

Forschungsbericht

Nr. 125

Mikrobielle Proteinsynthese und Proteinabbau von Futtermitteln in einem modifizierten Hohenheimer Futterwerttest (HFT)

Verfasser:

Fru Nji, F.; Hachenberg, S.; Pfeffer, E.

Institut für Tierernährung

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2285; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
Bonn, März 2005

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. Ernst Pfeffer

Projektbearbeiter: Dr. agr. Fidelis Fru Nji
Dipl.-Ing. agr. Sabrina Hachenberg

Institut für Tierernährung
Endenicher Allee 15
53115 Bonn...

Kooperation: Prof. Dr. Karl-Heinz Südekum

Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie
Christian-Albrecht-Universität
24098 Kiel

Zitiervorschlag:

FRU NJI, F. J. S. HACHENBERG und E. PFEFFER (2005): Mikrobielle Proteinsynthese und Proteinabbau von Futtermitteln in einem modifizierte Hohenheimer Futterwerttest (HFT). Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, Nr. 125, 57 Seiten

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	2
2.	Das Proteinbewertungssystem	3
2.2	Möglichkeiten zur Schätzung des Proteinabbaus <i>in sacco</i>	5
2.3	Möglichkeiten zur Schätzung des Proteinabbaus <i>in vitro</i>: Kurzzeitinkubationen im geschlossenen System	8
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	11
3.1	Zielsetzung und Versuchsplanung	11
3.2	Material und Methoden	11
3.2.1	Inkubationsapparatur	11
3.2.2	PProbenaufbereitung und Einwaage	12
3.2.3	Medium	13
3.2.4	Entnahme von Pansensaft.....	14
3.2.5	Durchführung der Inkubation.....	14
3.2.6	Versuchsaufbau	15
3.2.7	Bestimmung des NH ₃ -Gehaltes.....	15
3.2.8	Berechnung der Gasbildung	16
3.2.9	Berechnung des IVDN (%)	17
3.3	Beispielberechnung	17
3.3.1	Beispielberechnung der Gasbildung.....	18
3.3.2	Beispielberechnung des IVDN (%).....	18
4	ERGEBNISSE	19
4.1	Ergebnisse der Berechnung der Gasbildung	19
4.2	Ergebnisse der analysierten NH₃-N-Konzentration (mg/30 mL)	20
4.3	Ergebnisse der berechneten Effizienz der Proteinsynthese (mg MP-N/mL Gb)	22
4.4	Ergebnisse des berechneten IVDN (%)	23
5.	DISKUSSION	24
5.1	Fehlerdiskussion	24
5.2	Gasbildung aus den Futtermittelproben ohne Stärkezulage	26
5.3	Effekt der Stärkezulage auf die Gasbildung	30
5.4	Mikrobielle Proteinsynthese	32
5.4.1	Beurteilung der mikrobiellen Proteinsynthese	32
5.4.2	NH ₃ -N-Konzentration der Futtermittel ohne Stärkezulage	34
5.4.3	Effekt der Stärkezulage auf die NH₃-N -Konzentration	38
5.5	Überprüfung der IVDN-Werte und Beurteilung des Proteinabbaus	39
5.5.1	Überprüfung der Stabilität der IVDN-Werte anhand der Abweichungen in der Gasbildung	39
5.5.2	Überprüfung der Stabilität der IVDN-Werte aufgrund der Abweichungen in der NH ₃ -N-Konzentration	41
5.6	Beurteilung des Proteinabbaus	42
5.7	Einfluss der Kohlenhydratquelle auf die IVDN-Werte	45
5.8	Beurteilung des <i>in vitro</i> unabgebauten Futterproteins (IVUDN)	46
5.9	Einschätzung des Proteinwertes von Raps- und Sojaextraktionschrot	47
6	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	49
7	LITERATURVERZEICHNIS	50

1 EINLEITUNG

Die Bewertung der Proteinversorgung von Milchkühen erfolgt auf der Stufe des „nutzbaren Rohproteins am Duodenum“ (nXP) (GFE, 2001). Die Höhe des Flusses von Protein am Darm wird in erster Linie bestimmt durch die im Pansen gebildete Menge an Mikrobenprotein (MP) und das im Vormagen nicht abgebaute Futterprotein (UDP).

Zur Quantifizierung dieser Proteinmengen stehen kosten- und zeitaufwendige Untersuchungsmethoden am Tier zu Verfügung. Eine einfache, weniger zeitaufwendige und routinemäßig durchzuführende Methode zur Schätzung der Menge an synthetisiertem Mikrobenprotein und nicht abbaubarem Futterprotein wäre daher wünschenswert. Es ist zu überprüfen, ob eine Schätzung der notwendigen Kenngrößen zur Bestimmung des nutzbaren Rohproteins am Darm durch einfache *in vitro* Systeme möglich ist.

