Some species of moulds in silage pose a risk to the health of both animals and humans. Poor feed hygiene has severe consequences on farming, such as decreased milk yield and quality as well as fertility problems, immunosuppression, increased liver enzyme values, and decreased appetite in livestock (Richter et al., 2007; Richardt, 2008).

Mycotoxins produced as secondary metabolites by some species of moulds cause health issues, that can increase the need for medicinal treatment (Anacker, 2007). Both direct and indirect mycotoxin effects result in financial losses.

However, it is not only moulds have to be taken into account when it comes to fungal spoilage of silage. Aerobic yeast growth is exothermic and causes silage to heat up, resulting in nutrient losses in silage. This can speed up the growth of moulds while creating a favourable environment for clostridial growth, thereby facilitating silage decay (Richter et al., 2007) and increasingin the risk to animal health.

Additives from natural sources are possible ingredients in antimycotic acid products since they may have beneficial effects on the stability of silage and a potential for reducing corrosion. Five phytochemicals were screened for their antimycotic properties and their IC90 values – the concentration at which 90 % of all cells or spores were inhibited – were determined.

Materials and methods

Two species of yeasts, both *Candida* spp., as well as four mould strains *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, *Aspergillus fumigatus*, and *Penicillium roqueforti* were tested for their susceptibility towards five phytochemicals and five acids commercially used as silage preservatives, namely propionic acid, acetic acid, formic acid, benzoic acid, and potassium sorbate.

Individual substances were screened in triplicates in an agar diffusion assay. Aliquots of 75 µL of cell suspensions of yeast strains (10^6 cells/mL) or spore suspensions of mould strains (10^6 spores/mL) were spread on malt extract agar plates. In aliquots of 10 µL, the test substances were applied on up to four filter paper discs per plate as 10 % (v/v) dilutions in DMSO. Griseofulvin and amphothericin B were used as positive controls, while pure DMSO was used as a negative control. The plates were incubated at 45 °C (*A. fumigatus*) or 25 °C (all other strains) for at least 48 h. The diameter of the inhibition zone was measured using a ruler.

To determine the IC90 values of the phytochemicals, a micro dilution assay in 96-well plates filled with malt extract broth was carried out. Due to their lipophilic properties, the phytochemicals were diluted to 4000 µg/mL in DMSO before application in the plates. Amphothericin B served as a positive control. The seven two-fold dilutions of the test substances as well as of amphothericin B ranged from

1000 µg/mL to 15.63 µg/mL. In plates using moulds, spore suspensions of 10^5 spores/mL or yeast cell suspensions of 10^5 cells/mL were applied. OD620 values were taken at 0 h and after 24 hours of incubation at 25 °C to calculate the inhibitory effect of the tested substances. The data were then analysed with the Probit function of SPSS 10.0.

Results

The screening on malt extract agar plates was only partially effective. The outcome was substance-specific (see figure 1).

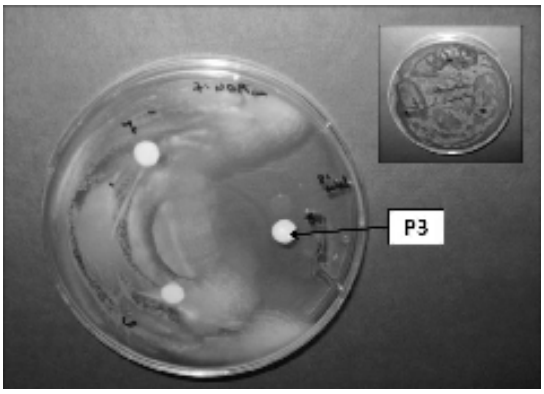


Figure 1: Agar plates after 144 h: *P. roqueforti* tested against phytochemical 3 (P3); top right-hand corner: growth control.

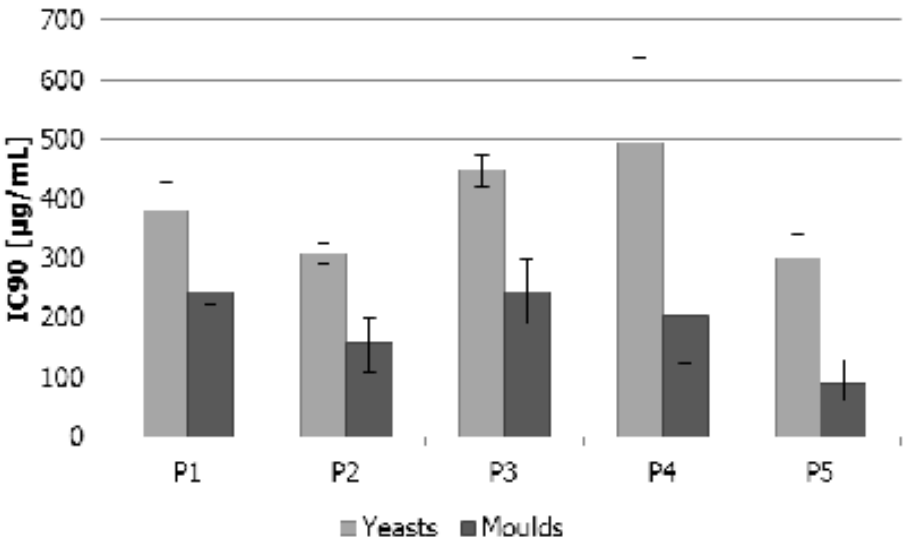


Figure 2: IC90 values of phytochemicals (P1-5) tested against yeasts and moulds. Error bars indicate minimum and maximum IC90s.

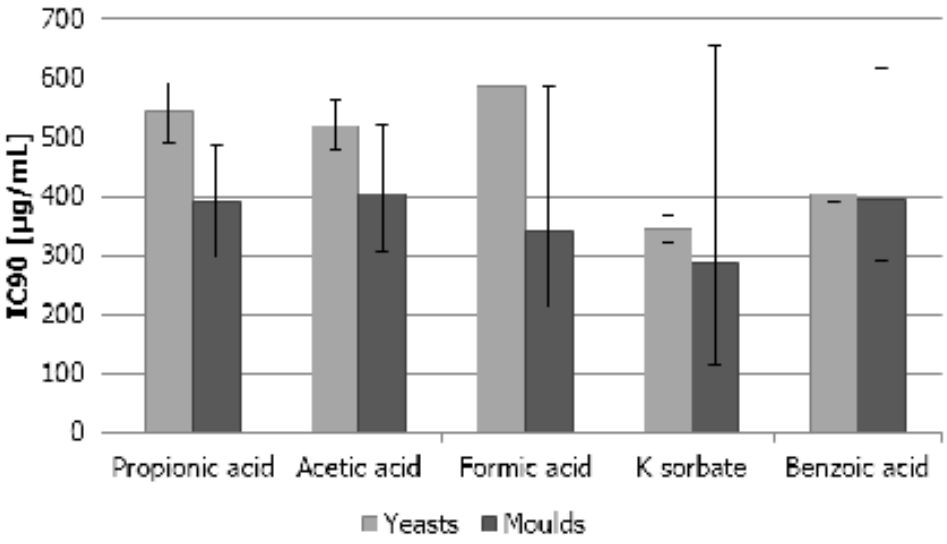


Figure 3: IC90 values of commonly used preservatives tested against yeasts and moulds. Error bars indicate minimum and maximum IC90s.

In the micro-dilution assay, the tested moulds tended to be more susceptible towards the tested chemicals than yeasts, as can be seen in figures 2 and 3. The most sensitive strain was *F. graminearum*, which was inhibited by the phytochemicals at 83-241 µg/mL, whereas the commonly used chemicals were effective at 114-304 µg/mL. However, the strains reacted fairly differently to the substances. One of the phytochemicals showed particularly strong antimycotic properties ranging from 60-130 µg/mL in moulds and from 259-342 µg/mL in yeasts.

Table 1: IC90 ranges [µg/mL] of all substances tested against yeasts and moulds.

	Candida glabrata	*Candida krusei*	*Aspergillus fumigatus*	*Fusarium graminearum*	*Fusarium proliferatum*	*Penicillium roqueforti*
			IC90 [µg/mL]			
P1	331	428	227	222	278	252
P2	292	326	135	107	199	186
P3	475	420	190	241	297	245
P4	636	353	126	123	339	221
P5	259	342	60	83	84	130
Propionic acid	493	593	298	304	487	475
Acetic acid	478	564	306	323	523	466
Formic acid	517	657	266	213	297	587
K sorbate	321	368	239	114	137	656
Benzoic acid	390	421	352	291	318	617

Yeasts strains were on average less susceptible to phytochemicals (figure 2) and commonly used chemicals (figure 3) than moulds. Figures 2 and 3 show the average IC90 of all moulds and yeasts against phytochemicals and acids as well as the minima and maxima, indicated using error bars. On average, the most effective substances were phytochemicals 2 and 5. However, as can be seen looking at the error bars in figures 2 and 3, the IC90 values varied greatly from strain to strain (see also table 1).

Discussion

The outcome of the screening on agar plates varied depending on the substance, although antimycotic properties had previously been reported in the literature for the substances tested. Therefore, the screening on agar plates was used as a rough approximation before all substances were tested for their quantitative antimycotic effect in a micro-dilution assay.

Moulds were, on average, more susceptible towards both phytochemicals and commonly used preservatives. This could be due to the cell wall of yeasts having a different composition than that of moulds.

Silage preservatives on the market have dosage recommendations of 1.5-22.0 kg/t. Potassium sorbate has a recommended dosage of at least 90 mg/kg at a dry matter content of 21-38 % and sodium benzoate at 250-2,500 mg/kg. The tested phytochemicals may even be effective at lower inclusion levels.

The results point to the considerable antimycotic potential of phytochemicals compared to organic acids. Therefore, the phytochemicals added to preservatives commonly used in the treatment of silage could result in powerful combinations. Synergies or potential interference between preservatives and phytochemicals remain to be investigated both *in vitro* and *in vivo*.

References

Anacker, G. (2007). Mikrobiologische Belastung von Hauptfutterkomponenten – Ursache für Gesundheitsprobleme in Milchviehherden. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft. Thüringen.

Richardt, W. (2008). Mikrobiologischer Status von Futtermitteln – Einfluss auf den Fütterungserfolg. 27. Tag des Milchviehhalters. Sachsen-Anhalt.

Richter, W., Schuster, M., Tischner, H., Weigand, S., Zimmermann, G., Eder, J. (2007). Schimmelpilze und Mykotoxine in Futtermitteln (Futtergetreide, Grünfutter, Silage, Heu, Stroh). Germany: Länderübergreifende Zusammenarbeit der Landesanstalten für Landwirtschaft. Deutschland.

Corresponding author

Theodora Höger
BIOMIN Holding GmbH
Technopark 1
3430 Tulln
E-mail: theodora.hoeger@biomin.net

The use of fermentation to improve the digestibility and safety of lupine and soybean

Elena Bartkiene[1], Vita Krungleviciute[1], Grazina Juodeikiene[2], Daiva Vidmantiene[2], Zita Maknickiene[3] and Paulius Matusevicius[1]

[1] Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, LT
[2] Kaunas University of Technology, Kaunas, LT
[3] Voke Branch, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Vilnius, LT

Introduction

Lupine seeds contain significant amounts of protein, fat, minerals and dietary fiber (Barneveld 1994; Dupont et al. 1994; Rahman 1997). The dietary value of lupine proteins is higher than that of beans or peas, which is mainly due to high concentrations of the essential amino acids lysine, leucine, and threonine, which are higher only in soya beans (Jappe et al. 2010). The reduction of protein digestibility in soya and lupine seeds has been associated with the presence of protease inhibitors, as well as anti-nutritionals, such as fibers and oligosaccharides (Hove and King 1979; Palliyeguru et al. 2011; Glencross 2009). Herewith, sweet lupine seeds (*Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius*) have much more lower amount of inhibitors (< 0.1 mg g^{-1}) than soya beans (26.2 mg g^{-1}) (Hove and King 1979).

One of the possibilities to increase seeds digestibility is lactic acid fermentation. Lactic acid bacteria (LAB) play a key role in feed fermentations where they contribute to the microbiological safety. However, important feed safety factor is occurence of biogenic amines (BA). Relatively high level of BA is considered as indicator of microbial contamination during fermentation because their formation has been related to the presence of contaminating microorganisms, such as LAB. In addition, L-(+) and D-(-)-lactic acid can be used for feed contact. However, the potential toxicity of D-(-)-lactic acid is of particular concern. Thus, research is needed with regard to the content of BA and D-(-)-lactic acid in fermented protein rich feed.

The aim of research was to evaluate the effect of fermentation of different genotypes of lupine (*L. luteus* and *L. albus*) and soybean (*Rudoji* and *Progress*) with lactic acid bacteria (LAB) *Lactobacillus sakei* KTU05-6*, Pediococcus acidilactici* KTU05-07 and *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8 on protein digestibility and formation of L-(+)- and D-(-)-lactic acid, and BA on purpose to improve the quality and safety of legume products.

Materials and methods

Determination of L(+)/D(-) lactic acid: L-(+)/D-(-)-lactic acid concentrations in fermented lupine and soybean products were determined by a rapid Megazyme test kit (Megazyme Int. Ireland, Wicklow, Ireland) for D-(-) lactate and L-(+)-lactate.

Determination of *in vitro* protein digestibility: Determination of protein digestibility was carried out according to Lqari et al. (2002).

Biogenic amine analysis: Extraction and determination of BA were carried out according to the procedures developed by Ben-Gigirey et al. (1999).

Statistical analysis: All analytical determinations were performed at least in triplicate. Data obtained were analysed using statistical package SPSS for Windows XP V15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2007). Significance of differences between treated samples was evaluated by using Duncan's multiple range tests. The confidence interval was 95% ($p < 0.05$).

Results and discussion

During SSF LAB produced mainly L-(+)-lactic acid (D-(-)/L-(+) ratio 0.40 in lupine and from 0.35 to 0.51 in soybean), while the spontaneous fermentation gave almost equal amounts of both lactic acid isomers (L-(+)/D-(-)) ratio of 0.9 in soya and 1.08 in lupine). In all cases lupine and soybean protein digestibility was found higher by 18.9% (for *L. luteus*), by 17.7% (for *L. albus*), and by 16.9% (for soybean *Rudoji*) and by 14.9% (for soybean *Progress*) in fermented samples compared with not treated samples. Fermentation decreased phenylethylamine, cadaverine, spermine and spermidine contents in lupine and soybean, while contents of putrescine, histamine and tyramine increased.

Contents of D-(-)-lactic acid, a major excess of which production can lead to metabolic acidosis, and histamine and tyramine considered as the most toxic BA in fermented lupine and soya products were far below those levels causing a health risk.

Conclusion

The use of appropriate LAB for SSF of different varieties of lupine and soya could be used to improve the legume protein bioavailability without safety deterioration.

References

Barneveld RJ (1994): Understanding the nutritional chemistry of lupin (Lupins spp) grain to improve livestock production efficiency. Nutr Res Rev 12, 203–230.

Dupont MS, Muzquiz M, Estrella I, Fenwick GR and Price KR (1994) Relationship between the sensory properties of lupin grain with alkaloid and tannin content. J Sci Food Agric 65**,** 95–100.

Rahman MH, Hossain MI and Moslehuddin MH (1997) Mineral balance of rats fed on diets containing sweet lupin (*Lupinus angustifolius* L.) or its fractions. Anim Feed Tech 65**,** 231–248.

Jappe U and Vieths S (2010) Lupine, a source of new as well as hidden food allergens. Mol Nutr Food Res 54**,** 113–126.

Hove EL and King S (1997) Trypsin inhibitor contents of lupin seeds and other grain legumes. New Zeal J Agr Res, 22, 41–42.

Palliyeguru MW, Rose SP and Mackenzie AM (2011) Effect of trypsin inhibitor activity in soya bean on growth performance, protein digestibility and incidence of sub-clinical necrotic enteritis in broiler chicken flocks. Br Poult Sci 52, 359–367.

Glencross B (2009) The influence of soluble and insoluble lupin non-starch polysaccharides on the digestibility of diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 294, 256–261.

Lqari H, Vioque J, Pedroche J, Millan F (2002) *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chem. 76, 349-356.

Ben-Gigirey B, De Sousa JMVB, Villa TG, Barros-Velazquez J (1999) Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). Journal of Food Protection 62, 933–939.

Corresponding author

Elena Bartkienė
Lithuanian University of Health Sciences
Tilzes str. 18, 47181 Kaunas, Lithuania
E-mail: elena.bartkiene@lva.lt

Silage fermentation quality in whole plant maize inoculated with a novel formulation of a biological inoculant with the re-cently EU-authorized *Lactobacillus kefiri*

Jutta Zwielehner[1], Jonas Jatkauskas[2] and Vilma Vrotnikiene[2]

[1] Biomin Holiding GmbH, AT
[2] Animal Nutrition and Feed Group, Institute of Animal Science LHSU, LT

Introduction

Multi-strain silage inoculants composed of homo- and heterofermentative Lactic Acid Bacteria (LAB) are the most prevalent biological silage inoculants today. Lactic acid, the main metabolite of homofermentative LAB lowers the pH value of silage and improves feed palatability (Krizsan et al., 2007). Unfortunately, high levels of lactic acid make silages more susceptible to aerobic spoilage (McDonald, 1991). Acetic acid is a heterofermentative metabolite which directly inhibits the growth of many spoilage bacteria, yeast and fungi, thereby prolonging the aerobic stability (or shelf life) of silage (McDonald, 1991). A good balance between lactic acid and acetic acid and homofermentative and heterofermentative silage inoculant strains is essential to achieve excellent palatability and aerobic stability. We tested a novel formulation of a biological silage inoculant for its effect on the fermentation quality of whole plant maize silage in a small-scale laboratory trial as well as in a large-scale trench silo.

Materials and methods

The laboratory scale silage experiment followed a randomized block design (2x1x10). Whole plant maize silage was either treated with the silage inoculant or left untreated (control). Each treatment was tested in 10 replicates (5 for testing nutrient composition and fermentation characteristics, and 5 for testing aerobic stability) during a 90 day experimental period (at constant 20°C) followed by an 11 day aerobic stability test. **Mini-silos** (glass jars closed with caps) with a volume of 3 litre with were fully filled at a density of 1kg DM $5L^{-1}$ (2.06-2.09 kg forage at DM content 35.5 %). The mini-silos were closed not later than 30 minutes after filling. In addition, 5 whole crop maize samples were collected immediately at the time of filling the silos and ten 0.7-litre laboratory silos (glass jars) were filled for determining reduction in pH-value 3 days after ensiling in untreated and inoculated herbage. Samples of the inoculant suspensions and water were plated out to check the actual LAB content using MRS medium (de Man, Rogosa and Sharpe agar) Petri dishes incubated anaerobically at 37°C for 48 h (ISO 15214).

Two **trench silos** with a volume of 100 t each were prepared under commercial conditions, one inoculated and one untreated.

All whole plant maize (*Zea mays* L.; Baxxos FAO 200) was harvested at the dough stage, at 35.5 % dry matter (DM), chopped to <2cm length and cracked by a forage harvester "Massey Ferguson 5130".

Experimental treatments
T1 (C): Negative control (no additives, but water)

T2 (BSM): As C with added $1x10^5$ cfu g^{-1} forage *L. plantarum* DSM 19457, *L. brevis* DSM 23231 and *L. kefiri* DSM 19455 (Biomin® BioStabil Mays, Biomin, Austria).

90 days after ensiling, silages were analyzed for DM loss (corrected for volatiles), microbiology (yeast and mold) and chemical composition: DM, DM (corrected for volatiles) crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), pH, lactic acid, volatile fatty acid (VFA - acetic, butyric, propionic acids), alcohols and N-NH_3 as described elsewhere (Acosta Aragon et al., 2012). Aerobic stability was measured on day 90 after ensiling by exposing the silages to air for 11 days and measuring temperature until silages were 3°C above ambient temperature.

Results

Whole crop maize contained medium dry matter concentration (354.7 g kg^{-1}); soluble carbohydrates concentration was high (79.3 g kg^{-1}DM) and crude protein content was low (101.2 g kg^{-1} DM) as shown in table 1.

Treatment with the biological silage inoculant increased fermentation rate of whole plant maize silages, resulting in a faster pH drop 3 days ($P < 0.01$) and 90 days after ensiling ($P < 0.01$) compared to the control silage (table 2). Additionally, inoculated silages produced more lactic acid ($P < 0.01$) in the lab-scale trial (table 2). In the big scale silo trial (table 3), pH after 90 days in treated silage was 3.72±0.02 compared to 3.82±0.05 ($P < 0.01$) in untreated silage. Lactic acid concentrations were elevated in the treated silage compared to the untreated silage ($P < 0.01$, table 2, 3). Acetic acid tended to be elevated in treated silages of both the mini-silo experiments and the big silo; however this difference was only numerical. Ammonia-N and ethanol concentrations in treated silages were lower ($P < 0.01$) compared to control silage in both experiments. Butyrate was lower in the small-scale experiments ($P < 0.01$), but in the big scale experiments, this difference was only numerical due to large variability (0.01±0.03 g kg^{-1} DM vs. 0.10±0.12 g kg^{-1} DM, $P = 0.165$). In the mini-silo trial the mean silage stability was prolonged by 5.25 days (figure 1), in the large scale trench silo the inoculated silage remained stable for 4.50 days longer (data not shown). This is likely due to lower yeast and mold abundances in the inoculated silages (figure 2).

Table 1: Chemical composition and microbial parameters of the whole crop maize prior to ensiling

	n	Herbage	sd
Dry matter, g kg^{-1}	5	**354.7**	4.181
Crude protein, g kg^{-1}DM	5	**101.2**	8.636
Crude fat, g kg^{-1}DM	5	**25.9**	2.176
Crude fibre, g kg^{-1}DM	5	**211.2**	5.701
Crude ash, g kg^{-1}DM	5	**47.8**	1.759
NDF, g kg^{-1} DM	5	**437.1**	43.607
ADF, g kg^{-1} DM	5	**272.1**	10.923
WSC, g kg^{-1}DM	5	**79.3**	4.950
pH	5	**5.77**	0.040
Buffer capacity, mequiv $100g^{-1}$ DM	5	**25.42**	2.280
Nitrate, mg kg^{-1} DM	5	**851.4**	139.498
Clostridia, log_{10}cfu g^{-1}	5	**<1**	0
Yeasts, log_{10}cfu g^{-1}	5	**5.03**	0.611
LAB, log_{10} CFU g^{-1}	5	**4.33**	0.309
Moulds, log_{10} CFU g^{-1}	5	**4.34**	0.252
Starch, g kg^{-1}DM	5	**391.4**	23.554
DE, MJ kg^{-1} DM	5	**13.21**	0.077
NEL, MJ kg^{-1} DM	5	**6.77**	0.068

Table 2: Effect of biological inoculant (BSM) treatment on chemical composition and fermentation characteristics of ensiled whole plant maize (MINI SCALE)

	Silages		**Average**	SE	p
	C X ± SD	BSM X ± SD			
Dry matter, DM, g kg^{-1}	325.7±3.67[a]	332.0±2.13[b]	**328.85**	**2.9**	*
Dry matter [#], DM, g kg^{-1}	336.7±4.02[a]	343.5±1.72 [b]	**340.1**	**2.87**	*
Crude protein, g kg^{-1} DM	101.2±1.89[a]	102.6±1.59[a]	**101.9**	**1.74**	0.406
Crude fat, g kg^{-1} DM	28.5±2.02[a]	27.7±1.52[a]	**28.1**	**1.77**	0.566
Crude fibre, g kg^{-1} DM	201.8±5.29[a]	196.1±4.51[a]	**198.95**	**4.9**	0.173
Crude ash, g kg^{-1} DM	48.8±1.45[a]	49.0±1.59[a]	**48.9**	**1.52**	0.654
WSC, g kg^{-1} DM	5.69±1.69[a]	6.81±1.59[a]	**6.25**	**1.64**	0.573
NDF, g kg^{-1} DM	434.5±19.74[a]	431.9±22.19[a]	**433.2**	**20.965**	0.982
ADF, g kg^{-1} DM	261.9±24.01[a]	259.8±17.78[a]	**260.85**	**20.895**	0.961
Total organic acids, g kg^{-1} DM	62.6±4.16[a]	77.5±3.26 [b]	**70.05**	**3.71**	**
Lactic acid, g kg^{-1} DM	43.4±3.41[a]	58.4±2.03 [b]	**50.9**	**2.72**	**
Acetic acid, g kg^{-1} DM	17.0±0.71[a]	18.7±1.43[a]	**17.85**	**1.07**	0.153
Butyric acid, g kg^{-1} DM	0.39±0.197[a]	0.05±0.077 [b]	**0.22**	**0.137**	**
Propionic acid, g kg^{-1} DM	0.20±0.079[a]	0.18±0.05[a]	**0.19**	**0.079**	0.09
Ethanol, g kg^{-1} DM	10.6±1.24[a]	6.0±0.37 [b]	**8.3**	**0.805**	**
Ammonia N, g kg^{-1} total N	46.9±3.37[a]	30.7±1.02 [b]	**38.8**	**2.195**	**
pH after 2 days	4.32±0.05[a]	4.02±0.02 [b]	**4.17**	**0.035**	**
pH after 90 days	3.94±0.04[a]	3.85±0.03 [b]	**3.895**	**0.035**	**
DE, MJ kg^{-1} DM	13.08±0.05[a]	13.32±0.04 [b]	**13.2**	**0.045**	**
NEL, MJ kg^{-1} DM	6.88±0.07[a]	6.93±0.06[a]	**6.905**	**0.065**	0.498
DM losses, g kg^{-1} DM	68.9±8.32[a]	46.3±9.45 [b]	**57.6**	**8.885**	**

Dry matter[#], calculated dry matter losses, chemical composition and fermentation parameters are corrected for volatiles; * and ** denotes significant at level 0.05 and 0.01 respectively. [a, b] Means with different superscript letters in a line indicate significant differences of P<0.05

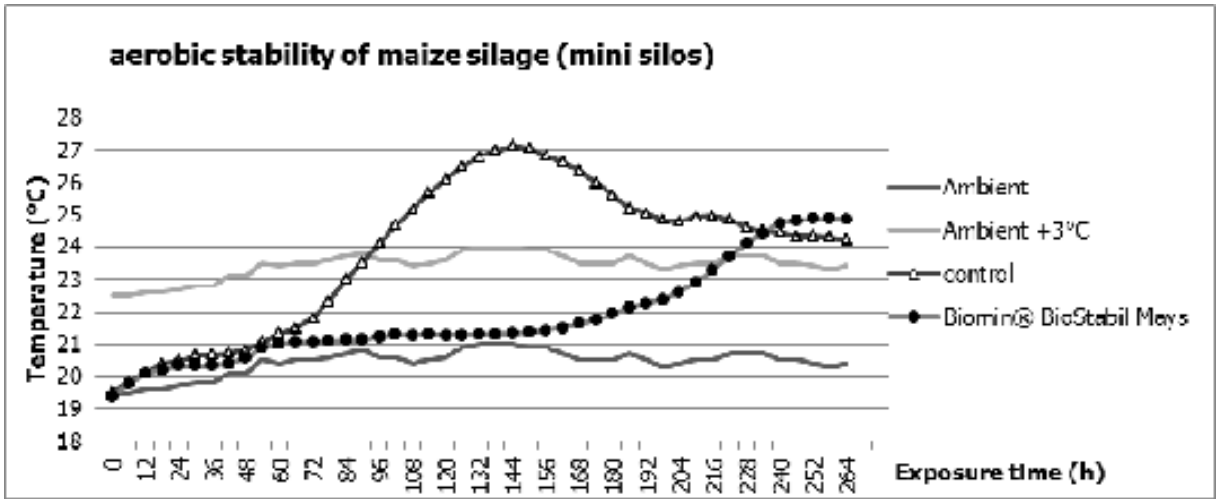


Figure 1: Temperature during 11 days in whole plant maize silage in mini silos treated with the biological silage inoculant Biomin® BioStabil Mays. Treatment prolonged the aerobic stability by 5.25 days compared to the untreated control.

Table 3: Effect of Biomin® BioStabil Mays (BSM) treatment on chemical composition and fermentation characteristics of ensiled maize (BIG SCALE)

	Silages		**Average**	SE	p
	C X ± SD	BSM X ± SD			
Dry matter, DM, g kg^{-1}	331.0±6.08[a]	339.5±4.45[b]	**335.24**	2.131	*
Dry matter *, DM, g kg^{-1}	342.2±6.10[a]	351.3±4.39[b]	**346.77**	2.199	*
Crude protein, g kg^{-1} DM	96.9±1.11[a]	98.4±2.37[a]	**97.65**	0.605	0.235
Crude fat, g kg^{-1} DM	26.6±1.01[a]	25.7±1.16[a]	**26.14**	0.361	0.200
Crude fibre, g kg^{-1} DM	200.4±4.16[a]	192.8±3.09[b]	**196.59**	1.665	*
Crude ash, g kg^{-1} DM	48.9±2.12[a]	48.9±1.65[a]	**48.88**	0.568	0.974
WSC, g kg^{-1} DM	5.36±1.81[a]	5.23±0.65[a]	**5.296**	0.405	0.889
NDF, g kg^{-1} DM	421.3±10.14[a]	419.7±11.46[a]	**420.50**	3.237	0.830
ADF, g kg^{-1} DM	260.4±15.54[a]	252.2±13.28[a]	**256.30**	4.516	0.400
Total organic acids, g kg^{-1} DM	63.83±7.39[a]	81.04±4.56[b]	**72.44**	3.401	**
Lactic acid, g kg^{-1} DM	44.12±6.82[a]	60.86±4.52[b]	**52.49**	3.280	**
Acetic acid, g kg^{-1} DM	19.41±2.14[a]	19.92±0.85[a]	**19.66**	0.493	0.635
Butyric acid, g kg^{-1} DM	0.10±0.12[a]	0.01±0.03[a]	**0.06**	0.030	0.165
Propionic acid, g kg^{-1} DM	0.21±0.09[a]	0.24±0.07[a]	**0.225**	0.024	0.467
Ethanol, g kg^{-1} DM	8.81±0.81[a]	5.68±0.47[b]	**7.244**	0.558	**
Ammonia N, g kg^{-1} total N	55.22±2.17[a]	39.13±2.77[b]	**47.175**	2.781	**
pH after 90 days	3.82±0.05[a]	3.72±0.02[b]	**3.769**	0.021	**
DE, MJ kg^{-1} DM	13.0±0.04[a]	13.26±0.04[b]	**13.14**	0.042	**
NEL, MJ kg^{-1} DM	6.88±0.05[a]	6.95±0.04[b]	**6.914**	0.018	*
DM losses, g kg^{-1} DM	87.40±12.57[a]	51.43±8.52[b]	**69.413**	6.796	**

Dry matter*, calculated dry matter losses, chemical composition and fermentation parameters are corrected for volatiles; * and ** denotes significant at level 0.05 and 0.01 respectively. [a, b] Means with different superscript letters in a line indicate significant differences of P<0.05

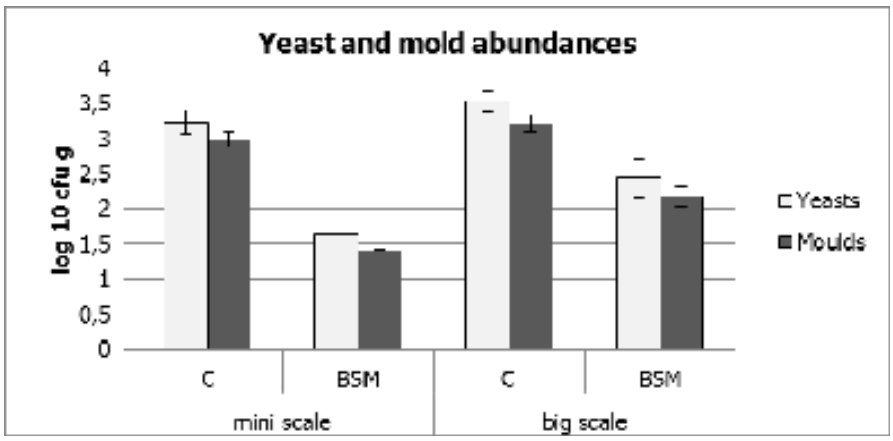


Figure 2: Yeast and mold abundances in whole plant maize silages treated with the biological silage inoculant Biomin® BioStabil Mays. Fungal contamination was consistently lower in treated maize silage compared to untreated control.

Discussion

Based on the WSC content of the herbage prior to ensiling, the whole plant maize silage was considered to be moderately easy to ensile (27.0 g kg^{-1} fresh matter of WSC) according to the EFSA opinion on silage additives guidelines (European Food Safety Authority 2008). The buffering capacity and nitrate concentration was typical for whole crop maize. The initial pH of all substrates that used for en-

siling was similar. Microbiological enumeration of herbage showed that the number of yeasts and molds was typical for the epiphytic microflora characteristics in Lithuanian conditions.

The aim of formulating a multi-strain silage additive is to preserve the feed palatability, feeding value and to increase the stability of silages. Lactic acid is one of few fermentative metabolites favoring feed palatability (Krizsan and Randby, 2007). Inoculation led to significantly elevated lactic acid levels in the model silo experiment and the fairly uncontrolled big scale silage experiment. The tested silage additive preserved the energy in the silage, however only in the big scale experiment at significant levels. A feeding experiment in dairy cows is currently under way to finally put the feeding value and palatability of this whole plant maize silage to the test.

Acetic acid is widely considered responsible for longer silage stability upon exposure to air (McDonald, 1991). In the experiments presented here, treated silage did not have significantly elevated acetic acid levels over untreated control. Nevertheless, aerobic stability was increased. Canibe et al. (Canibe et al., 2014) observed that prolonging aerobic stability of high moisture corn silage depended mainly on the characteristics of the forage to be ensiled, e.g. the pH sensitivity of the spoilage organisms present on the plant surface. A meta- analysis of published fermentation experiments with a single heterofermentative strain (Kleinschmit and Kung, 2006) found that elevated acetic acid levels were associated with elevated dry matter losses. Acetic acid inhibits spoilage at concentrations above 15 g kg^{-1} forage. In this study levels around 19 g kg^{-1} acetic acid were observed in all trial groups. Still the inoculated silage carried a lower yeast and mold load, displayed increased stability and had lower dry matter losses. This could be due to the faster pH drop in the inoculated silage. Assuming that a faster drop in pH through lactic acid was followed by a more rapid increase of acetic acid, the yeast and mold were exposed to these metabolites for a longer period of time at the end of the experiment at day 90. This would then allow a more efficient inactivation of these spoilage organisms. However, we only measured fermentation acids and spoilage fungi abundance after 90 days fermentation.

Conclusion

The novel formulation of biological silage inoculant containing the recently EU-authorized *L. kefiri* DSM 19455 significantly improved the fermentation quality of whole plant maize silage, leading to lower losses during fermentation and longer stability upon opening the silos.

References

ACOSTA ARAGON, Y., JATKAUSKAS, J. & VROTNIAKIENE, V. 2012. The effect of a silage inoculant on silage quality, aerobic stability, and meat production on farm scale. ISRN veterinary science, 2012**,** 345927.

CANIBE, N., KRISTENSEN, N. B., JENSEN, B. B. & VILS, E. 2014. Impact of silage additives on aerobic stability and characteristics of high-moisture maize during exposure to air, and on fermented liquid feed. Journal of applied microbiology, 116**,** 747-60.

KLEINSCHMIT, D. H. & KUNG, L., JR. 2006. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. Journal of dairy science, 89**,** 4005-13.

KRIZSAN, S. J. & RANDBY, A. T. 2007. The effect of fermentation quality on the voluntary intake of grass silage by growing cattle fed silage as the sole feed. Journal of animal science, 85**,** 984-96.

KRIZSAN, S. J., WESTAD, F., ADNOY, T., ODDEN, E., AAKRE, S. E. & RANDBY, A. T. 2007. Effect of volatile compounds in grass silage on voluntary intake by growing cattle. Animal, 1**,** 283-92.

MCDONALD, P. 1991. The Biochemistry of Silage.

Corresponding author

Dr. Jutta Zwielehner
Biomin Holding GmbH; Industriestrasse 21; 3130 Herzogenburg
E-mail: jutta.zwielehner@biomin.net

Influence of *Ustilago maydis* on the nutritive and hygienic value and fermentation characteristics of maize silage

Petr Doležal[1], Libor Kalhotka[1], Martina Fröhdeová[1], Ladislav Zeman[1], Katarzyna Szwedziak[2] and Marek Tukiendorf[2]

[1] Department of Animal Nutrition and Forage Production, Mendel University in Brno, Brno, CZ
[2] University of Technology in Opole, PL

Introduction

Maize smut (*Ustilago maydis*) can create from June until the harvest time greyish bulging galls with sticky and badly smelling, later strongly dusting mass of *teliospores* which can infect the stands, seeds and soil. The occurrence of maize smut has not been for a long time described as a disease of the stand edges only as its occurrence has significantly increased in the last five years. Bochowiak a Skorupska (2006) state that the distinctive temperature changes in June 2006 were the main reason behind the incidence of maize smut in Poland. Epidemiological study has shown that 20 – 50% of the maize stand was infected during this period. Spores are capable to infect only the following year if ploughed into the soil they can safely survive for one year and they survive for at least three years on the soil surface and in the plants remnants. The infection presents itself especially in the places of mechanical damage or injury (ŘÍHA, 2006) but the factor of mechanically damaged maize tissue due to the unfavourable climate (drought, dampness) resp. the lack of moisture followed by rainfall also plays an important part. The reduction of smut incidence is achieved in places where there is a consistent pest control as well as limited movement of mechanization in the fully grown stand and thus the plant damage is limited. As a consequence, the infection is limited (ŘÍHA 2006). Several authors studied the influence of smut in maize regarding the quality of silage and nutritional value. Many studies have shown that silages made from the infected maize had low content of mycotoxins and silages did not have a harmful effect on the production and health of cattle. On the other hand, Richter et al. (1994) state that plants infected with maize smut had lower content of DM, lower content of nutrients and i*n sacco* degradability of DM and OM did not differ from healthy plants. However, sheep ate 28% less of DM from sick plants than from healthy plants.

Materials and methods

In the model experiment there was used ensilaged maize from healthy stand with DM of original weight 358.95 gkg^{-1} (A) and maize plants naturally infected with smut(*Ustilago maydis*) from the same land with the weight of DM below 300 g. kg^{-1} (B). Established were two experimental variants in three repetitions: Variant A – control silage, Variant B – experimental treated – by natural contamination with *Ustilago maydis.* Model silages were stored in the laboratory at average laboratory temperature of 25-27 ^{o}C for 180 days. Parameters assessed to establish the quality of the fermentation process after the 185 days were as follows: DM content of silage, pH, water extract acidity (TA), amounts of lactic acid, acetic acid, sume of acids in DM and contents of ethanol. Analytical procedures were described in our earlier work (Doležal, 2002). Silages also underwent microbial analysis and the total amount of microorganisms (CPM), moulds and yeast-fungi were established. Results were statistically processed by using the analysis of variance and differences between individual groups were analyzed

by Scheffe-test in program STATISTICA 8. Data in the text are presented as average ± standard deviation.

Results and discussion

From the outcome of the model experiment in which the influence of smut (*Ustilago maydis*) infection of maize on the quality of fermentation (Table 1) was studied, it is apparent that the course of fermentation was different due to the differing DM content of silage biomass. This manifested itself especially in different pH values, KVV and fermentation acids. The silage infected with maize smut had, in comparison with control silage, higher (P<0.01) concentration of fermentation acids in 1kg of DM (12,15 %) as compared to 9.37 % and that was reflected in the higher value of KVV (1744.3 mg KOH) as compared to 1498.3 mg KOH in 100 g of silage.The higher value of titrate acidity corresponded statistically lower (P<0.05) with the lower average pH value of silage.There was found a statistically different (P<0.01) lower average alcohol content (0.87 %) in comparison with the control silage (2.385 %).

In the experimental silage even considering the statistically lower (P<0.01) DM content (249.63 $g.kg^{-1}$) there was found lower average content of lactic acid and higher (P<0.05) average content of acetic acid (0.838 %) in comparison with control silage (2.388 %, resp. 0.692 %), which had a higher DM content (328.70 $g.kg^{-1}$). Richter et al. (1994) also states lower DM content in infected silage as opposed to the silage from healthy maize plants. The experimental infected silage in correlation with lower DM content discharged silage liquids in ratio of 36.93 l. t^{-1} of silage matter while the control silage due to the higher DM content did not discharge any liguids. This confirmed that the infection of maize stand with smut (*Ustilago maydis*) results in lower DM content (P<0.01) of infected plants.

It is obvious from the results as shown in table 2 that the smut (*Ustilago maydis*) infection of maize plants also influenced the change in microbial composition of silages. It was confirmed that the silage prepared from the infected stand was diagnosed with lower mould content than in the control silage which corresponds with the results of Richter et al. (1994). The silage from infected plants also contained higher amount of lactic fermentation bacteria ($63.6*10^6$) in comparison with control silage ($57.1*10^6$). The silage from infected plants had significantly lower yeast fungi content (24.4% share) from the content in control silage. The silage from infected plants had significantly higher total amount of microorganisms (TAM) than the amount diagnosed in control silage. From the above stated it is apparent that the infection of maize plants with smut (*Ustilago maydis*) leads to the overall increase in the amount of microorganisms but at the same time it does not lead to the increase in the amount of micromycetes. This hypothesis can be also supported by the lower DM content in infected plants which is more convenient for bacterial microflora.

Table 1: Average characteristics of model maize silage from healthy and sick plants of *Ustilago maydis*

Maize silage	DM (g/kg)	pH	TA mg KOH	LA %	AA %	∑ acids in D M %	LA/AA	Ethanol %	Ammonia %
Healthy plants	328.70 ±19.738^{A}	3.865 ±0.04^{a}	1498.3 ±37.333	2.388 ±0.00	0.692 ±0.261^{b}	9.370 ±0.755^{B}	3.605 ±0.936	2.385 ±0.203^{A}	0.040 ±0.00
Sick plants	249.63 ±5.797^{B}	3.692 ±0.124^{b}	1744.3 ±253.8	2.195 ±0.219	0.838 ±0.084^{a}	12.250 ±1.39^{A}	2.628 ±0.237	0.87 ±0.511^{B}	0.035 ±0.005

TA… water extract acidity; LA ... lactic acid; AA .... acetic acid; *Variants in capitals differ* (P<0.01); *variants in lower case differ* (P<0.05).

Table 2: Average content of micromycetes i maize silages (in 1 g)

Maize silage	TAM	LAB	Micromycetes			
			Total	Yeast fungi	Moulds	
					in total	Geotrichum
A- Controle	34 063 636	57 100 000	46 182	45 955	227	0
B - Sick plants	54 500 000	63 600 000	11 272	11 227	45	0

TAM .... total amount of microorganisms; LAB ..... bacteria of lactic fermentation

Conclusion

The results of the experiment indicated that the used sick plants of maize of *Ustilago maydis* has different effect on the contents of lactic acid bacteria and the quality of fermentation process. There were found significant differences in the important fermentation characteristics of the observed model silages. The silage from sick plants of maize had non significantly lower LA content, lower pH value, worse ratio of LA:AA but overall higher ($P< 0.01$) content of acids in the dry matter of silage. Ethanol fermentation was significantly ($P<0.01$) reduced in silage from sick plants in comparison with control silage. There was found a significantly lower content of moulds and yeast fungi but on the other hand significantly higher total amount of microorganisms. There was higher fermentation loss (4.30 %) in the experimental silage from sick plants of maize in comparison with control silage (3.17 %).

Acknowledgement

The work was funded from the Projects NAZV QH 71041.

References

Bochowiak, A., Skorupska, M, 2007: Common smut of maize – a problem for breeders and farmers. *Ochrona roślin*, 52:1, 23-26.

Doležal, P., 2002: Vliv přídavku *Lactobacillus plantarum* DSM 12771 na kvalitu siláží silně zavadlé vojtěšky a trávy (Effect of supplements of *Lactobacillus plantarum* DSM 12771 on the quality of ensiled alfalfa and grass with a high content of dry matter). *Acta universitatis agriculturae et silvicultuarae Mendelianae Brunensis* Brno, 5, p. 37–44.

Richter, G. H., Flachowsky, G., Schneider, A., Wirth, R., Schwartze, J., Jahreis, G., 1994: Investigations about the influence of blister smut (*Ustilago zeae*) on feed value of maize for silage making. *Wirtschaftseigene Futter*, 40:2/3, 161-169.

Corresponding author

Dr. Petr Dolezal
Department of Animal Nutrition and Forage Production
Mendel University in Brno
Zemedelska 1-3, 613 00 Brno
E-mail: dolezal@mendelu.cz

Alles unter einem Dach

PROCHEMA AGRO

Partner der Futtermittelindustrie
und des Handels

Wir vertreten:

esco
European salt company

SOLVAY

RETORTE
AURUBIS GROUP

RHI

ADM

Jungbunzlauer
From nature to ingredients

JELU

Rübelmann
GmbH & Co.KG

BALCHEM
Real People. Real Science. Real Results.

Geschäftsbereich Agro
PROCHEMA Handelsgesellschaft m.b.H. - Ateliergasse 1 - 1220 Wien - Österreich
Tel.: 0043 1 203 40 41 - Webseite: www.prochema.com - eMail: prochema.sales-feed@prochema.com

Einfluss des Zusatzes von Braunalgen (*Laminaria saccharina)* zum Ferkelfutter auf die intestinale Genexpression wichtiger Faktoren der Proliferation und Immunantwort

Christiane Becker[1], Jie Zhao[2] und Wilhelm Windisch[1]

[1] Technische Universität München, DE
[2] Haizhibao Deutschland GmbH, Freising, DE

Einleitung

Während der Absetzphase sind Ferkel einem enormen immunologischen Druck ausgesetzt, was zum Auftreten von Durchfallerkrankungen führen kann [Pie et al., 2007]. Früher wurden dem Futter deshalb häufig antibiotische Leistungsförderer zugesetzt, die eine Stabilisierung der Mikroflora im Darm bewirken und somit den Gesundheitsstatus der Ferkel verbessern sollten. Seit deren Verbot in der EU im Jahre 2006 ist die Forschung im Bereich Tierernährung verstärkt auf der Suche nach alternativen ergotropen Substanzen, von denen einige bereits Einzug in die Fütterungspraxis gefunden haben (z.B. Probiotika, organische Säuren). Eine in diesem Zusammenhang vielversprechende Substanzklasse sind Prebiotika. Dies sind lösliche Kohlenhydrate, die weder von endogenen Verdauungsenzymen noch von potentiellen Pathogenen abgebaut werden können und damit die kommensale Mikroflora fördern. Die Fermentation der prebiotischen Substrate durch die Darmmikroorganismen führt zu einer vermehrten Produktion von flüchtigen Fettsäuren. Diesen wird ein trophischer Effekt auf die Darmzellen zugeschrieben, wodurch es zu einer Veränderung in der Proliferationsrate der Darmmukosa kommen kann [Mair et al., 2010]. Außerdem führt die mangelnde Nutzbarkeit der Prebiotika durch pathogene Mikroorganismen zu einer Verschiebung in der mikrobiellen Besiedelung des Darms hin zur erwünschten Mikroflora, wodurch der immunologische Druck im Darm vermindert werden kann.

Solch günstige Effekte auf die intestinale Flora wurden im Menschen auch dem Prebiotikum Laminarin, zugeschrieben [Brownlee et al., 2005]. Laminarin, ein Bestandteil der Zellwände von Braunalgen der Spezies *Laminaria,* ist ein β-Glucan und besteht aus Glucosemolekülen, welche über β-1,3-glykosidische Verbindungen verknüpft sind [Sweeney et al., 2012]. In der traditionellen chinesischen Medizin gelten Braunalgen als wirksames Mittel bei Darmerkrankungen (z.B. Diarrhö). Laminaria-Braunalgen haben bereits Einzug in die Humanernährung gefunden und werden zum Teil als Lebensmittel verzehrt (z.B. „Zuckertang", Hüllmaterial für Sushi). Ebenso werden Verarbeitungsprodukte von Algen als marine Ballaststoffe (v.a. Alginat, Laminarin) in Form von Futtermittelzusatzstoffen in der Tierernährung verwendet. Die Grundlage der potentiell positiven Wirkungen von Braunalgen in der Nutztierfütterung wurde bisher jedoch kaum untersucht.

Ziel der aktuellen Studie war es, in einem Fütterungsversuch mit Absetzferkeln die Proliferationsrate sowie die immunologische Antwort spezifischer Darmabschnitte, sowie des mesenterialen Lymphknoten auf Ebene der Genexpression unter dem Einfluss der Braunalge *Laminaria saccharina* zu charakterisieren.

Material und Methoden

Der Fütterungsversuch wurde mit 48 Absetzferkeln an der Versuchsanlage für Tierernährung der TU München in Freising-Weihenstephan durchgeführt. Die Ferkel wurden mit einem Anfangsgewicht von

ca. 9 kg nach Wurf und Geschlecht in 4 Gruppen á 12 Tiere eingeteilt (vollständig randomisiertes Blockdesign) und den folgenden Behandlungen zugeordnet:

Gruppe 1: 100% einer Standardration (Positivkontrolle)
Gruppe 2: 95% Standardration + 5% Diatomeenerde (Negativkontrolle)
Gruppe 3: 95% Standardration + 5% Braunalgen (heißluftgetrocknet)
Gruppe 4: 95% Standardration + 5% Braunalgen (heißluftgetrocknet und vorerhitzt).

Die Tiere wurden in Einzelhaltung in einer praxisüblichen Flatdeck-Anlage in 2 Reihen zu je 24 Tieren gehalten. Die Fütterung erfolgte tierindividuell zweimal täglich. Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Als Standardration wurde eine praxisübliche Futtermischung verwendet, welche hauptsächlich aus Weizen, Roggen und Mais bestand. Die Zulage der Braunalgen bzw. der Diatomeenerde erfolgte durch Einmischung in die fertige Futtermischung und anschließende Pelletierung.

Nach 5 Wochen wurden die Ferkel unter Betäubung getötet und Gewebeproben des Magen-Darm-Traktes entnommen. Die Proben wurden innerhalb von 20 Minuten entnommen, in RNAlater (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) konserviert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Messung der Genexpression wurde die total RNA aus den Gewebeproben mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits (Qiagen. Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Die Konzentration und Reinheit sowie die Integrität der Proben wurde am NanoDrop (PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland) bzw. am Experion System (Bio-Rad, München, Deutschland) überprüft. Die Reverse Transkription wurde mit einer RNA Menge von 500 ng unter Verwendung des iScript Systems (Bio-Rad) am Thermocycler T100 (Bio-Rad) durchgeführt. Im Anschluß wurde die cDNA mit einem Volumen von 80 µl RNase freiem Wasser (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) verdünnt.

Die Genexpression wurde mittels real-time qPCR am Eppendorf realplex System (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit dem SensiFAST SYBR No Rox Kit (Bioline) quantifiziert. Das Reaktionsgemisch pro Probe wurde hierbei wie folgt angesetzt: 7,5 µl SensiFAST SYBR Mix, 0,8 µl forward und reverse Primer, 4,4 µl RNase freies Wasser, 1,5 µl cDNA. Das Reaktionsgemisch wurde bei folgendem Temperaturprogramm inkubiert: 95°C für 2 Minuten (*Aktivierung der Polymerase*); 40 Zyklen: 95°C für 5 Sekunden (*Denaturierung*), 60°C (primerspezifisch) für 10 Sekunden (*Annealing*), 72°C für 5 Sekunden (*Extension*), Schmelzkurvenanalyse.

Hierbei sollte die Expression wichtiger Faktoren, welche in den Zellzyklus (z.B. IGF-1, CDK4, Caspase 3), die Zellverbindungen (="tight junctions"; Ocludin, Zona occludens) und die immunologische Abwehr (z.B. Interleukine) eingebunden sind, bestimmt werden.

Die Genexpressionsdaten wurden mittels relativer Quantifizierung gemäß des ΔΔCq-Models analysiert [Livak and Schmittgen, 2001]. Geeignete Referenzgene (RG) wurden mit Hilfe des GeNorm und Normfinder Algorithmus der GenEx Software (Multi D Analyses, Göteborg, Schweden) ermittelt. Diese Algorithmen detektieren die am stabilst exprimierten Gene innerhalb des spezifischen Versuchsdesigns. Die optimale Anzahl an RG wurde mit Hilfe der gepaarten Varianzanalyse integriert in den GeNorm Algorithmus bestimmt. Zur Normalisierung wurden Ubiquitin (UBQ) und Histon H3 (H3) verwendet.

Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0.05$) wurden mit dem Student-Newman-Keuls (SNK)-Test ermittelt.

Ergebnisse

Die Messung der Genexpression unterschiedlicher Gene des Zellzyklus, der immunologischen Abwehr und der Zellverbindungen im Ileum (Tabelle 1) ergab keine statistisch signifikante Regulation beim Vergleich der Behandlungs- und der Kontrollgruppen.

Tabelle 1: Ergebnisse der Genexpressionsmessung im Ileum dargestellt als x-fache Regulation ($2^{-\Delta\Delta Cq}$), wobei ein Wert von 1,00 für keine Änderung in der Genexpression steht (Trends sind durch *markiert)

Gen	x-fache Regulation ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)			
	Gruppe 3		Gruppe 4	
	vs. Positiv-kontrolle	vs. Negativ-kontrolle	vs. Positiv-kontrolle	vs. Negativ-kontrolle
IL-1a	1,20	0,74	2,23	1,37
CycD	2,53	1,74	0,97	0,67
Casp3	1,36	1,16	0,74	0,70
bcl-2	1,67	0,85	1,78	0,90
bcl-XL	1,64	1,10	1,52	1,02
IGF1	3,32	2,07	1,48	0,92
NFkB	1,42	1,16	1,40	1,14
OCLN	2,39	2,73	1,38	1,57
ZO-1	1,88	1,94	1,76	1,81
CDK4	1,58	1,38	1,13	0,99
TNFa	1,38*	0,91	1,70	1,23
TGFß	2,31*	1,56*	1,43	0,97

Für TNFa und TGFβ zeigte sich eine tendenzielle Aufregulation ($p<0,1$) beim Vergleich von Gruppe 3 mit der Positivkontrolle ($p=0,10$ und $p=0.06$). Ebenso konnte ein Trend für eine Aufregulation für TGFβ beim Vergleich von Gruppe 3 mit der Negativkontrolle ($p=0,08$) festgestellt werden.

Im mesenterialen Lymphknoten (Tabelle 2) ergaben sich statistisch signifikante Änderungen in der Genexpression für IL-1b und IL-4.

Tabelle 2: Ergebnisse der Genexpressionsmessung im mesenterialen Lymphknoten dargestellt als x-fache Regulation ($2^{-\Delta\Delta Cq}$), wobei ein Wert von 1,00 für keine Änderung in der Genexpression steht (statistisch signifikante sind fettgeruckt dargestellt, Trends durch *markiert)

Gen	x-fache Regulation ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)			
	Gruppe 3		Gruppe 4	
	vs. Positiv-kontrolle	vs. Negativ-kontrolle	vs. Positiv-kontrolle	vs. Negativ-kontrolle
IL-1b	2,83	**3,89**	1,54	4,55
IL-4	1,50	2,07	1,99	**2,74**
IL-5	0,89	1,09	1,99	2,42
IL-6	0,90	1,13	2,73	3,44
IL-8	1,75	1,81	4,02	4,16
IL-10	1,75*	1,44	2,62	2,15
IL-17a	1,21	1,83	1,48	2,23
CycD	1,10	1,33	1,13	1,38
NFkB	1,68	1,78	1,61	1,71
Casp3	1,18	1,28	1,86	2,02
TGFß	0,89	1,17	0,88	1,16
CDK4	1,04	1,24	1,23	1,48
TNFa	1,27	1,35	0,99	1,05

IL-1b zeigte eine signifikante Aufregulation beim Vergleich von Gruppe 3 mit der Negativkontrolle ($p=0,05$) um den Faktor 3,89. Beim Vergleich von Positiv- und Negativkontrolle war IL-1b um das 0,54-fache herunterreguliert ($p=0,01$). Verglichen mit der Negativkontrolle konnte in Gruppe 4 eine Aufregulation von IL-4 um den Faktor 2,74 beobachtet werden ($p=0,05$).

Diskussion

Prebiotika wird eine immunmodulierende Wirkung zugeschrieben, die im Bereich der Tierproduktion bereits in verschiedenen Studien bestätigt werden konnte [Fleige et al., 2007, Mair et al., 2010, Masanetz et al., 2011, Pie et al., 2007]. Neben potentiellen direkten Effekten auf das Immunsystem, sollen prebiotische Substanzen helfen die erwünschte Darmflora zu stärken und das Wachstum potentieller Pathogene zu inhibieren [Bohmer et al., 2005], was zu einer verminderten Notwendigkeit der Aktivierung des Immunsystems führen kann [Macfarlane and Cummings, 1999]. Diese Hypothese konnte durch die aktuellen Ergebnisse unterstützt werden. Der Trend einer Aufregulation des anti-inflammatorischen Cytokins TGFβ deutet auf eine Unterdrückung der Immunantwort hin was eine erhöhte Toleranz der Mukosa gegenüber pro-inflammatorischen Reizen (z.B. Allergenen im Lumen) mit sich bringen kann. Ähnliche Ergebnisse konnten schon im Dünndarm von Kälbern beobachtet werden [Fleige et al., 2007].

Widersprüchliche Ergebnisse konnten in der Genexpression der Immunfaktoren im mesenterialen Lymphknoten beobachtet werden. So konnte eine Aufregulation sowohl des anti-inflammatorischen Interleukin 4, als auch des pro-inflammatorischen IL-1b festgestellt werden. Die Aufregulation von IL-4 würde die Hypothese einer Inhibition der Aktivierung der Immunantwort weiter unterstützen.

In anderen Studien wurde jedoch auch eine vermehrte Expression von pro-inflammatorischen Cytokinen im Lymphknoten unter dem Einfluss von Prebiotika berichtet (z.B. IL-8) [Masanetz et al., 2011]. Die Expression pro-inflammatorischer Cytokine kann durch Zellwandbestandteile (z.B. Lipoteichonsäure) gram-positiver Bakterien induziert werden [Standiford et al., 1994]. Es ist anzunehmen, dass das Vorhandensein fermentierbarer Kohlenhydrate im Colon zu einem Anwachsen der bakteriellen Population führt, was möglicherweise die Induktion pro-inflammatorischer Cytokine im Rahmen einer möglichen Förderung gram-positiver Spezies mit sich bringt.

In der aktuellen Studie konnten nur geringfügige Unterschiede in der Genexpression verschiedener Immunfaktoren im Ileum festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, welche zeigen konnten, dass die Effekte von Prebiotika im Dünndarm marginal sind [Mair et al., 2010, Sweeney et al., 2012]. Endgültige Schlussfolgerungen können aus diesen Ergebnissen nicht gezogen werden. Dennoch konnte ein Trend hin zu weniger lokalen Entzündungsprozessen im Ileum beobachtet werden. Die Untersuchung weiterer Darmabschnitte (v.a. Colon), die dem gegenwärtigen Stand der Forschung zufolge deutlicher auf die Wirkung prebiotischer Substanzen reagieren [Mair et al., 2010, Sweeney et al., 2012], sollte helfen die potentiellen Effekte von Prebiotika marinen Ursprungs weiter zu klären.

Literatur

Bohmer BM, Branner GR, Roth-Maier DA (2005) Precaecal and faecal digestibility of inulin (DP 10-12) or an inulin/Enterococcus faecium mix and effects on nutrient digestibility and microbial gut flora. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 89, 388-96

Brownlee IA, Allen A, Pearson JP, Dettmar PW, Havler ME, Atherton MR, Onsoyen E (2005) Alginate as a source of dietary fiber. Crit Rev Food Sci Nutr, 45, 497-510

Fleige S, Preissinger W, Meyer HH, Pfaffl MW (2007) Lactulose: Effect on apoptotic and immunological-markers in the gastro-intestinal tract of pre-ruminant calves. Veterinarni Medicina, 52, 437-44

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25, 402-8

Macfarlane GT and Cummings JH (1999) Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? Bmj, 318, 999-1003

Mair C, Plitzner C, Pfaffl MW, Schedle K, Meyer HH, Windisch W (2010) Inulin and probiotics in newly weaned piglets: effects on intestinal morphology, mRNA expression levels of inflammatory marker genes and haematology. Arch Anim Nutr, 64, 304-21

Masanetz S, Preissinger W, Meyer HH, Pfaffl MW (2011) Effects of the prebiotics inulin and lactulose on intestinal immunology and hematology of preruminant calves. Animal, 5, 1099-106

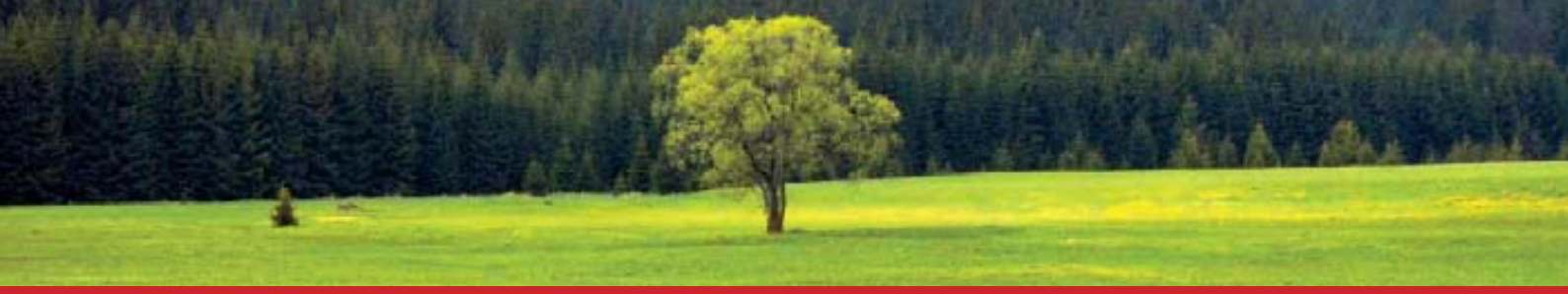
Pie S, Awati A, Vida S, Falluel I, Williams BA, Oswald IP (2007) Effects of added fermentable carbohydrates in the diet on intestinal proinflammatory cytokine-specific mRNA content in weaning piglets. J Anim Sci, 85, 673-83

Standiford TJ, Arenberg DA, Danforth JM, Kunkel SL, VanOtteren GM, Strieter RM (1994) Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. Infect Immun, 62, 119-25

Sweeney T, Collins CB, Reilly P, Pierce KM, Ryan M, O'Doherty JV (2012) Effect of purified beta-glucans derived from Laminaria digitata, Laminaria hyperborea and Saccharomyces cerevisiae on piglet performance, selected bacterial populations, volatile fatty acids and pro-inflammatory cytokines in the gastrointestinal tract of pigs. Br J Nutr, 108, 1226-34

Autorenanschrift

Dr. Christiane Becker
Lehrstuhl für Tierernährung
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
TU München
Liesel-Beckmann-Straße 2
D-85354 Freising
E-Mail: christiane.becker@wzw.tum.de



GOING BACK TO THE ROOTS, WE FOUND THE FUTURE:

OptiCell® Ruminant

A NEW TOOL TO STABILIZE RUMEN pH

agromed
natural effects

info@agromed.at, www.agromed.at

Einfluss eubiotischer Lignocellulose auf die Durchfallhäufigkeit und Produktion flüchtiger Fettsäuren im Colon von Absetzferkeln

Arthur Kroismayr[1], Ard van Enckevort[2], Linda Baarslag[2] und Klaus Neufeld[3]

[1] Agromed Austria GmbH, AT
[2] Denkavit Ingredients BV, NL
[3] Animal Research Center, AT

Einleitung

Frühdurchfälle stellen bei Absetzferkeln eine häufige Art von Erkrankung, die oftmals zum Tod oder schlechtem juvenilem Wachstum führt, dar. Bestimmte Nahrungsfasern sind bekannt für ihre stabilisierende Wirkung Richtung einer physiologischen Kotkonsistenz und können folglich zur Verhinderung von Durchfall führen. Besonders löslichen Nahrungsfaserbestandteilen, wie etwa löslichen Hemicellulosen oder Oligosacchariden, wird eine eubiotische Wirkung im Colon nachgesagt. Solche löslichen Nahrungsfasern beeinflussen den Gehalt an kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren im Colon und stabilisieren dadurch die Darmmikroflora und schützen die Colon Mucosa (Buddington, 1998).

Plöger (2011) beschreibt, dass die kurzkettige Fettsäure Butyrat protektive Effekte auf den Darm ausübt, indem es bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) eine Stabilisierung der epithelialen Barrierefunktion oder Induktion antiinflammatorischer Effekte bewirkt. Zudem besitzt Butyrat wichtige Funktionen bei der Zelldifferenzierung und der Induktion von Apoptosen.

Die oben beschriebenen positiven Wirkungen von löslichen Nahrungsfaserbestandteilen auf den Gehalt flüchtiger Fettsäuren im Colon und daraus resultierend auf die Darmgesundheit scheinen neben der Art der verabreichten löslichen Faser auch von der Dosis abzuhängen. Aus diesem Grund wurde in nun beschriebener Studie eine Mischung aus nicht - löslicher und löslicher Lignocellulose (OptiCell, Agromed Austria) an Ferkel verfüttert und der Effekt auf die Darmgesundheit untersucht.

Material und Methoden

120 Absetzferkelferkel (French Hybrid) mit einem Alter von 21 Tagen wurden entsprechend gleicher Genetik und Abstammung, Geschlecht und Absetzgewicht auf 2 Behandlungsgruppen aufgeteilt. Die Tiere wurden in insgesamt 24 Buchten (12 Buchten je Behandlung) zu je 5 Tieren gehalten. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten ein Standardabsetzfutter auf Basis von Weizen und Gerste (18.8% Rohprotein, 2.7% Rohfaser, 10.3MJ ME, 1,38% verdauliches Lysin) ohne Zusatz von Leistungsförderern oder Futterzusatzstoffen welchen Effekte auf die Darmgesundheit nachgesagt werden (z.B. Phytogene Stoffe, Präbiotika oder ähnliche). Die Tiere der Versuchsgruppe erhielten die Kontrolldiät plus 1.5% eubiotische Lignocellulose durch Substitution von Weizen. Dadurch erhöhte sich der Rohfasergehalt der Versuchsdiät um etwa 0.84%. Der Nährstoffgehalt der Versuchsdiät war um 1.5% verdünnt, da eubiotische Lignocellulose keine futtermittelanalytisch detektierbaren Nährstoffe (Protein, Energie) enthält.

Folgende Parameter wurden bei diesem Versuch erhoben:

- Tägliche Futteraufnahme pro Bucht (n=5)

- Gewichtsentwicklung pro Bucht an den Versuchstagen 1, 7 und 21.
- Anzahl notwendiger veterinärmedizinsicher Behandlungen gegen Durchfall mit Morbafloxacin.

Am 19. Versuchstag wurden aus 8 Buchten (4 Versuch, 4 Kontrolle) Sammelproben mit frischem Kot aller 5 Tiere je Bucht hergestellt. Diese Sammelproben wurden später auf ihren Gehalt an flüchtigen Fettsäuren analysiert, auch der pH Wert wurde erhoben.

Für die statistischen Analysen wurde SPSS Version 19 Software benutzt (GLM Procedure, Chi Square Test).

Ergebnisse

Innerhalb der ersten 21 Tage konnte kein signifikanter Unterschied bei den zootechnischen Leistungen festgestellt werden, wenn auch die Futteraufnahme und Lebendgewichte in der mit eubiotischer Lignocellulose behandelten Gruppe numerisch leicht erhöht waren (Tabelle 1). Signifikant gesenkt werden konnte allerdings die Anzahl an Tieren welche mit Morbafloxacin gegen Durchfallerkrankungen behandelt werden mussten (33.3% in der Kontrollgruppe versus 21.7% in der Versuchsgruppe).

Tabelle 1: Gewichtsentwicklung, Futterverwertung und Durchfallhäufigkeit

		Kontrolle	**Eubiotische Lignocellulose**
Absetzgewicht	(kg)	6.19	6.19
Gewicht Versuchstag 7	(kg)	7.40	7.52
Gewicht Versuchstag 21	(kg)	12.35	12.50
Futteraufnahme Tag 1 - 21	(g/Tag))	367	380
Futterverwertung Tag 1 - 21	(kg/kg)	1.25	1.27
Gegen Durchfallerkrankung behandelte Tiere	(%)	33.3[a]	21.7[b]

[a,b]: $p<0.05$

Die Analysen der Kotproben förderten prozentuelle Unterschiede des Gehalts kurzkettiger flüchtiger Fettsäuren (Tabelle 2) zu Tage. So waren die gemessenen Gehalte an Essigsäure (+4,5%), Propionsäure (+12.2%) und Buttersäure (+19%) im Kot der Tiere aus der Versuchsgruppe höher als bei jenen der Kontrollgruppe. Auch die Summe aller kurzkettigen Fettsäuren brachte numerisch erhöhte Werte im Kot der Versuchsgruppe.

Der pH Wert im Kot der Kontrollgruppe war 6.88 jener der Versuchsgruppe 6.77.

Tabelle 2: Flüchtige Fettsäuren und pH Wert im Ferkelkot

		Kontrolle	**Eubiotische Lignocellulose**
Essigsäure	(mM)	66.2	69.2
Propionsäure	(mM)	21.3	23.9
Buttersäure	(mM)	11.0	13.09
Summe aller kurzkettiger flüchtiger Fettsäuren	(mM))	108.1	116.6
pH Wert		6.88	6.77

Diskussion

Der Einsatz eubiotischer Lignocellulose bei Absetzferkeln wirkte sich in dieser Studie nicht signifikant, aber numerisch leicht positiv auf die täglichen Zunahmen und die Futteraufnahme aus. Ähnliche Ergebnisse berichten Kroismayr et.al (2008) welche die gleiche Lignocellulose mit selbiger Einmischrate 35 Tage an Absetzferkel verfüttert hatten. Dort zeigte sich ein signifikant positiver Einfluss der eubiotischen Lignocellulose auf tägliche Zunahmen und Futterverwertung. Interessant ist, dass Kroismayr et.al (2008) nach 14 Tagen bei den Leistungsparametern ebenso keine signifikanten sondern ähnlich numerische Unterschiede wie in heutiger Studie nach 21 Tagen festgestellt haben. Es kann also durchaus vermutet werden, dass bei längerer Messung der Leistungsparameter Unterschiede sichtbar hätten werden können.

Diese Studie sollte aber primär den Einfluss der untersuchten eubiotischen Lignocellulose auf die Darmgesundheit untersuchen. Die festgestellte Erhöhung der flüchtigen Fettsäuren im Kot deutet auf eine verstärkte Aktivität bestimmter Darmbakterien hin. Speziell natürlich auf jene Bakterien, welche erwähnte flüchtige Fettsäuren aus dem Nahrungsbrei fermentieren. Besonders der erhöhte Gehalt an Buttersäure ist hierbei interessant, wird diese doch stark mit der Wasser – Rückresorption aus dem Chymus in Verbindung gebracht. Wie in der Einleitung erwähnt, beschreibt Plöger (2011), dass die kurzkettige Fettsäure Butyrat protektive Effekte auf den Darm ausübt. Die positiven Effekte erhöhter Buttersäurebildung können eine sinnvolle Erklärung für die signifikant gesenkte Durchfallhäufigkeit bei den Ferkeln mit eubiotischer Lignocellulose in der Ration sein.

Grund für die positive Wirkung eubiotischer Lignocellulose auf die Darmbesiedelung und als Konsequenz daraus die Produktion flüchtiger Fettsäuren, dürfte jedenfalls der ausgewiesene Gehalt an löslichen Faserfraktionen in diesem Produkt sein. Dieser Effekt löslicher Faserbestandteile wird auch durch die Ergebnisse von Buddington (2008) bestätigt.

Schlussfolgerung

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Einsatz eubiotischer Lignocellulose bei Absetzferkeln einen positiven Einfluss auf die Durchfallhäufigkeit der Tiere hat, welche signifikant gesenkt werden konnte. Erklärt kann dieser Effekt durch den Einfluss der untersuchten Testsubstanz auf die Dickdarmbesiedelung und daraus resultierend auf die Produktion flüchtiger Fettsäuren im Colon werden.

Literatur

Buddington, R. K. (1998): The influences of dietary inputs on the neonatal gastrointestinal tract: managing the development of a complex ecosystem. J. Anim. Feed Sci. 7:155-165.

Plöger, S (2011): Die kurzkettige Fettsäure Butyrat stabilisiert die epitheliale Barrierefunktion des Darmes durch HNF-4a-abhängige Herabregulierung der Claudin-2-Expression. Dissertation, FU Berlin, Germany

Kroismayr, A., Neufeld, K., Affentranger P.: Einfluss einer neuartigen Lignocellulose auf Leistungsparameter in der Ferkelaufzucht Proceedings, 7. BOKU Symposium Tierernährung, 118-122

Autorenanschrift

Dr. Arthur Kroismayr
Bad Haller Straße 23
A-4550 Kremsmünster (Österreich)
E-Mail: Kroismayr@agromed.at

Effects of a phytogenic feed additive on growth performance, nutrient digestibility, caecal microflora composition and intestinal histomorphology of broilers

Sudipto Haldar[1], Basharat Syed[2] and Tobias Steiner[2]

[1] Department of Animal Nutrition, Faculty of Veterinary and Animal Sciences, West Bengal University of Animal and Fishery Sciences, Kolkata, IN
[2] BIOMIN Holding GmbH, 3130 Herzogenburg, AT

Introduction

Phytogenic feed additives (PFAs) are used in animal feeding to improve performance of agricultural livestock. This class of feed additives has recently gained increasing interest, especially for use in poultry in light of the worldwide ban looming on the usage of antibiotic growth promoters (AGPs) in food animals. According to the European Union legislation (EC 1831/2003) PFAs are categorized as 'sensory additives' and in particular flavoring compounds which consist mainly of plant extracts (essential oils, oleoresins and flavonoids) and their active principles (Mountzouris et al., 2011). The essential oils present in the PFAs reportedly improve growth (Giannenas et al., 2003; Isabel and Santos, 2009), nutrient digestibility (Jamroz et al., 2005) and gut health (Giannenas et al., 2003; McReynolds et al., 2009) in poultry. These properties of the PFAs project them as suitable alternatives to antibiotic growth promoters (AGPs). Some studies in broilers demonstrated antimicrobial efficacy of PFAs against *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* (Mitsch et al., 2004; Jamroz et al., 2005) and the effects are attributed mainly to their phenolic components and their action on microbial cells (Burt, 2004; Si et al., 2006). Positive effects of PFAs on morphology of the small intestinal tissues have also been documented (Namkung et al., 2004). Such effects on gastrointestinal morphology are postulated to increase nutrient digestibility in poultry (Hernandez et al., 2004).

The present work aimed at comparing the effects of a PFA and an AGP on growth performance, nutrient digestibility, caecal microflora composition and intestinal histomorphology in broiler chickens.

Materials and methods

Animals and housing

An experiment of 39 days duration was conducted with an as-hatched flock of 1-day-old Cobb 400 broilers (n = 432). The chicks were randomly assigned to three treatments (144 birds in each treatment), each consisting of 12 replicate pens (n = 12 chicks/pen).

Diets and treatments

The efficacy of the PFA was tested on maize–soybean based basal diets (Table 1). Exogenous polysaccharide degrading enzymes and anti-coccidial drugs were not added because these might partly mask the effects of the PFA. However, a toxin binder was used to prevent mould growth in the stored feed.

The treatments were (i) control (basal diet only), (ii) basal diet + AGP (bacitracin methylene disalicylate containing 450 mg active BMD/g), 500 mg/kg and (iii) basal diet + PFA (Digestarom® Poultry, Biomin Phytogenics GmbH, Stadtoldendorf, Germany), 150 mg/kg diet.

Table 1: Formulation and composition (g/kg) of the experimental diets

	Starter (1–7 d)	Grower (8–21 d)	Finisher (22–39 d)
Ingredients			
Ground corn	540.7	567.2	583.4
Soya bean meal (46% CP)	396.0	362.5	328.0
Soybean oil	27.0	33.7	51.1
Calcite powder	12.45	12.45	12.45
Di-calcium phosphate	16.5	16.5	17.0
DL-methionine	0.55	0.95	1.35
Lysine hydrochloride	0.3	0.2	0.2
Sodium bicarbonate	2	2	2
Salt	2	2	2
Premix*	2	2	2
Toxin binder	0.5	0.5	0.5
Calculated composition (g/kg as-fed)			
ME_N (MJ/kg)	11.85	12.14	12.65
Crude protein	223.5	210.4	196.3
Ether extract	52.7	59.8	7.33
Crude fiber	2.5	2.4	2.4
Calcium	9.57	9.47	9.38
Available P	3.18	3.16	3.13
Digestible lysine	11.02	10.19	9.39
Digestible methionine	3.51	3.76	3.99
Digestible methionine + cysteine	6.87	6.73	6.77

*including vitamins and trace elements

Measurements of production traits

Birds were individually weighed at 7, 21 and 39 d which designated the starter, grower and finisher periods respectively. Body weight gain (BWG), total feed intake (FI), average daily feed intake (ADFI) and feed conversion were calculated pen wise for each period and for the overall period. Mortality was recorded daily and the data was adjusted accordingly.

Determination of fecal nutrient digestibility

Fecal digestibility of DM, CP and CF was determined by total fecal collection for 3 consecutive days from 36 d of age onwards. For this, 2 birds were selected randomly from each pen and were distributed in 12 cages from 30 d of age (8 cages per treatment, 3 birds per cage) as adaptation. Excreta were collected per cage from 36 d at every 2 h intervals, mixed, weighed, and a 10% aliquot was sampled and frozen (−20°C). The sampled excreta were again pooled by cage at the end of the collection period (38 d) and a 10% aliquot was taken and dried. Feed samples were collected daily during the digestibility trial and pooled to produce a single composite of each diet. Diet and excreta samples were analyzed (AOAC, 1990) as mentioned above.