Das im Rahmen dieses Projektes angewendete Verfahren stellt eine modifizierte Form des Hohenheimer Futterwerttests (HFT) dar. Der HFT ist ein Standardverfahren zur Schätzung des energetischen Futterwertes und ist als solches in den Untersuchungslabors etabliert. Dieses Verfahren sollte nun erweitert werden, um gleichzeitig Daten zum Proteinstoffwechsel der Pansenmikroben zu gewinnen.

Bei den untersuchten Raps- und Sojaextraktionsschroten (Raps 3 und 7 sowie Soja 3 und 6) handelt es sich um Futtermittelproben aus einem größeren Projekt, in dem eine vergleichende Untersuchung mehrerer Raps- und Sojaextraktionsschrotchargen erfolgen sollte.

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit einer *in vitro* durchführbaren Inkubationstechnik mittels Pansensaftes für die Proteinbewertung der oben genannten Futtermittelproben soll diese Arbeit einen Beitrag leisten.

2. Das Proteinbewertungssystem

2.1 Faktorielle Ableitungen und Schätzformeln

Die Empfehlungen des Ausschusses für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE) zur Proteinversorgung von Milchkühen und Aufzuchttrindern basieren auf dem nutzbaren Rohprotein am Darm (nXP). nXP stellt die Summe aus „intraruminal nicht abgebautem Futterrohprotein (UDP) und Mikrobenprotein (MP) dar“ (GfE, 2001).

Die aktuellen Empfehlungen zur Versorgung auf der Basis des „nutzbaren Proteins am Darm“ (GfE, 1997, 2001) beruhen auf den Arbeiten von Lebzién et al. (1996). Zur Schätzung dieser Flussgröße wurden Versuche an 532 duodenalfistulierten Kühen aus Braunschweig-Völkenrode und Dummerstorf-Rostock durchgeführt: Ermittelt wurden die Verdaulichkeit der Rohnährstoffe im Chymus und der Chymusfluss am Duodenum sowie der mikrobielle Anteil am Chymus-N mit Hilfe von ^{15}N oder mit Ribonukleinsäure (RNA) (Brandt und Rohr, 1981). Auf der Grundlage dieser Messungen wurden Regressionsgeraden abgeleitet, mit deren Hilfe sich das nXP aus Rationsparametern schätzen ließ. Die Aufnahme an Umsetzbarer Energie (ME) oder verdaulicher organischer Substanz (VOS) und an nativem Rohprotein stellten die wichtigsten Einflussgrößen auf den Fluss an nutzbarem Rohprotein dar.

Eine Verbesserung der Schätzgleichung wurde durch die Berücksichtigung der Wechselbeziehung zwischen mikrobieller Proteinsynthese und dem Umfang des Futterproteinabbaus erreicht, wie die Untersuchungen von Voigt und Piatkowski (1987) bestätigten.

Die von der GfE (2001) empfohlenen Formeln für die Schätzgleichungen zur Schätzung der Menge an nutzbarem Rohprotein am Darm (g/d) sind:

$$\text{nXP} = 11,93 - (6,82 (\text{UDP}/\text{XP}_H)) \text{ ME} + 1,03 \text{ UDP}$$

$$\text{nXP} = 187,7 - (115,4 (\text{UDP}/\text{XP}_H)) \text{ VOS} + 1,03 \text{ UDP}$$

mit

nXP	=	nutzbares Rohprotein am Darm (g)
XP _H	=	Futterprotein ohne Harnstoff (g)
UDP	=	unabgebautes Futterprotein (g)
ME	=	umsetzbare Energie (MJ)
VOS	=	verdauliche organische Substanz (kg)

Die Menge des unabgebauten Futterproteins (UDP) wird mittels Differenzrechnung aus dem am Dünndarm ermittelten Nichtammoniak-N bestimmt (GfE 2001):

$$\text{UDP} = \text{NAN} * 6,25 - (\text{Mikrobenprotein} + \text{endogenes Protein})$$

mit

$$\text{NAN} = \text{Nichtammoniak-N}$$

Nach GfE (2001) variiert der UDP-Anteil in Abhängigkeit von der Proteinquelle beträchtlich. Auch eine Fehleinschätzung des Mikrobenproteins und des endogenen Proteins verfälscht die UDP-Werte, wobei für die Menge des endogenen Proteins ein Wert von 3,6 g N/kg Chymustrockenmasse unterstellt wurde (Brandt et al., 1981).

Die limitierende Größe für die Synthese von Mikrobenprotein stellt die Zufuhr an Umsetzbarer Energie (ME) bzw. die verdauliche organische Substanz (VOS) dar. Eine ausreichende Stickstoffversorgung vorausgesetzt, beträgt die mittlere mikrobielle Proteinsynthese (MP) $10,1 \pm 1,5$ g MP je MJ ME bzw. 156 ± 24 g MP je kg VOS.

Die UDP-Mengen wurden bislang nur an duodenalfistulierten Tieren unter enormem Aufwand quantifiziert. Infolgedessen ist der vorliegende Datensatz zur Abbaubarkeit des Futterproteins verschiedener Futtermittel vergleichsweise gering, so dass die in den Futterwerttabellen (DLG 1997) angegebenen UDP-Werte teilweise noch auf Annahmen und Vergleichen mit ähnlichen Futtermitteln beruhen.

Eine Abschätzung der mikrobiellen Proteinsynthese und des im Pansen nicht abbaubaren Futterrohproteins mittels einfacher *in vitro* Untersuchung ist daher dringend erforderlich.

Neben der *in sacco* Methode sollen hier die aktuell diskutierte chemische Rohproteinfraktionierung sowie Kurzzeitinkubationen im geschlossenen System als mögliche Techniken näher erläutert werden.

2.2 Möglichkeiten zur Schätzung des Proteinabbaus *in sacco*

Unter standardisierten Bedingungen werden bei der *in sacco* oder auch *in situ* Methode die zu untersuchenden Futtermittelproben über eine Fistel in den Pansen eingebracht und über festgelegte Zeitintervalle inkubiert. Dabei befinden sich die Proben mit bekannter Einwaagemenge in nicht abbaubaren Polyester- oder Nylonbeuteln mit definierter Porengröße. Nach der Entnahme der Beutel aus dem Pansen und Aufbereitung der Proben, kann die Abbaubarkeit des Proteins unter Festlegung einer bestimmten Passagerate mit Hilfe der Gleichung nach Ørskov und McDonald (1979) bestimmt werden:

$$P = a + b \cdot (1 - e^{-ct})$$

mit

P	=	Proteinabbau zum Zeitpunkt t der Inkubation (g/g XP)
a	=	lösliche Proteinfraktion (g/g XP)
b	=	unlösliche aber abbaubare Proteinfraktion (g/kg T)
c	=	Abbaurrate der Fraktion b (h ⁻¹)
t	=	Dauer der Inkubation (h)

Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass die Proben unter „natürlichen“ Bedingungen, wie sie im Pansen vorherrschen, abgebaut werden und die Gefahr der Anreicherung der Fermentationsendprodukte verringert ist.

Als Nachteil ist die schwere Standardisierbarkeit dieser Technik zu nennen. So haben zum Beispiel die Porengröße (LINDBERG, 1984) und der pH-Wert im Pansen (HVELPLUND, 1985) einen Einfluss auf die Abbaubarkeit. Auch die Übertragung der *in sacco* ermittelten Werte auf *in vivo* Verhältnisse ist nach wie vor fraglich und bedarf weiterer Klärung (GfE, 2001).

Die Schwierigkeit der Quantifizierung des UDP wurde ebenfalls von Madsen und Hvelplund (1994) bestätigt. Sie fanden heraus, dass bei der Untersuchung von fünf verschiedenen Futtermitteln (Sojabohnenschrot, Kokosschrot, Baumwollsaatschrot, Gerste und Fischmehl)

in 23 Laboren aus 17 Ländern eine geringe Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Forschungsinstitute bestand.

Madsen und Hvelplund (1985) untersuchten den Proteinabbau von Soja- und Rapsextraktionsschrot mit unterschiedlichen Analyseverfahren. Sie verglichen die *in situ* Methode sowie zwei weitere *in vitro* Inkubationstechniken, und stellten vor, dass es wurde eine enge Beziehung zwischen *in situ* zu den *in vivo* Werten bei einer Passagerate von 8 % pro h. Im Gegensatz hierzu zeigten die beiden anderen angewandten Methoden eine schlechte Übereinstimmung.

Moss und Givens (1994) untersuchten drei verschiedene Sojaextraktionsschrote, mit einem Rohproteingehalt von 469 bis 506 g XP/kg T und ein Rapsextraktionsschrot mit 397 g XP/kg T, hinsichtlich der Proteinabbaubarkeit *in situ*. Die Inkubation erfolgte an drei pansenfistulierten Schafen für 0, 2, 3, 8, 24 und 48 Stunden, wobei die Polyesterbeutel der erstgenannten Inkubationsdauer nicht im Pansen der Tiere inkubiert, sondern ausgewaschen wurden.