Caecal microflora composition

The entire gastrointestinal (GI) tract was removed aseptically from the carcass of the birds slaughtered at 39 d. The GI tract was then divided into sections (i.e. duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon). The small intestine was processed for histomorphological study and the caeca with contents were stored at 4°C. The caecal digesta was processed within 24 h (Mountzouris et al., 2011). Each caecal digesta homogenates were serially diluted from 10^{-1} to 10^{-8}. *Salmonella*, coliforms, total anaerobic bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus* and *Pseudomonas aeruginosa* were cultured on prepared agar plates (Hi-Media Laboratories Ltd., Mumbai, India). The clostridia were cultured in

reinforced clostridial agar (M 154, Hi-Media Laboratories, Mumbai, India). Diluted digesta samples were streaked onto the agar plates and incubated at 37°C for 48 h. The clostridia plates were incubated anaerobically at similar temperature. Visible colonies were enumerated using a colony counter and the results were expressed as $\log_{10}$ CFU/g caecal digesta.

Histomorphology of the small intestine

The histomorphological analysis of the small intestine was performed (Haldar et al., 2011) to evaluate the effects of the PFAs on villus height (VH, from the tip of the villus to the top of the lamina propria), crypt depth (CD, from the base up to the region of transition between the crypt and villus) and the thickness of the muscularis mucosae in the duodenum, jejunum and ileum. Segments measuring 2-cm in length from the mid-points of the duodenum, jejunum and ileum were cut and fixed in 10% buffered formalin. Histological sections were examined with a phase contrast microscope coupled with an integrated digital imaging analysis system. Ten measurements were taken per bird for each variable; the average of these values was used for statistical analysis.

Results

Production performance

Overall (1 to 39 d), AGP and the PFA supplementation to the basal diet improved final BW (p = 0.011) and BWG (p = 0.001). Although FI was similar across the diets (p > 0.05), feed conversion was improved due to supplementation of PFA relative to the control group (p = 0.0001) (Table 2). Cumulatively, mortality was much higher in the control group (4.22%) as compared with the AGP (2.22%) and the PFA (2.78%) groups.

Digestibility of nutrients

Intake of DM, CP and EE did not differ significantly between treatments (p > 0.05). Inclusion of PFA in diet improved apparent DM digestibility (p = 0.001) as compared with the control group. The difference between the AGP and the PFA groups was not significant in this regard (p > 0.05). Supplementation of AGP and PFA to the basal diet improved digestibility of CP (p = 0.043) and ether extract (p = 0.017) as compared with the control group (Table 3).

Caecal microflora composition

The composition of caecal microflora at 39 d of age is shown in Table 4. Supplementation of AGP reduced total *Salmonella* numbers as compared with the control group (p = 0.041). However, the effect of the PFA on caecal *Salmonella* count was discernible and the difference between the PFA group with the control and the AGP groups was statistically not significant (p > 0.05).

Supplementation of PFA decreased total coliforms count as compared to the control and the AGP groups (p = 0.001). The total numbers of anaerobic bacteria (p = 0.0001) and *Clostridium* (p = 0.011) decreased by the AGP and the PFA compared with the control group. Supplementation of AGP and PFA tended to decrease *Staphylococcus aureus* in caecal digesta as compared with the control group (p = 0.062). There was no effect of dietary treatments on the caecal populations of *Pseudomonas aeruginosa* (p > 0.05). However, supplementation of PFA increased the number of caecal *Lactobacillus* as compared with the control and the AGP diets (p = 0.001).

Histomorphology of small intestine

Supplementation of AGP and PFA to diet largely increased VH and decreased thickness of the mucosal wall across the small intestine (Table 5). In duodenum VH increased by AGP supplementation as compared with the control group (p = 0.016). In jejunum AGP and PFA caused significant increment in VH

compared with the control (p = 0.0001); the difference between the AGP and the PFA group was also significant (p < 0.05) which indicated stronger effect of the PFA on VH in jejunum. In ileum, AGP and PFA alike increased VH compared to the control (p = 0.0001) group. CD was unaffected by diets in duodenum and ileum ($p > 0.05$). In jejunum, CD decreased ($p = 0.0001$) by PFA treatment as compared with the control and the AGP treated groups. There was a significant effect of AGP and PFA supplementation on the thickness of the muscularis mucosae in duodenum ($p = 0.0001$) and ileum ($p = 0.001$). Both treatments reduced mucosa thickness compared with the control group. In jejunum, however, thickness of the muscularis mucosae was unaffected by diets ($p > 0.05$).

Discussion

PFA supplementation improved overall feed conversion by 7.1 points compared with the AGP group. This was in accord with earlier reports (Mountzouris et al., 2011) which indicated improvement in final BW and feed conversion due to PFA supplementation without any effect on FI. The growth promoting effects of the PFAs and the AGP in this study may be correlated with the digestibility of nutrients. It has been well documented that AGPs improve nutrient digestibility mostly through their effects on intestinal microbiota (Bedford, 2000). Improvement of nutrient digestibility by PFA addition and performance data similar to added avilamycin were reported by Jamroz and Kamel (2002). Extracts from spices and herbs may stimulate digestive secretions (Platel and Srinivasan, 2004) and exert beneficial actions within the digestive tract. The present findings also suggest that PFAs favorably affect gut functions and digestive activities to stimulate growth in broilers.

Literature depicting antimicrobial role of PFAs is ample (Windisch et al., 2008). In our study, the PFAs reduced caecal population of coliforms and fortified the gut microflora with beneficial bacteria such as *Lactobacillus.* Literature is rather scanty about the mode of action by which the PFAs facilitate proliferation of *Lactobacillus* although such beneficial effects are reported (Jamroz et al., 2005; Mountzouris et al., 2011). Once the lactobacilli are established they might selectively exclude the pathogens from colonization due to the fast proliferation, colonization and acidification in the gut (McReynolds et al., 2009).

Table 2: Performance of broilers fed with an AGP or a PFA on overall growth performance (1-39 days of age)

	Control	AGP	PFA	*p*-value
Body weight (g)	1945.9^{b}	2017.9^{ab}	2066.9^{a}	0.011
Body weight gain (g)	1896.8^{b}	1869.5^{ab}	2018^{a}	0.001
Feed intake (g)	3789.5	3800.2	3751.5	0.101
Feed conversion	2.002^{a}	1.931^{ab}	1.86^{a}	0.0001

[a, b]Means with dissimilar superscripts in a row differ significantly

Table 3: Intake and apparent fecal digestibility of nutrients in broilers supplemented with either AGP or a PFA

	Control	AGP	PFA	*p*-value
Nutrient intake g/d				
Dry matter	94.18	97.59	96.04	0.501
Crude protein	23.07	21.76	22.38	0.214
Ether extract	6.65	6.74	6.66	0.255
Nutrient digestibility (g/g intake)				
Dry matter	0.674^{b}	0.711^{ab}	0.744^{a}	0.001
Crude protein	0.761^{b}	0.784^{a}	0.794^{a}	0.043
Ether extract	0.736^{b}	0.781^{a}	0.782^{a}	0.017

[a, b] Means with dissimilar superscripts in a row differ significantly

Table 4: Caecal microflora composition (log_{10} CFU/g wet caecal digesta) in broilers supplemented with either an AGP or a PFA at 39 d of age

	Control	AGP	PFA	*p*-value
Total *Salmonella*	5.56^{b}	4.99^{a}	5.25^{ab}	0.041
Total coliforms	5.54^{b}	5.62^{b}	5.1^{a}	0.001
Anaerobic bacteria	5.91^{b}	5.64^{a}	5.53^{a}	0.0001
Staphylococcus aureus	2.61	1.24	1.14	0.062
Pseudomonas aeruginosa	4.81	4.74	4.84	0.272
Lactobacillus	4.96^{b}	5.01^{b}	5.35^{a}	0.001
Total *Clostridium*	5.17^{b}	4.95^{a}	4.97^{a}	0.011

[a, b]Means with dissimilar superscripts in a row differ significantly

Table 5: Villus height, crypt depth and thickness of muscularis mucosae in broilers supplemented with either an AGP or a PFA at 39 d of age

Measurements µm	Control	AGP	PFA	*p*-value
Duodenum				
Villus height	2549.1^{b}	3481.1^{a}	2903.4^{ab}	0.016
Crypt depth	45.3	42.7	32.8	0.102
Mucosa thickness	387.1^{b}	183.9^{a}	230.4^{a}	0.0001
Jejunum				
Villus height	2583.6^{b}	2969.9^{a}	3290.1	0.0001
Crypt depth	29.8^{b}	31.1^{a}	20.2^{a}	0.0001
Mucosa thickness	206.8	215.6	212.9	0.875
Ileum				
Villus height	2050.1^{b}	2736.4	2839.9	0.0001
Crypt depth	34.1	30.9	31.6	0.449
Mucosa thickness	320.3^{b}	233.9^{a}	211.8^{a}	0.001

[a, b] Means with dissimilar superscripts in a row differ significantly

The inhibitory effect of the PFA on *Clostridium* is encouraging and paves the way for removal of the AGPs from diets of poultry. The essential oils present in PFAs inhibit the growth of clostridia (Dorman and Deans, 2000). Mitsch et al. (2004) opined that PFAs stabilize the gut microflora and thereby reduce the colonization of clostridia in gut.

The caecal microbiota population in this study revealed that the AGP and the PFA alike reduced total bacterial load in the gut. Overall, from the gut perspective, the PFA purportedly favored a healthy gut which in turn could be concomitant with the growth enhancement.

Morphological changes in gastrointestinal tissues caused by PFA may provide further information on possible benefits to the digestive tract. In general, PFA and also AGP caused major increase in height of villus across the small intestine. This ought to increase absorptive surface area and efficiency of digestion and absorption. Similar effect of PFA on villus height was reported by Namkung et al. (2004). Considering the fact that the majority of absorption occurs in the jejunum where the strongest effect of the PFA on villus height was detected, crypt depth in jejunum was intriguing. The crypt is regarded as the villus factory and a deeper crypt may indicate faster tissue turnover to permit renewal of the villus. Greater villus height increases the activities of enzymes secreted from the tips of the villi, resulting in improved digestibility (Baurhoo et al., 2007). Gordon and Bruckner-Kardoss (1961) reported that germ-free birds had thinner muscularis mucosae than the birds reared under conventional management systems. Thinning of the mucosa might spare nutrients for productive processes and this was reflected in the body weight of the birds.

Conclusion

In conclusion, supplementation of PFA to a maize-soybean meal based coccidiostat free diet improved body weight gain and feed conversion in 39 days, which was comparable to bacitracin methylene disalicylate used as an AGP. The digestibility study showed that supplementation of AGP and PFA improved digestibility of nutrients by increasing the height of the villus throughout the small intestine. Compared to the AGP, the PFA supported establishment of a favorable gut microbiota composed of higher numbers of *Lactobacillus* and less *Clostridium*. Overall, the present work demonstrated the efficacy of PFA and confirms the importance of considering the inclusion of the PFAs in dietary regimens of poultry in place of the antibiotic growth promoters.

References

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Washington, D.C.

Baurhoo B., Phillip L., Ruiz-Feria C.A. (2007) Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. Poult. Sci. 86, 1070–1078.

Bedford M. (2000) Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. World's Poult. Sci. J. 56, 349-364.

Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods – a review. Int. J. Food Microbiol. 94, 223-253.

Dorman H. J. D., Deans S. G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88, 308–316.

EC (European Commission), (2003) Regulation 1831 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Off. J. Eur. Union L, 268/29.

Giannenas I., Florou Paneri P., Papazahariadou M., Christaki E., Botsoglou N.A., Spais A.B. (2003) Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. Arch. Anim. Nutr., 57, 99-106.

Gordon H.A., Bruckner-Kardoss E. (1961) Effect of normal microflora on intestinal surface area. Am. J. Physiol. 201, 175–178.

Haldar S., Ghosh T.K., Toshiwati Bedford M.R. (2011) Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and yeast protein concentrate on production performance of broiler chickens exposed to heat stress and challenged with Salmonella enteritidis. Anim. Feed Sci. Technol. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.03.007.

Hernandez F., Madrid J., Garcia V., Orengo J., Megias M.D. (2004) Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. Poult. Sci. 83, 169–174.

Isabel B., Santos Y. (2009) Effects of dietary organic acids and essential oils on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. J. Appl. Poult. Res. 18, 472 – 476.

Jamroz D., Kamel C. (2002) Plant extracts enhance broiler performance. J. Anim. Sci. 80 (Suppl. 1), 41.

Jamroz D., Wiliczkiewicz A., Wertelecki T., Orda J., Scorupinska J. (2005) Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and domestic grains. Br. Poult. Sci. 46, 485-493.

McReynolds C., Waneck C., Byrd J., Genovese K., Duke S., Nisbet D. (2009) Efficacy of multistrain direct-fed microbial and phytogenetic products in reducing necrotic enteritis in commercial broilers. Poult. Sci. 88, 2075-2080.

Mitsch P., Zitterl-Eglseer K., Kohler B., Gabler C., Losa R., Zimpernik I. (2004) The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. Poult. Sci. 83, 669–675.

Mountzouris K.C., Paraskevas V., Tsirtsikos P., Palamidi I., Stenier T., Schatzmayr G., Fegeros K. (2011) Assessment of a phytogenic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal micro flora composition. Anim. Feed Sci. Technol. 168, 223-231.

Namkung H., Li M., Gong J., Yu H., Cottrill M., de Lange C.F.M. (2004) Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. Can. J. Anim. Sci. 84,697–704.

Platel K., Srinivasan K. (2004) Digestive stimulant action of spices: A myth or reality? Indian J. Med. Res. 119, 167–179.

Si W., Gong J., Tsao R., Zhou T., Yu H., Poppe C., Johnson R., Du Z. (2006) Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. J. Appl. Microbiol. 100, 296–305.

Windisch W., Schedle K., Plitzner C., Kroismayr A. (2008) Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. J. Anim. Sci. 86 (E. Suppl.), E 140 – E 148.

Corresponding author

Dr. med. Vet. Basharat Syed
BIOMIN Holding GmbH
Industriestrasse 21; 3130 Herzogenburg, Austria
E-mail: basharat.syed@biomin.net

Effect of chamomille extract on gut microflora in broiler chickens

Zuzana Jakubcová[1], Libor Kalhotka[2], Lenka Dostalova[2], Lenka Detvanová[2], Ondřej Šťastník[1], Eva Mrkvicová[1], Eva Mrázková[1] and Ladislav Zeman[1]

[1] Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, CZ

[2] Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, CZ

Introduction

Because of the prohibition on the use of antibiotic growth promoters by 2006 and planned ban on the use of coccidiostats in poultry production we need to look for an alternative to those resources. Alternatively, antibiotics may be use of spices, herbs or essential oils. The biological activity, including antibacterial, antifungal, antiviral and anti-inflammatory effects of aromatic essential oils has been known since antiquity. One of the best properties of plant essential oils is their antimicrobial activity. They are effective against a wide range of organisms including organisms which perishable food, potentially pathogenic microorganisms for people, animals or the environment, and some of the microorganisms in the digestive tract of animals. The microflora of the gastrointestinal tract occurring protozoa, fungi, and bacteria (Yegani, Korver, 2008). The poultry increases the amount of intestinal microbes from the duodenum to the appendix. In the appendices is the highest concentration of intestinal microorganisms. The majority of the microorganisms in poultry consists of strict anaerobes. In addition, there are lactobacilli, enterococci and coliforms (Marendiak, Kopčanová, Leitbeg, 1987).

In poultry production is an important pathogen Clostridium perfringens type A or C (Shanmugavelu, 2006). Bacterial spores are highly resistant to heat, drying, acids and many chemical disinfectants. Infections caused by Clostridium perfringens in poultry may cause various clinical manifestations and lesions including necrotic enteritis, necrotic dermatitis, inflammation of the liver or stomach ulcers. With enteritis caused by Clostridium perfringens is also very closely related to coccidiosis. Coccidia damage the bowel, cause an inflammatory response and increased mucus production in the gut. This creates the conditions for the reproduction of bacteria Clostridium perfringens, which further damages the intestine (Hafez, 2011)

Material and methods

The experiment was included 78 seven day old male chickens Ross 308. Chickens were weighed, marked with wing marks and divided into groups. Before the start of the experiment were chickens weighed and divided into weight-balanced groups. One group was the control and the second was added chamomile extract in feed mixture. Chickens were slaughtered during the growth of the 18, 25, 32 and 39 day of age, from each group were always selected five chickens. The feed mixture was blended from the following components: wheat, corn, soybean meal, sunflower oil and mineral-vitamin mixture without anticoccidics. In compound feed was mixed chamomile extract at concentration of 0,3 % and 0,6 %. The microbiological analysis sample was taken from the contents of the small intestine (ileum) about 5 grams in sterile tubes and then tenfold dilutions were prepared.

Diluted samples were homogenized. When vaccination sample volume of 1 ml using an automatic pipette was used the method of direct sowing culture medium.

Samples were prepared at two dilutions and subsequently incubated. There were three groups of microorganisms:

- The total number of microorganisms (PCA agar at 30°C for 72 hours)
- The number of coliform organisms (VRBL agar for 24 hours at 37 ° C)
- Number of mesophilic lactic acid bacteria (MRS agar at 30 ° C for 48 hours)
- Determination of Clostridium perfringens (on TSN agar at 46 ° C for 24 hours)

The temperature, times and the nutrient medium for the various microorganisms is different. The inoculated petri dishes were placed in a thermostat at a given temperature for a specified time. When the determination of lactic acid bacteria and Clostridium perfringens were petri dishes inserted first into the respective generator anaerostat anaerobic environment. Anaerostat properly sealed and then placed in a thermostat at a given temperature. After incubation, the number of bacteria grown in ml of the sample determined from the number of characteristic colonies grown on the plates of the dilution selected so that the number of colonies to provide a readable result. The results were statistically evaluated.

Results and discussion

The aim of the project was to determine the effect of feeding chamomile extract the composition of microorganisms in the digestive tract of broiler chickens Ross 308 and their development during growth. The trial was monitored by colony forming units (CFU.g-1) in clostridia, coliforms, lactic acid bacteria (LAB) and the total number of microorganisms. The number of CFU is shown in table 1. The average weight of chickens shows table 2.

Table 1: Results of microbiological analysis

Group	Coliform organisms ($KTJ.g^{1}$) average	*Clostridium prefringens* ($KTJ.g^{1}$) average	BMK ($KTJ.g^{1}$) average	CPM ($KTJ.g^{1}$) average
H1	$4,17.10^{8}$	$4,23.10^{1}$	$2,22.10^{9}$	$1,39.10^{12}$
H2	$3,49.10^{9}$	$2,19.10^{2}$	$3,88.10^{9}$	$5,20.10^{13}$
K	$5,35.10^{9}$	$3,82.10^{2}$	$5,81.10^{9}$	$3,15.10^{13}$

Table 2: Average body weight of chickens

Group/day of age	11-17	17-24	24-31	31-38
H1	249,9	509,2	679,1	715,8
H2	236,7	507,7	676,6	782,5
K	251,9	523,5	677,2	740,8

Conclusions

In our experiment, which was based on supplementation of chamomile extract, we monitored its effect on the gut microflora of broiler chickens. The addition of 0,3 % and 0,6 % chamomile extract to the broilers diet had no effect on their growth. Number of CFU, sulphide-reducing clostridia, coliforms and lactic acid bacteria was higher in the control group. Total plate count was highest in the group

with addition 0,6 % of chamomile extract. There was no difference in average gain between groups with and without chamomille extract.

Acknowledgments

Thanks for financial support to the project IP 1/2013 „Vliv zkrmování vybraných extraktů bylin u brojlerů na složení mikroorganismů v trávicím traktu."

References

Hafez, H. M., 2011. Enteric diseases of poultry with special attention to Clostridium perfringens. Pak Vet J, 31(3): 175-184. ISSN: 2074-7764

Marendiak, D., Kopčanová, Ľ., Leitgeb, S., 1987: Poľnohospodárska mikrobiológia. 1. vyd. Bratislava: Príroda,. 433 s

Shanmugavelu, S., Ruzickova, G., Zrustova, J., Brooker, J.D., 2006: A fermentation assay to evaluate the effectiveness of antimicrobial agents on gut microflora. Journal of microbiological methods 67: 93–101

Yegani, M., Korver, D. R., 2008: Factors Affecting Intestinal Health in Poultry. Poultry Science, 87:2052–2063

Corresponding author

Zuzana Jakubcová
Department of Animal Nutrition and Forage Production
Faculty of Agronomy,
Mendel University in Brno
Zemědělská 1, 61300 Brno, Czech Republic
E-mail: ZuzanaJakubcova@seznam.cz

Influence of the acidifier compound on counts of fecal resistant *E. coli* and growth performance of weaning pigs

N. Roth[1], R. Breitsma[1], A. Kovacs[1], R. Berrios[1], B. Doupovec[1], F. Goelss[2], G. Wegl[2] and V. Klose[2]

[1] BIOMIN Holding GmbH, Herzogenburg, AT
[2] BIOMIN Research Center, Tulln, AT

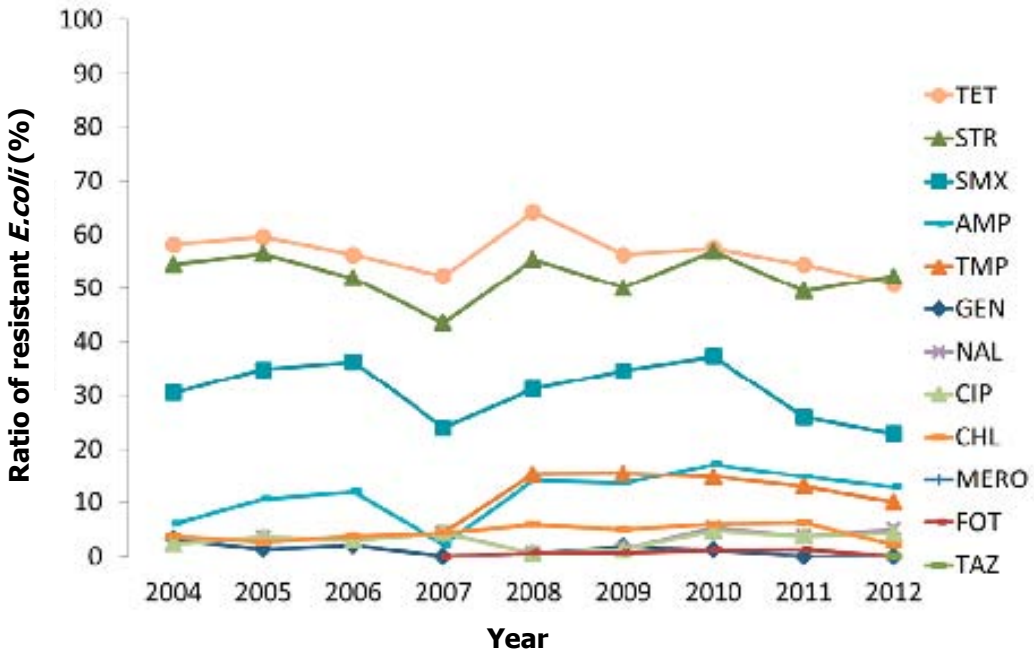
Introduction

Antibiotics are used to treat clinical diseases in farm animals, prevent and control common disease events, and enhance animal growth (MacEwen and Fedorka-Cray 2002). The use of antibiotics in farm animals can be divided between therapeutic, prophylactic, and sub-therapeutic applications. The disadvantage of antibiotics is the emergence and spread of resistant bacteria. Antibiotic resistant bacteria are a global problem for human and animal health (Alanis 2005; Livermore 2007; Livermore 2012). The use of antibiotics in animal agricultural is recognized as one of the major contributors to the development of resistant organisms that result in life-threatening human infections. Curbing antibiotics use is also part of the strategy to control the mounting public health crisis related to antibiotic resistance (Landers et al 2012). It is necessary to reduce the use of antimicrobial drugs to control antibiotic resistance.

Another method is to reduce the levels of resistant bacteria in the gastrointestinal tract (GIT) of animals. This lowers the load of resistant bacterial in the gut environment, which consequentially reduces the transmission of the resistance genes. Lowering antibiotic resistance is especially important for bacterial species common in humans and animals. Antibiotic resistant strains of *E. coli* are ubiquitous in both human and animal isolates (Amara et al 1995). *E. coli* is used as an indicator for resistance problems in animals as well as in humans and the environment (Stedt et al 2014).

Surveillance and monitoring studies on antimicrobial resistance provide information on the occurrence of resistances in pigs in different parts of the world. *E. coli* resistance in swine was described in the Austrian Resistance Report AURES (AGES 2013), a yearly report published since 2004 on antibiotic resistance in humans and the veterinary sector. To date, a total of about 160 digesta samples from the large intestine of swine from 30 farms in Austria have been analyzed for *E. coli*. Tests for antimicrobial susceptibility to different antibiotics were conducted. The microbiological resistance of *E. coli* using epidemiological cut-off values is shown in Figure 1. Epidemiological cut-off values were determined on the basis of the distribution of minimal inhibitory concentration for an antibiotic and a bacterial species (Silley et al 2012).

The ratio of resistant *E. coli* was determined using the following: [Number of resistant *E. coli* per year/ number of tested *E. coli* per year] x 100. The ratio of resistant *E. coli* to tetracycline, streptomycine, sulfamethoxazol and ampicillin was between 15% and 50% in 2012 and it was higher than the ratio of resistant *E. coli* to other tested antibiotics. For this reason, *E. coli* resistance to tetracycline, streptomycine, sulfamethoxazol and ampicillin were determined in the following swine trial described. Multiresistance includes resistances to tetracycline, streptomycine and sulfamethoxazol.



TET—tetracycline; STR—streptomycine, SMX—sulfamethoxazol; AMP—ampicilline; TMP—trimethoprim; GEN—gentamicin; NAL—nalidixic acid; CIP—ciprofloxacin; CHL—chloramphenicol; MERO—meropenem; FOT—cefotaxim; TAZ—cefrazidim

Figure 1: Microbiological resistance of *E. coli* to different antibiotics; Source: AURES, 2013

Materials and methods

The trial was carried out at the BIOMIN Center of Applied Animal Nutrition in Mank, Austria, using 60 pigs [(Landrace x Large White) x Pietrain]. Pigs, two weeks after weaning (body weight 12.27 kg; 40 days) were assigned to 2 treatments. The negative control group diet contained no growth-promoting feed additives, whereas the diet of the trial group was supplemented with a compound acidifier consising of organic acids, cinnamaldehyde and a permeabilizer (OCP) at the inclusion rate of 1.0 kg/t feed. No antibiotics were added to the feed. The duration of the trial was 42 days. Body weight and feed intake were recorded during the changes in diet on day 14, day 28 and at the end of the trial on day 42. Feed conversion ratio was calculated. Mortality and clinical symptoms for diarrhea or other medical incidences were observed daily. Fecal samples of four pigs in one pen were pooled into sampling bottles. Three samples per group from three pens were collected and immediately frozen on day 14 and at the end of the trial on day 42.

The counts of *E. coli* as well as *E. coli* resistant to ampicillin and multi-resistant to tetracyline, streptomycine and sulfomethoxazole were determined in all fecal samples. TBX agar was prepared for the detection of *E. coli*. Antibiotics or their combinations were added to agar to detect resistant *E. coli*. Antibiotic concentrations in the agar were as follows: streptomycin – 25 mg/l, oxytetracyclin hydrochlorid – 25 mg/l, ampicillin – 50 mg/l, sulfomethoxazole – 150mg/l.

Each frozen feces sample was mixed with sterile 0.9% NaCl as a solution at a ratio of 1:2 (100 g feces + 100 ml 0.9% NaCl), placed in a fresh stomacher bag and homogenized for 120 seconds. This solution was diluted to 1:5 (20 ml solution + 80 ml 0.9% NaCl) and homogenized for 120 sec., afterwhich a serial dilution up to 10^{-9} with 0.9% NaCl was conducted. One hundred microliters of each solution in the serial dilution was streaked out on TBX agar. Plates were incubated for 24 hours at 37°C under aerobic conditions.

All data generated from the trial was subjected to statistical analysis by means of ANOVA (IBM SPSS Statistics 19.0).

Results

Results of the trial showed no significant differences in growth performance. However, there were numerical improvements in body weight and weight gain in the group that received diets supplemented with OCP (Table 1). Body weight at day 42 was 3% higher in the trial group compared to the negative control group. Average weight gain in the OCP group was 4% higher than the negative control group.

Microbiological analysis of fecal samples showed no significant differences of *E. coli* numbers between groups because of the high variation of *E. coli* in samples.

Analysis of samples on day 14 showed no difference in the total *E. coli* count between groups but there were lower counts of resistant *E. coli* in the group fed OCP (Table 2). Microbiological analysis at the end of the trial on day 42 showed that total *E. coli* counts in the fecal samples of the group fed OCP was around 1 log below the control group (Table 3).

The count of *E. coli* resistant to ampicillin in the trial group was 1 log below the control group. The count of *E. coli* with multi-resistance to tetracyline, streptomycine and sulfomethoxazole (Tre+Str+Sul) in the trial group was nearly 2 logs below the control group. Figure 2 shows the average *E. coli* and resistant *E. coli* counts in the fecal samples of pigs at the end of the trial.

Table 1: Performance characteristics of piglets

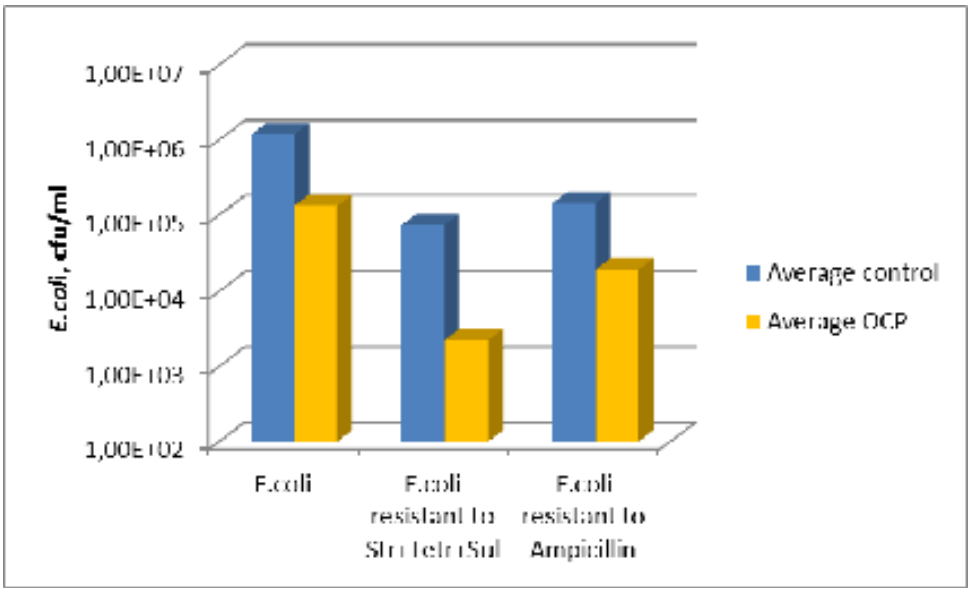
Peroid	Body weight, kg		Weight gain, kg		Feed intake, g		FCR	
	Control group	OCP group	Control group	OCP group	Control group	OCP group	Control group	OCP group
Day 14 /Period 1-14	19.25	19.46	6.97	7.20	725	761	1.58	1.58
p-value	0.786		0.552		0.785		0.987	
Day 28/ Period 1-28	29.10	29.27	16.83	17.00	974	1014	1.62	1.67
p-value	0.881		0.817		0,701		0.192	
Day 42/ Period 1-42	37.71	38.75	25.45	26.48	1110	1161	1.83	1.84
p-value	0.399		0.243		0.538		0.862	

Table 2: *E. coli* in fecal samples on day 14, cfu/ml

	Control sample 1	Control sample 2	Control sample 3	OCP sample1	OCP sample 2	OCP sample 3	Average control	Average OCP	p-value
E.coli	1.14E+07	5.50E+04	2.08E+07	5.91E+05	3.62E+06	2.90E+07	1.08E+07	1.11E+07	0.344
E.coli resistant to Tetr+Str+Sul	7.64E+06	4.00E+03	4.06E+06	6.55E+05	7.66E+04	3.55E+05	3.90E+06	3.62E+05	0.121
E.coli resistant to ampicillin	7.20E+05	9.00E+03	8.56E+05	0.00E+00	1.98E+05	4.42E+05	5.28E+05	2.13E+05	0.174

Table 3: *E. coli* in fecal samples on day 42, cfu/ml

	Control sample 1	Control sample 2	Control sample 3	OCP sample1	OCP sample 2	OCP sample 3	Average control	Average OCP	p-value
E. coli	2.20E+05	1.73E+06	1.59E+06	1.33E+05	1.13E+05	1.50E+05	1.18E+06	1.32E+05	0.162
E. coli resistant to Tetr+Str+Sul	9.41E+03	6.62E+03	2.01E+05	4.29E+02	1.82E+03	4.39E+03	7.23E+04	2.21E+03	0.389
E. coli resistant to ampicillin	5.17E+04	6.62E+03	3.71E+05	4.18E+04	4.68E+03	1.15E+04	1.43E+05	1.93E+04	0.393



Abbreviations: Str+Tet+Sul – streptomycine, tetracycline and sulfamethoxazol

Figure 2: Average counts of *E. coli* in fecal samples of pigs, cfu/ml

Discussion

Antibiotic use in animal production has been identified as a risk factor associated with the development of antibiotic resistant bacteria that can be transferred to humans via several routes. These include human consumption of animal products, exposure to resistant microorganisms from contact with animals, and the contamination of ground and surface waters by wastes containing antimicrobials and resistant microorganisms (Jindal et al 2006). Exposure to antibiotics increases the level of antibiotic resistance among bacteria belonging to the normal intestinal flora of animals but also among pathogenic bacteria (Bogaard and Stobberingh, 2000).

In cases where high levels of resistant pathogenic bacteria are present, antibiotic treatments may no longer be effective against pathogens. Organic acids are well known to modulate intestinal microbiota of pigs (Piva et al 2002). The positive influence of acidifiers depends on the type and concentration of acidifiers in the feed. Dietary acidifiers decrease pH in the stomach and the lower GIT of weaning pigs, and thus, protect the host from pathogenic invasion and proliferation and improve nutrient digestion. These benefits may subsequently result in improved growth performance of weaning pigs (Kil et al. 2011).

Weaning pigs often have an overgrowth of pathogenic bacteria (e.g., coliforms) and a smaller population of favorable bacteria (e.g., *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*; Barrow et al 1977). Adding acidifiers to weaning pig diets favors the growth of beneficial bacteria, with an accompanying reduction in harmful bacteria, by reducing stomach pH (Partanen and Mroz, 1999). *In vitro* experiments show that organic acidifiers may have direct antimicrobial effects, specifically on the pH-sensitive harmful bacteria such as coliforms (Gauthier 2002).

The combined acidifier OCP in the present study contains cinnamaldehyde with additional antimicrobial activity (Lis-Balchin 2003). Organic acids exert their activity in the feed and to a greater extent in the upper gastro-intestinal tract and phytochemicals more in the distal part of the intestinal tract (Langhout, 2000). Another component of the tested combined acidifier is a permeabilizer which en-

hances the effects of organic acids and cinnamaldehyde due to an increase in outer membrane permeability (Riemensperger et al 2012). The combination of the organic acids with cinnamaldehyde and a permeabilizer increases the effectiveness for combatting bacteria.

Limited literature sources are available on the efficacy of acidifiers aginst resistant bacteria in swine. However, the use of antimicrobial feed additives in the form of commercial competitive exclusion culture and their activity on resistant *E. coli* is described by Hofacre et al 2002. In the challenge trial with broilers, the culture significantly reduced intestinal colonization of antibiotic resistant *E. coli.* On the other hand, feed supplementation with zinc seems to have a direct effect on the *E. coli* diversity and antimicrobial resistance in the gut of piglets. It was shown that high zinc concentrations increase the proportion of multi-resistant *E. coli* (Bednorz et al 2013).

In the present study, the antimicrobial effect of the OCP had an effect on the reduction of antibiotic resistant *E. coli*. By reducing antibiotic resistant bacteria, OCP contributes to a possible solution to the problem of antibiotic resistance. Moreover, the reduction in opportunistic pathogens and antibiotic resistant bacteria minimizes the risk of infections among animals and positively influences swine production. The fewer resistant bacteria there are in the intestinal flora, the lower the likely possibility that genes encoding resistance will be transferred to other bacteria, including pathogenic bacteria. This may also reduce the dissemination of resistant bacteria in the farm environment. Reducing the resistance of pathogenic *E. coli* to antibiotics may contribute to the successful treatment of animals during a disease outbreak.

Conclusion

The addition of OCP to the swine diet yielded improvements in growth performance parameters. Analysis of fecal samples showed that it was possible to reduce the number of resistant *E. coli* and reduce the number of multi-resistant *E. coli* in swine feces with the help of OCP. Differences were not significant as the variation between samples was high.

References

AGES Östereichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (2013) AURES 2012 Resistenzbericht Österreich http://www.ages.at/ages/gesundheit/mensch/antibiotikaresistenzen/aures-2012/ 18.03.2014 15:40.

Alanis A.J. (2005): Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res. 36, 697-705.

Amara A., Ziani Z., and Bouzoubaa K. (1995): Antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. Vet. Microbiol. 43, 325-330.

Barrow P.A., Fuller R., and Newport M.J. 1977 Changes in the microflora and physiology of the anteriorintestinal tract of pigs weaned at 2 days with special reference to the pathogenesis of diarrhea. Infect Immunol.; 18:586-595

Bednorz C., Oelgeschläger K., Kinnemann B., Hartmann S., Neumann K., Pieper R., Bethe A., Semmler T., Tedina K., Schierack P., Wieler L.H., and Guenther S. (2013): The broader context of antibiotic resistance: Zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. Intern J Med Microb http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.06.004

Bogaard A.E., and Stobberingh E.E. (2000): Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. Intern. J Antimicr. Agents 14, 327–335.

Gauthier R. (2002): Intestinal health, the key to productivity - the case of organic acids. Precongreso Cientifico Avicola IASA XXVII convencion ANECA-WPDC. Puerto Vallarta, Mexico.

Hofacre C.L., Johnson A.C., Kelly B.J., and Froyman R. (2001): Effect of a Commercial Competitive Exclusion Culture on Reduction of Colonization of an Antibiotic-Resistant Pathogenic *Escherichia coli* in Day-Old Broiler Chickens. Avian diseases 46, 198–202.

Jindal A., Kocherginskaya S., Mehboob A., Matthew R., Mackie R.I., Raskin L., and Zilles J.L. (2006): Antimicrobial use and resistance in swine waste treatment systems. Appl Environ Microbiol. 72, 7813–7820.

Kil D.Y., Kwon W.B., and Kim B.G. (2011): Dietary acidifiers in weanling pig diets: a review. Rev. Colomb. Cienc. Pec.l 24, 3

Landers T.F., Cohen B., Wittum T.E., and Larson E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. Public Health Rep. 127, 4–22.

Langhout P. (2000) New additives for broiler chickens. Feed Mix Special: Alternatives to antibiotics, P. 24–27.

Lis-Balchin M. (2003): Feed additives as alternatives to antibiotic growth-promoters: botanicals. Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs 1, 333–352.

Livermore D.M. (2007): Introduction: the challenge of multiresistance. Intern J Antimicrob Agents. 29, 1-7.

Livermore D.M. (2012): Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. Korean J Intern Med. 27, 128-42.

Mc Ewen S.A. and Fedorka-Cray P.J. (2002): Antimicrobial use and resistance in animals. Clin Infect Dis. 3, 93-106.

Partanen K.H., and Mroz Z. (1999): Organic acids for performance enhancement in pig diets. Nutr Res Rev. 12, 117-145.

Piva A., Casadei G., and Biagi G. (2002): An organic acid blend can moderate swine intestinal fermentation and reduce microbial proteolysis. Canadian Journal of Animal Science 82, 527–537.

Riemensperger A.V., Bachinger D., Schaumberger S., Urbaityte R., and Pasteiner S. (2012): The effect of an organic acid blend, cinnamaldehyde and a Permeabilizing substance on the inhibition of bacterial growth *in vitro* and growth performance of weaning pigs. Vet Med Zoot 60, 82.

Silley P. (2012): Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz. 31, 33-41.

Stedt J., Bonnedahl J., Hernandez J., McMahon B.J., Hasan B., Olsen B., Drobni M., and Waldenstroem J. (2014): Antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European countries. Infect Ecol and Epidem. 4: 21565.

Corresponding author

MSc Nataliya Roth
BIOMIN Holding GmbH
Industriestrasse 21
3130 Herzogenburg, Austria
E-mail: nataliya.roth@biomin.net

Synergistic effect of acid mixtures with phytochemicals against gut pathogens

Diana Bachinger[1], Cornelia Schauerhuber[1], Nataliya Roth[2] and Gerd Schatzmayr[1]

[1] BIOMIN Research Center, Tulln, AT
[2] BIOMIN Holding GmbH, Herzogenburg, AT

Introduction

Antibiotics have long been used for their antimicrobial and growth promoting effects to guarantee healthy, growing animals and pathogen-free food. With increased consumer concerns over the risks of antibiotics on the environment, human health and food safety, in-feed antibiotics were banned in the EU in 2006.

Clearly, the removal of antibiotic growth promoters (AGPs) without any replacements would have a negative impact on feed intake, weight gain, animal health and ultimately profitability (Perdok et al., 2003).

The application of organic acids, phytochemicals and their combination seems to be a highly promising alternative to AGPs. Their antimicrobial activity against the common feed pathogens *E. coli* and *Salmonella* species is the subject of this work.

The aim was to test the antibacterial activity of two mixtures of organic acids and seven phytochemicals and their combinations in order to find additive and synergistic effects.

Materials and methods

The two acid mixtures (AMs) were extracted from their carrier by shaking in reverse osmosis water. The following AMs were used:

- AM1: formic and propionic acid on carrier, adjusted to pH 3.6 with ammonia
- AM2: formic, acetic and propionic acid on carrier, adjusted to pH 3.5 with ammonia

The acid solutions were diluted using tryptic soy broth (TSB) to a final acid concentration of 0.135 % in the microplates.

The seven selected phytochemicals (PCs 1-7) were dissolved in 50 % ethanol and subsequently diluted using TSB to individual final concentrations ranging from 125 to 1000 ppm in the microplates.

The following test strains were selected:

- *Salmonella* enterica ssp. enterica
- *Salmonella* enterica ssp. I ser. Typhimurium
- *Escherichia coli* O55:K59(B5):H
- *Escherichia coli* O128:H2

One day prior to the experiment, each bacterial strain was cultivated from a cryo culture using 100 µl bacterial suspension and 10 ml of TSB at 37 °C overnight. The next day, the main culture was created using 100 µl of the overnight culture and 10 ml TSB. The main culture was again incubated for

4 hours to ensure complete viability. For the microplate assay, the main cultures were diluted to an optical density (OD) of 0.1± 0.015 at 690 nm.

The test wells of the microplates were filled with 100 µl of bacterial suspension and 100 µl of the diluted test substances. Both the AMs and PCs were tested alone and in combination in four replicates.

In addition, the following controls were prepared:

- Medium control: 200 µl TSB
- Growth control: 100 µl of bacterial suspension + 100 µl TSB
- Ethanol control: 100 µl of bacterial suspension + 100 µl TSB, with 0.75 % ethanol
- Positive control: 100 µl of bacterial suspension + 100 µl TSB, with 0.0625 – 8 mg/l ampicillin

The microplates were incubated at 37 °C without gassing. The OD[690 nm] in the wells of the plates was measured before and after 24 hours of incubation.

The change of the OD in the test wells was compared to the change in the growth control and expressed as % inhibition. An effect was classified as synergistic if the growth inhibition of the combined substances [**PC**+**AM**] was significantly ($p < 0.01$) higher than the theoretical sum of the individual substances [**PC**]+[**AM**]. Statistical analysis was conducted via the program "R" for statistical computing.

Results and discussion

AM1 inhibited the bacterial strains from -7 to 31 % whilst AM2 inhibited them from 33 to 60 %, as shown in Figure 1.

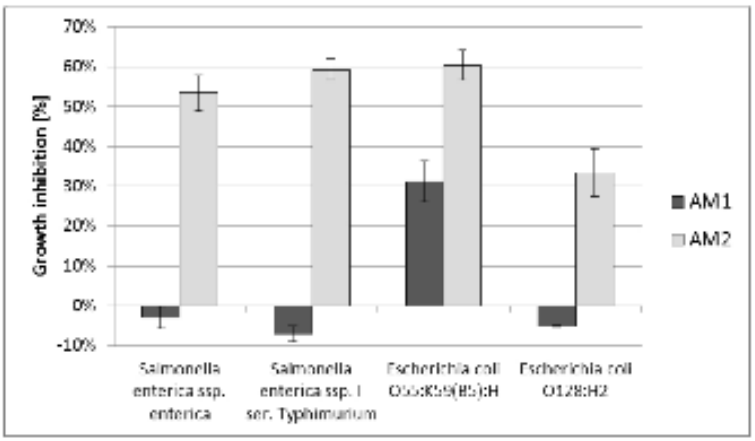


Figure 1: Growth inhibition of bacteria by acid mixtures. Error bars show standard deviations (n=4)

The negative calculated inhibition of AM1 can be interpreted as growth enhancement. This might be explained by the fact that some bacteria are able to use organic acids as substrates, if they are used in very small concentrations which do not alter the pH value. Therefore, the addition of very small amounts of acid provided more nutrients for the bacteria, resulting in higher growth.

It was shown that AM2, consisting of formic, acetic and propionic acid, had a higher antibacterial activity than AM1, consisting of only formic and propionic acid, when applied at the same concentration. This suggests a positive effect of combining several organic acids. The three acids used in AM2 exhibited different modes of action for bacterial growth inhibition, e.g. reduction of the pH in the medium itself (especially formic acid), entering the cells in un-dissociated form and subsequently lowering the

pH within the cell plasma (primarily propionic acid) or disrupting the bacterial membrane (Papatsiros and Billinis, 2012). The combination of those different antibacterial approaches may be the reason for the increased effects in AM2 shown in this study.

The PCs inhibited all of the strains from 17 to 57 % at their individual concentrations. When the AMs and PCs were combined, additive to synergistic effects resulting in up to 100 % inhibition were observed, as shown in Figure 2.

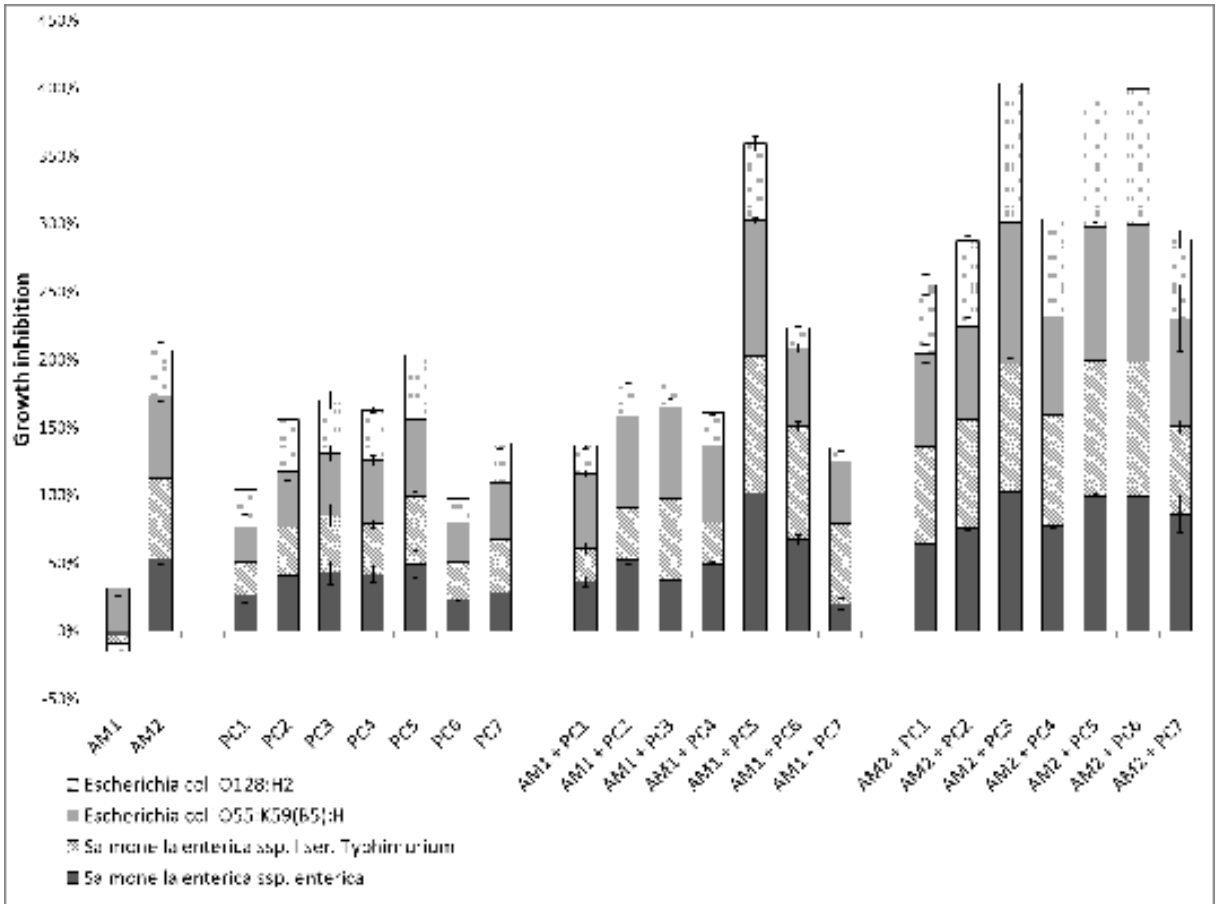


Figure 2: Growth inhibition of bacteria by AMs, PCs and their combinations. Maximum inhibition of individual strain per test substance = 100 %. Error bars show standard deviations (n=4)

Only additive effects were observed against *E. coli* O55:K59(B5):H and only the combination [AM2+PC6] showed a significant ($p < 0.01$) synergistic activity against *E. coli* O128:H2. It is possible that these particular strains of *E. coli* were more resistant to natural antimicrobials than the *Salmonella* species.

The combinations [AM1+PC5], [AM1+PC6] and [AM2+PC6] showed significant ($p < 0.01$) synergistic activities against the two *Salmonella* species.

In the present study it was observed that *E. coli* and *Salmonella* were more greatly inhibited by the combination of organic acids and PCs in comparison to the individual substances.

Two mechanisms may explain this synergism. First, the addition of organic acids lowers the pH, converting the active phytochemical compounds into a state which allows them to enter the bacterial cell

and exert their antimicrobial activity (Zhou et al., 2007). Second, the PCs can damage the bacterial cell membrane and further improve the penetration of the acids into the cytoplasm (Gauthier, 2005).

Conclusion

It was shown that organic acids exhibit synergistic antibacterial activity when used in a combination (formic, acetic and propionic acid) and therefore provide a good basis for an AGP alternative.

The combination with selected phytochemicals can provide even better synergistic effects, leading to a total inhibition of two *Salmonella* species in this study.

Therefore, the combination of organic acid mixtures with phytochemicals represents an effective alternative to in-feed antibiotics.

References

Gauthier, R. 2005. Organic acids and essential oils, a realistic alternative to antibiotic growth promoters in poultry. Forum Internacional de Avicultura. 17-19 Agosto. Foz do Iguacu. Brasil. 148-157

Perdok, H., Langhout, P., Van Vugt, P. 2003. Stimulating appetite for AGP-free success. Feed Mix 11. 10-13

Papatsiros, V. G., Billinis, C. 2012. The Prophylactic Use of Acidifiers as Antibacterial Agents in Swine. Antimicrobial Agents. Edited by Varaprasad Bobbarala. 422 p.

Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., Li, J., Ren, Y., Yan, W. 2007. Synergistic Effect of Thymol and Carvacrol Combined with Chelators and Organic Acids against *Salmonella* Typhimurium. Journal of Food Protection 70. 1704-1709

Corresponding author

Diana Bachinger, MSc
BIOMIN Holding GmbH
BIOMIN Research Center
Technopark 1
A-3430 Tulln
E-mail: diana.bachinger@biomin.net

Salmonellen im Staub – Ein Hinweis für Salmonellen im Futter und Mischfutterbetrieb

Elisabeth Viktoria Reiter[1], Veronika Kolar[1], Andreas Adler[1] und Ian Kopacka[2]

[1] AGES, Institut für Tierernährung und Futtermittel, Linz und Wien, AT
[2] AGES, Fachbereich Daten, Statistik & Integrative Risikobewertung, Graz, AT

Einleitung

Der größte Salmonellen-Ausbruch der letzten Jahre mit 159 Humanerkrankungen an *Salmonella (S.)* Mbandaka war epidemiologisch auf ein kontaminiertes Futtermittel zurückzuführen (Allerberger 2012). Eiweißhältige Einzelfuttermittel wie z.B. Soja-, Raps- oder Sonnenblumenextraktionsschrote gelten als bedeutende Kontaminationsquelle für Mischfutter und Mischfutterbetriebe (Wierup and Häggblom 2010).

Gerade in Futtermitteln kommen Salmonellen in sehr geringen Konzentrationen vor, üblicherweise rechnet man zwischen 3-5 Keimen je Gramm Probe. Diese niedrigen Keimgehalte erschweren den kulturellen Nachweis von positiven Proben.

Staubpartikel hingegen stellen aufgrund ihrer großen Oberfläche ein ausgezeichnetes Medium für Salmonellen dar und können hier eher nachgewiesen werden als im Mischfuttermittel (Whyte, McGill et al. 2003, Davies and Wales 2010). Im Rahmen der betrieblichen Eigenkontrolle könnte die Entnahme von Staubproben eine Möglichkeit bieten, Salmonellenkontaminationen im Mischfutterwerk frühzeitig zu erkennen. Zudem gibt die Entnahme von Staubproben während des Produktionsprozesses auch Auskunft über den Hygienestatus des Betriebes sowie die Effektivität der angewandten Hygienisierungsverfahren.

Mit dem Projekt SINS konnte ein Überblick über die Kontaminationsrate in österreichischen Futtermittelbetrieben (Einzelfuttermitteln bzw. Mischfuttermitteln) geschaffen werden. Zudem wurde eine Übersicht über den Hygienestatus (im Zeitraum von einem Jahr) in Bezug auf Salmonellen erstellt.

Material und Methoden

In insgesamt 39 Mischfutterbetrieben wurden Staubproben sowohl entlang des Produktionsprozesses, als auch in den Rohwaren- und Fertigfutterlagerstätten der mischfuttermittelherstellenden Betriebe gezogen. Hierzu wurden im Zuge der Prozesskontrolle entlang der Produktionsprozesse 1373 Proben in 16 Mischfutterwerken gezogen, im Rahmen der Lagerkontrolle 2326 Proben in 39 Betrieben im Rohwaren- und Fertigfutterlager.

Die Proben wurden nach Übermittlung am Institut für Tierernährung und Futtermittel der AGES in Linz auf das Vorhandensein von Salmonellen untersucht. Die Analyse erfolgte gemäß der ISO-Norm EN ISO 6579:2002/A1:2007 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. —Anhang D: Nachweis von *Salmonella* spp. in Tierkot und in Umgebungsproben aus der Primärproduktion" (EN ISO 6579:2002/A1 2007).

Nach entsprechender Bebrütungsdauer und Kultivierung auf Selektivnährböden wurde auf die Anwesenheit typischer Salmonellenkolonien und atypischer Kolonien, die Salmonellen sein könnten, geprüft.

Repräsentative Isolate wurden an das NRL für Salmonellen (AGES, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Graz) übermittelt. Die Bestätigung von Salmonella-Isolaten erfolgt durch Serotypisierung basierend auf dem White-Kauffmann-Le Minor-Schema. Bei ausgewählten Stämmen wurde zusätzlich ein genetisches Fingerprinting mittels Pulsfeld-Gelektrophorese entsprechend PulseNet Protokoll durchgeführt (Ribot, Fair et al. 2006).

Ergebnisse

Im Zuge der Prozesskontrolle, wurden in Proben von 12 der 16 Betriebe neun unterschiedliche Serotypen festgestellt, wobei in einigen Betrieben mehr als ein Serotyp isoliert werden konnte.

In Summe wurden in der Prozesskontrolle 34 Salmonellen-Isolate (2,48 %) gefunden, wobei *S.* Senftenberg 19-mal nachgewiesen werden konnte. Weiters wurde fünfmal *S.* Oranienburg, dreimal *S.* Havanna und zweimal *S.* Worthington isoliert. *S.* Agona, S. Jerusalem, S. Mbandaka, *S.* Solna und *S.* Tennessee wurden jeweils einmal aus Staubproben isoliert.

Im Bereich der Rohwarenlagerung sowie um die Elevatoren und im Bereich um die thermische Behandlung wurden deutlich häufiger Salmonellen nachgewiesen als nach der thermischen Behandlung.

Im Bereich der Kühlung wurden in dieser Studie jedoch nie Salmonellen gefunden, im Mischfutterbereich dagegen zweimal. Eine Übersicht über positive Proben entlang des Herstellungsprozesses ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Anteil der positiven und negativen Proben aufgeschlüsselt nach Probenahmeort

Probenahmeort	negative Proben	positive Proben	Anteil positiv
Rohwarenlagerung	277	10	3.48 %
Elevatorfuß	150	7	4.46 %
Mischbereich und Waagen	327	9	2.68 %
Außenbereich thermische Behandlung	177	6	3.28 %
Kühlung	136	0	0.00 %
Mischfutterlagerung	272	2	0.73 %
Summe (1373)	1339	34	2.48 %

Im Rahmen der Kontrolle der Lagerstätten wurden insgesamt 2326 Proben in 39 Betrieben in ganz Österreich gezogen, davon wurden 1306 Proben aus dem Rohwarenlager und 1020 Proben aus dem Mischfutterlager (Fertigfutter) entnommen. Von den untersuchten Proben wurden in 49 Staubproben Salmonellen nachgewiesen, wobei aus einer Probe zwei Serotypen isoliert werden konnten (insgesamt 50 Salmonella-Isolate). Insgesamt wurden elf unterschiedliche Serotypen in den Staubproben der Rohwaren- und Fertigfutterlager nachgewiesen.

Davon wurde 24-mal S. Senftenberg, neunmal *S.* Mbandaka, je dreimal *S.* Agona, *S.* Oranienburg sowie *S.* Typhimurium, je zweimal *S.* Havana und *S.* Infantis, und je einmal *S.* Abony, *S.* Llandorf, *S.* Solna und *S.* Worthington gefunden.

Insgesamt wurden bei 41 (3,14 %) von 1306 Proben, die im Rohwarenlager gezogen wurden, Salmonellen nachgewiesen. Im Fertigfutterlager wurden insgesamt aus acht von 1020 (0,78 %) Staubproben Salmonellen isoliert.

Bei genauerer Betrachtung und Unterteilung der Staubproben in fünf Kategorien, je nach gelagertem Futter im Silo, aus dem die Staubprobe gezogen (Ölsaat, Getreide, Geflügel, Schwein und Sonstiges) zeigte, dass Proben der Kategorie Ölsaat mit 3,48 % mit Abstand die höchste Salmonellenprävalenz aufwiesen. Salmonellenprävalenzen einzelner Kategorien sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Anteil positiver Proben nach Futtermittelkategorien

Kategorie	Proben	Positiv	Anteil pos.
Geflügel	178	1	0.56 %
Getreide	317	5	1.58 %
Ölsaat	660	23	3.48 %
Schwein	101	0	0%
Sonstiges	1070	20	1.87 %

Zudem konnte ein signifikanter jahreszeitlicher Einfluss in der Häufigkeit des Auftretens Salmonella-positiver Proben festgestellt werden. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit Salmonellen nachzuweisen in den Quartalen II und III (Faktor 3,16) deutlich geringer als in den Quartalen I und VI.

Die Ergebnisse zeigen, dass trotz der in den Mischfutterwerken bereits getroffenen Hygienemaßnahmen Salmonellen die Lebensmittelkette über das Futtermittel erreichen können, was ein direktes Risiko für den Menschen darstellen kann. Außerdem zeigt ein Vergleich der Serovare, dass die in Österreich aus FM-Proben isolierten Serovare (wie etwa *S.* Mbandaka, *S.* Senftenberg, *S.* Agona, *S.* Montevideo und *S.* Havana), auch in den letzten Jahren auch in österreichischen Geflügelbeständen (EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 2014) nachgewiesen werden konnten.

Diskussion

Die Ergebnisse, zeigen dass Salmonellen im Vergleichszeitraum häufiger in Staubproben als in Einzelfuttermitteln nachgewiesen wurden (RASFF Portal 2014). Außerdem zeigt sich auch in der gegenständlichen Studie, dass Ölfrüchte einen wesentlichen Beitrag für das Einschleppen von Salmonellen in den Mischfutterbetrieb haben. In ein Futtermittelwerk eingeschleppte Salmonellen können je nach Serovar und den örtlichen Gegebenheiten in der Anlage persistent werden und die nachfolgenden Mischfutterchargen (re-) kontaminieren. Die Entnahme von Staubproben an „Kontrollpunkten" entlang des Herstellungsprozesses von Mischfutter erscheint somit als ein probates Mittel für die Eigenkontrolle.

Weiters zeigen die Ergebnisse ein deutliches Winter-Sommer-Gefälle in der Häufigkeit des Auffindens von Salmonellen. Hier scheint gerade im Pelletierprozess das Verhältnis von Außentemperatur zu Pelletiertemperatur - im Hinblick auf eine mögliche Kondenswasserbildung - der entscheidende Faktor zu sein. Dies ist im Rahmen der Mischfutterherstellung gesondert zu berücksichtigen.

Die Entnahme von Staubproben in der Österreichischen Mischfutterproduktion zeigt insgesamt, dass häufig dieselben Serotypen in den Staubproben nachgewiesen wurden. Eine genauere Betrachtung lässt diese auf eine gemeinsame Kontaminationsquelle zurückzuführen. In der Österreichischen Mischfutterproduktion sind viele Hersteller gerade in der GVO-freien Produktion insbesonders bei Sojaschrot auf dieselben Lieferanten angewiesen. Im Falle positiver Lieferungen sind daher meist mehrere Betriebe gleichzeitig betroffen. Die verstärkte Analyse von Staubproben sollte neben der Durchführung von Rohwareneingangskontrollen zu rascheren Entscheidungen im Hinblick auf geeignete Maßnahmen zur Dekontamination führen.

Literatur

Allerberger, F. (2012). "Molecular Typing in Public Health Laboratories: From an Academic Indulgence to an Infection Control Imperative." J Prev Med Public Health 45 (1): 1-7.

Davies, R. H. and A. D. Wales (2010). "Investigations into Salmonella contamination in poultry feedmills in the United Kingdom." Journal of Applied Microbiology 109 (4): 1430-1440.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2014). "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses,ZoonoticAgents and Foodborne Outbreaks in 2012." EFSA Journal 12 (2): 312

EN ISO 6579:2002/A1 (2007). "Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonella spp. - Änderung 1: Anhang D: Nachweis von Salmonella spp. in Tierkot und in Umgebungsproben aus der Primärproduktion.".

RASFF Portal. (2014). "Notification list 2010-2013. Quelle: https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/." Retrieved 03.02.2014.

Ribot, E. M., M. A. Fair, R. Gautom, D. N. Cameron, S. B. Hunter, B. Swaminathan and T. J. Barrett (2006). "Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet " Foodborne Pathogens and Disease 3 (1): 59-67.

Whyte, P., K. McGill and J. D. Collins (2003). "A Survey of the prevalence of Salmonella and other enteric pathogens in a commercial poultry feed mill." Journal of Food Safety 23 (1): 13-24.

Wierup, M. and P. Häggblom (2010). "An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of salmonella contamination in pig production." Acta Veterinaria Scandinavica 52 (1): 15.

Autorenanschrift

Dr[in] Elisabeth Viktoria Reiter
Institut für Tierernährung und Futtermittel
AGES, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien
E-Mail: elisabeth.reiter@ages.at

Fakten über Mykotoxine

- Es gibt mehr als 500 verschiedene Mykotoxine.
- Tiere sind oft mehreren Toxinen gleichzeitig ausgesetzt.
- Interaktionen zwischen Mykotoxinen machen eine genaue Diagnose schwierig.
- Bereits eine geringe Dosis von Mykotoxinen im Futter kann über einen längeren Zeitraum hinweg zu negativen Einflüssen in der Produktivität und Fortpflanzung führen.

MYCOTOXIN
MANAGEMENT

Mit Mykotoxinen aufräumen!

Alltech®

Alltech (Deutschland) GmbH
Wiesenstr. 21 (W21) | 40549 Düsseldorf
Tel: +49 211 5066858-0 | Fax: +49 211 5066858-9
deutschland@alltech.com | Alltech.com/deutschland
AlltechNaturally @Alltech

Copyright, ©, 2013, Alltech. All rights reserved

Maskierte Mykotoxine in fermentierten Pflanzenmaterialien: mikrobiologische, biochemische und analytische Aspekte

Gerhard Strauß[1] und Christian Koch[2]

[1] LUFA, Speyer, aktuell: Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising, DE
[2] DLR Westpfalz, Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung Hofgut Neumühle, DE

Einleitung

Mykotoxine spielen im Hinblick auf die Qualität und Verwertbarkeit von Lebens- und Futtermitteln eine immer größere Rolle. Oft ist über diese sekundären Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen nichts oder nur sehr wenig hinsichtlich ihrer Wirkung auf Pflanze, Mensch oder Tier bekannt. Immer häufiger werden auch so genannte maskierte Mykotoxine gefunden, die sich durch biochemische Modifikationen mit klassischen Analysenverfahren kaum mehr nachweisen lassen. Die toxische Wirkung auf Organismen bleibt jedoch weit gehend erhalten bzw. wird sogar noch gesteigert. In der Routine-Diagnostik sind im Wesentlichen HPLC bzw. LC-MS/MS- sowie ELISA-Verfahren etabliert, wobei sich die Analytik auf Fusarientoxine wie Trichothecene, Fumonisine, Zearalenon oder Aspergillentoxine wie Aflatoxine und Ochratoxin A beschränkt.

In der Routine-Diagnostik und Forschungsprojekten zur Analytik von ausgewählten Mykotoxinen in Silagen mittels LC-MS/MS- und ELISA-Analytik wurden vielfach nicht unerhebliche und bisher nicht erklärbare Unterschiede in der Höhe der Belastung festgestellt (Strauß 2013; Koch et al. 2013). Bisher wurden diese auffälligen Diskrepanzen nicht näher untersucht.

Die Einbeziehung mikrobiologischer, biochemischer und analytischer Aspekte kann die Differenzen durch die Entstehung maskierter Mykotoxine in fermentierten Pflanzenmaterialien bei Getränken, Lebens- und Futtermitteln plausibel erklären.

Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden Silierversuche mit Silomais durchgeführt. Den Versuchssilagen wurde zu Beginn der Silierung Zearalenon zugegeben. Zum Zeitpunkt 0 (Einsilierung), 2 Wochen, 4 Wochen und 6 Wochen nach Inkubation wurden Proben zur Analyse des Zearalenons entnommen. Die Analysen des genannten Mykotoxins erfolgte mittels LC-MS/MS-Verfahren gem. VDLUFA-Methode (VDLUFA, 2011). Untersuchungen mittels ELISA wurden mit handelsüblichen Testkits der Fa. R-biopharm (Darmstadt) durchgeführt. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Inkubation der Testansätze erfolgte bei Raumtemperatur bis zu 10 (Reaktionsversuch) bzw. 42 Tage (Silierversuch).

Das Zearalenon wurde von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Ergebnisse

Die Beobachtung der Metabolisierung von Zearalenon wurde mit zerkleinerten Maispflanzen im Labormaßstab in Kleinstmengen durchgeführt. Die Fermentation/Silierung wurde durch die pH-Wert-Absenkung kontrolliert und nachgewiesen (Abbildung 1). Der pH-Wert sank von anfänglich 5,6 auf 4,5 nach 6 Wochen.

Die anfängliche Zearalenonkonzentration von 300 µg/kg TM blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum von 6 Wochen konstant, sofern diese mittels ELISA-Verfahren bestimmt wurde. In den gleichen Testansätzen bzw. Extrakten ergab sich eine Abnahme der Zearalenonkonzentration um 40 % (Abbildung 1) bei Bestimmung des Zearalenons über das LC-MS/MS-Verfahren. Diese Versuche zeigen, dass über den Versuchszeitraum von 6 Wochen zeitabhängige messbare Differenzen beim LC-MS/MS-Verfahren auftreten. Die Messwerte beim ELISA-Verfahren bleiben während des Untersuchungszeitraums im Wesentlichen konstant. Die bisherigen Versuche veranschaulichen damit, dass unter säurehaltigen Inkubationsbedingungen im Hinblick auf den bestimmbaren Mykotoxingehalt eine Abhängigkeit von der Inkubationsdauer, dem angewandten Analysenverfahren und den Inkubationsbedingungen feststellbar ist.

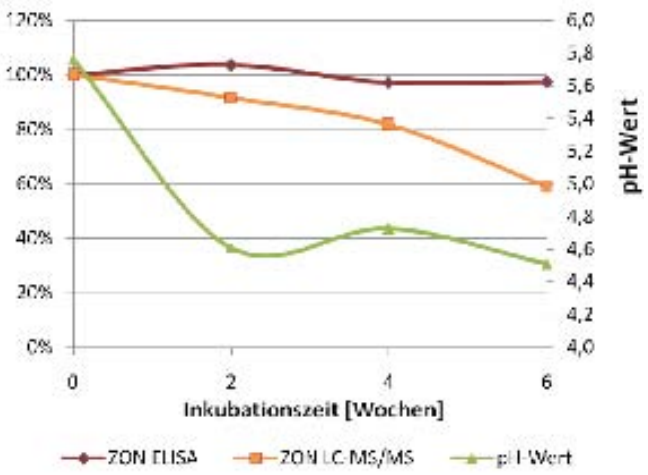


Abbildung 1: Prozentuale Veränderung des messbaren Mykotoxingehalts bezogen auf den Anfangswert in einem Silierversuch mit Maispflanzen. Die mittels ELISA- bzw. LC-MS/MS-Verfahren messbaren Konzentrationen an Zearalenon entwickelten sich im Versuchszeitraum unterschiedlich. Nach 6 Wochen Inkubation sank der Messwert für Zearalenon bei der LC-MS/MS-Analyse um 40 %. Der ELISA-Messwert veränderte sich unwesentlich.

Diskussion

In früheren Untersuchungen von silierten Futtermitteln (Gras- und Maissilagen) wurden erhebliche Unterschiede bei typischen Leittoxinen festgestellt (Koch et al. 2013), je nachdem ob das LC-MS/MS- oder das ELISA-Verfahren angewendet wurde (Abbildung 2). Insbesondere für Zearalenon ergaben sich signifikante Differenzen. Die aktuellen Ergebnisse decken sich damit mit Daten, die unter Praxisbedingungen gewonnen wurden.

Bei unfermentierten Produkten waren diese Unterschiede nicht feststellbar. Hier lagen die Messergebnisse von Maisprodukten bei den unterschiedlichen Analysenverfahren sehr vergleichbar (Strauß, 2013).

Der Vergleich fermentierter und unfermentierter Matrices offenbart, dass mikrobiologisch bedingte Prozesse für die analytischen Differenzen verantwortlich sein könnten (Abbildung 2). Primär entstehen durch die anaerobe Umsetzung von organischen Verbindungen Gärprodukte wie Alkohole und Gärsäuren, die unter biochemischen Gesichtspunkten reaktive funktionelle Gruppen tragen. Hydroxy- und Carboxygruppen können insbesondere Esterverbindungen eingehen. Da annähernd alle Mykotoxine in Seitenketten ebenfalls funktionelle Gruppen aufweisen, stehen sie somit als Reaktionspartner zur Verfügung. Die Konzentration dieser reaktiven Verbindungen verändert sich im Laufe der Fermentation

signifikant und können hohe Gehalte in Silagen erreichen: Allein der Anteil an Milchsäure in einer Maissilage kann mehr als 5 % bezogen auf die Trockenmasse ausmachen.

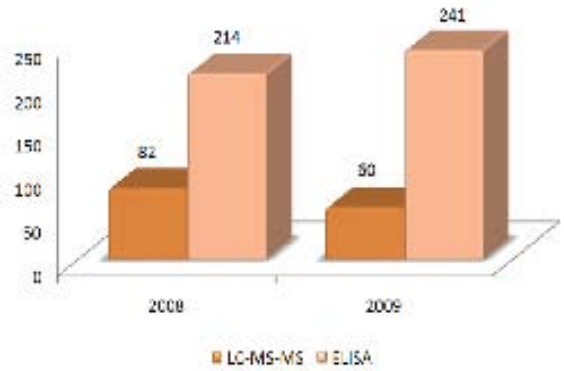


Abbildung 2: In Maissilagen mittels ELISA- bzw. LC-MS/MS-Verfahren bestimmte Mykotoxingehalte. Bei Zearalenon wurden mittels ELISA-Analytik signifikant höhere Gehalte gemessen (µg/kg Trockenmasse). Die Diskrepanzen lassen sich durch die Maskierung von Mykotoxinen erklären, die die Analytik unterschiedlich beeinflusst.

$$A + B \leftrightarrow C + D \qquad \frac{c(C)\ c(D)}{c(A)\ c(B)} = K$$

$$\Delta G° = - RT\ln K$$

Abbildung 3: Massenwirkungsgesetz. Bei der Umsetzung der Edukte A und B zu den Produkten C und D wird ein Gleichgewicht erreicht, das umso weiter auf Seiten der Produkte C und D liegt, je größer die Gleichgewichtskonstante K ist. (ΔG°= freie Energie, R = allgemeine Gaskonstante, T = absolute Temperatur)

Das Massenwirkungsgesetz (MWG, Abbildung 3) verlangt unter diesen Bedingungen, dass eine Gleichgewichtseinstellung zwischen chemischen Reaktionspartnern stattfindet (Abbildung 4), so sollten Carboxygruppen mit Hydroxygruppen zu Esterverbindungen reagieren. Da es auf Grund der Fermentation einen sehr hohen Überschuss an Carboxygruppen gibt, muss entsprechend dem MWG das Gleichgewicht sehr weit auf Seiten der Ester verschoben werden. In der Praxis bedeutet dies, dass die Hydroxygruppen von Mykotoxinen oder anderen Verbindungen verestert werden. Hier liefert der saure pH-Wert die besten Reaktionsbedingungen (Säurekatalyse). Ausreichend Reaktionszeit ist bei Fermentationsprozessen (z.B. Silierprozesse) gegeben.

Tatsächlich wurden von Weiß et al. (2011) hohe Konzentrationen an flüchtigen Esterverbindungen (z.B. Ethylacetat oder Ethyllactat) gefunden, deren Entstehung bisher nicht geklärt werden konnte.

Auch für die Mikroorganismen hat die Veresterung ihrer Stoffwechselprodukte einen elementaren Vorteil: die Anhäufung dieser Gärprodukte hemmt die Energiegewinnung ihres Gärstoffwechsel, da es zu einer Gleichgewichtseinstellung kommt. Dadurch dass die Gärsäuren aus dem Gleichgewicht entzogen werden, können diese energieliefernden Prozesse effizienter ablaufen. Zudem sind hohe Konzentrationen an Enzymen (Esterasen), also Biokatalysatoren, aus lysierten pflanzlichen Zellen oder bakteriellen Ursprungs vorhanden. Durch die Veresterung kann auch der Ansäuerung des Substrats entgegenge-

wirkt werden, die auch für säuretolerante gärende Mikroorganismen letztendlich zu einer Wachstumshemmung führt.

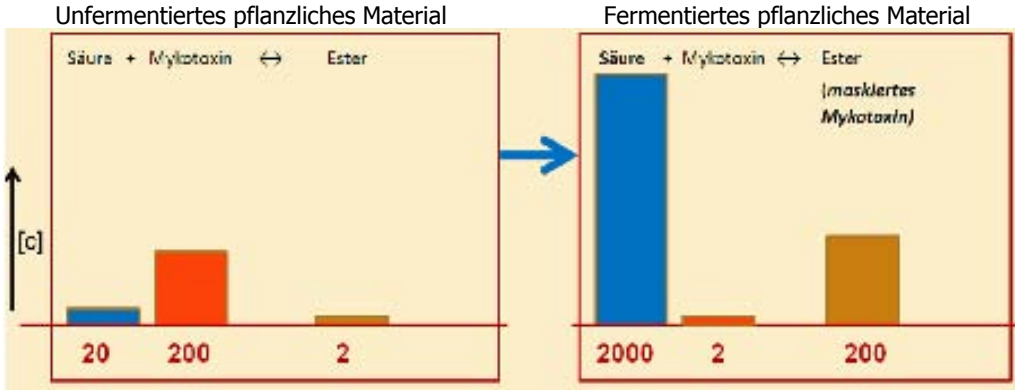


Abbildung 4: Veranschaulichung zur Wirkung des Massenwirkungsgesetzes bei der Maskierung von Mykotoxine während der Fermentation. Die Silierung mit der Anhäufung von Gärsäuren verschiebt das Gleichgewicht auf Seite der Ester: Es kommt zur obligaten Bildung maskierter Mykotoxine, da Reaktionspartner, Reaktionszeit, Katalysatoren und pH-Wert geeignete Bedingungen schaffen. Anmerkung: es handelt sich um willkürliche Zahlenangaben.