Die effektive Abbaubarkeit wurde ebenfalls mit der Gleichung von Ørskov und McDonald (1979) für eine Passagerate von 2, 5 und 8 % pro h ermittelt. Südekum und Andree (1997) untersuchten mit der bereits erklärten Methode Rapsextraktionsschrot (360 g XP/kg T) hinsichtlich Ausmaß und Rate des Proteinabbaus und des Verschwindens der Aminosäuren für die Inkubation von 0, 2, 4, 8, 16, 24 und 48 Stunden. Analog zu Moss und Givens (1994) wurde mit den Beuteln der ersten Inkubationszeit verfahren.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der genannten Untersuchungen zur effektiven Abbaubarkeit des Rohproteins dargestellt; die genauen Einzelheiten der Versuchsbeschreibungen sind den jeweiligen Veröffentlichungen zu entnehmen.

Tabelle 1: N-Fractionen (%) und Effektive N-Abbaubarkeit (%) des Rohproteins

Autor und Futtermittel	XP (g/kg T)	n	Parameter für die Gleichung nach Ørskov und McDonald (1979)			effektive N-Abbaubarkeit (%) bei einer Passagerate von 2, 5 und 8 % pro h		
			a (%)	b (%)	c (%)	0,02	0,05	0,08
Moss u. Givens (1994)								
Sojaextraktionsschrot	469	4	9,2	78,8	13,2	75	62	53
Sojaextraktionsschrot B ¹⁾	506	4	8,9	65,0	21,2	64	55	48
Sojaextraktionsschrot H ²⁾	496	5	11,6	72,1	10,2	87	72	62
Rapsextraktionsschrot	397	1	28,3	63,4	22,5	87	80	75
Südekum u. Andree (1997)								
Rapsextraktionsschrot	360		10,1	83,2	7,9	75,8	60,4	50,8
Lindberg (1984)								
Rapsextraktionsschrot 10 ³⁾			33,5	50,9	10			
Rapsextraktionsschrot 36 ⁴⁾			32,5	54,5	10			
Madsen u. Hvelplund (1985)								
Rapsextraktionsschrot	416							77
Rapsextraktionsschrot	415							69
Rapsextraktionsschrot	381							66
Rapsextraktionsschrot	394							63
Rapsextraktionsschrot	395							64
Sojaextraktionsschrot	525							65
Sojaextraktionsschrot	516							64
Sojaextraktionsschrot	499							64
Sojaextraktionsschrot	521							64
Sojaextraktionsschrot	534							62
Sojaextraktionsschrot	529							60

¹⁾ Sojaextraktionsschrot (Brasilien); ²⁾ Sojaextraktionsschrot (Hipro)³⁾ Porengröße der Nylonbeutel 10 µm; ⁴⁾ Porengröße der Nylonbeutel 36 µm

2.3 Möglichkeiten zur Schätzung des Proteinabbaus *in vitro*: Kurzzeitinkubationen im geschlossenen System

Wie bereits erwähnt, untersuchten Madsen und Hvelplund (1985) den Proteinabbau von Soja- und Rapsextraktionsschrot mit unterschiedlichen Analyseverfahren. Zum einen erfolgte die Inkubation in einem Zentrifugalbecher mit Pansensaft-Puffer-Gemisch, zum anderen wurde die Löslichkeit des Proteins in einer Pufferlösung festgestellt. Im Gegensatz zu den *in sacco* Werten zeigten die beiden anderen Methoden eine schlechte Übereinstimmung mit den *in vivo* ermittelten Werten.

Eine weitere Möglichkeit zur Schätzung der Proteinabbaubarkeit basiert auf der ersten Stufe der Inkubationstechnik mittels Pansensaft nach Tilley und Terry (1963). Auf Grund der Annahme, dass eine Bestimmung des nutzbaren Rohproteins von Futtermitteln *in vitro* möglich sei und durch eine Regressionsgleichung (Lebzien et al., 1996) geschätzt werden könnte, untersuchten Zhao und Lebzien (2000) 25 Futtermittelproben. Als Inkubationsgefäß dienten 80 mL fassende Zentrifugationsbecher, in denen 0,5 g des zu untersuchenden Futtermittels eingewogen und die mit einer speziellen Vorrichtung, bestehend aus einem Gummistopfen mit eingelassenem Gummiballon, verschlossen wurden. Das Inkubationsmedium von insgesamt 50 mL bestand aus einem Pansensaft-Puffer-Gemisch (Zusammensetzung des Puffers s. Zhao und Lebzien, 2000). Während der 24 und 30 Stunden dauernden Inkubation im 38 °C warmen Wasserbad wurde das frei werdende Gas im Ballon aufgefangen. Nach der Inkubation und Aufbereitung der Probe konnte der Stickstoff, getrennt nach fester und flüssiger Phase bestimmt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine signifikante Beziehung zwischen den *in vivo* Daten mittels Regressionsgleichung und den aus *in vitro* Daten nach 24 Stunden Inkubation ermittelten Werten des nutzbaren Rohproteins besteht: $Y = 0,85 x + 18,0$ mit $r^2 = 0,84$; $P \leq 0,001$.

Die von Raab et al. (1983) publizierte Methode zur Untersuchung des Proteinabbaus und der Proteinsynthese von Futtermitteln ist eine modifizierte Form des von Menke et al. (1979) publizierten Hohenheimer Futterwerttestes (HFT) und stellt das grundlegende Verfahren für die Untersuchungen in dieser Arbeit dar. Es handelt sich um eine *in vitro* Inkubationstechnik auf der Basis eines Pansensaft-Puffer-Gemisches unter standardisierten Bedingungen. Die

Gasmenge, die bei der Inkubation von 200 mg T einer Futtermittelprobe nach 24 Stunden entstand, stand in einer engen Beziehung zur Verdaulichkeit der organischen Substanz *in vivo* und konnte zur Abschätzung der Umsetzbaren Energie (ME) des inkubierten Futtermittels genutzt werden. Ein linearer Anstieg der Gasbildung mit zunehmender Substratmenge war gegeben, solange nicht mehr als 90 mL Gas gebildet wurde. Über diesen Bereich hinaus bestand keine Proportionalität zwischen der gebildeten Gas- und der Substratmenge (Steingass, 1983).

Um Unterschiede in der Fermentationsaktivität des Pansensaftes auszugleichen, wurden sogenannte Standardfuttermittel mit bekannter Gasbildung mitgeführt (Steingass und Menke, 1986), auf die im Kapitel 5.1 näher eingegangen wird.

Der Proteinumsatz konnte jedoch allein auf der Basis der gebildeten Gasmenge nicht beurteilt werden. Auch die Messung des bei der Inkubation frei werdenden Ammonium-Stickstoffes war als Aussage über den Abbau des Futterproteins während der Inkubation unzureichend, da nicht nur Ammonium freigesetzt, sondern auch gleichzeitig durch die mikrobielle Proteinsynthese gebunden wurde.

Die modifizierte Form des HFT nach Raab et al. (1983) sah neben der alleinigen Inkubation der Futtermittelproben eine Inkubation derselben Proben zuzüglich einer stickstofffreien Energiequelle in Form von Stärke vor. Das durch die zusätzliche Energie gesteigerte Mikrowachstum führte zu einer Abnahme der Ammoniumwerte und einem proportionalen Anstieg der gebildeten Gasmenge. Diese Beziehung wird in Abbildung 1 dargestellt, zunächst ohne konkreten Bezug zu den analysierten Daten.