Als Schlussfolgerungen ergibt sich Folgendes: In fermentierten Lebensmitteln oder Futtermitteln, bei denen in den Ausgangsprodukten oder durch Fehlgärungen Toxine von Bakterien, Pflanzen oder Mykotoxine vorhanden waren, besteht durch Umsetzungen (Metabolisierung) mit Gärprodukten die Möglichkeit, dass diese Substanzen einer Analytik im Rahmen der Routine-Diagnostik entzogen werden (Berthiller et al., 2013). Hier könnten insbesondere Ester aus Gärprodukten und Toxine vermehrt auftreten. Im tierischen Organismus können diese Esterverbindungen durch entsprechende Enzyme wieder gespalten werden und eine physiologische Wirkung ausüben. Von veresterten Trichothecenen gibt es Hinweise, dass die Toxizität in Abhängigkeit von der Anzahl der Esterbindungen sogar zunimmt (Nishie et al., 1989).

Die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes postuliert, dass in diesen fermentierten Produkten praktisch umfangreiche biochemische Modifikationen an allen organischen Verbindungen stattfinden, die entsprechende funktionelle Gruppen tragen. Diese mikrobiologischen, biochemischen und analytischen Aspekte sollten bei der Bewertung fermentierter oder säurekonservierter Lebens- und Futtermittel mit einfließen. Die Vielfalt an möglichen Konjugaten muss in Anbetracht der Vielzahl an Gärprodukten als hoch angesehen werden.

Diese neuen Erkenntnisse können letztendlich mit der Bildung von Estern plausibel die auffälligen analytischen Diskrepanzen erklären und verbessern die Möglichkeiten der toxikologischen Bewertung von Analysenergebnissen insbesondere bei fermentierten Lebens- und Futtermitteln sowie Getränken im Hinblick auf möglicherweise vorhandene Mykotoxine bzw. deren Metabolite.

Literatur

Berthiller, F., Crews, C., Dall`Asta, C., Saeger, S., Haesert, G., Karlovsky, P., Oswald, I., Seefelder, W., Speijers, G., Stroka, J., 2013. Masked Mycotoxins – A review. Mol Nutr Food Res. 57(1): 165-186

Koch C, Romberg FJ, Kühl J, Strauß G (2013) Mykotoxingehalte von Mais- und Grassilagen - Ein Vergleich von zwei Analyseverfahren. Mais 2: 89-91

Nishie, K., Cutler, H.G., Cole, R.J., 1989. Toxicity of Trichothecenes, Moniliformin, Zearalenone / ol, Griseofulvin, Patulin, Pr Toxin and Rubratoxin B on Protozoan Tetrahymena pyriformis. Res Commun Chem Pathol Pharm 65: 197-210

Strauß, G., 2013: Maskierte Mykotoxine in fermentierten Lebens- und Futtermitteln: biochemische, mikrobiologische und analytische Aspekte. J Verbr Lebensm, im Druck

Weiss, K., Gerlach, K., Südekum, K.-H. 2011: Flüchtige Substanzen in Maissilagen in Abhängigkeit von Silierbedingungen und aerober Lagerungsdauer. Proceedings 123. VDLUFA- Kongress, 13.9. bis 16.9.2011, Speyer, 534 -540

Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) (Hrsg.), 2011: Methode 16.13.1, Identifizierung und Quantifizierung von Fusarientoxinen in Getreide und Futtermitteln mittels LC-MS/MS. In: Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Bd. III Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, 3. Aufl., VDLUFA-Verlag, Darmstadt.

Autorenanschrift

Gerhard Strauß
Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen
Landesanstalt für Landwirtschaft
Lange Point 4, 85354 Freising
E-Mail: gerhard.strauss@lfl.bayern.de

Feeding low protein diets magnified the deoxynivalenol toxicity in broiler chickens

Wageha Awad[1,2], Khaled Ghareeb[2,3], Michael Hess[1] and Josef Böhm[3]

[1] Clinic for Poultry and Fish Medicine, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, AT
[2] Department of Animal hygiene, Behaviour and Management, Faculty of Veterinary Medicine, South Valley University, Qena, EG
[3] Institute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, AT

Abstract

Deoxynivalenol (DON) is a common contaminant of poultry feed. Because mycotoxin production depends on environmental conditions such as temperature and humidity, DON contamination cannot be avoided completely. Consequently, exposure of human and farm animals including poultry to DON is a permanent health risk assessment issue. It was shown that poultry have less sensitivity to feed refusal than pigs. Although acute mycotoxicoses are rare in poultry production, chronic exposure to low levels of mycotoxins is responsible for reduced productivity, altered immunity and increased susceptibility to infectious diseases. In general, trichothecenes are well absorbed from the digestive tract after which they are widely distributed in many tissues and organs. Deoxynivalenol intoxication results in cytotoxicity and inhibition of protein synthesis, lesions of the gastrointestinal tract, bone marrow and lymphoid tissues as well as kidney and heart lesions. Adverse effects of mycotoxins on cells are also associated with the increased production of free radicals and reactive oxygen species resulting in oxidative damage of target tissues. There is a very delicate balance between antioxidants and pro-oxidants in the body of young chickens. Nutritional stress factors can disrupt the antioxidant/pro-oxidant balance. Additionally, many authors have suggested that DON -induced free radical production may be one of the mechanisms causing membrane and DNA damage. In pervious study, it was shown that DON caused DNA fragmentation in chicken spleen leukocytes. Recently, it was shown that the level of dietary protein showed no effect on lymphocyte number in broiler chickens. Accordingly, the aim of the present research was to study the effect of DON (10 mg/kg diet) on lymphocyte DNA fragmentation in broilers fed the normal (19 %) or low-protein (15 %) diets in the grower period. It was found that deoxynivalenol increased the amount of DNA damage in chicken lymphocytes by 40.37% in low protein diet compared with the normal protein by 31.99%. Furthermore, Feeding of contaminated low protein diets decreased the feed intake, body weight, body weight gain and feed efficiency during the grower phase. From the results it can be concluded that the toxicity of DON were more severe in chickens when fed a low protein diets than when fed a normal protein diets. The enhancement of the effect of DON in diet deficient in protein might be the result of a decrease in the minimum effective dose and a greater slope for the response curve. Finally, the results indicate that blends of feed ingredients contaminated with Fusarium mycotoxin DON should not be fed to broiler chickens because of the possible adverse effects on performance and immune status. Moreover, under field conditions with additional factors, such as low-protein diets, the toxicity of DON could be exaggerated and thus might adversely affect the health and performance of poultry.

Corresponding author

Wageha Awad, PhD.
Clinic for Poultry and Fish Medicine
Department for Farm Animals and Veterinary Public Health
University of Veterinary Medicine
A-1210 Vienna
E-mail: wageha.awad@vetmeduni.ac.at

Deoxynivalenol in chicken feed induces lipid peroxidation and oxidiative stress of jejunal cells

Khaled Ghareeb[1,2], Wageha A. Awad[2,3] and Josef Böhm[1]

[1] Institute of Animal Nutrition and Functional plant compounds, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, AT

[2] Department of Animal Hygiene, Poultry and environment and department of Animal Behaviour and management, Faculty of Veterinary Medicine, South Valley University Qena, EG

[3] Clinic for Avian, Reptile and Fish Medicine, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, AT

Abstract

Deoxynivalenol (DON) is a trichothecene mycotoxin and commonly contaminates poultry feeds. Oral exposure of deoxynivalenol was shown to alter the structure and function of chicken intestines as a consequence for the effects of DON on the protein synthesis and nutrient transporters expression. DON may induce lipid peroxidation and consequently affects cellular membrane integrity and induces metabolic disturbances in animals. Therefore lipid peroxidation can be one indicator for cellular damage in the toxicity of DON mycotoxin. Consequently it becomes important to characterize the capability of DON to induce oxidative stress. For this purpose, a total of 20 one day male broiler chicks were divided into 2 groups depending on the dietary treatment as follow: 1- control group (10 birds) received basal feeds and 2- DON group (10 birds) received basal feeds contaminated with 10 mg DON/kg of feeds At the end of feeding trial, all birds were slaughtered and intestinal segments from duodenum and jejunum were collected. The concentrations of TBARS were measured by ELISA kits. The results showed that, TBARS levels in duodenal tissue did not show significant changes between control group and DON group. However, TBARS in jejunal tissue was increased ($P < 0.05$) after chronic exposure to DON, suggesting that jejunum is the target for DON toxicity.

In conclusion, oxidative stress of jejunal mucosa can be one of the important mechanisms of the pathogenesis of chronic DON intoxication.

Introduction

Deoxynivalenol (DON) is an unavoidable and a common contaminant of poultry feed. It is mainly produced by *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and frequently occurred in cereals and grains. It is known that the tissues with a high protein turnover such as the gastrointestinal tract and immune cells are highly sensitive to DON. One of the important possible adverse impacts of mycotoxin is the higher production of free radicals and reactive oxygen species leading to oxidative cell damage (Dvorska et al., 2007).

Lipid peroxidation and oxidative stress can be one indicator for cellular damage in the toxicity of DON mycotoxin. The biomolecules such as nucleic acids, proteins, and lipids are the main targets of oxidative damage (Gutteridge et al., 1990). It was shown that trichothecences produced lipid peroxidation and consequently affected cellular membrane integrity and resulted in metabolic disturbances in animals (Minervini et al., 2004).

Therefore, the current study was conducted to evaluate the effects of chronic DON intoxication in broilers on the level of TBARS in the intestines of broilers.

Materials and methods

Birds and Diets

Control birds were fed with uncontaminated basal feed and DON group fed basal diet contaminated with 10 mg DON/kg feed. The birds of each group (1 d old) were fed for 5 weeks.

Meaurment of TBARS

TBARS in duodenum and jejunum were measured by ELISA kits (Feldman, 2004).

Statistical analysis

Statistical program SPSS (version 17; SPSS GmbH, SPSS Inc., Munich, Germany) was used for data analysis. T-test was used to find the significance between means of dietary treatments. The probability values of 0.05 ($p \leq 0.05$) were considered significant.

Results and discussion

TBARS levels in duodenum did not differ between control and DON group ($P > 0.05$). This result is online with Placha et al. (2009) who found that diet contaminated with DON (3 mg/kg) did not influence the level of malondialdehyde (MDA) in duodenal tissue of broilers.

However, TBARS of jejunal tissue was increased ($P < 0.05$) in DON group compared with control birds (23 nmol/mg and 19 nmol/mg respectively). These results indicate that the jejunal mucosa is more sensitive for the oxidative stress produced by DON toxicity. Similar results are obtained in broilers when fed with diet contaminated with DON which resulted in a compromised the blood phagocytic activity (Borutova et al., 2008). Moreover, DON elevated the level of MDA, a biomarker of lipid peroxidation in human intestinal Caco-2 cells (Kouadio et al., 2005).

Intestine is a complex barrier that can regulate the absorption of nutrients and can exclude most lumen pathogens and toxins (Ghareeb et al., 2012). Previous reports showed that DON can change the intestinal histomorphology (Awad et al., 2011; Kolf-Clauw et al., 2009) and reduced absorption of nutrients (Awad et al., 2004; 2007; 2008; 2011). These effects on the jejunal mucosa can be a consequence of oxidative stress produced by DON in jejunal tissue. However, these effects were not verified in the current experiment. Therefore, further research is required to investigate the impacts of DON on gut functions in correlation with DON ability to induce lipidperoxidation and oxidative stress in chickens.

In conclusion, DON in chicken feed resulted in lipid-peroxidation and oxidative stress in jejunum of broilers suggesting that jejunal tissue may be the main target for DON.

Acknowledgment

This work received financial support from BIOMIN Holding GmbH, Herzogenburg, Austria. The authors thank Mrs. Anita Dockner (Institute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds) for her technical assistance.

References

Awad, W. A., J. Böhm, E. Razzazi-Fazeli, H. W. Hulan, J. Zentek. 2004. Effects of deoxynivalenol on general performance and electrophysiological properties of intestinal mucosa of broiler chickens. Poult. Sci. 83:1964-1972.

Awad, W. A., E. Razzazi-Fazeli, J. Böhm, J. Zentek. 2007. Influence of deoxynivalenol on the D-glucose transport across the isolated epithelium of different intestinal segments of laying hens. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 91:175-180.

Awad, W. A., E. Razzazi-Fazeli, J. Bohm, J. Zentek. 2008. Effects of B- trichothecenes on luminal glucose transport across the isolated jejunal epithelium of broiler chickens. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 92:225-230.

Awad, W. A., W., Vahjen, J. R., Aschenbach, J. Zentek. 2011. A diet naturally contaminated with the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol down regulates gene Expression of glucose transporters in the intestine of broiler chickens. Livestock Science 140, 72-79.

Borutova, R., S. Faix, I. Plachaa, L. Gresakovaa, K. Cobanovaa, L. Lenga. 2008. Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and blood phagocytic activity in broilers. Arch Anim Nutr 62: 303-312.

Dvorska, J. E.,, A. C. Pappas, F. Karadas, B. K. Speake, P. F. Surai. 2007. Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 145: 582-587.

Feldman, E. 2004. Animal models of diabetic complications consortium (AMDCC protocols); Thiobarbituric acid reactive substances (TNARS) Assay. http://www.amdcc.org/shared/showFile.aspx?doctypeid=3&docid=33

Ghareeb, K., W. A., Awad, M. Mohnl, R., Porta, M., Biarnés, J., Böhm, G., Schatzmayr. 2012. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of Campylobacter jejuni in broiler chickens. Poultry Science 91, 1825–1832.

Gutteridge, J. M. C., B. Halliwell. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 15:129–135.

Kolf-Clauw, M., J., Castellote, B., Joly, N., Bourges-Albellaß, I., Raymond-Letron, P., Pinton, I. P., Oswald. 2009. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynialenol: histopathological analysis. Toxicology *In Vitro* 23, 1580-1584.

Kouadio, J. H., T. A. Mobio, I., Baudrimont, S.,Moukha, S. D. Dano, E. E. Creppy. 2005. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. Toxicology 213: 56-65.

Minervini, F., F. Fornelli, G. Lucivero, C. Romano, A. Visconti.2005. T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines. Toxicology 210: 81-91.

Placha, I., R. Borutova, L. Gresakova, V. Petrovic, S. Faix. 2009. Effects of excessive selenium supplementation to diet contaminated with deoxynivalenol on blood phagocytic activity and antioxidative status of broilers. J Anim Physiol Anim Nutr 93: 695–702.

Corresponding author

Prof. Josef Böhm
University of Veterinary Medicine Vienna (Vetmeduni),
Department for Farm Animals and Veterinary Public Health,
Institute of Animal Nutrition and Functional plant compounds
Veterinärplatz 1, A-1210 Vienna
E-mail: josef.boehm@vetmeduni.ac.at

Fumonisin und Fumonisin-Derivate bei Ratten: Einfluss auf die Darmarchitektur, Becherzellenhäufigkeit und Apoptoseneigung

Christa Steindl[1], Veronika Nagl[2], Irene Hahn[2], Franz Berthiller[2] und Christiane Schwarz[1]

[1] Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), AT

[2] Christian Doppler Labor für Mykotoxin-Metabolismus und Analytikzentrum, Dept. IFA-Tulln, BOKU, AT

Einleitung

Mykotoxine sind giftige Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen (Bartles und Rodemann 2003) und kommen in Futter- und Nahrungsmitteln vor. Sie können bereits in kleinen Mengen bei Mensch und Tier zu Vergiftungen führen (Kück et al. 2009). Dabei ist jedoch die Wirkung und chemische Struktur von Mykotoxinen sehr unterschiedlich (Bartles und Rodemann 2003). Zurzeit sind zirka 400 chemisch definierte Mykotoxine bekannt, die von rund 250 Schimmelpilzarten gebildet werden. Diese Schimmelpilzarten sind meistens Vertreter der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* oder *Fusarium* (Kück et al. 2009). In der Landwirtschaft gemäßigter Zonen sind vor allem die Pilze aus der Gattung *Fusarium* bedeutsam und spielen vorwiegend bei Getreide und Mais eine große Rolle (Börner et al. 2009). Fumonisine, wie Fumonisin B_1 (FB_1) und Fumonisin B_2 (FB_2), zählen zu den Fusarientoxinen (Bartles und Rodemann 2003) und werden hauptsächlich von den Pilzstämmen *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirnberg und *Fusarium proliferatum* gebildet (Thiel et al. 1991, Voss et al. 2007). In Österreich zählt der Körnermais mit rund 189.000 ha Anbaufläche zu den wichtigsten Fruchtarten (BMLFUW 2013). Da Fumonisine vorwiegend in Mais und Maisprodukten vorkommen (Voss et al. 2007), sind die Auswirkungen von den unterschiedlichen Fumonisinen und deren Derivaten für die tierische und menschliche Gesundheit von großer Bedeutung.

FB_1 ist das am meisten verbreitete Fumonisin in der Natur. Es ist nicht nur kanzerogen und hemmt die Sphingolipid-Biosynthese, sondern hat zudem noch eine hepatotoxische und nephrotoxische Wirkung. Des Weiteren kann es unter anderem bei Pferden Leukoencephalomalazie hervorrufen, sowie Lungenödem (Humpf und Voss 2004) und Hydrothorax (Harrison et al. 1990) beim Schwein.

Beim Prozess der Herstellung von Futter- und Nahrungsmitteln können so genannte Fumonisin-Derivate entstehen, wie beispielsweise das hydrolysierte FB_1 (HFB_1) oder partiell hydrolysiertes FB_1 ($pHFB_1$) (Hartinger und Moll 2011). Wird FB_1 alkalisch behandelt (z.B. bei der Herstellung von Masa aus Mais), so kann HFB_1 entstehen. Dabei werden die Tricarbylsäure-Seitenketten von FB_1 abgespalten (Hartinger und Moll 2011). Bei der Umwandlung von FB_1 können auch Zwischenprodukte wie die beiden $pHFB_{1a}$ und $pHFB_{1b}$ entstehen (Heinl et al. 2010).

Neben der Hydrolyse können Fumonisine auch kovalente Bindungen mit Makromolekülen eingehen, man spricht dann von maskierten Mykotoxinen: Die Form von N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl) FB_1 (NDF-FB_1) wird durch die Reaktion von FB_1 mit reduzierenden Zuckern unter Hitzeeinfluss gebildet (z.B. in der Lebensmittelverarbeitung), wobei es hier zur Ausbildung einer Schiff'schen Base mit anschließender Amadori-Umlagerung kommt (Humpf und Voss 2004).

Obwohl sich die Schadwirkung der Fumonisine vor allem bei Leber und Niere manifestiert, konnte in vorangegangenen Studien mit Absetzferkeln oder der Ratte als Modelltier gezeigt werden, dass durch Verfütterung von Fumonisinen auch Veränderungen der Darmmucosa verzeichnet werden (Grenier et al. 2012, Gruber et al. 2013). Gruber et al. (2013) testeten die Wirkung von FB_1 und HFB_1 in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Darmarchitektur von Ratten. Aufbauend auf dem Versuch von Gruber et al. (2013), soll nun herausgefunden werden, ob neben FB_1 und HFB_1 auch die partiell hydrolysierte Form $pHFB_1$ und das maskierte Fumonisin NDF-FB_1 bei Veränderungen in der Darmmucosa beteiligt sind, nachdem es dazu noch keine Informationen in der verfügbaren Literatur gibt. Der Darm kann durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln bzw. Futtermitteln geschädigt werden (Bouhet et al. 2004). Dadurch kann eine Veränderung in der Darmmucosa und gegebenenfalls eine Änderung der Apoptoserate in den Zotten ausgelöst werden. In diesem Zusammenhang soll im vorliegenden Versuch auch auf die Anzahl der Becherzellen, sowie der apoptotischen Zellen im Darm der Ratte ein Focus gelegt werden.

Material und Methoden

Um zu analysieren, ob unterschiedliche Fumonisin-Derivate einen Einfluss auf den Rattendarm haben, wurde ein Fütterungsversuch (BMWF-66.016/0006-II/3b/2013) an 20 männlichen, fünf Wochen alten Sprague Dawley (Hsd: Spargue Dawley, Harlan Laboratories) Ratten durchgeführt. Zu Beginn wurden die Tiere gewogen, und anhand ihres Gewichtes gleichmäßig einer der fünf Gruppen zugeteilt (siehe Tabelle 1). Die Haltung erfolgte paarweise in Makrolon Typ III Käfigen, wobei vier Ratten immer dasselbe Futter erhielten.

Nach einer Akklimatisierungsphase von sieben Tagen mit mykotoxinfreiem Kontrollfutter bekamen die Tiere anschließend für drei Wochen das jeweilige Versuchsfutter *ad libitum* gefüttert. Neben einer mykotoxinfreien Kontrollgruppe wurden dabei je 13,9 µmol FB_1, $pHFB_1$, HFB_1 bzw. NDF-FB_1 je kg kommerziellem Rattenfutter in die Versuchsgruppen eingemischt.

Tabelle 1: Übersicht der Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	**n**	**Toxinkonzentration / kg Futter**
Kontrollgruppe	4	-
FB_1	4	13,9 µmol FB_1
$pHFB_1$	4	13,9 µmol $pHFB_1$a + $pHFB_1$b
HFB_1	4	13,9 µmol HFB_1
NDF-FB_1	4	13,9 µmol NDF-FB_1

Am Ende des Fütterungsversuches wurden die Ratten mittels Kohlendioxid euthanasiert. *Post mortem* erfolgte die Gewinnung von Jejunum (~ 25 cm oberhalb der Einmündung vom Ileum ins Colon), Ileum (~ 4 cm oberhalb der Einmündung vom Ileum ins Colon) und Colon (auf halber Höhe zwischen proximalem Colon und Rectum). Die Gewebeproben wurden mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und schließlich in einer 8 %igen Formalin-Lösung für 48 Stunden fixiert. Nun erfolgten die Entwässerung der Proben, sowie die Einbettung in Paraffin. Anschließend wurden mit dem Mikrotom 4 µm dicke Gewebeschnitte quer zur Längsachse angefertigt, die für die AB-PAS-Färbung (Alcianblau Periodic-Acid-Schiff Färbung) und die TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) Fluoreszenz-Färbung herangezogen wurden. Dazu wurden die Proben zuerst entparaffiniert und rehydratisiert.

Für die Analyse der Becherzellen wurde eine AB-PAS-Färbung durchgeführt. Dabei bewirkt das Alcianblau, dass die sauren Mukosubstanzen blau angefärbt werden (Weyrauch et al. 2009). Durch die Oxidation mit der Perjodsäure werden Aldehyde gebildet, welche schließlich mit dem Schiff-Reagenz nachweisbar sind (Schwarzacher und Schnedl 2005). Diese werden rot-violett eingefärbt. Durch die

Gegenfärbung von Hämalaunlösung nach Mayer, können die Zellkerne sichtbar gemacht werden (Welsch und Deller 2010).

Die TUNEL Methode wird für den spezifischen Nachweis von apoptotischen Zellen herangezogen. Das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL-System misst die fragmentierte DNA von apoptotischen Zellen (Promega Corporation 2009). Das rTDT Enzym (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, recombinant) hängt das fluoreszierende Fluorescein-12-dUTP an die 3´OH-Enden der DNA. Somit werden die Bruchstücke markiert, da ein polymerer Schwanz gebildet wurde (Gavrieli et al. 1992). Die TUNEL-Färbung wurde nur in den ilealen Proben durchgeführt.

Für die Vermessung der histologischen Schnitte wurde das Lichtmikroskop Leica DM6000 B (Leica, Darmstadt, Deutschland) mit ausgestatteter Kamera (Leica DFC319 FX) verwendet. Die Analyse der Bilder erfolgte durch das Software Programm Leica Application Suite (V3.5.0) (Leica, Darmstadt, Deutschland). Es wurden Zottenlänge, -breite, -fläche und -umfang im Jejunum und Ileum gemessen, sowie Kryptentiefe, -umfang und -fläche im Jejunum, Ileum und Colon. Des Weiteren wurde die Anzahl der blauen Becherzellen in den Zotten und Krypten ermittelt und auf einen definierten Zotten- bzw. Kryptenumfang bezogen. Die Anzahl an apopotischen Zellen je Zotte wurde auf die Zottenlänge bezogen.

Mit Hilfe des Computerprogrammes SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) erfolgte die statistische Auswertung der Daten. Mit der Prozedur UNIVARIATE erfolgte der Test auf Normalverteilung. Des Weiteren wurde mit der Prozedur GLM eine einfache Varianzanalyse durchgeführt. Der Mittelwertvergleich erfolgte nach Tukey-Kramer. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug $\alpha = 0{,}05$.

Ergebnisse

In den Tabellen 2 bis 4 sind die Resultate der histologischen Analysen im Dünn- und Dickdarm der Spargue Dawley Ratten zusammengefasst. Im Jejunum und Ileum konnten keine signifikanten Veränderungen in der Zottenlänge, Zottenbreite, Zottenfläche und dem Zottenumfang, bezogen auf das eingesetzte Fumonisin, festgestellt werden. Des Weiteren unterschied sich auch das Verhältnis Zottenlänge zu Kryptentiefe nicht zwischen den Versuchsgruppen. In keinem der drei Darmabschnitte wurde eine Signifikanz in der Kryptentiefe und dem Kryptenumfang erfasst. Auch in den gezählten blauen Becherzellen je 100 µm Zottenumfang bzw. Kryptenumfang konnten keine signifikanten Ergebnisse beobachtet werden. Des Weiteren hatte die Fütterung von Fumonisinen keinen statistisch beschreibbaren Einfluss auf die Anzahl an apoptotischen Zellen je Zottenlänge im Ileum.

Tabelle 2: Histometrische Ergebnisse der Wirkung von Fumonisin und dessen Derivate im Jejunum

JEJUNUM	**Kon[1]**	**FB_1**	**$pHFB_1$**	**HFB_1**	**NDF-FB_1**	**SEM**	**p-Wert**
Zottenlänge [µm]	577	553	561	555	601	12	n.s.
Zottenbreite [µm]	126	116	121	127	137	4	n.s.
Zottenfläche [μm^2]	42300	35100	37400	35900	45300	1700	n.s.
Zottenumfang [µm]	907	899	863	841	980	23	n.s.
Becherzellen je 100 µm Zottenumfang	3,40	3,06	3,17	2,92	2,76	0,13	n.s.
Kryptentiefe [µm]	141	123	130	127	128	3	n.s.
Kryptenfläche [μm^2]	5070	4410	4960	4880	4440	170	n.s.
Kryptenumfang [µm]	331	303	314	308	306	6	n.s.
Becherzellen je 100 µm Kryptenumfang	6,77	5,93	6,32	6,42	5,54	0,25	n.s.
Zottenlänge /Kryptentiefe Verhältnis	4,12	4,54	4,35	4,41	4,74	0,14	n.s.

[1] Kontrolle; n.s. nicht signifikant ($p > 0{,}10$)

Tabelle 3: Histometrische Ergebnisse der Wirkung von Fumonisin und dessen Derivate im Ileum

ILEUM	Kon[1]	FB_1	$pHFB_1$	HFB_1	$NDF\text{-}FB_1$	SEM	p-Wert
Zottenlänge [µm]	585	545	517	531	544	13	n.s.
Zottenbreite [µm]	145	140	157	121	156	7	n.s.
Zottenfläche [μm^2]	37200	36500	32800	32300	43200	2500	n.s.
Zottenumfang [µm]	774	786	693	762	839	22	n.s.
Becherzellen je 100 µm Zottenumfang	4,26	3,86	4,07	3,69	3,58	0,13	n.s.
Kryptentiefe [µm]	184	152	162	161	160	5	n.s.
Kryptenfläche [μm^2]	8000^{a}	6230^{ab}	6910^{ab}	5860^{b}	6450^{ab}	250	*
Kryptenumfang [µm]	432	364	391	371	376	9	n.s.
Becherzellen je 100 µm Kryptenumfang	6,79	6,05	7,29	6,73	6,87	0,22	n.s.
Zottenlänge /Kryptentiefe Verhältnis	3,18	3,58	3,21	3,37	3,41	0,07	n.s.
apoptotische Zellen je 300 µm Zottenlänge	1,67	2,16	2,91	2,34	3,13	0,21	n.s.

[1] Kontrolle; *signifikant ($p < 0,05$); n.s. nicht signifikant ($p > 0,10$); Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p<0,05$)

Tabelle 4: Histometrische Ergebnisse der Wirkung von Fumonisin und dessen Derivate im Colon

COLON	Kon[1]	FB_1	$pHFB_1$	HFB_1	$NDF\text{-}FB_1$	SEM	p-Wert
Kryptentiefe [µm]	295	248	266	258	266	6	n.s.
Kryptenfläche [μm^2]	10760	9360	9650	9700	9140	280	n.s.
Kryptenumfang [µm]	672	584	615	587	601	12	n.s.
Becherzellen je 100 µm Kryptenumfang	5,94	6,45	5,91	6,55	6,05	0,12	n.s.

[1] Kontrolle; n.s. nicht signifikant ($p > 0,10$)

Die durchschnittliche Kryptenfläche in der Kontrollgruppe war signifikant größer als die Kryptenfläche der HFB_1-Gruppe, wohingegen bei FB_1 nur ein tendenzieller Unterschied zur Kontrolle beobachtet wurde ($p<0,10$; siehe Tabelle 3). In Jejunum und Colon wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede für den Parameter Kryptenfläche verzeichnet (siehe Tabelle 2 und Tabelle 4).

Diskussion

Der Versuch von Gruber et al. (2013) untersuchte die Wirkung von FB_1 und HFB_1 in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Darmmorphologie bei Ratten. In einer vierwöchigen Fütterungsstudie wurde dabei eine Kontrolle ohne Fumonisinzusatz gegen FB_1 bzw. HFB_1 niedrig (13,9 µmol/kg) und hoch (69,3 µmol/kg) konzentriert getestet. Auch Gruber et al. (2013) haben Veränderungen in der Kryptenmorphologie beobachtet: Dabei führte das niedrig konzentrierte FB_1 zu tieferen und das höher dosierte FB_1 zu kürzeren Krypten im Jejunum, wohingegen HFB_1 das Gegenteil bewirkte. Signifikante Veränderungen im Bezug auf die Krypten im Jejunum wurden im vorliegenden Versuch nicht detektiert. Allgemein konnte jedoch durch Zusatz der verschiedenen Fumonisine eine Verkürzung der jejunalen Krypten beobachtet werden (Kontrast gegen Kontrolle, $p<0,10$).

Darüber hinaus beobachteten Gruber et al. (2013) signifikant tiefere Krypten in den HFB_1-Gruppen und nummerisch kürzere Krypten bei FB_1-Fütterung im Ileum. Eine Vertiefung der Krypten konnte im vorliegenden Versuch nicht festgestellt werden, es kam generell zu einer Reduktion von Kryptentiefe, -fläche und -umfang im Ileum durch Zusatz der verschiedenen Fumonisin-Derivate (Kontrast gegen Kontrolle, $p<0,05$). Diese Veränderung war in der HFB_1-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle im Bezug auf die Kryptenfläche auch signifikant. Ebenfalls konnte diese Reduktion durch Fumonisin-Einsatz auch im Colon bei der Kryptentiefe und dem -umfang beobachtet werden (Kontrast gegen Kontrolle, $p<0,05$).

Des Weiteren wurde ein höheres V/C Verhältnis im Ileum bei Gruber et al. (2013) in der FB_1-Gruppe als in der Kontrollgruppe festgestellt. Demgegenüber konnte in der Studie von Rauber et al. (2013)

eine signifikante Reduktion im V/C Verhältnis im Jejunum (Konz. 200 mg/kg), festgestellt werden. Rauber et al. untersuchten den Einfluss von FB_1 in drei Konzentrationen (0, 100, 200 mg/kg Futter) für 28 Tage, unter anderem auf die morphologische Entwicklung des Dünndarms in männlichen Broilern. In Übereinstimmung mit Gruber et al. (2013) konnte in unserem Versuch ein nummerisch höheres Verhältnis Zottenlänge zu Kryptentiefe im Ileum bei der FB_1-Gruppe verzeichnet werden. Im Gegensatz zur Studie von Rauber et al. (2013) wurden auch im Jejunum, in den mit Fumonisin versetzten Versuchsgruppen, nummerisch höhere Werte als in der Kontrollgruppe errechnet. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Konzentrationen in unserer Studie mit 10 mg FB_1 /kg Futter deutlich geringer als in der Vergleichsstudie ausfielen.

Auch der Einfluss auf die Zottenlänge wurde bei Rauber et al. (2013) untersucht. Es wurde beobachtet, dass es zu einer signifikanten Reduktion der Zottenlänge im Jejunum, bei der eingesetzten Konzentration von 200 mg/kg Futter, kam. In der Studie von Grenier et al. (2012) wurde FB_1 und HFB_1 im Dünndarm von vier Wochen alten, weiblichen Ferkel getestet. Über 14 Tage bekamen die Tiere entweder Kontrollfutter, 2,8 µmol FB_1/kg Körpergewicht oder 2,8 µmol HFB_1/kg Körpergewicht zugeführt. Es wurde herausgefunden, dass nur FB_1 die Zottenlänge im Dünndarm signifikant reduzierte (-20% im mittleren; -31% im distalen). HFB_1 hatte keine signifikante Wirkung auf die Zottenlänge. Die Auswirkung von FB_1 und Deoxynivalenol (DON), sowie deren Kombination auf die Zottenlänge wurde von Basso et al. (2013) *ex vivo* in fünf Ferkeln beobachtet. Dabei wurden die Tiere nach 24 Tagen euthanasiert und die Gewebeproben entnommen. Das Jejunum wurde anschließend bei 37 °C mit FB_1 (100 µM), DON (10 µM) und FB_1+DON (100 µM + 10 µM) für vier Stunden inkubiert. Von jedem Tier wurden 24 Proben für die histologische Analyse herangezogen. Es konnte eine Reduktion in der Zottenlänge bei DON und FB_1+DON festgestellt werden. In unserer Studie konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zottenlänge weder im Jejunum noch im Ileum erfasst werden. In der NDF-FB_1-Gruppe wurde eine nummerisch längere Zotte im Jejunum als in der Kontrollgruppe und in den anderen Versuchsgruppen beobachtet werden. Es ist jedoch anzumerken, dass im Gegensatz zu den Vergleichsstudien in unserer Studie mit 13,9 µmol/kg Futter deutlich geringere Konzentrationen an FB_1 und dessen Derivate verfüttert wurden.

Basso et al. (2013) beobachteten des Weiteren, dass die Zahl der Becherzellen in der Kontrollgruppe signifikant höher war als in FB_1, DON und FB_1+DON. Im angeführten Versuch konnte lediglich eine nummerisch höhere Anzahl der blauen Becherzellen je Zottenumfang in der Kontrollgruppe im Jejunum beobachtet werden ($p>0,05$).

Betrachtet man den Einsatz von $pHFB_1$ und NDF-FB_1, so wird die Darmmucosa, sowie die Anzahl der blauen Becherzellen von Ratten nicht signifikant beeinflusst. Im Ileum hingegen konnten nummerisch mehr Becherzellen in den Versuchsgruppen $pHFB_1$ und NDF-FB_1 gezählt werden.

Die Fütterung von Fumonisin B_1 und dessen Derivaten hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl an apoptotischen Zellen in den ilealen Zotten. Nichtsdestotrotz zeigte der Kontrast aller Versuchsgruppen gegen die Kontrolle eine tendenziell höhere Apoptoseneigung ($p<0,10$).

Schlussfolgerungen

Das Fumonisin FB_1, die hydrolysierten Derivate $pHFB_1$ und HFB_1 sowie das maskierte Mykotoxin NDF-FB_1 weisen im vorliegenden Versuch keine signifikanten Einflüsse auf die Zottenmorphologie im Dünndarm auf. Generell ist eine Reduktion der Kryptenausprägung, vor allem im Ileum, sichtbar. Dies zeigte sich in einer signifikant kleineren Kryptenfläche bei HFB_1 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Obwohl keine statistisch beschreibbaren Unterschiede in der Anzahl an Becherzellen beobachtet werden konnten, war ein Trend zur höheren Apoptoseneigung bei Fumonisin-Einsatz zu verzeichnen. Dennoch sollten weiterführende Studien durchgeführt werden, um im Speziellen die Auswirkungen von $pHFB_1$ und NDF-FB_1 auf die Darmmucosa zu untersuchen. Neben dem Einsatz höherer Mykotoxinkonzentrati-

onen sollte dabei auch die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Ratten auf Nutztiere berücksichtigt werden.