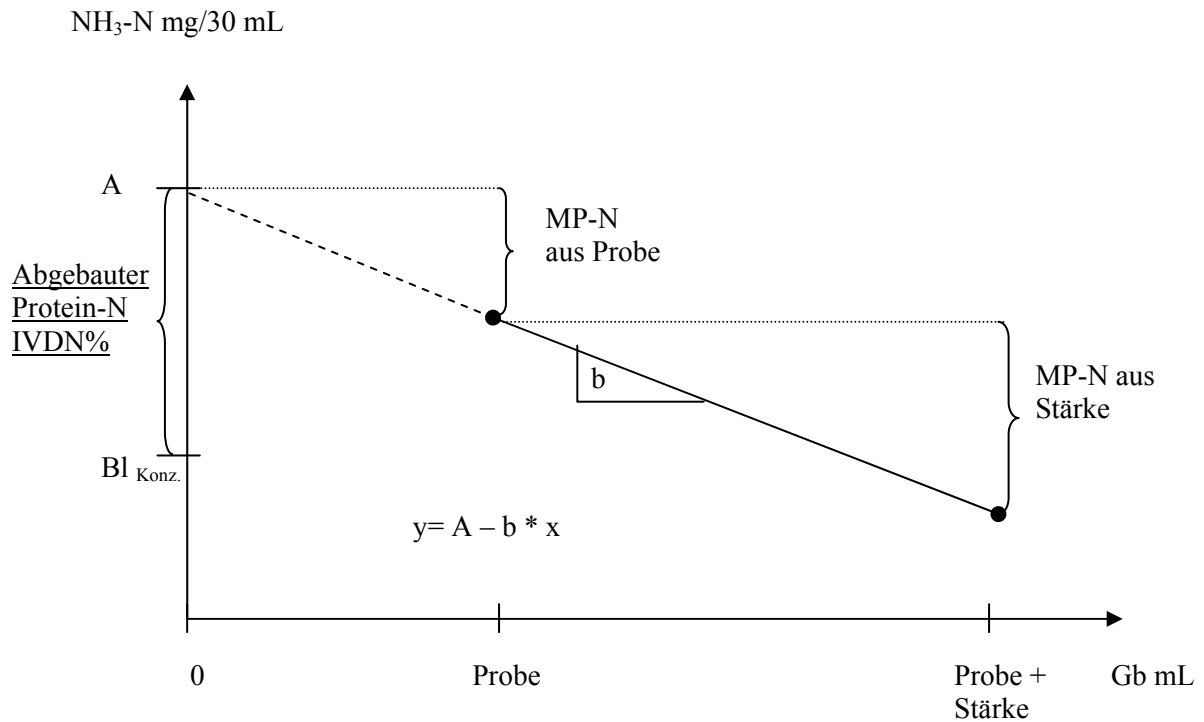


Abbildung 1: Beziehung zwischen der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration und der Gasbildung

Verläuft bei Stärkezulage der Abbau von $\text{NH}_3\text{-N}$ linear zur Zunahme des gebildeten Gases, so kann die Beziehung zwischen der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration (y , mg) und der Gasbildung (x , mL) beider Futtermittelproben durch eine lineare Regressionsgleichung dargestellt werden. Die Differenz der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration zwischen Probe und Probe + Stärke stellt die Mikrobenproteinmenge dar, die auf Grund der zusätzlichen Energie durch die Stärkezulage gebildet werden konnte. Das bedeutet, dass der Regressionskoeffizient der Geraden die Menge an Mikrobenproteinstickstoff (mg) pro mL gebildete Gasmenge angibt und somit ein Maß für die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese ist.

Der mittels Extrapolation ermittelte y-Achsen-Abschnitt (Punkt A) dieser Regressionsgeraden stellt die theoretische Menge an $\text{NH}_3\text{-N}$ dar, die aus dem Futter und dem Blindwert freigesetzt würde, wenn keine Proteinsynthese stattfände. Demnach könnte kein Gas produziert und kein Mikrobenprotein gebildet werden. Durch Abzug der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration des Blindwertes und in Bezug auf die eingewogene N-Menge kann die $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration und damit der $\text{NH}_3\text{-N}$, der aus dem Protein des Futtermittels stammt, berechnet werden, der als IVDN % (*in vitro* degraded N) bezeichnet wird:

$$\text{IVDN \%} = \frac{\text{mgNH}_3\text{N}_{(0\text{mLGb})} - \text{mgNH}_3\text{N}_{(\text{Bl})}}{\text{mgN}_{(\text{Einwaage})}} \cdot 100$$

Die Aufteilung der Futtermittelproben nach RAAB et al. (1983) erfolgte in fünf Experimenten, deren Einwaage 26 mg Rohprotein pro untersuchtes Futtermittel betrug. Die Inkubationen erfolgten, für die Versuche 1, 2 und 4 in zweifacher sowie für die Versuche 3 und 5 in dreifacher Ausführung. Der verwendete Pansensaft stammte von einer am Pansen fistulierten Kuh und wurde mit dem nach Menke et al. (1979) beschriebenen Medium versetzt.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielsetzung und Versuchsplanung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die mikrobielle Proteinsynthese sowie der Proteinabbau aus Raps- und Sojaextraktionsschrot mittels modifizierten Hohenheimer Futterwerttestes (HFT) untersucht werden. Der Proteinabbau sollte als „*in vitro* degraded nitrogen“ (IVDN %) angegeben und aus der Differenz zwischen den NH₃-N-Konzentrationen aus dem theoretisch ermittelten Wert von Probe und Blindwert sowie der des Blindwerts berechnet werden. Die mikrobielle Proteinsynthese sollte durch die Abnahme der NH₃-N-Konzentration in der Probe auf Grund gesteigerter Gasbildung (Gb) durch die Stärkezulage in mg MP/mL Gb festgestellt werden.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Inkubationsapparatur

Die Inkubation der untersuchten Futtermittel erfolgte mit dem nach Menke et al. (1979) beschriebenen System des Hohenheimer Futterwerttests (HFT) Bei diesem handelte es sich um einen Brutschrank mit einem darin befindlichen, durch einen Elektromotor (M) angetriebenen, Rotor (R). Dieser bestand aus zwei, im Abstand von 13 cm montierten, Kunststoffscheiben, die 57 Bohrungen aufwiesen. Als Inkubationsgefäße dienten Präzisionsglasspritzen (P) (im Folgenden Kolbenprober genannt). Sie bestanden aus einem Kolben und einem darin passenden Schliffkolben (Stößel) und hatten ein Volumen von 100 mL mit einer Graduierung von 1 mL mit einer Ablesegenauigkeit von 0,5 mL. konnte. Auf

dem Kapillaransatz des eingesetzten Kolbenprobers befand sich ein Silikonschlauch, der sich mit Hilfe einer Schlauchklemme verschließen ließ. Während der Inkubation bei einer Temperatur von $39\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ wurden die Kolbenprober waagrecht im Rotor platziert und währenddessen, mit Ausnahme der Zeit, in der die gebildete Gasmenge abgelesen wurde, mit zwei Umdrehungen pro Minute kontinuierlich und langsam durchmischt.