Literatur

Bartles G. und Rodemann B. (2003): Strategien zur Vermeidung von Mykotoxinen im Getreide. Gesunde Pflanze Heft 5, 125-135

Basso K., Gomes F. und Loureiro Bracarense A.P. (2013): Deoxynivalenol and Fumonisin, Alone or in Combination, Induce Changes on Intestinal Junction Complexes and in E-Cadherin Expression. Toxins 5, 2341-2352

BMLFUW (2013): Grüner Bericht 2013 – Bericht über die Situation der österreichischen Land- und Forstwirtschaft. at: http://www.lebensministerium.at/publikationen/land/gruener_bericht/gruenerbericht13.html (19.02.2014)

Bouhet S., Hourcade E., Loiseau N., Fikry A., Martinez S., Roselli M., Galtier P., Mengheri E. und Oswald I.P. (2004): The Mycotoxin Fumonisin B_1 Alters the Proliferation and the Barrier Function of Porcine Intestinal Epithelial Cells. Toxicol. Sciences 77, 165-171

Börner H., Schlüter K. und Aumann J. (2009): Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 8., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Gavrilie Y., Yoav S. und Shmuel A.B-S (1992): Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. The Journal of Cell Biology 3, 493-501

Grenier B., Bracarense A.P., Schwartz H.E., Trumel C., Cossalter A.M., Schatzmayr G., Kolf-Clauw M., Moll W.D. und Oswald I.P. (2012): The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B_1 correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. Biochemical Pharmacology 83, 1465-1473

Gruber E., Nagl V. und Mair C. (2013): Der Einfluss von Fumonisin B_1 und dessen hydrolysiertem Derivat auf die Darmmorphologie bei Ratten. In: Auf der Suche nach neuartigen Futtermitteln und Technologien in der Tierernährung. Eigenverlag, Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie, Wien; 310-315

Harrison L.R., Colvin B.M., Greene T., Newmann L.E. und Cole J.R. Jr. (1990): Pulmonary Edema and Hydrothorax in Swine Produced by Fumonisin B1, a Toxic Metabolite of *Fusarium Moniliforme*. Journal of Vet. Diagn. Invest. 2, 217-221

Hartinger D. und Moll W.D. (2011): Fumonisin elimination and prospects for detoxification by enzymatic transformation. World Mycotoxin Journal 4, 271-283

Heinl S., Hartinger D., Thamhesl M., Vekiru E. und Krska R., Schatzmayr G., Moll W.-D. und Grabherr R. (2010): Degradation of fumonisin B_1 by the consecutive action of two bacterial enzymes. Journal of Biotechnology 145, 120-129

Humpf H.-U. und Voss K.A. (2004): Review – Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. Mol. Nutr. Food Res. 48, 255-269

Kück U., Nowrousian M., Hoff B. und Engh I. (2009): Schimmelpilze – Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. Dritte Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Promega Corporation (2009): DeadEND™ Fluorometric TUNEL System-Instructions for use of product G3250, at: http://at.promega.com/~/media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/DeadEnd%20Fluorometric%20TUNEL%20System%20Protocol.pdf (07.01.2014)

Rauber R.H., Oiveira M.S., Mallmann A.O., Dilkin P., Mallmann C.A., Giacomini L.Z. und Nascimento V.P. (2013): Effects of fumonisin B_1 on selected biological responses and performance of broiler chicken. Pesq. Vet. Bras. 33[9], 1081-1086

Schwarzacher H. G. und Schnedl W. (2005): Histologie Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. In: Wachtler F. (Hrsg.). 7., verbesserte Auflage. Facultas Universitätsverlag Wien

Thiel P.G., Marasas W.F.O., Sydenham E.W., Shephard G.S., Gelderblom W.C.A. und Nieuwenhuis J.J. (1991): Survey of Fumonisin Production by Fusarium Species. American Society for Microbiology Vol. 57 No. 4, 1089-1093

Voss K.A., Smith G.W. und Haschek W.M. (2007): Fumonisins: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. Animal Feed Science and Technology 137, 299-325

Welsch U. und Deller T. (2010): Lehrbuch Histologie. 3. Auflage. Urban & Fischer Verlag München

Weyrauch K.D., Smollich A. und Plendl J. (2009): Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Enke Verlag Stuttgart

Autorenanschrift

Christa Steindl und Christiane Schwarz
Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie; IFA-Tulln
BOKU – Universität für Bodenkultur Wien; Muthgasse 11; A-1190 Wien
E-Mail: c.steindl@students.boku.ac.at; christiane.schwarz@boku.ac.at

Reduction of ammonia and greenhouse gas emissions from egg production by using a phytogenic feed additive

Stefan J. Hörtenhuber[1,2], Leopold Jungbauer[3], Karola R. Wendler[3] and Werner J. Zollitsch[2]

[1] Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), AT
[2] BOKU – University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Department of Sustainable Agricultural Systems, AT
[3] Delacon Biotechnik GmbH, Steyregg, AT

Introduction

Besides increasing the laying rate of hens, greenhouse gas (GHG) emissions per kg of egg may be mitigated by dietary substitution of feedstuffs with a high GHG-load, and by reduced emissions from housing and manure management systems (MMS). Reduction strategies are directed towards four relevant gases, i.e. (i) carbon dioxide (CO_2; mainly from the use of fossil energy and soil-related emissions), (ii) methane (CH_4; mainly from MMS but also from enteric fermentation), (iii) dinitrous oxide (N_2O; from soils and MMS) and ammonia (NH_3; from MMS, related to N_2O emissions).

While the use of the phytogenic feed additive "Biostrong® 510" (BSG; Delacon Biotechnik GmbH, Steyregg, Austria) was found to address all mitigation pathways described above (i.e. increasing laying performance; potentially easing a dietary substitution of feedstuffs with a high GHG-load; reduced emissions from MMS), no information was available on the overall carbon footprint effect of an application of this technology for egg production. Therefore the aim of this study is to assess the GHG emissions over a full life cycle from the production of the phytogenic feed additive, the effect of its application in egg production systems until farm gate and until the retailer level, including effects on ammonia emissions.

Materials and methods

The carbon footprint assessment was carried out following the guidelines of PAS 2050 (BSI, 2011) and its recommendations concerning product carbon footprints, which are based on IPCC (2007), ISO-14040 and ISO-14044 (ISO, 2006ab). Total emissions were calculated by summarising emitted methane (CH_4), dinitrous oxide (N_2O) and carbon dioxide (CO_2) and expressing it as CO_2-equivalents (CO_2-eq). The conversion factors used were 25 and 298 kg CO_2-eq per kg methane and nitrous oxide, respectively (100-year horizon; IPCC, 2007).

Life cycle GHG emissions were calculated using *Sima Pro* (v 7.3; PRé Consultants, 2008) and *MS-Excel*, utilising data from *Ecoinvent* (v 2.2; Ecoinvent, 2010) and *GEMIS* (*v 4.7;* Öko-Institut, 2011). Methods and factors for calculating NH_3 and GHG emissions from housing and MMS, are based on IPCC (2006) and the Austrian National Inventory Report (Anderl et al., 2013; referring to IPCC, 1997 and IPCC, 2006).

System boundaries were defined to include most processes relevant for GHG emissions, i.e. from the supply of external inputs to emissions from the layer unit (i.e. CH_4 from enteric fermentation and manure, direct and indirect N_2O emissions from MMS). Emissions from external inputs (e.g. electric energy or fuels) were considered for production of BSG, for production of feedstuffs in the diet as well as for other inputs such as electric energy in the houses. Besides energy and fuel-related GHG, indirect

and direct emissions from soil were taken into account for production of feedstuffs (Hörtenhuber et al., 2011). In accordance with PAS 2050 (BSI, 2011), GHG emissions from the production of capital goods ('infrastructure', i.e. barns, factory buildings or machinery) were not considered in the calculation.

Concerning the supply chain of BSG, all emissions from raw materials were loaded on the main products BSG, as no by-products had to be considered. Physical allocation was used for feedstuffs which were by-products from energy production (e.g. rapeseed cake as a by-product of rapeseed oil; Hörtenhuber et al., 2011). Caloric allocation was preferred over economic allocation due to constant proportions which do not fluctuate with market prices.

Functional units for calculation of GHG emissions were: (a) 1 kg of Biostrong 510® (BSG) and (b) kg of eggs at farm-gate and the retailer level produced either with or without BSG supplementation.

GHG emissions from the production of feedstuffs and raw materials of BSG were either taken directly from Hörtenhuber et al. (2011) or were calculated based on the method described therein, using data from GEMIS and SimaPro (mainly Ecoinvent-data). All emission factors (see Table 1) contain effects from a first level transport, either as described by Hörtenhuber et al. (2011) or calculated from Ecoinvent-data. Additionally, further effects were included in the resulting GHG emissions for BSG: packaging materials plus a second and a third level transportation step from the factory to a feed mill and further on to a farm (assumption of each 200 kilometres of lorry transportation). Information for emissions from milling, mixing and pelleting in the feed mills and transport were derived from GEMIS and Ecoinvent.

Direct emissions from production processes for BSG were calculated from the producer's total annual demand on energy. These emissions were allocated to the overall amount of feed additives produced per year. Related emission factors were derived from GEMIS (v 4.7) and Ecoinvent for the average Austrian natural gas (per m^3) and the average Austrian electricity mix (per kWh), respectively.

All inputs related to egg production were included into the assessment, e.g. electric energy for lighting, for automatic feeding systems, cleaning and for ventilation as well as natural gas for heating, litter material and the related transport (GEMIS v 4.7; Hörtenhuber et al., 2011; Ecoinvent).

Production data, data from measurements of NH_3 emissions as influenced by BSG and data on diets were used for the calculations. Data of scientific trials (two trials from Germany, each one from the Czech Republic and Korea) and field trials (Turkey, Mexico) were provided by Delacon Biotechnik GmbH (personal communication, 2014). On average, feed conversion ratios (FCR; kg feed kg^{-1} egg mass) of 2.10 and 2.05 were found for the control and the BSG-supplemented laying hens. Although it can be assumed that the BSG groups showed less N excreted due to the more efficient N utilisation, N excreted was assumed equal for both the control and the BSG group at 0.73 kg N per year and animal (see Anderl et al, 2013). For NH_3 emissions we included measured data from the studies: derived from the average of five studies with NH_3-measurements, we accounted for a reduction of about one third of NH_3 for the the BSG group for indirect N_2O emissions.

Table 1 describes the composition of a typical layer diet fed to the control group. For a first calculation (path 1) of the BSG-related mitigation effect on GHG emissions, the experimental group received basically the same diet, which was supplemented with 150 ppm (0.015%) of BSG. Consequently, the BSG group showed a better feed conversion ratio.

Additionally, with supplementation of BSG, the dietary crude protein may be lowered without a reduction in performance (model calculations by Delacon, personal communication; see e.g. Cypriano et al., 2009, for broilers). Hence, for a second estimation (calculation path 2) of a BSG-effect on GHG emissions, we calculated differences for equal amounts (equal FCRs) of (i) a (slightly) changed BSG-supplemented diet as compared to (ii) a corn-wheat-soy control diet with the same matrix values. For this path 2, an indicator for competition between food and feed was calculated as the ratio between potentially human edible inputs and outputs for crude protein and energy, also accounting for co-product feedstuffs from milling and agro-energy production.

Besides emissions from use of energy, biogenic emissions of methane (CH_4) and nitrous oxide (N_2O) are relevant for livestock systems. These emissions result from enteric fermentation (CH_4) and from MMS (both CH_4 and N_2O) as well as from indirect emissions of N_2O with gaseous losses of NH_3, and to a much lesser extent with losses of nitric oxides, NO_X. Biogenic emissions were derived from IPCC (2006) and the Austrian National Inventory Report (Anderl et al., 2013).

Table 1: Feedstuffs, their proportions and emission factors from best case to worst case (kg CO_2-eq kg^{-1} feedstuff) for the laying hens' average diet

Feedstuffs	Proportion in diet (%)	Emission factor (kg CO_2-eq kg^{-1} feed)	
		Best case[a]	Worst case[b]
Maize (corn)	35%	0.186	0.340
Wheat	26%	0.242	0.387
Extracted soybean meal	15%	1.609	4.288
Extracted rapeseed and sunflower seed meal	9%	0.482	0.769
Limestone	9%	0.309	0.320
Others[c]	6%	0.219	3.685
Sum	*100.0%*	*0.494*	*1.016*

[a] Home-grown feedstuff, mostly from organic production; certified soybeans for extracted soybean meal.
[b] Bought-in feedstuff, mostly conventional production, non-certified soybeans for extracted soybean meal.
[c] Amino acids and premix (including e.g. mono-calcium-phosphate), wheat bran and BSG (0.015%) in the case of the experimental group.

Results

The calculated GHG emissions per kg BSG are in an order of magnitude of 2.5 kg CO_2-equivalents, and vary slightly, depending on the origin of raw materials and whether or not infrastructure processes were taken into account. The inclusion of BSG (150 ppm) in laying hen diets does not substantially increase the feed production-related GHG emissions per ton of feed (i.e. less than 0.1 %). Emissions from feed supply (mainly corn, wheat, soybeans) were found to be the most important drivers for GHG emissions from egg production (see tables 1 and 2). The most important source for GHG is the supply of solvent-extracted soybean meal, which was assumed to be mainly imported from (Latin) America (see Hörtenhuber et al., 2011).

We found that GHG emissions per kg eggs could be reduced by about 4 % (see table 2), if the diets for laying hens were supplemented with BSG, depending on the system boundaries of the calculation and the origin and production methods for feedstuffs and raw materials.

GHG reduction per kg of eggs was mainly achieved by an improved digestibility and thus a better feed conversion ratio (contributing about 40 % of the GHG reduction), which also resulted in less nitrogen excreted per kg eggs and reduced ammonia emissions, following a direct inhibition of ammonia formation by BSG saponins. The latter effect was identified to contribute about 60 % of the GHG reduction, mainly due to reduced indirect NO_2 emissions from MMS.

A calculated input/output ratio for egg production indicates the food – feed-competition. The two diets concerning path 2 – which were equivalent in terms of their matrix values, but either without BSG and common protein and oil contents or with BSG and lower protein and oil contents – showed differences concerning the demand for nutritionally valuable soybean meal and soybean oil due to the improved digestibility with BSG. As compared to the control group, the experimental group with BSG-supplementation showed an average reduction of 1.5 % of potentially human edible protein and energy to yield the same quantity of edible protein and energy from eggs. For this calculation path 2, an even greater reduction of GHG emissions was found: the BSG-supplemented corn-wheat-soy diet

showed a reduction of about 7 % as compared to an equal amount of the control diet. Including all other GHGs (from MMS etc.), an overall advantage of 6 % was calculated per kg eggs.

Table 2: GHG emissions per kg of eggs at the farm gate and at the retailer level (kg CO_2-eq kg-1 eggs; excluding GHG emissions from capital goods (infrastructure)

Processes with GHG emission	Best case[a]		Worst case[a]	
	Control	BSG	Control	BSG
Layer breeders and hatchery	0.016	0.016	0.016	0.016
Feedstuffs (including BSG in experimental group)	1.038	1.011	2.134	2.080
Transport of feedstuffs & litter materials	0.119	0.116	0.119	0.116
Energy related emissions from livestock systems	0.054	0.054	0.054	0.054
CH_4 from enteric fermentation	0.029	0.028	0.029	0.028
CH_4 from MMS	0.001	0.001	0.001	0.001
Direct N_2O from MMS	0.102	0.099	0.102	0.099
Indirect N_2O from MMS	0.092	0.063	0.092	0.06
Packaging & distribution to the retailer	0.085	0.085	0.085	0.085
Allocation to spent hens (by-product)	-0.128	-0.122	-0.214	-0.205
Total (farm-gate incl. co-product spent laying hen, incl. layer breeders and hatchery)	**1.322**	**1.266**	**2.333**	**2.253**
Difference		**-4.2%**		**-3.4%**
Total (retailer level incl. packaging and distribution)	**1.407**	**1.351**	**2.418**	**2.338**
Difference		**-4.0%**		**-3.3%**

[a] Concerning origin and production methods for feedstuffs and raw materials.

Discussion

GHG-emissions per kg of supplied BSG seem relatively high. This is mainly due to the large quantities of GHG emitted during cultivation, processing, packaging or transportation of specific plants and plant organs needed for the production of BSG. However, due to very low dietary inclusion rates of BSG of only 150 ppm, overall GHG emissions per kg of egg mass produced are hardly influenced (less than 0.1 %). In contrary, the reduction in NH_3 emissions and the improved performance of laying hens fed BSG-supplemented diets leads to an improved carbon footprint per kg eggs.

The reduction of about 4 % of GHG emissions is substantial, particularly when considering that the use of the feed additive does not require changes in supply chains or cost-intensive measures such as investments in feeding or housing systems. Additionally, the feed additive may be easily combined with other mitigation options (e.g. adaptations in MMS) in order to further reduce GHG emissions.

For direct comparison of GHG emissions derived herein with results from different studies, it is essential that similar methods and system boundaries were used. The absolute values reported herein are however similar to those reported by other authors (e.g. Cederberg et al., 2009: 1.4 kg CO_2-eq per kg eggs; Sonesson et al., 2008: 1.6-1.8 kg CO_2-eq per kg eggs; Verge et al., 2009: 2.5 kg CO_2-eq per kg eggs).

Conclusions

It was shown in experiments that the use of the phytogenic feed additive Biostrong 510® (BSG) in laying hen diets leads to an improvement in performance, increases the economical return and reduces the environmental impact originating from ammonia (and odour) emissions from egg production. Furthermore, it is concluded from this study that a dietary BSG-supplementation contributes to a reduction of the carbon footprint of egg production: less greenhouse gases are emitted per unit of egg mass produced in the life cycle from cradle to farm-gate or to the retailer, mainly due to improved

laying rate and reduced indirect N_2O emissions. Effective phytogenic feed additives may therefore be seen as a tool which contributes to a reduction of negative environmental impacts of intensive livestock production systems.

References

Anderl, M., Freudenschuß, A. , et al., 2013. Austria's National Inventory Report 2013. Submission under UNFCC and under the Kyoto Protocol. Vienna, Austria.

BSI (British Standardisation Institute), 2011. Publicly Available Specification PAS 2050 – Specification for the assessment of the life cycle greenhouse gas emissions of goods and services. http://www.bsigroup.com/upload/Standards%20&%20Publications/Energy/PAS2050.pdf. ISBN 978 0 580 71382 8.

Cederberg, C., Sonesson, U., Henriksson, M., Sund, V. Davis, J., 2009. Greenhouse gas emissions from Swedish production of meat, milk and eggs from 1990 and 2005. The Swedish Institute for Food and Biotechnology, SIK Report No. 793, September 2009.

Cypriano, L., Piccini, I., Filho, J.B.P., Pastore, N.S., Mader, A., Asamer, A., 2009. Performance and tibia characteristics of broilers fed a phytogenic feed additive. In: Schedle, K., Kraft, M., Windisch, W.M. (Eds.), Proceedings of the 8th BOKU-Symposium Tierernährung. Vienna, Austria, 1 October 2009. University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Austria. pp. 157-159.

Delacon Biotechnik GmbH (2014): Personal communications, 2014-01-10, 2014-03-14.

Ecoinvent Centre, 2010. Ecoinvent data v 2.2. Dübendorf, Switzerland.

Hörtenhuber, S., Lindenthal, T., Zollitsch, W., 2011. Reduction of greenhouse gas emissions from feed supply chains by utilizing regionally produced protein sources - the case of Austrian dairy production. Journal of the Science of Food and Agriculture 91, 1118-1127.

IPCC (International Panel on Climate Change), 1997. Revised 1996 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/gl/invs1.html.

IPCC, 2006. Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. www.ipccnggip.iges.or.jp/public/2006gl/index.html.

IPCC, 2007. Climate Change 2007. IPCC Fourth Assessment Report. The Physical Science Basis. https://www.ipcc-wg1.unibe.ch/publications/wg1-ar4/wg1-ar4.html.

ISO, 2006a. International Standard: Environmental management – Life cycle assessment – Principles and framework. Second edition 2006-07-01.

ISO, 2006b. International Standard. Environmental management – Life cycle assessment – Requirements and guidelines. First edition 2006-07-01.

Öko-Institut (Institut für angewandte Ökologie e.V.), 2011. GEMIS (Globales Emissions-Modell Integrierter Systeme), Version 4.7. Darmstadt/Freiburg/Berlin, Germany. http://www.gemis.de/

PRé Consultants, 2011. SimaPro, Life Cycle Assessment software package. Version 7.3. Amersfoort, The Netherlands.

Sonesson, U., Cederberg, C., Flysjö, A. Carlsson, B., 2008. Life cycle analysis (LCA) of Swedish eggs. SIK-report No 783 2008. SIK.

Verge, X.P.C., Dyer, J.A., Desjardins, R. Worth, D., 2009. Long-term trends in greenhouse gas emissions from the Canadian poultry industry. Journal of Applied Poultry Research, vol. 18, pp. 12.

Corresponding author

Dr. Stefan J. Hörtenhuber
Forschungsinstitut für biologischen Landbau Österreich, FiBL (Research Institute of Organic Agriculture Austria), Doblhoffgasse 7/10, A-1010 Vienna. Email: stefan.hoertenhuber@fibl.org

Leopold Jungbauer; Dr. Karola Wendler
Delacon Biotechnik GmbH
Weissenwolffstraße 14, A-4221 Steyregg, Austria.
E-mail: leopold.jungbauer@delacon.com / karola.wendler@delacon.com

Dr. Werner J. Zollitsch
BOKU – University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Department of Sustainable Agricultural Systems, Division of Livestock Sciences, Gregor-Mendel-Str. 33, A-1180 Vienna, Austria.
E-mail: werner.zollitsch@boku.ac.at

EU APPROVED
ZOOTECHNICAL ADDITIVE

FRESTA® F

Safe Effective Proven

First and only EU approved phytogenic zootechnical additive

www.delacon.com

DELACON
Phytogenic Feed Additives

Effect of a phytogenic feed additive on performance and ammonia emissions of growing-finishing pigs

Miriam Goerke[1], Karel Holub[2] and Karola R. Wendler[1]

[1] Delacon Biotechnik GmbH, Steyregg, AT
[2] Performing Nature Research Center, Stosikovice na Louce, CZ

Introduction

The negative impact of livestock production on the environment is getting more and more in the focus of public concern and ammonia is one of the major pollutants from livestock production. Thus, directives and regulations have been implemented to decrease ammonia emissions. Beside general feeding strategies such as phase feeding, feed additives showed great potential to reduce ammonia emissions while providing economic benefits to the farmer.

Feed additives containing saponins have been reported to reduce ammonia concentrations (Veit et al., 2011; Veit et al., 2010; Zentner, 2007). This effect might be explained by the direct binding of ammonia to saponins (Killeen et al., 1998) and/or the inhibition of the bacterial enzyme urease (Nazeer et al., 2002; Yeo and Kim, 1997), which catalyzes the hydrolysis of urea into ammonia and carbon dioxide.

In contrast to other techniques like air cleaners, phytogenic feed additives can already reduce the ammonia production/concentration at animal level, which means an increase of animal welfare.

The objective of the current study was to investigate the effects of the phytogenic feed additive **FRESTA**® *F Plus* on ammonia (NH_3) emissions of growing-finishing pigs. **FRESTA**® *F Plus* is a preparation of the essential oils of caraway and lemon in an excipient based on mixed dried herbs and spices, including saponins.

Materials and methods

A 72 day study was conducted to evaluate the effect of the phytogenic feed additive **FRESTA**® *F Plus* on performance and ammonia emissions in growing finishing pigs (initial body weight 45 kg, end weight 115 kg). For the experiment, a total of 54 growing barrows were allocated to two experimental groups. The control group received a commercial grower and finisher diet (Table 1). In the experimental group, **FRESTA**® *F Plus* (Delacon Biotechnik GmbH, Austria) was added to the diet in form of a premix based on semolina with a dosage of 10 kg/t. Final dosage of **FRESTA**® *F Plus* in the ready mixed feed was 150 g/t. In the control group the same amount of semolina was added as placebo. Animals were housed in climatic chambers to allow for measurement of NH_3 concentrations. Each treatment held three chambers with 3 pens and 3 animals per pen. For measurement of performance, pigs were weighed individually at day 0, 24, and 72 of the experiment. Average daily gain (ADG) was calculated for each individual pig for the two trial phases (day 0-24 and 24-72) and overall (day 0-72). Average daily feed intake (ADFI) and feed conversion rate (FCR) were calculated on pen basis for the same trial phases as mentioned above. Gas concentration in the chambers was measured every 13 minutes with a photoacoustic multi gas monitoring system (Innova). In order to calculate ammonia emissions, the speed of outgoing air was recorded in all chambers. Gas measures were averaged per day and chamber. NH_3 emissions were calculated per animal and day and per kg body weight gain for the whole duration of the trial, respectively. Statistical analysis of the data was performed with Proc

Mixed of SAS, with treatment as fixed factor and a repeated statement for day. Chamber was included in the model as a random factor. Least square means were compared by Tukey test. Statistical significance is declared at $P \leq 0.05$ with $0.05<P \leq 0.10$ considered as a near-significant trend.

Table 1: Composition of experimental diets

Ingredients	Grower	Finisher
Wheat	37.0	40.0
Wheat bran	3.0	8.6
Barley	38.55	36.5
Extracted rape meal	8.0	6.0
Extracted soya meal	5.0	4.0
Extracted sunflower meal	3.0	
Animal fat	1.5	1.0
NaCl	0.4	0.45
Aminovitan – P1 + (premix of vitamins and microtracers)	0.3	0.3
Lysine 100	0.4	0.4
Threonine 100	0.1	0.1
Monocalciumphosphate	0.55	0.45
Limestone	1.2	1.2
FRESTA® *F Plus* Premix[1]/Semolina	1.0	1.0
Calculated nutrients		
Crude protein (g/kg)	15.5	14.3
Metabolizable energy (MJ/kg)	12.9	12.8

[1] contains 150 g **FRESTA**® *F Plus*

Results and discussion

All pigs were healthy throughout the trial, except for one pig in the **FRESTA**® *F Plus* group which had to be excluded due to leg problems after 24 days of trial. The reduced number of pigs in the **FRESTA**® *F Plus* group after the first trial phase (Control: 3 chambers x 9 pigs =27 pigs; **FRESTA**® *F Plus* group: 2 chambers x 9 pigs + 1chamber x 8 pigs=26 pigs) was accounted for during calculation of performance and ammonia emissions.

Performance results are shown in table 2. The inclusion of **FRESTA**® *F Plus* led to a significant increase of ADFI in the second experimental phase (P=0.025) as well as over the total trial period (P=0.038). The increase in ADFI was reflected in significant higher ADG in the second phase (P=0.025) and over the whole trial (P=0.016). Maximum numeric improvement of FCR was 3.3 % in phase 2.

Beside improvements in performance, the **FRESTA**® *F Plus* supplemented group showed significant reductions in ammonia emissions compared to the control (Table 3). In the **FRESTA**® *F Plus* group, average NH_3 emissions per animal and day were reduced by 22 % (P=0.002) and the reduction of NH_3 emissions based on kg body weight gain was 24 % (P=0.013) compared to the control group, respectively.

In the present study, ammonia emissions in g/kg BW are lower compared to the results presented by Veit et al. (2012). This may at least in part be attributed to the lower dietary crude protein levels of 15.5 and 14.3 g/kg in the grower and finisher period of the present study, compared to 20.7 and 18.7 g/kg as used in the study of Veit et al. (2012). Thus, the results of the present study show, that the phytogenic feed additive **FRESTA**® *F Plus* leads to a reduction of ammonia emissions even if used in combination with other NH_3 mitigation strategies, such as reduced dietary crude protein content and application of crystalline amino acids.

Table 2: Performance results of Control and **FRESTA**® *F Plus* treatment group (LSmeans)

	Control	**FRESTA**® *F Plus*	max SE	P-value Treatment
BW_0	45.7	44.6	0.900	0.388
BW_1	68.5	67.9	1.160	0.717
BW_2	112.0	115.0	1.468	0.161
$ADFI_{01}$	2.307	2.361	0.032	0.237
$ADFI_{12}$	2.954^b	3.096^a	0.041	0.025
$ADFI_{02}$	2.738^b	2.851^a	0.036	0.038
ADG_{01}	0.949	0.970	0.038	0.694
ADG_{12}	0.907	0.981	0.022	0.025
ADG_{02}	0.919^b	0.979^a	0.016	0.016
FCR_{01}	2.467	2.439	0.084	0.812
FCR_{12}	3.271	3.163	0.069	0.271
FCR_{02}	2.976	2.920	0.044	0.378

$_0$ trial start
$_1$ day 24
$_2$ end of trial (day 72)
$_{01}$ phase 1 of trial (24 days)
$_{12}$ phase 2 of trial (48 days)
$_{02}$ total trial period (72 days)
Means with different superscripts differ $P<0.05$

Table 3: NH_3 emissions of **FRESTA**® *F Plus* fed pigs compared to negative control (LSmeans)

	Control	**FRESTA**® *F Plus*	SE	P-value Treatment
NH_3 in mg/h	3528.81^a	2687.61^b	97.87	0.004
NH_3 in g/animal*day	9.41^a	7.35^b	0.19	0.002
NH_3 in mg/kg BWG[1]	9.97^a	7.57^b	0.39	0.013

Means with different superscripts differ $P<0.05$
[1]BWG= body weight gain

Conclusion

Results of the present study showed, that the addition of **FRESTA**® *F Plus* improves performance of pigs while ammonia emissions and thus, the negative impact of animal husbandry on the environment could be significantly reduced. Application of **FRESTA**® *F Plus* can be combined with other NH_3 mitigation strategies, such as reduced dietary crude protein content and use of crystalline amino acids.

References

Killeen, G. F., C. R. Connolly, G. A. Walsh, C. F. Duffy, D. R. Headon and R. F. Power. 1998. The effects of dietary supplementation with *Yucca schidigera* extract or fractions thereof on nitrogen metabolism and gastrointestinal fermentation processes in the rat. J. Sci. Food Agri. 76: 91-99.

Nazeer, M. S., T. N. Pasha, S. Abbas and Z. Ali. 2002. Effect of Yucca Saponin on Urease Activity and Development of Ascites in Broiler Chickens. Int. J. Poult. Sci. 1: 174-178.

Veit, M., A. Mader, L. Cypriano, I. Piccini, A. M. Gabbi and D. Zanoni. 2010. Impact of a phytogenic feed additive on performance and ammonia emission in piglets. 9. Boku-Symposium Tierernährung. Tagungsband – Eiweiß in der modernen Tierernährung - Bedarf, Qualität, neue (alte) Futtermittel: 220-226.

Veit, M., E. Zentner, L. Jungbauer and K. R. Wendler. 2011. Effects of a phytogenic feed additive on reduction of ammonia and odor concentrations in growing-finishing pigs. 10. Boku-Symposium Tierernährung. Tagungsband - Eiweiß in der modernen Tierernährung: 149-154.

Veit, M., E. Zentner, K. R. Wendler and I. Mösenbacher-Molterer. 2012. Effects of a saponin containing phytogenic feed additive on performance and ammonia- and odor emissions in growing-finishing pigs. 11. Boku-Symposium Tierernährung. Tagungsband – Die Zukunft der Tierernährung: 191-195.

Yeo, J. and K. I. Kim. 1997. Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. Poult.Sci. 7: 381-385.

Zentner, E. 2007. Einsatz von phytogenen Futterzusätzen im Hinblick auf Ammoniakreduktion und tägliche Zunahmen in der Mastschweinehaltung. Bautagung Raumberg-Gumpenstein. Zukunftsorientierte Stallbaulösungen für die Rinder- und Schweinehaltung: 19-24.

Corresponding author

Miriam Goerke M.Sc.
R&D Species Manager Swine
Delacon Biotechnik GmbH; Weissenwolffstr. 14; A-4221 Steyregg
E-mail: miriam.goerke@delacon.com

Emissionsbewertung von Fütterungsstrategien in der Schweineproduktion mit Hilfe eines praxistauglichen Kalkulationsmodells

Christoph Duden und Hans-Peter Pecher

H. Wilhelm Schaumann GmbH, Pinneberg, DE

Einleitung

In den veredelungsstarken Regionen Westeuropas mit knapper Flächenausstattung kommt immer mehr die Problematik von Nährstoffemissionen bei Stickstoff, Phosphor und Schwermetallen in die Diskussion. Die Beschaffung von zusätzlicher Fläche zur Nährstoffverteilung ist teuer. Eine Belastung der Ackerfläche bei intensiver Tierhaltung durch einen Nährstoffbilanzüberschuss liegt bereits vor (LANDESREGIERUNG NIEDERSACHSEN 2014; KICKINGER 2009; KÜHNE et al. 2002). Der Druck auf die landwirtschaftlichen Betriebe hat und wird sich weiter durch 1.) Den politischen und gesellschaftlichen Willen zur Absenkung der Belastung, 2.) Gleichzeitiger Wachstumsbestrebungen der Veredelungsbetriebe und 3.) Wachsender Proteinbedarf der Weltbevölkerung verschärfen. Die Nährstoffe Stickstoff, Phosphor, Kupfer und Zink stellen eine besondere Belastung dar. Stickstoff und Phosphor hat maßgeblichen Einfluss auf die Grundwasserqualität und Eutrophierung der Gewässer, während sich Kupfer und Zink im Boden anreichert, wenn kein ausreichender Entzug durch Pflanzen vorliegt (FAO 2014).

Ist eine Akkumulation aufgetreten kann sie nur schwer rückgängig gemacht werden. Flächen können irreversibel unbrauchbar werden (ZETHNER, et alt. 2007). Die Applikationsmenge hat keinen Einfluss auf die durch Pflanzen entzogene Nährstoffmenge (MONTAVI et alt. 2003). Der Gesetzgeber schreibt vor, dass die nachhaltige Funktion des Bodens zu sichern und wiederherzustellen ist. Dazu sind schädliche Bodenveränderungen abzuwehren. Jeder, der auf den Boden einwirkt, hat sich so zu verhalten, dass schädliche Bodenveränderungen nicht hervorgerufen werden. (BBODSCHG 2012).

Da die Beschaffung zusätzlicher Fläche nur schwer möglich ist, muss die Nährstoffausscheidung der Schweine reduziert werden. Das größte Potenzial liegt hierfür bei Minderungsmaßnahmen in der Fütterung (SCHULTHEISS et alt. 2002). Zum Beispiel orientieren sich die Gehalte an Kupfer und Zink im Futter an gesetzlichen Höchstmengen und nicht am Nährstoffbedarf des Tieres. Anders formuliert liegt ein erhebliches Potenzial in der praktischen Fütterung, dessen Grundlage das Knowhow des Landwirts und Beraters ist. Das heißt eine besondere Bedeutung fällt der intensiven Beratung des Landwirts durch Offizialberatung und Futtermittelindustrie zu (SCHULTHEISS et alt. 2002).

Ziel dieser Arbeit ist es die fundierten wissenschaftlichen Grundlagen so aufzubereiten und über ein Kalkulationsmodell darzustellen, dass beim Landwirt oder dessen Berater Interesse für die Problematik entsteht und dass ein Handlungsbedürfnis auf dem einzelnen Betrieb geweckt wird. Das Kalkulationsmodell soll für die Ferkelerzeugung, Ferkelaufzucht und Schweinemast anwendbar sein.

Material und Methoden

Im Wesentlichen wurden drei Ansätze verfolgt: Die Verwendung wissenschaftlicher Grundlagen, die Entwicklung einer einfachen Eingabemaske und die Zusammenführung der Ergebnisse in verdichteten Kennzahlen. Die wissenschaftlichen Grundlagen wurden der GfE-Empfehlung und anderen weiterführenden wissenschaftlichen Publikationen entnommen. Entsprechende Daten wurden mit einem multi-

faktoriellen Ansatz neu zusammengefügt, um wichtige Kennzahlen für die Nährstoffausscheidung zu erlangen. Diese Kennzahlen wurden durch Berücksichtigung der Inhaltsstoffe der Futterration, wichtiger Leistungsdaten des Betriebes und der Retention im Tier berechnet. Die Eingabemaske wurde im „APP-Design" erstellt, damit eine Weiterentwicklung in eine Anwendung für Smartphones und Tablets möglich ist. Diese Art der Anwendung macht es dem Benutzer häufig leicht das Programm spielerisch, einfach verständlich und an jedem Ort auszuprobieren. Der Arbeitsaufwand für die Erkenntnis „Einsparpotenzial Betrieb" soll gering sein und das Ergebnis einen hohen Wert für den Anwender haben. Deshalb muss die Datenpflege überschaubar sein und nach Möglichkeit Datenquellen nutzen, die der Landwirt im Gedächtnis hat. Die Darstellung soll einfach, anschaulich und die gesamte Anwendung „praktikabel" sein. Die Ergebnisse der Kalkulation sollen dem Landwirt das mögliche Einsparpotential durch eine Optimierung der Futterration darstellen. Die Kennzahlen müssen dem Betriebsleiter präsent und für ihn verwertbar sein.

Es wurden drei wesentliche Ansätze zur Nährstoffreduktion verfolgt: 1. Dem Anwender soll es möglich sein die Nährstoffversorgung dem reellen Nährstoffbedarf anzupassen. Hier ist ein besonders hohes Potenzial in der Phosphorversorgung. 2. Dem Anwender wird der große Vorteil durch die Verwendung von Zusatzstoffen mit besonders hoher Verfügbarkeit dargestellt. Zu diesen zählt das Produkt Aminotrace der Firma Schaumann. Hier wird durch Bindung von Spurenelemente wie Kupfer und Zink an Aminosäuren die Verwertung von Kupfer und Zink verbessert (RIMBACH und MÄNNER 2012). Durch eine bessere Verwertung kann Kupfer und Zink in der Ration eingespart werden und senkt dadurch die Ausscheidung und Belastung der Nährstoffbilanz. Eine sicherere und gleichmäßigere Verfügbarkeit von Aminotrace im Darm machen zusätzlich ein Absenkung der Sicherheitszuschläge möglich, wodurch eine weitere Einsparung von Kupfer und Zink möglich ist. Für die bessere Verwertung des Phosphors wird Phytase zugesetzt. 3. Der Zusatz von freien Aminosäuren macht eine bessere Verwertung des Rohproteins möglich und senkt damit die Stickstoffausscheidung und Stickstoffbelastung des Tierstoffwechsels.

Ergebnis

Ergebnis ist ein Kalkulationsprogramm auf Excel-Basis, mit übersichtlichen, an kleine Displays angepassten Darstellungen und einem Menü-Band am unteren Rand der Anwendung. Das Programm beinhaltet die Nährstoffbilanzierung für Ferkelerzeugung, Ferkelaufzucht und Schweinemast, die unter „Nährstoffreduktion" zu einem Betriebsergebnis zusammengefasst werden. Dazu müssen zunächst auf dem Startbildschirm (Abbildung 1) unter „1. Basisdaten" die Betriebsdaten, zu denen Herdengröße und biologische Leistungen zählen, eingegeben werden und Sollwerte der Ration betriebsindividuell angepasster werden. Anschließend können unter „2. Eingesetzte Komponenten eingeben" neben Standardkomponenten, wie Weizen und Soja, Zusatzkomponenten einer übersichtlichen Tabelle hinzugefügt werden. Der letzte Schritt ist „3. Ration gestalten". Es ist möglich für tragende Sauen, säugende Sauen, Ferkelaufzucht I, Ferkelaufzucht II, Vormast, Mittelmast und Endmast eine Ration zu erstellen. Dabei werden, MJ, Rohprotein, Lysin, MJ:Lysin-Verhältnis, Rohfaser, Calcium, Phosphor, Kupfer, Zink und der Preis je 100 kg Futter berücksichtigt. Für die eingesetzten Komponenten wird der Verbrauch dargestellt. Es können zwei Szenarien abgespeichert und verglichen werden. Das Speichertool ermöglicht neben dem Vergleich der Inhaltsstoffe zweier Mischungen auch eine Optimierung der Nährstoffausscheidung von Stickstoff, Phosphor, Kupfer und Zink. Die Nährstoffreduktion auf dem Gesamtbetrieb wird in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 2). Der Landwirt sieht anhand der eigesparten Nährstoffmenge (in kg), der Absenkung des Düngeflächenbedarfs für Stickstoff und Phosphor (in ha) und der Minderung der Flächenbelastung durch Kupfer und Zink (in g/ha) das Einsparpotenzial des Betriebes. Über den Button „Futtermittelverbrauch" können die verbrauchten Mengen der verwendeten Futtermittel angezeigt werden.

Abbildung 1: Startbildschirm der Anwendung

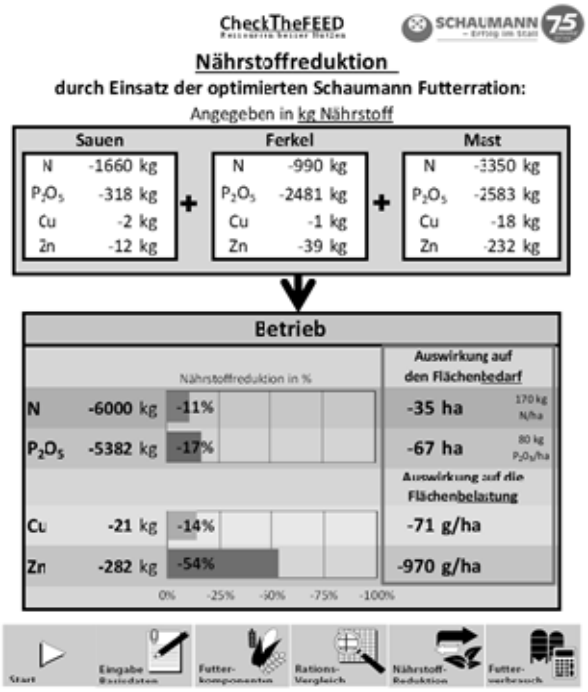


Abbildung 2: Bildschirm "Nährstoffreduktion" mit einer übersichtlichen Darstellung der Ergebnisse der Optimierung

Da die vollständige Darstellung aller Rechenwege sehr Umfangreich ist, wird das hinter der Eingabemaske liegende Rechenmodell beispielhaft an der Schweinemast erklärt. Zunächst wird die Ration durch Zusammenstellung der Einzelkomponenten errechnet. Die Inhaltstoffe werden bei 88 % Trockenmasse ausgewiesen. Der Futterverbrauch für den Gesamtbetrieb wird über die verkauften Mastschweine und die Futterverwertung berechnet. Die Nährstoffreduktion ergibt sich durch den Vergleich der Inhaltsstoffe zweier Rationen. Dazu wird für jede Ration die rechnerische Ausscheidung je Tier ermittelt. Die Ausscheidung ist gleich Nährstoffinput minus Nährstoffansatz. Der Nährstoffinput geht aus den Inhaltsstoffen der Ration und der Futterverwertung hervor. Die Retention wird über die Gewichtszunahme und den Proteinansatz je kg LM Zuwachs ermittelt. Dies entspricht in der Schweinmast 160 g Protein/kg LM Zuwachs und 5,1 g Phosphor je kg Zuwachs (GFE 2006). Für Stickstoff wird 30 % Ausbring- und Lagerverlust berechnet. Die eingesparte Dungfläche wird durch Berücksichtigung der maximalen Ausbringmenge nach Düngeverordung von 170 kg N/ha aus organischen Düngern kalkuliert (DÜV 2006). Für Phosphor wird ein durchschnittlicher Pflanzenbedarf von 80 kg P_20_5/ha angenommen (LWK NDS 2011). Die Konzentration von Kupfer und Zink in der Gülle bei 100% TM beträgt das Vierfache der Konzentration in dem Futter bei 88 % TM(KICKINGER 2009). Der Kupfer- und Zinkanfall wird über die Futterverwertung und den Gülleanfall auf den Gesamtbetrieb hochgerechnet. Die Kennzahlen zum Gülleanafall (1,5 m^3/Mastschwein; 7,5 % TM) wurden dem KTBL (2010) entnommen. Da der Kupfer- und Zinkanfall auf dem Gesamtbetrieb als auch die für die Gülledüngung zur Verfügung stehende Fläche bekannt ist, kann die Minderung der Nährstoffbelastung in g/ha Kupfer bzw. Zink berechnet werden.

Diskussion

Ziel der Anwendung ist die fundierten wissenschaftlichen Grundlagen so aufzubereiten, dass der Landwirt und Berater durch wenig Aufwand ein wertvolles Ergebnis erzielt. Sobald der Aufwand sehr

Führende Konzepte

Betriebsgerechte Lösungen für die erfolgreiche Fütterung, Futterkonservierung und Stallhygiene.

Alles aus einer Hand.

www.schaumann.at

Jakob Fuchs – Gasse 25-27 ; 2345 Brunn am Gebirge
✆ 02236 316 41

SCHAUMANN
– Erfolg im Stall

groß wird besteht die Gefahr, dass potenzielle Nutzer nicht auf die Anwendung zurückgreifen und damit das Ziel, Interesse an der Nährstoffminderung zu wecken, verfehlt wird. Aus diesem Grund wurde sich auf wenige, wichtige Inhaltsstoffe der Ration konzentriert. Es ist zu empfehlen, dass der Landwirt für eine ausführliche Betrachtung zusätzlicher Nährstoffe auf eine PC Anwendung zurückgreift. Durch die Eingrenzung auf die, für die Berechnung wesentliche Betriebsdaten, wird es ermöglicht die Eingabemaske übersichtlich und effizient zu gestalten. Das Rechenmodell kann nach dem Baukastenprinzip erweitert werden. Damit auch für die Auswirkung der Kupfer- und Zinkreduktion eine konkrete Auswirkung auf den Flächenbedarf dargestellt werden kann, müssen wissenschaftlich fundierte und praxistaugliche Kennzahlen entwickelt werden. Bisherige Untersuchungen und Empfehlungen weisen Diskrepanzen beim Nährstoffbedarf je Hektar auf (DERSCH und HÖSCH 2003). Geplant ist die Umsetzung der Excel Anwendung zu einer smartphone- und tabletfähigen Anwendung.

Literatur

BBodSchG (2012): Bundesbodenschutzgesetz. § 1 bis § 4. Fassung vom 24.02.2012.

DERSCH, G., HÖSCH, J. (2003): Kupfer und Zink – In Zukunft stärker beachten. Der fortschrittliche Landwirt 11: 6–9.

DÜV (2006): Düngeverordung der Bundesrepublik Deutschland. Fassung vom 27.02.2007

FAO (2014): Pigs and Environment. Food and Agriculture Organization of the United Nations http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/pigs/Environment.html (Download vom 25.02.14)

GFE (2006): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen. Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main.

KICKINGER, T. (2009): Schwermetallemissionen über Wirtschaftsdünger in Österreich. Dissertation. Universität für Bodenkultur, Wien.

KTBL (2010): Betriebsplanung Landwirtschaft 2010/2011. 22. Auflage. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. . Darmstadt

KÜHNE, V., BIEN, B., GOLDBACH, H. E. (2002): Schwermetallbilanzen auf schweinehaltenden Veredelungsbetrieben. KTBL-Schrift 410. Seite 66-72

LANDESREGIERUNG NIEDERSACHSEN (2014): Eutrophierung – Quellen und Einträge. Niedersächsisches Ministerium für Umwelt, Energie und Klimaschutz. http://www.umwelt.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=26260&article_id=-89000&_psmand=10 (Download vom 25.02.2014)

LWK NDS (2011): Düngeempfehlung Grundnährstoffe. Landwirtschaftskammer Niedersachsen. http://www.lwk-niedersachsen.de/index.cfm/portal/pflanze/nav/341/article/11622.html (Download vom 25.02.14)

MONTOVI, P., BONAZZI, G., MAESTRI, E., MARMIROLI, N. (2003): Accumulation of copper and zinc from liquid manure in agricultural soils and crop plants. Plant and Soil 250: 249-257

RIMBACH, M., MÄNNER, K. (2012): Effects of different iron, manganese, zinc and copper sources on their bioavailability in weanling piglets. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology. Band 21. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt/M.

SCHULTHEISS, U., DÖHLER, H., ECKEL, H., ROTH, U. (2002): Fütterungsstrategien zur Verminderung von Schwermetallgehalten in Wirtschaftsdüngern. Kongressband 2002 Leipzig – VDLUFA-Schriftreihe 58. VDLUFA. Seite 59-69

ZETHNER, G., SATTELBERGER, R., HANUS-ILLNAR, A. (2007): Kupfer und Zink im Wirtschaftsdünger von Schweine- und Geflügelmastbetrieben. Umweltbundesamt Österreich, Wien.

Autorenanschrift

Hans-Peter Pecher
H. Wilhelm Schaumann GmbH
An der Mühlenau 4
D-25421 Pinneberg
E-Mail: hans-peter.pecher@schaumann.de

Assessment of greenhouse gas emissions from milk and feed

Karoline Reckmann[1] and Ansgar Lasar[2]

[1] Union Agricole Holding AG, Pinneberg, DE
[2] Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Oldenburg, DE

Introduction

Livestock production is increasingly facing consumer's concerns about the environmental impact of its different production systems. Thereby, the dairy sector is responsible for 4 % of global anthropogenic greenhouse gas (GHG) emissions (Gerber et al., 2010). Meanwhile, the demand for milk and dairy products is expected to double by the middle of the century due to population growth and change in consumption patterns. The dairy sector therefore faces significant challenges. GHG emissions associated with agricultural products, especially livestock products, differ from those of other sectors (e.g. transport or energy). For most sectors fossil carbon dioxide (CO_2) dominates GHG emissions, while in agriculture methane (CH_4) and nitrous oxide (N_2O) are the main contributors (Flysjö, 2012). The largest environmental burden for animal food is created at the primary production stage, where about 80 % of GHG emissions from dairy products occur before the farm gate (Gerber et al., 2010). In order to further specify the environmental impact of milk production, GHG emissions of milk produced in the field were analysed. Results were compared to those of modelled dairy farms in order to simplify their classification.

Material and methods

When analysing how to mitigate climate change most efficiently, life cycle thinking is required. In this context, the current study is limited to the assessment of GHG emissions, comprising CH_4, N_2O and CO_2. The system encompassed the production of feed, housing of animals (including manure management), and production of milk and meat. The milking system is illustrated in figure 1.

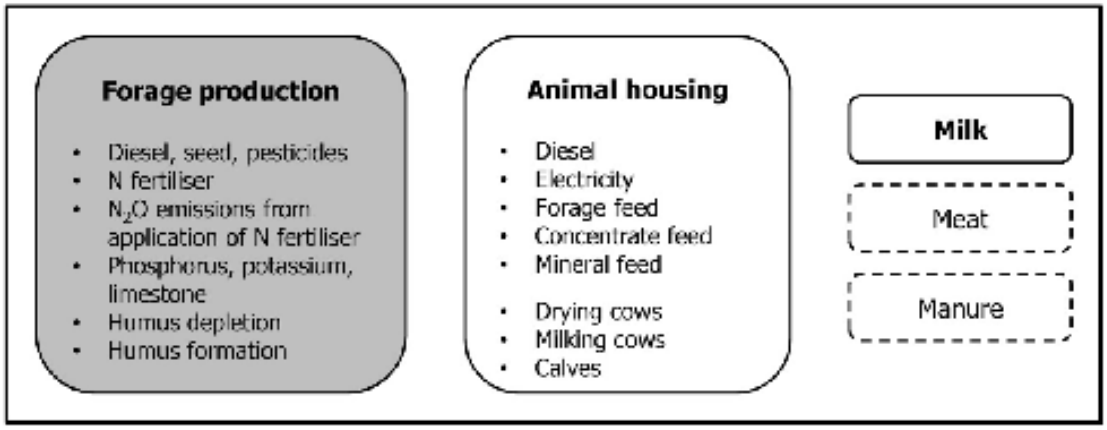


Figure 1: Milk production system within boundaries assessed. Grey box reflects the cultivation of forage feed, which is assessed separately and as part of the milk system.
Co-products are illustrated in boxes with dashed lines

The functional unit of the system was one kg of energy-corrected milk (ECM; IDF, 2010) at farm gate. Resulting, the delivery of milk to the dairy factory and the processing were not included. Since dairy systems do not only result in the production of milk, several co-products have to be considered when assessing GHG emissions of milk. Co-products included meat from culled dairy cows and surplus calves as well as manure used as crop fertiliser. The overall GHG emissions of the system have to be allocated to the various products. Hence, 13 % of the overall emissions were allocated to meat, whereas 12 % and 75 % were referred to manure and milk, respectively.

The assessment was performed by a cooperation of the Provincial Chamber of Agriculture of Lower Saxony together with the farm, representing milk production in 2012. Since feed production is already known as having great impact on the overall environmental impacts of milk, it was especially considered in this analysis. Main characteristics of forage feed are shown in table 1, representing the production of maize silage and grass silage. 103 ha of cropland were cultivated in total. Characteristic biological performances of the dairy farm are listed in table 2, where average yearly milk yield amounted 11,028 kg ECM per cow.

In order to facilitate the classification of results presented, the dairy farm under study was compared to two types of average farms. The farms were modelled by means of data from the Provincial Chamber of Agriculture of Lower Saxony reflecting benchmark gross values of dairy farms. Out of this data, a dairy farm producing least GHG emissions was modelled as well as a dairy farm emitting highest GHG.

Table 1: Main characteristics of the cultivation of forage feed in 2012

	Maize	Grass	Pasture
Cropland (ha)	41	32	30
Net yield per ha (kg)	12,700	9,500	12,800
Energy content of silage (MJ NEL per kg DM)	6.8	6.2	6.3
Total N fertiliser applied (kg N per ha)	220	240	270
P fertiliser applied (kg P_2O_5 per ha)	115	70	80
K fertiliser applied (kg K_2O per ha)	215	220	250
Limestone fertiliser applied (kg CaO per ha)	250	250	300

Table 2: Main characteristics of the dairy farm as performed in 2012

Dairy farm characteristics (per year)		
Herd size	176	milking cows
Milk yield	11,028	kg ECM
Age of first calving	26	months
Calving rate	1.02	calves per cow
Forage use	5,500	kg DM per cow
Electricity use	250	kWh per cow

Results

The assessment of forage cultivation resulted in GHG emissions of 435, 262 and 152 g CO_2-eq per kg DM net yield for maize silage, grass and pasture, respectively. Shares of different parameters impacting the results are illustrated in figure 2. As shown, maize production highly contributed to humus depletion which in turn raised GHG emissions (41 % of overall CO_2-eq). Other main contributors of maize to the GHG emissions were the production and application of N fertiliser (47 %). In contrast, diesel, seed and pesticides as well as fertilisation of phosphorus, potassium and lime contributed less to the overall GHG emissions in all three cropping systems assessed. The cultivation of grassland and pastureland did not result in any humus depletion. It rather caused humus formation, thereby reduc-

ing the results considerably. In both systems, impacts of N fertilisation were comparable to those described for maize. Thus, the differences in soil effects mainly defined the variations between different cropping systems assessed.

The overall GHG assessment of milk produced in 2012 resulted in 649 g CO_2-eq per kg ECM milk. Different parameters influencing the results are illustrated in figure 3. As shown, the overall GHG emissions were mainly caused by CH_4 emissions due to enteric fermentation of the animals (41 %). Another parameter highly influencing the results was production of feedstuffs (38 %), whereas forage and concentrate feed had comparable shares. The remaining 21 % of emissions were due to the housing of animals, which included electricity and diesel, stock replacement and manure management.

The overall results were compared to two modelled dairy farms, as described above. Figure 4 shows that the company-owned dairy farm performed best in terms of GHG emissions. Compared to the modelled dairy farm with highest results, GHG emissions were reduced by 28 %.

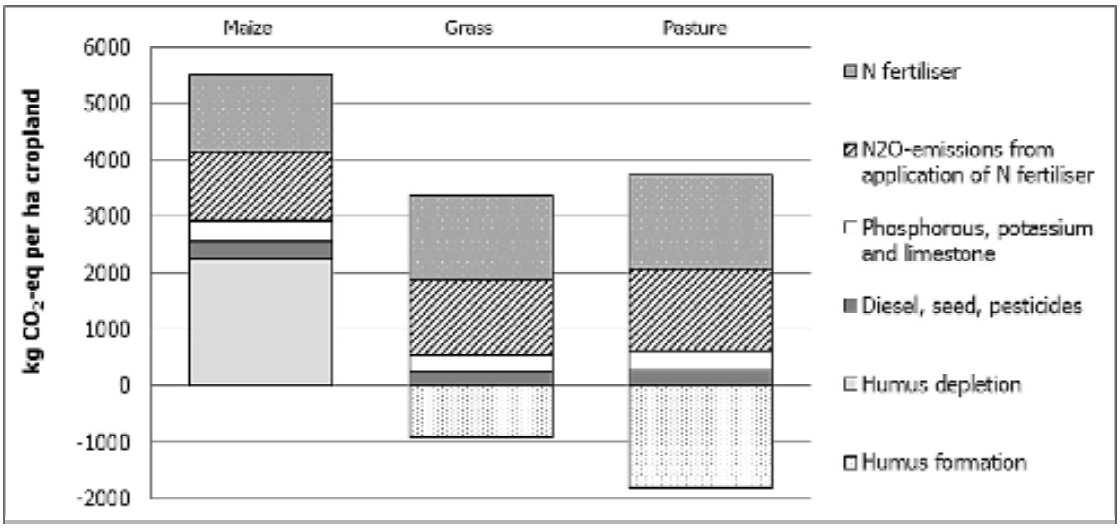


Figure 2: Shares of various production parameters to the GHG emissions from forage cultivation

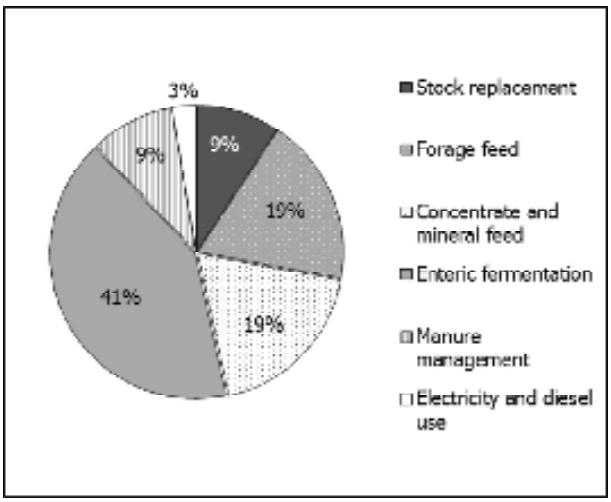


Figure 3: Percentages of various production parameters to the GHG emissions from milk production

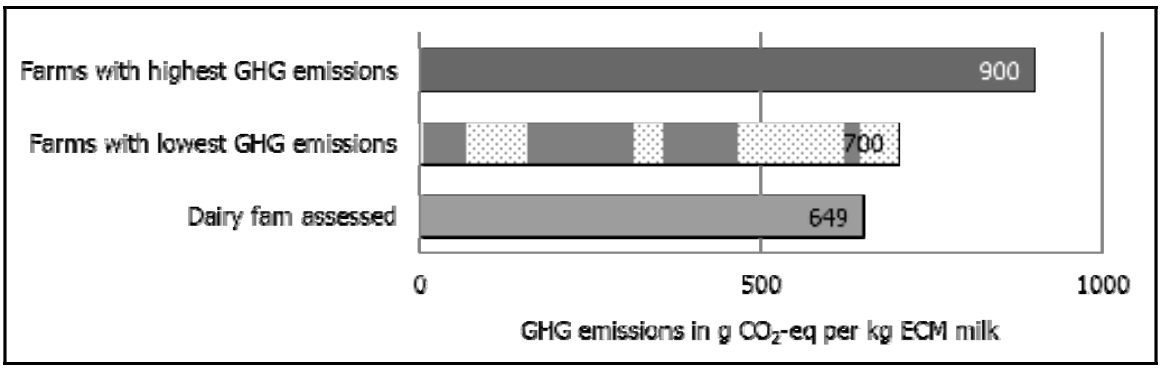


Figure 4: Comparison of GHG emissions from milk produced in modelled farms with highest and lowest GHG emissions with milk produced in the field

Conclusion

The assessment of milk produced in the field showed that the dairy farm performed better-than-average. The analysis resulted in 649 g CO_2-eq per kg ECM milk produced. Main strengths of the farm are listed in the following:

- gas-tight storage of a large share (45 %) of manure produced
- higher-than-average milk yield of the herd
- high energy content of forage feed due to an optimised ensiling management
- efficient grass cultivation
- low electricity consumption

Additionally, based on the analyses presented, some measurements potentially reducing GHG emissions have been identified. Options for improvement included use of a greater amount of manure stored gas-tight, the improvement of N-efficiency in maize cultivation as well as immediate incorporation of manure applied to the field. More precisely, an increased gas-tight storage to 100 % of manure produced would result in a reduction of 66 g CO_2-eq per kg ECM milk. Minimising N fertilisation to 180 kg N per ha maize would reduce 42 g CO_2-eq per kg DM net yield. The benefit of those management practices derived from the analysis will be assessed by another assessment in the field during the year.

References

Flysjö, A. (2012). Greenhouse gas emissions in milk and dairy product chains - improving the carbon footprint of dairy products. PhD Thesis, Department of Agroecology. Aarhus University, Tjele, Denmark.

Gerber, P., Vellinga, T., Opio, C. & Steinfeld, H. (2010). Greenhouse Gas Emissions from the Dairy Sector, A Life Cycle Assessment. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Animal Production and Health Division, Rome, Italy.

IDF, International Dairy Federation (2010). A common carbon footprint approach for dairy. The IDF guide to standard lifecycle assessment methodology for the dairy sector. Bulletin of the International Dairy Federation 445; Brussels, Belgium.

Corresponding author

Dr. Karoline Reckmann
Union Agricole Holding AG
An der Muehlenau 4, D-25421 Pinneberg
E-mail: karoline.reckmann@union-agricole.de

Gehalte an Vitamin A und E in Tankmilch von Weide- und TMR-Betrieben

Ulrich Roser[1], Thomas Jilg[2], Hermine Kienberger[3], Wolf Pelletier[1] und Arnulf Tröscher[1]

[1] BASF SE, DE
[2] Technische Universität München, DE
[3] LAZBW Aulendorf, DE

Einleitung

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf unterschiedliche Gehalte an den Vitaminen A und E in Milch von Weideherden gegenüber TMR-Herden. Die Versorgung mit diesen Vitaminen wird in aller Regel über vitaminisiertes Mineralfutter sichergestellt. Vitamin A wird von Tieren aus dem Betacarotin (BC) der Pflanzen synthetisiert. Die Umwandlungsrate ist von der Vitamin A-Versorgung des Tieres abhängig. So können Tiere die Vitamin A-Zufuhr aus Pflanzen regulieren. Konserviertes Grünfutter verliert über die Lagerdauer an Betacarotin. Dies ist besonders bei Silage zu beachten, während BC in Heu stabiler ist. Vitamin A-Gehalte je Liter FCM werden in der Literatur mit ca. 600 IU (Calderón *et al.* 2007) bis 2000 IE (ARC - USDA 2014) angegeben. Der Vitamin E-Gehalt hängt sehr stark von der Fütterung ab, wobei Milch von der Weide in der Literatur mit bis zu über 2 mg und solche aus einer TMR-Fütterung mit unter 1 mg/l Milch (Focant M. *et al.* 1998; Vagni *et al.* 2011) beschrieben wird. Da Gehaltsprofile über die gesamte Weideperiode neueren Datums zu diesen beiden fettlöslichen Vitaminen kaum zu finden sind, wollten wir in unserer Studie helfen, diese Lücke zu schließen. Außerdem wollten wir auch den Effekt eines unterschiedlichen Weideanteils auf diese zwei fettlöslichen Vitamine beleuchten.

Material und Methoden

Wir untersuchten Milch von 3 Betrieben: ein TMR-Betrieb (A=Fleckvieh), ein Vollweidebetrieb (B=Braunvieh), und ein Gemischtbetrieb (C=Holstein Friesian). Der Betrieb A liegt 550 bis 660 m über NN. Die Durchschnittstemperatur liegt bei 8,4 °C und der durchschnittliche Niederschlag beträgt 900 mm. Bei den Rindern beläuft sich der Bestand auf 81 Milchkühe, 110 Stück weibliches Jungvieh, 80 Kälber (bis 6 Monate), 60 Mastbullen und 31 Mutterkühe. Das Milchvieh wird ganzjährig im Stall gehalten mit ganzjähriger Abkalbung und einer Fütterung mit einer TMR-Ration in 2 Gruppen. Diese Mischungen bestehen aus Grassilage, Maissilage, Biertreber, Getreide, Rapsprodukte und Stroh. Im Jahr 2011 lag die Herdenleistung bei 8.827kg Milch mit 4,10% Fett und 3,55% Eiweiß. Vom Betrieb A wurden von April bis November 35 Tankmilchproben, einmal wöchentlich, entnommen und eingefroren. Der Betrieb B wirtschaftet biologisch und liegt in einer Höhe von 590 -630 m NN. Der Betriebsschwerpunkt liegt auf der Milchviehhaltung, der Ochsenmast sowie der Kälberaufzucht. Der Bestand setzt sich zusammen aus 32 Milchkühen, 50 Masttieren (Mastochsen und Mastfärsen) sowie Kälbern. Von Mai bis Oktober besteht die Fütterung hauptsächlich aus Weidegras und maximal 1,5 kg Getreide als Lockfutter zum Melken. Eine Supplementierung mit vitaminisiertem Mineralfutter erfolgt. Die Weide setzt sich im Frühjahr hauptsächlich aus Löwenzahn, später aus Weißklee und Dt. Weidelgras zusammen. Im Winter dient als Grobfutterbasis vorwiegend Grassilage und Heu sowie etwas Getreideschrot. Man betreibt saisonale Frühjahresabkalbung, wobei die Abkalbezeit um die Monate März - Mai liegt (2011 um den 20 April). Im Jahr 2011 lag seine Herdenleistung bei ca. 6.200 kg Milch mit 4,17% Fett

und 3,49% Eiweiß. Von dem Betrieb B wurden von April bis Oktober, einmal wöchentlich insgesamt 29 Tankmilchproben entnommen und eingefroren. Der Betrieb C wirtschaftet biologisch. Sein Betriebsschwerpunkt liegt auf der Bio-Milch-Erzeugung. Der Tierbestand umfasst derzeit 85 Kühe der Rasse Holstein, schwarz- und rotbunt. Diese werden in einem Laufstall gehalten und kalben ganzjährig. Die Fütterung besteht in der Weidesaison hauptsächlich aus Gras auf der Kurzrasenweide mit Weidelgras-Kleegraseinsaat mit ca. 40% Weißklee. Zusätzlich erhalten die Kühe ganzjährig Silomais (6,0 kg/Tier/Tag FS; 32,7% TS, 6,62 NEL, 197g XF) und Kleegrassilage (20 -25kg/Tier/Tag FS; 38,5% TS, 152 XP, 6,0 NEL, XF 230) und vitaminisiertes Mineralfutter. 2011 lag die Herdenleistung bei 7.119 kg Milch mit 3,94 % Fett und 3,05 % Eiweiß. Vom diesem Betrieb wurden während der Weideperiode, April bis November, einmal wöchentlich insgesamt 32 Tankmilchproben gezogen und sofort eingefroren. Alle Proben wurden von einem Kurier eingesammelt und zur Technischen Universität München - Weihenstephan (TUM) zur anschließenden Analyse transportiert. Die Analyse erfolgte für die Vitamine A und E nach der EU-Verordnung zur amtlichen Futtermittelanlyse (EU Kommission 27. Januar/ 2009).

Ergebnisse

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, gab es signifikante Unterschiede im Vitamin A-Gehalt zwischen dem Vollweidebetrieb B und den Betrieben A und C. Letztere waren statistisch nicht zu unterscheiden. Die beiden Betriebe A und C hatten sehr gut übereinstimmende Gehalte von ca. 2200 I.E./kg Milch. Sie lagen ca. 15% über dem A-Gehalt des Vollweidebetriebes B.

Tabelle 1: Die Gehalte an Vitamin A und E im Jahresdurchschnitt je Betrieb (Mittelwerte, Standardabweichung und p-Werte (t-Test)). Betrieb B: Vollweide; Betrieb C: Gemischt; Betrieb A: TMR.

		Vitamin A	Vitamin E
	Betriebe	I.E/kg	mg/kg
Mittelwert	B	1936	1,77
	C	2246	1,04
	A	2266	0,65
Standardabw.	B	366	0,64
	C	301	0,37
	A	474	0,10
t-Test, p-Werte	B:C	0,001	0,00001
	B:A	0,004	0,00000
	A:C	0,839	0,00000

Sehr deutlich waren die Unterschiede im Gehalt an Vitamin E zwischen allen 3 Betrieben. Dabei stieg der Jahresdurchschnittsgehalt mit steigendem Weideanteil an und lag mit 1,72 mg/kg Milch um Faktor 3 höher als der E-Gehalt der TMR-Milch. Die Vitamin E-Gehalte der Milch waren negativ korreliert mit der Milchleistung.

Das Vitamin-A-Profil über die Weideperiode ist in Abbildung 1 dargestellt. Der Vollweidebetrieb B liegt konstant zwischen 1500 und 2500 I.E/kg Milch, während die Gehalte vom TMR-Betrieb A wesentlich stärker variieren. Die Vitamin A-Gehalte von Betrieb C zeigen die geringsten Streuungen. Eine abnehmende Tendenz über die Untersuchungsperiode hinweg ist für die Betriebe A und C feststellbar.

Das Vitamin E-Profil ist in Abbildung 2 dargestellt. Hier zeigen sich ausgeprägte Streuungen der Betriebe B und C. Der Vollweidebetrieb B liegt auf einem deutlich höheren Niveau als die beiden Betriebe A und C, mit einer Tendenz zu höheren Gehalten im Spätjahr bei B. In zahlreichen Milchproben aus dem TMR-Betrieb A lagen die Vitamin E-Gehalte unterhalb der Nachweisgrenze.

BTC
Chemical Distribution

Your partner for Feed Additives

Our Expertise - Your success

Visit us online at
www.btc-europe.com

BTC for Nordic/Baltics
Tel. +45 32 66 07 50

BTC for UK/Ireland
Tel. +44 161 488 52 23

BTC for Poland
Tel. +48 22 570 97 24

BTC for Germany/
Austria/Eastern
Europe/Switzerland
Tel. +49 984 398 28 0

BTC for Benelux
Tel. +32 2 373 22 18

BTC for Italy
Tel. +39 036 25 1 21

BTC for Iberia
Tel. +34 93 521 42 99

BTC for Greece
Tel. +30 210 686 02 05

A brand of
BASF
The Chemical Company

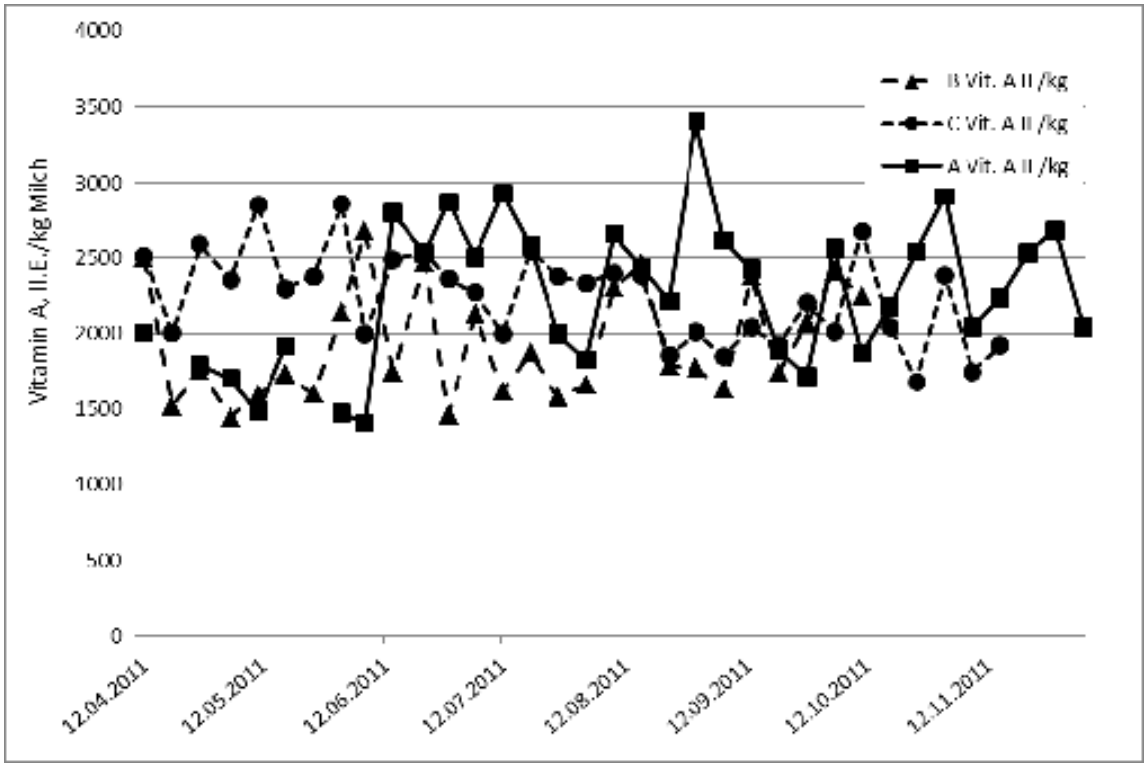


Abbildung 1: Saisonaler Verlauf der Vitamin A-Gehalte über die Weideperiode von 3 Betrieben mit unterschiedlichem Weideanteil. Betrieb B: Vollweide; Betrieb C: Gemischt; Betrieb A: TMR

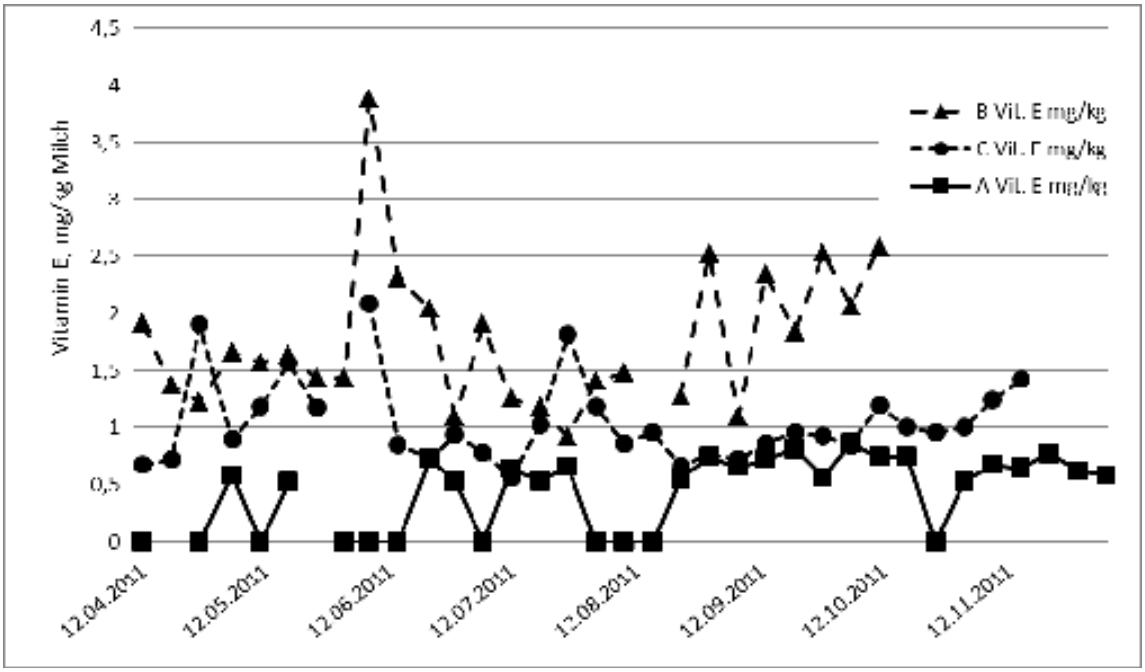


Abbildung 2: Saisonaler Verlauf der Vitamin E-Gehalte über die Weideperiode von 3 Betrieben mit unterschiedlichem Weideanteil. Betrieb B: Vollweide; Betrieb C: Gemischt; Betrieb A: TMR

Diskussion

Die in der Tabelle 1 dargestellten Gehalte aller Betriebe an Vitamin A stimmen mit der Literatur weitgehend überein, und bescheinigen eine gute Versorgungslage (ARC - USDA 2014). Die Streuung (Abbildung 1) über die geprüfte Periode dürfte die zuverlässige Ergänzung mit vitaminisiertem Mineralfutter widergeben.

Die Vitamin E-Gehalte streuen erheblich zwischen den Betrieben. Einerseits ergibt sich eine positive Abhängigkeit vom Weideanteil und andererseits eine mögliche negative Abhängigkeit von der Höhe der Milchleistung. Die erste Beziehung wird in der Literatur bestätigt. So enthält Milch von organisch geführten Betrieben (mit systembedingt hohem Anteil von Weidegang in dieser Produktionsform) mehr Vitamin E gegenüber konventionellen Betrieben (Nielsen *et al.* 2004), auch, wenn in den konventionellen Betrieben Vitamin E supplementiert wurde. Bei einer insgesamt sehr niedrigen Transferrate von <2% konnten selbst supra-nutritive Zulagen an Vitamin E den Gehalt in der Milch nicht über ca. 1,6 mg/l hinaus erhöhen (Vagni *et al.* 2011). In Milch oder Milchprodukten von organisch geführten bzw. weidenden Betrieben wird regelmäßig mehr Vitamin E gefunden als in Milch oder Milchprodukten von vergleichbaren konventionellen Betrieben (Bergamo *et al.* 2003; Delgado-Pertíñez *et al.* 2013). Eine neue Arbeit aus Schweden legt nahe, dass die Vitamin E-Versorgung für organisch gehaltene Kühe, ohne eine weitere Zulage unzureichend sein könnte (Johansson *et al.* 2014). Sie verfolgten die Kühe über 2 Jahre und fanden in der 2. Laktation bei diesen Kühen eine vermehrte Häufung von Mastitis gegenüber supplementierten Kontrolltieren. Die E-Gehalte der Milch waren trotz einer Supplementierung der Kontrolltiere mit ca. 600 mg täglich, auf gleicher Höhe wie die Milch der organisch gefütterten Kühe und zwar nur auf 0,48 bis 0,75 mg pro Liter. Angesichts von steigenden Fettgehalten in modernen Rationen ist auch der Befund von Interesse, dass eine Vitamin E-Supplementierung zu einer Sojaölzulage (O'Donnell-Megaro *et al.* 2012) zu einer signifikanten Steigerung der Milchleistung führen kann.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß der Vitamin A Gehalt der Milch anscheinend durch den Zugang zu mit Vitamin A angereichertem Mineralfutter beeinflußt war, jedoch in allen Betrieben auf einem guten und bedarfsdeckenden Versorgungsniveau lag.

Die in der Literatur beschriebenen höheren Vitamin E-Gehalte von Weidemilch konnten in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Ferner war der Vitamin E Gehalt der Milch negativ korreliert mit der Milchleistung. Unterstellt man, dass die drei Betriebe in unserer Untersuchung ähnliche Vitamin-E-Mengen supplementierten, so wäre zu diskutieren, ob die Milchleistung bei der Bemessung der Vitamin-E-Versorgung nicht mit herangezogen werden sollte. Höherleistende Milchkühe könnten von einer höheren Vitamin E Zulage profitieren.