(mit P = Präzisionsglasspritzen (Kolbenprober), R = Rotor, M = Motor)

3.2.2 Probenaufbereitung und Einwaage

Bei den zu untersuchenden Futtermitteln handelte es sich um je zwei verschiedene Raps- und Sojaextraktionsschrote. Wenn im Folgenden von Futtermitteln gesprochen wird, handelt es sich um die Futtertypen Raps und Soja, von denen insgesamt vier Chargen (Raps 3 und Raps 7 sowie Soja 3 und Soja 6) untersucht wurden. Vor der Einwaage wurden die Proben auf eine Siebfeinheit von ca. 1 mm mit einer Zentrifugalmühle gemahlen. Von diesen Futterproben wurden die Trockenmassen (T) sowie die Rohproteingehalte (XP) bestimmt. Die Futtermittel wurden allein oder mit Stärkezulage eingewogen. Bei der Stärke handelt es sich um eine Kartoffelquellstärke, von welcher ebenfalls der Trockenmassegehalt ermittelt wurde. Die eingewogene Probemenge richtete sich nach der zu erwartenden Gasmenge, die 90 mL nicht überschreiten sollte (Steingass und Menke, 1986).

Die Messung der Gasbildung folgte im einzelnen den Anweisungen von Steingass und Menke (1986). Von jedem Futtermittel wurden für jede Inkubation drei Kolben ohne und drei Kolben mit Stärkezulage inkubiert. Weitere vier Kolben dienten als Blindwerte. Bei diesen handelte es sich um Kolben, die ausschließlich das Pansensaft-Puffer-Gemisch ohne Futter- oder Stärkezulage enthielten.

Tabelle 2: Einwaage der Futtermittel (mg) (je drei Kolbenprober)

Inkubationszeit	4 Stunden		8 Stunden		12 Stunden		24 Stunden	
Futtermittel	Futtermittel	Stärke	Futtermittel	Stärke	Futtermittel	Stärke	Futtermittel	Stärke
Raps 3, 7	200	-	200	-	130	-	130	-
Raps 3, 7 + Stärke	200	200	200	200	130	130	130	130
Soja 3, 6	230	-	125	-	130	-	130	-
Soja 3, 6 + Stärke	230	125*	125	125	130	130	130	130

* Stärkezulage im zweiten Versuchsansatz: 230 mg

3.2.3 Medium

Das Inkubationsmedium beinhaltete in Anlehnung an die VDLUFA-Methode (VDLUFA, 1976) folgende Zusammensetzung:

- 0,5 mL Spurenelementlösung (3,86 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 2,92 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 0,29 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 2,34 g $\text{FeCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ad 100 mL H_2O)
- 290 mL Pufferlösung (35 g NaHCO_3 ; 4 g $(\text{NH}_4) \text{HCO}_3$ ad 1000 mL H_2O)
- 290 mL Mengenelementlösung (7,14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 6,2 g KH_2PO_4 ; 0,6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ad 1000 mL H_2O)
- 1,5 mL Resazurinlösung (100 mg Resazurin ad 100 mL H_2O)
- 60,5 mL Reduktionslösung (58 ml H_2O ; 2,5 mL 1 N NaOH; 380 mg $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$)

Das Medium wurde auch nach Steingass und Menke (1986) hergestellt wobei Woulffschen Flasche im temperierten Wasserbad (39 °C) vorbereitet. Die Lösungen wurden in der angegebenen Reihenfolge zu 580 mL destilliertem H_2O gegeben. Ein Magnetführer gab die Gewähr, dass sich die einzelnen Komponenten vollständig mischten. Die Reduktionslösung wurde jeweils erst nach der Pansensaftentnahme angesetzt und erst dann unter ständiger CO_2 -Begasung in die Woulffsche Flasche gegeben. Wegen des Indikators (Resazurin) erhielt das Medium eine bläuliche Farbe, die nach Zugabe der Reduktionslösung von rosa zu farblos umschlug und somit ein annähernd sauerstofffreies Milieu anzeigte. Der durchgesiebte Pansensaft konnte sodann hinzugefügt werden.