Literatur

(27. Januar/ 2009) VERORDNUNG (EG) Nr. 152/2009 DER KOMMISSION zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln. In ´Amtsblatt der Europäischen Union´ pp. 1–130

ARC - USDA (2014) ´National Nutrient Database for Standard Reference. Release 26.´ Basic Report: 01175, Milk, fluid, 1% fat, without added vitamin A and vitamin D [Online]. Available at http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/154?qlookup=01175&max=25&man=&lfacet=&new=1

Bergamo, P, Elena Fedelea, Luigi Iannibellib, Giovanni Marzillob (2003) Fat-soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chemistry* 82 (4), 625–631. 10.1016/S0308-8146(03)00036-0

Calderón, F, Chauveau-Duriot, B, Pradel, P, Martin, B, Graulet, B, Doreau, M, Nozière, P (2007) Variations in Carotenoids, Vitamins A and E, and Color in Cow's Plasma and Milk Following a Shift from Hay Diet to Diets Containing Increasing Levels of Carotenoids and Vitamin E. *Journal of Dairy Science* 90 (12), 5651–5664. 10.3168/jds.2007-0264

Delgado-Pertíñez, M, Gutiérrez-Peña, R, Mena, Y, Fernández-Cabanás, VM, Laberye, D (2013) Milk production, fatty acid composition and vitamin E content of Payoya goats according to grazing level in summer on Mediterranean shrublands. *Small Ruminant Research* 114 (1), 167–175. 10.1016/j.smallrumres.2013.06.001

Focant M., E. Mignolet, M. Marique, F. Clabots, T. Breyne, D. Dalemans, Y. Larondelle (1998) The Effect of Vitamin E Supplementation of Cow Diets Containing Rapeseed and Linseed on the Prevention of Milk Fat Oxidation. *Journal of Dairy Science* (81), 1095–1101.

Johansson, B, Persson Waller, K, Jensen, SK, Lindqvist, H, Nadeau, E (2014) Status of vitamins E and A and β-carotene and health in organic dairy cows fed a diet without synthetic vitamins. *Journal of Dairy Science* 97 (3), 1682–1692. 10.3168/jds.2013-7388

Nielsen, JH, T. Lund-Nielsen, L. Skibsted (2004) Higher antioxidant content in organic milk than in conventional milk due to feeding strategy [Online]. Available at http://www.darcof.dk/enews/sep04/milk.html

O'Donnell-Megaro, AM, Capper, JL, Weiss, WP, Bauman, DE (2012) Effect of linoleic acid and dietary vitamin E supplementation on sustained conjugated linoleic acid production in milk fat from dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95 (12), 7299–7307. 10.3168/jds.2012-5802

Vagni, S, F. Saccone, L. Pinotti, A. Baldi (2011) Vitamin E Bioavailability: Past and Present Insights. *Food and Nutrition Sciences* 02 (10), 1088–1096. 10.4236/fns.2011.210146

VERORDNUNG (EG) Nr. 152/2009 DER KOMMISSION zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuc hung von Futtermitteln (27. Januar/ 2009). In ´Amtsblatt der Europäischen Union´ pp. 1–130

Autorenanschrift

Dr. Arnulf Tröscher
BASF SE, G-ENL/MT – F31
Chemiestr. 22, 68623 Lampertheim, Deutschland
E-Mail: arnulf.troescher@basf.com

Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci isolated from Montenegrin dairy products made of raw bovine milk

Sigrid Mayrhofer, Stefan Aigner, Katharina Dürr, Mary A.A. Ochome and Konrad J. Domig

BOKU – University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna Department of Food Science and Technology, AT

Introduction

Enterococci are naturally and consistently present in the intestine of farm animals. They are selected as Gram-positive indicator organisms to reflect the degree of resistance in the commensal flora of animals due to the selective pressure exerted by the use of antimicrobials in food animals.

Generally an increased expression of antimicrobial resistance in enterococci is observed. The resulting ability of enterococci to escape the action of commonly used antibiotics influences the rise in the prevalence of enterococcal infections in human to some degree (Hollenbeck and Rice, 2012).

To deal with the above mentioned topic the antimicrobial susceptibility of enterococci from dairy products made of cow's milk was investigated within this study and compared to already published data.

Materials and methods

About 300 lactic acid bacteria isolated from Montenegrin dairy products served as pool for the investigation. The isolates had originally been characterized on the basis of Gram-staining and katalase-test. Bacteria were maintained as cryo-cultures and resuscitated on M17 agar plates, which were incubated aerobically at 37°C for 24 hours. The taxonomic position of each isolate was assessed by RAPD-, genus- and species-specific PCR. Firstly RAPD-PCR was performed to group the isolates. Based on the obtained groups, genus- and species-specific PCRs were applied.

The antimicrobial susceptibility of the identified enterococci was determined by agar disc diffusion according to the protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). In brief, Mueller Hinton (MH; Oxoid) agar plates were inoculated with the bacterial inoculum, prepared by suspending *Enterococcus*-colonies from MH agar plates in 5 ml 0.85% NaCl solution to a turbidity of McFarland standard 0.5. Subsequently, antibiotic disks containing tetracycline, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, streptomycin, gentamicin, kanamycin, ampicillin, vancomycin and tylosin (Oxoid) were placed on the MH agar plates. Plates were incubated under aerobic conditions for 16-18h at 35°C, followed by measurement of the inhibition zone diameters (IZDs), including the diameter of the disk (in millimeters).

Isolates belonging to resistant subpopulations of clindamycin, kanamycin, streptomycin and tetracycline were randomly examined for the presence of resistance genes by PCR-based methods.

Results

Using RAPD-, genus- and species-specific PCR, 246 of 295 roughly classified lactic acid bacteria strains could be verified as enterococci. Of these, 195 isolates were identified as *En. faecium*, 30 isolates as *En. faecalis*, 12 isolates as *En. durans* and four isolates as *En. hirae*. Five isolates belonged to *Enterococcus* species, which couldn't be identified at species-level.

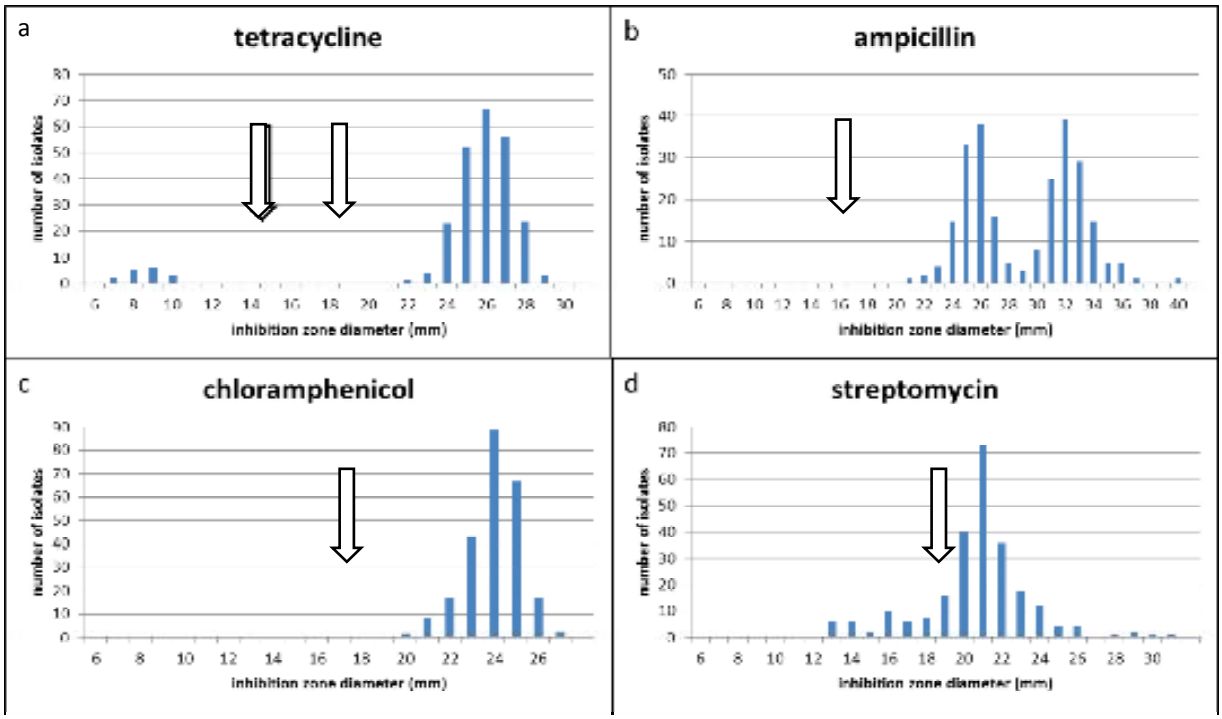


Figure 1: Distribution of minimum inhibitory concentrations (MICs) for a) tetracycline, b) ampicillin, c) chloramphenicol, d) streptomycin in 246 *Enterococcus* isolates. Arrows indicate breakpoints used to differentiate between susceptible and resistant isolates.

Obtained IZDs of all tested isolates and for each antibiotic were evaluated by graphically displaying them in form of a histogram. The distribution of IZDs in a histogram can be either unimodal, bimodal or even multimodal. In the simplest case, there is a bimodal distribution that facilitates the characterization of two subpopulations: one with large IZDs, representing susceptible isolates, and another one with smaller IZDs, corresponding to isolates possessing a resistance mechanism. Such distributions were observed for the antibiotics clindamycin, kanamycin and tetracycline (Figure 1a). For erythromycin and ampicillin also bimodal distributions were obtained. However, these distributions consisted of isolates with larger IZDs, indicating two different susceptible subpopulations (Figure 1b). If a population consists of several subpopulations that exhibit various levels of susceptibility, a so-called multimodal distribution can be defined on the basis of multiple resistance mechanisms. On the other hand, a unimodal distribution describes a population, which is either uniformly susceptible or resistant. Unimodal distributions could be determined for the antimicrobial agents tylosin, chloramphenicol, vancomycin, streptomycin and gentamicin. Whereas the unimodal distributions were narrow and located at the susceptible range for tylosin, chloramphenicol and vancomycin (Figure 1c), broader distributions were observed for gentamicin and streptomycin (Figure 1d). Regarding the last antibiotic, isolates with smaller IZDs were classified as resistant due to the streptomycin-breakpoint of EUCAST.

Except of the tetracycline resistance genes found in all isolates belonging to the resistant subpopulation, none of the other tested resistance genes could be detected.

Discussion

Animal data have clearly shown the relationship between the exposure to antibiotics and the level of antimicrobial susceptibility of enterococci colonizing the gastrointestinal tract (Hollenbeck and Rice, 2012).

Within this study the antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from Montenegrin dairy products were investigated. According to our results, all of them were susceptible to tylosin, chloramphenicol, erythromycin, vancomycin and gentamicin. Resistant subpopulations could be determined for the antibiotics clindamycin, kanamycin, tetracycline and streptomycin. However, no resistance genes could be detected for these antibiotics, except of genes coding for tetracycline resistance. Looking at the susceptibility data in more detail, most resistant isolates belonged to the species *E. faecalis* (clindamycin, streptomycin), *E. hirae* (clindamycin, streptomycin), *E. durans* (kanamycin) or undetermined *Enterococcus* spp. (clindamycin). Hence it is known that the species *E. faecalis* is intrinsically resistant to clindamycin and streptomycin due to an efflux pump and low cell wall permeability (Hollenbeck and Rise, 2012). Thus, intrinsic resistance mechanisms are also supposed for the other two species and acquired resistance could mainly be detected for tetracycline.

Also low levels of antibiotic resistance were found by Čanžek Majhenič et al. (2005) investigating enterococci from cheese made in the nearby region Slovenia. On the other hand three out of five *En. faecalis* isolates from Spanish artisanal raw milk cheeses displayed resistance to up to eight different antibiotics and one of two *En. durans* isolates was resistant to vancomycin (Rodríguez-Alonso et al., 2009). This resistance appeared to be common in *Enterococcus* strains from several cheese varieties described in former studies (Rodríguez-Alonso et al., 2009). The structurally-related antibiotic avoparcin had been used as feed additive to promote growth of farm animals for a long time. The ban on avoparcin as feed additive in Europe may be the cause of the vancomycin susceptibility observed in recently isolated enterococci (Rodríguez-Alonso et al., 2009). The acquired tetracycline resistance in the tested enterococci isolates corresponds to the literature as this resistance is the most common bacterial antibiotic resistance found in nature (Chopra and Roberts, 2001). Low costs have made tetracycline attractive for agricultural use (Roberts, 2003). However, a low level of enterococci with acquired resistance has been found within this study which may be due to a low exposure to antibiotics.

Acknowledgements

This work was performed within the WTZ project (OeAD)- "Identification and basic characterization of potential lactic acid bacteria starter cultures isolated from traditional fermented milk in Montenegro"

References

Čanžek Majhenič et al. (2005) Enterococci from Tolminc cheese: Population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. International Journal of Food Microbiology 102, 239–244.

Chopra, I. and M. Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews 65, 232–260.

CLSI (2012) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards – 11th ed., document M2-A11.

EUCAST (2013) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. http://www.eucast.org

Hollenbeck, B.L. and L.B. Rice (2012) Intrinsic and acquired resistance mechanisms in Enterococcus. Virluence 3, 421–423.

Roberts, M. C. (2003) Acquired tetracycline and/or macrolide-lincosamides-streptogramin resistance in anaerobes. Anaerobe 9, 63–69.

Rodríguez-Alonso et al. (2009) Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and Micrococcaceae/Staphylococcaceae isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. Journal of Food Safety 74, 284–293.

Corresponding author

Dr. Sigrid Mayrhofer
Universität für Bodenkultur Wien
Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie
Institut für Lebensmittelwissenschaften
Arbeitsgruppe für Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene
E-mail: sigrid.mayrhofer@boku.ac.at

Einfluss der Lysinversorgung auf die Schlachtkörperzusammensetzung und die Nährstoffzusammensetzung wertvoller Teilstücke von Pekingenten

Wolfgang Wetscherek, Carmen Neumann und Karl Schedle

Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, AT

Einleitung

Der Entenfleischverzehr in Österreich liegt nur bei etwa 0,3 kg/ Kopf und Jahr (STATISTIK AUSTRIA, 2013). Die Nachfrage nach Entenfleisch war aufgrund des hohen Fettgehaltes der Pekingenten in der Vergangenheit eher zurückhaltend und hat sich hauptsächlich auf die Weihnachts- und Osterzeit konzentriert. Durch intensive Zuchtarbeit konnte bei der Pekingente der Fettgehalt deutlich reduziert und der Brustfleischanteil erhöht werden. Dies hat dazu beigetragen, die Akzeptanz von Entenfleisch beim Konsumenten zu erhöhen (GRASHORN, 2012).

Fragestellung

Einfluss eines 10% über den Bedarfsempfehlungen liegenden Lysingehaltes bei Pekingenten auf:

- Tageszunahmen
- Futteraufwand je kg Zunahme
- Anteil der wertvollen Teilstücke
- Nährstoffzusammensetzung von Brust- und Schenkelfleisch

Material und Methoden

Der Versuch wurde im Geflügelversuchsstall, Äußere Wimitz 3, A-9311 Kraig, Kärnten im August/September 2013 durchgeführt. Es wurden 120 zwei Tage alte Pekingentenküken (87±9g) in jeweils drei Boxen pro Versuchsgruppe aufgeteilt und bis zum 42. Lebenstag gemästet.

Fütterung

Um dem sich im Verlauf der Mast ändernden Nährstoffbedarf der Tiere gerecht zu werden, wurden die Nährstoffkonzentrationen der Futterrationen in 2 Mastphasen angepasst (Tabelle 1). Für die Kontrollgruppe wurden die Energie- und Aminosäurengehalte der Empfehlung für Pekingenten (EVONIK 2010) verwendet. Bei der Lysin-Gruppe wurde der Lysingehalt unter Verwendung von L-Lysin HCL um 10% erhöht. Das Futter und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt. Die Zusammensetzung der Futtermischungen ist in der Tabelle 1 dargestellt.

Datenerhebungen und Probenziehungen

Von jeder Versuchsgruppe wurden 18 Tiere nach der Schlachtung zerlegt und neben dem Gewicht der grillfertigen Ware auch die Gewichte von Brust, Schenkel, Restkörper, Leber und Abdominalfett erhoben. Jeweils ein Schenkel und eine Brust jedes Tieres wurden im rohen bzw. im gebratenen Zustand

auf Trockenmasse-, Asche-, Eiweiß- und Fettgehalt untersucht. Bei der Zubereitung der rohen Schenkel und Brust wurde zusätzlich der Grillverlust bestimmt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Futtermischungen

Futtermittel, %	**Growerphase (1.-21. Tag)**		**Finisherphase (22.-42.Tag)**	
	Kontrolle	**Lysin**	**Kontrolle**	**Lysin**
Mais	20,00	19,968	10,00	9,989
Weizen	22,67	22,67	12,06	12,06
Gerste	10,00	10,00	20,00	20,00
Unifrutol	6,78	6,78	9,68	9,68
Actiprot	10,00	10,00	10,00	10,00
Sojaextraktionsschrot	24,39	24,39	10,34	10,34
Erbse	-	-	20,00	20,00
Grasgrünmehl	3,00	3,00	5,00	5,00
Futterkalk	1,323	1,323	1,136	1,136
Dicalciumphosphat	0,85	0,85	1,008	1,008
Viehsalz	0,18	0,18	0,17	0,17
L-Lysin	**0,315**	**0,347**	**0,112**	**0,123**
DL-Methionin	0,126	0,126	0,255	0,255
L-Threonin	0,136	0,136	0,066	0,066
L-Tryptophan	-	-	0,012	0,012
Prämix	0,23	0,23	0,161	0,161
Errechneter Nährstoff- und Energiegehalt				
AME_N, MJ/kg	12,20	12,20	12,60	12,60
Rohprotein, g/kg	200	200	170	170
Lysin, g/kg	**11,60**	**12,76**	**9,00**	**9,90**

Ergebnisse

Analysenergebnisse

Die Analysen der eingesetzten Futtermischungen unterschieden sich nicht wesentlich und entsprachen den errechneten Nährstoff- und Energiegehalten. Der Zusatz von L-Lysin führte zu der gewünschten Anhebung des Lysingehaltes in den Futtermischungen.

Zootechnische Leistungen

Der höhere Lysingehalt führte zu signifikant besseren Tageszuwächsen und zu einem geringeren Futteraufwand in der Endmast der Pekingenten. Weiters bewirkte die Erhöhung des Lysingehaltes einen höheren Brustanteil an der grillfertigen Ware (Tabelle 2).

Nährstoffzusammensetzung von Brust und Schenkelfleisch

Die 18 Proben je Gruppe wurden in drei Gewichtsgruppen unterteilt und miteinander verglichen. Insgesamt lag im rohen Schenkelfleisch mit Haut der Eiweißgehalt bei ca. 17% und der Fettgehalt bei ca. 22% und unterschied sich nicht signifikant. Einzig bei der individuellen Auswertung der Gewichtsgruppen war bei den leichten Pekingenten der Eiweißgehalt der Lysingruppe signifikant um 1,3% geringer (Abbildung 1). In Abbildung 2 werden die Eiweiß- und Fettgehalte der gebratenen Schenkelproben dargestellt. Insgesamt lag der Eiweißgehalt bei ca. 23% und der Fettgehalt bei ca. 16%. Der Bratverlust bei der Zubereitung unterschied sich nicht zwischen den Gewichtsklassen und Gruppen und lag bei ca. 28% und ist neben einem Wasserverlust auch auf einen deutlich veringerten Fettgehalt zurückzuführen.

Bei der Analyse der rohen Brustproben mit Haut konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gewichtsklassen bzw. Versuchsgruppen festgestellt werden. Im Durchschnitt lag der Eiweißgehalt bei ca. 14,5% und der Fettgehalt bei 24,5% (Abbildung 3). Beim gebratenen Brustfleisch erhöhte sich der Eiweißgehalt auf ca. 23% und der Fettgehalt reduzierte sich auf ca. 20% im Vergleich zur rohen Ware. Auch hier traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und Gewichtsklassen auf (Abbildung 4).

Der Bratverlust bei der Zubereitung unterschied sich zwischen den Gewichtsklassen, aber nicht zwischen den Gruppen. Bei leichten Pekingenten lag der Zubereitungsverlust bei ca. 42% und reduzierte sich bei den schweren auf ca. 35%.

Tabelle 2: Mast- und Schlachtleistungsergebnisse

Merkmal	Kontrolle	Lysin	SEM	P-Wert
Tageszunahme Growerphase, g/d	56	55	0.89	0.472
Tägl. Futteraufnahme Growerphase, g/d	102	100	0.96	0.406
Futteraufwand Growerphase, kg/kg	1.80	1.82	0.03	0.820
Tageszunahme Finisherphase, g/d	74	78	0.96	**0.020**
Tägl. Futteraufnahme Finisherphase, g/d	213	209	2.37	0.373
Futteraufwand Finisherphase, kg/kg	2.87	2.67	0.06	**0.099**
Lebendgewicht Tag 42, g	2896	2959	22.42	0.154
Grillfertige Ware, g	1843	1864	15.27	0.504
Abdominalfett, g	36	35	1.05	0.566
Leber, g	60	59	0.76	0.495
Anteil der grillfertigen Ware, % der LM	75.2	75.1	0.16	0.705
Brust, % der grillfertigen Ware	20.2	21.7	0.36	**0.029**
Schenkel, % der grillfertigen Ware	22.5	22.4	0.26	0.782
Restkörper in % der LM, %	43.7	42.6	0.36	0.113

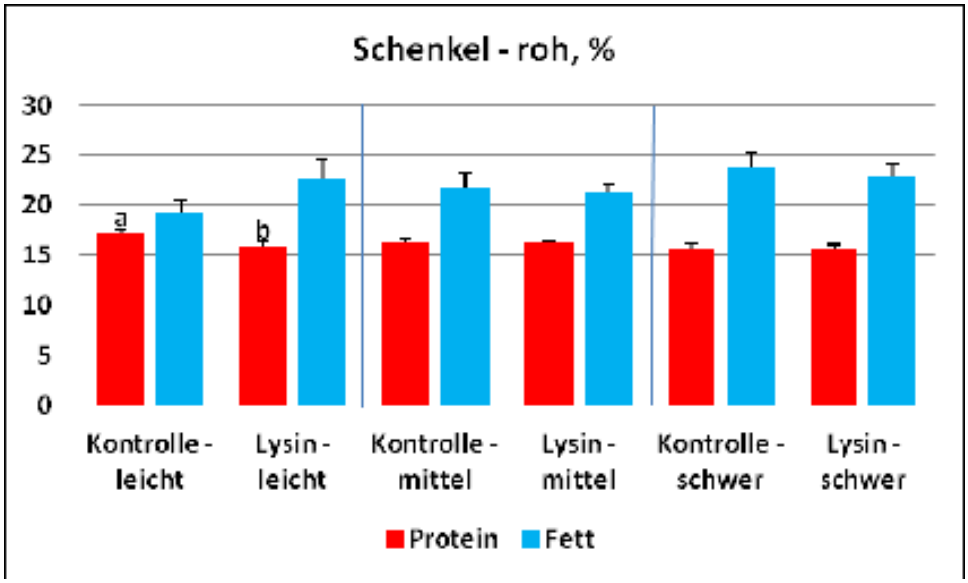


Abbildung 1: Protein- und Fettgehalt des rohen Schenkelfleisches mit Haut

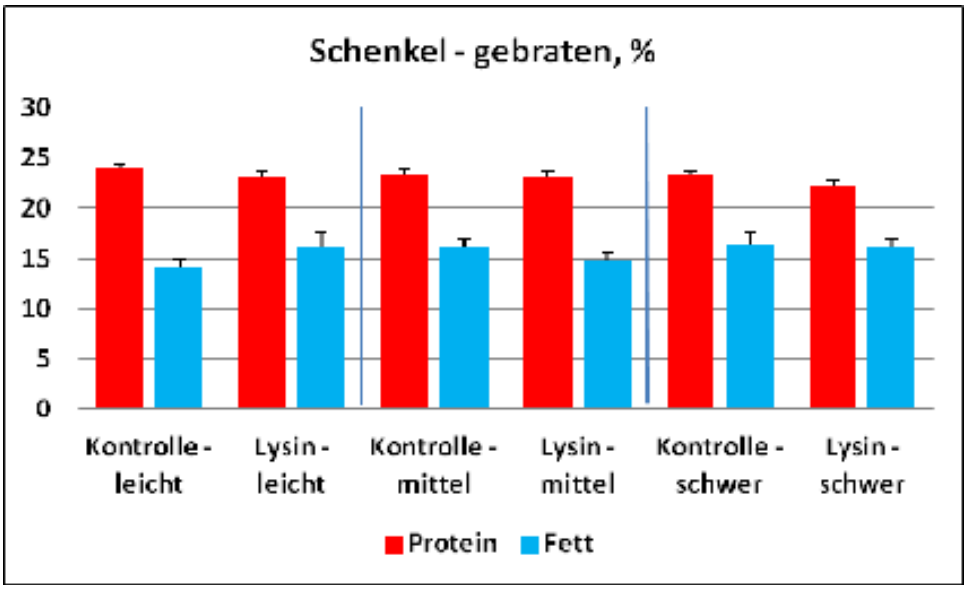


Abbildung 2: Protein- und Fettgehalt des gebratenen Schenkelfleisches mit Haut

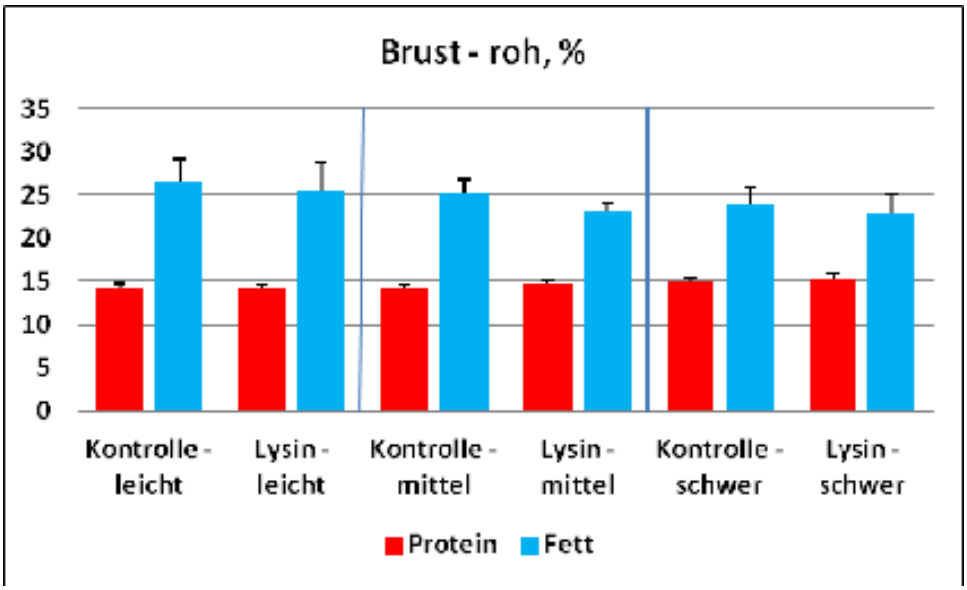


Abbildung 3: Protein- und Fettgehalt des rohen Brustfleisches mit Haut

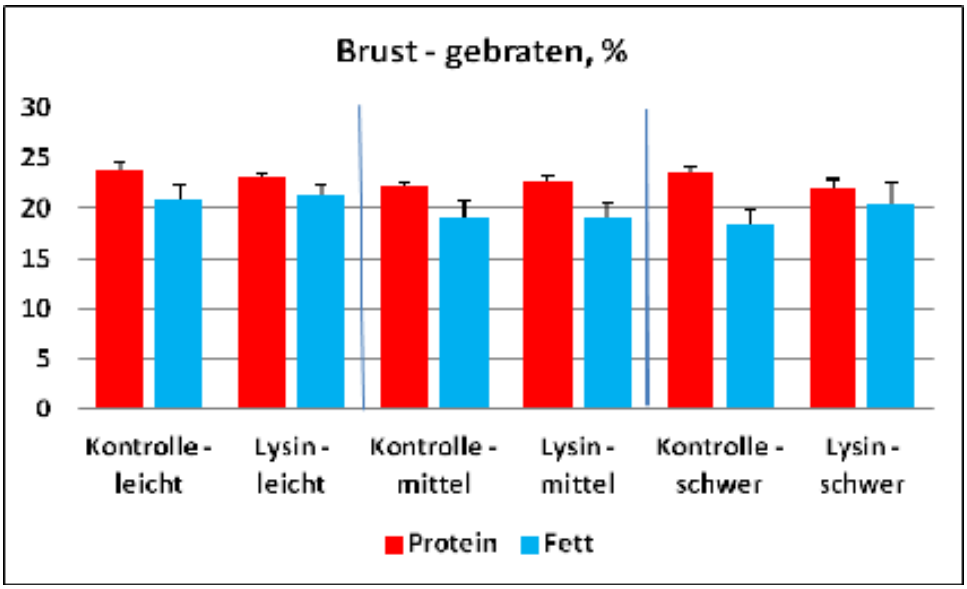


Abbildung 4: Protein- und Fettgehalt des gebratenen Brustfleisches mit Haut

Zusammenfassung

Die Erhöhung des Lysingehaltes um 10% über den EVONIK-Empfehlungen führte zu signifikant bessern Tageszuwächsen in der Endmast und zu einen signifikant höheren Anteil des Brustfleisches. Die Nährstoffzusammensetzung von Schenkel und Brust wurde durch den höheren Lysingehalt in der Futtermischung nicht verändert.

Literatur

EVONIK (2010): Überarbeitet Aminosäurenempfehlungen. AminoNews 14, 1, 27-30.

GRASHORN M. (2012): Entenmast DLG-Merkblatt 377, DLG e.V. Fachzentrum Land- und Ernährungswirtschaft, 1. Auflage. Frankfurt am Main

STATISTIK AUSTRIA (2013): Versorgungsbilanzen für Geflügel nach Arten 2012. Verfügbar: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/land_und_forstwirtschaft/preise_bilanzen/versorgungsbilanzen/ (Zugriff: 23.11.2013)

Autorenanschrift

Ao. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Wetscherek
Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie
Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln
Universität für Bodenkultur Wien
Muthgasse 11, 1190 Wien
E-Mail: wolfgang.wetscherek@boku.ac.at

Autorenverzeichnis

Adler, A. 297
Aigner, S. 343
Awad, W. 307, 309
Baarslag, L. 274
Bachinger, D. 293
Bartelt, J. 76, 88
Bartkiene, E. 257
Becker, C. 268
Bedford, M. 102
Bělková, J. 85
Berrios, R. 287
Berthiller, F. 312
Bliznikas, S. 212
Böhm, J. 307, 309
Bormann, T. 26
Bosse, A. 130
Brandsch, C. 54
Bravo, D. 72
Breitsma, R. 287
Brenes Payá, A. 232
Brestenský, M. 65
Brucker, L. 235
Bruneau, C. 72
Budan, A. 246
Carle, R. 235
Čerešňáková, Z. 222
Chamorro, S. 232
Chevaux, E. 92
Chrastinová, Ľ. 125, 151
Chrenková, M. 125, 151, 204, 222
Clech, O. 108
Čobanová, K. 125
Corrent, E. 76, 88
Daubner, F. 232, 246
De Sutter, J. 60
Detvanová, L. 284
Doležal, P. 179, 264
Domig, K.J. 219, 343
Dostalova, L. 284
Doupovec, B. 287
Duden, C. 329
Dürr, K. 343
Dusel, G. 76, 80
Eckel, B. 226
Elsen, T. 60
Engler, P. 232
Erasmus, L.J. 168
Ettle, T. 134, 171
Fahn, C. 162
Fischer, B. 140
Formelová, Z. 125, 151, 204, 222
Fremaut, D. 60
Friedrichkeit, M. 146
Friedt, W. 18
Fröhdeová, M. 175, 179, 264
Geerkens, C.H. 235
Gerard, C. 183
Ghareeb, K. 307, 309
Gierus, M. 1
Goelss, F. 287
Goerke, M. 324
Gräber, T. 54, 240
Gruzauskas, R. 212
Guillou, D. 92

Haasbroek, E. 168
Hager, H.H. 24
Hagg, F.M. 168
Hahn, I. 312
Haldar, S. 277
Halli, K. 199
Harder, H. 208
Heger, J. 65
Heine, D. 219
Hess, M. 307
Höger, T. 253
Holl, E. 226
Holub, K. 324
Horn, G. 54, 240
Hörndl, D. 162
Hörtenhuber, S.J. 318
Hoy, S. 199
Htoo, J.K. 80
Imrichová, J. 125
Jakubcová, Z. 175, 284
Jatkauskas, J. 259
Jerešiūnas, A. 48
Jerešiūnienė, O. 48
Jeroch, H. 121
Jilg, T. 337
Jungbauer, L. 318
Juodeikiene, G. 257
Kainz, M. 24
Kalhotka, L. 264, 284
Kampf, D. 60
Kandričáková, A. 125
Keimer, B. 188, 194
Kienberger, H. 337
Kliseviciute, V. 212
Klose, V. 287
Kluge, H. 54, 88, 240
Kluth, H. 26
Kneifel, W. 219
Koch, C. 199, 302
Kohl-Parisini, A. 208
Kolar, V. 297
Kopacka, I. 297
Korzekwa, M. 226, 249
Kovacs, A. 287
Kozłowski, K. 121
Kraler, M. 219
Kroismayr, A. 274
Krungleviciute, V. 257
Kupfer, A. 240
Labuda, R. 253
Lamballais, A. 116
Lasar, A. 333
Látal, O. 156
Lauková, A. 125
Le Dividich, J. 92
Le Ray, M.L. 183
Le Treut, Y. 92
Lé, S. 108
Leiber, F. 6
Lepont, A. 108, 116
Lindermayer, H. 32, 40, 44
Lohölter, M. 249
Lustyková, A. 85
Maknickiene, Z. 257
Männer, K. 96
Martens, L. 60
Marzin, D. 183
Matusevicius, P. 257

Mayrhofer, S. 343
Michlmayr, H. 219
Mlyneková, Z. 204
Mrázková, E. 175, 179, 284
Mrkvicová, E. 175, 284
Murray, D.S. 24
Nagl, V. 312
Nakamura, N. 60
Neufeld, K. 274
Neumann, C. 347
Nitrayová, S. 65
Obermaier, A. 134, 171
Ochome, M.A.A. 343
Oguey, C. 72, 168
Ondruška, Ľ. 125
Ostertag, J. 171
Pallissé, R. 232, 246
Pasteiner, S. 253
Patráš, P. 65
Pecher, H.-P. 329
Peganova, S. 102, 188, 194
Pelletier, W. 337
Plachá, I. 125
Polačiková, M. 125, 151
Pomikalová, S. 125, 151
Pommelet, C. 116
Pozdíšek, J. 156
Preißinger, W. 40, 44
Propstmeier, G. 40, 44
Quelennec, C. 183
Raceviciute-Stupeliene, A. 212
Rafay, J. 125
Rajský, M. 151, 204
Reckmann, K. 333
Reiter, E.V. 297
Relandeau, C. 212
Romberg, F.-J. 199
Rosener, D. 92
Roser, U. 337
Roth, N. 287, 293
Rozkot, M. 85
Schatzmayr, G. 253, 293
Schauerhuber, C. 293
Schedle, K. 219, 347
Schieder, C. 146
Schmidt, L. 208
Schmitt, J. 140
Schöndorfer, K. 253
Schröder, B. 102
Schultz, S. 24
Schwarz, C. 312
Stangl, G.I. 54, 88
Šťastník, O. 284
Steindl, C. 312
Steiner, T. 96, 146, 277
Steinruck, U. 108
Strauß, G. 302
Strompfová, V. 125
Štýbnarová, M. 156
Sviliuvienė, I. 48
Syed, B. 277
Szwedziak, K. 264
Tamašauskienė, D. 48
Tessier, N. 232
Tocha, M. 116
Tocher, D.R. 24
Trautwein, J. 80
Tredan, T. 246

Tröscher, A.	337
Tukiendorf, M.	264
Václavková, E.	85
van der Veen, R.H.	168
van Enckevort, A.	274
Vidmantiene, D.	257
Viel, B.	72, 168
Vodnansky, M.	204
Vrotnikiene, V.	259
Wagner, A.L.	72
Walker, N.D.	188, 194
Wegl, G.	287
Weinmann, P.	208
Weisbjerg, M.R.	222
Wendler, K.R.	318, 324
Werner, J.	208
Wetscherek, W.	347
Windisch, W.	162, 268
Winkler, A.	76
Wirth, M.	140
Wolffram, S.	12
Würzbach, M.	226, 249
Zebeli, Q.	208
Zeman, L.	175, 264, 284
Zentek, J.	96, 235
Zhao, J.	268
Zollitsch, W.J.	318
Zwielehner, J.	253, 259

Sponsoren

Wir danken folgenden Firmen für ihre großzügige Unterstützung:

Alphabetische Reihenfolge

AB Vista
3 Woodstock Court, Blenheim Road,
Marlborough Business Park, Marlborough
Wiltshire, SN8 4AN
United Kingdom

AGRANA Bioethanol GmbH
Industriegelände Pischelsdorf
3435 Pischelsdorf
Austria

Agrarmarkt Austria
Marketing GesmbH
Dresdner Straße 68a
1200 Wien
Austria

agromed Austria GmbH
Bad Hallerstraße 23
4550 Kremsmünster
Austria

Alltech Deutschland GmbH
Wiesenstraße 21 (W21)
40549 Düsseldorf
Germany

AMANDUS KAHL GmbH & Co.KG
Dieselstraße 5-9
21465 Reinbeck
Germany

BIOMIN GmbH
Industriestraße 21
3130 Herzogenburg
Austria

Bonmix Ltd.
Nortz Industrial Zone
5500 Lovech
Bulgaria

BTC Europe GmbH
Zweigniederlassung
Industriestraße 20
91593 Burgbernheim
Germany

DELACON Biotechnik GmbH
Weissenwolffstraße 14
4221 Steyregg
Austria

Dr. Eckel GmbH
Im Stiefelfeld 10
56651 Niederzissen
Germany

DSM Nutritional Products Ltd
P.O. Box 3255
4002 Basel
Switzerland

EVONIK Industries AG
Health & Nutrition
feed additives
Rodenbacher Chaussee 4
63457 Hanau-Wolfgang
Germany

H. Willhelm Schaumann GmbH & Co. KG
Jakob-Fuchs-Gasse 25-27
2345 Brunn am Gebirge
Austria

LALLEMAND Specialties GmbH
Ottakringer Straße 89
1160 Wien
Austria

Lohmann Animal Health GmbH
Heinz-Lohmann-Strasse 4
27472 Cuxhaven
Germany

NOR-FEED SUD
Natural Origin Response for Feed
3, rue Amedeo Avogadro
49070 Beaucouzé
France

Pancosma S.A.
Voie-des-Traz 6
1218 Le Grand-Saconnex
Switzerland

Plantextrakt GmbH & CO. KG
Dutendorfer Straße 5-7
91487 Vestenbergsgreuth
Germany

PROCHEMA Handelsgesellschaft m.b.H.
Business Unit Agro
Ateliergasse 1
1220 Wien
Austria

Pulte GmbH & Co. KG
Südstraße 7
83253 Rimsting
Germany

Reisenberger GmbH
Stuttgarterstraße 2
2380 Perchtoldsdorf
Austria

Universität für Bodenkultur Wien
Gregor Mendel-Straße 33
1180 Wien
Austria

Zinpro Performance Minerals™
Akkerdistel 2E
5831 PJ Boxmeer
Netherlands