3.2.4 Entnahme von Pansensaft

Der Pansensaft stammte von 3,5 Jahre alten, dauerhaft pansenfistulierten Hammeln, die im Stall des Instituts für Tierernährung der Universität Bonn gehalten werden. Um tierindividuelle Schwankungen in der Zusammensetzung des Pansensaftes zu vermeiden und um eine Beeinflussung durch aufgenommene Futtermittel zu verhindern, erfolgte die Entnahme aus drei Spendertieren und vor der Morgenfütterung. Die Tiere waren gemeinsam in einer Freilaufbox auf gummierten Spalten untergebracht. Bei der zweimaligen Fütterung pro Tag, morgens um 7 Uhr und nachmittags um 14.30 Uhr, erhielten sie Heu (600 g/Tag) und Kraftfutter (600 g/Tag). Beide Rationskomponenten wurden ihnen zu gleichen Teilen verabreicht, jedoch bestand die abendliche Ration aus zwei Dritteln der Tagesration. Die Hammel hatten ständig freien Zugang zu Wasser.

Der Pansensaft wurde mit einer Vakuumpumpe über die Pansenfistel entnommen. Das Inokulum wurde in einer 2-L-Saugflasche aufgefangen, die sich in einem etwa 40 °C warmen Wasserbad befand. Für den Transport in das Labor wurde er in eine vorgewärmte Thermoskanne gefüllt und im Labor durch zwei Käsetücher filtriert.

Das Pansensaft-Puffer-Verhältnis sollte 1:2 betragen, so dass 610 mL Pansensaft zu der vorbereiteten Lösung unter ständiger CO₂-Begasung gegeben wurden.

3.2.5 Durchführung der Inkubation

Nach weiteren 10 Minuten konnte durch Umlegung der CO₂-Zufuhr die Begasung auf die Oberfläche der Lösung reduziert und mit der Befüllung der auf etwa 39 °C vorgewärmten Kolbenprober begonnen werden. Mit einer Dispensette wurden jeweils 30 mL Pansensaft-Puffer-Gemisch in die Kolben abgefüllt. Hierfür musste der Silikonschlauch des Kolbens über den Schlauch der Pipette gezogen und die Schlauchklemme geöffnet werden, so dass das Pansensaft-Puffer-Gemisch in den Kolben laufen konnte. Anschließend wurde der Kolben, mit dem Silikonschlauch nach oben, waagrecht gehalten und leicht geschüttelt. Dies sollte bewirken, dass sich der gesamte Kolbeninhalt in der Lösung befand und nicht am Kolbenrand kleben blieb. Des Weiteren konnten dadurch beim Befüllen eingebrachte Luftblasen an die Oberfläche befördert werden, die durch langsames Hochdrücken des Stößels über den Silikonschlauch entfernt wurden. Die Schlauchklemme wurde geschlossen und die Position des Kolbens notiert (V_0).

Nach dem gleichen Prinzip erfolgte die Handhabung der Befüllung aller weiteren Kolben.

3.2.6 Versuchsaufbau

Der gesamte Inkubationszeitraum von 24 Stunden wurde auf zwei Versuchsläufe mit einer Wiederholung pro Lauf aufgeteilt. Im ersten Versuchsansatz (I, II) erfolgte die Inkubation der in zweifacher Ausführung eingewogenen Futtermittel für 4 und 8 Stunden. Im zweiten Versuchsansatz (III, IV) für 12 und 24 Stunden.

Nach der ersten Inkubationszeit von 4 Stunden wurde die erste Hälfte der Proben aus dem Brutschrank genommen, die gebildete Gasmenge (V_4) abgelesen und der Inhalt jedes Kolbens in eine Glasflasche entleert. Um eine weitere Aktivität der Pansenmikroben zu unterdrücken, wurden die Flaschen in einem Eisbad gekühlt. Erfasst wurde ferner die Gasmenge (V_4) der zweiten Hälfte der Proben. Bei einer Gasproduktion > 50 mL wurde das gebildete Gas durch Senkrechtthalten des Kolbens und Öffnen der Schlauchklemme entfernt, der Kolben dadurch entgast und der Stößel auf die 30 mL-Marke zurückgeschoben. Anschließend wurde für weitere 4 Stunden inkubiert. Nach der nächsten Inkubationseinheit von 8 Stunden wurde ebenfalls die Gasmenge (V_8) erfasst und mit den Proben auf die gleiche Weise verfahren wie oben beschrieben.

Analog konnte der zweite Versuchsansatz durchgeführt werden, wobei die erste Hälfte der Proben nach 12 Stunden und die zweite Hälfte nach 24 Stunden entnommen wurde. Auch die von diesen Proben gebildeten Gasmengen wurde nach 4- und 8-stündiger Inkubation abgelesen, falls nötig wurde der Stößel auf die 30 mL-Marke zurückgestellt.

3.2.7 Bestimmung des NH_3 -Gehaltes

Die NH_3 -Bestimmung erfolgte durch Destillation (wie nach dem Kjehldahlverfahren beschrieben). Vor der Destillation wurde der gesamte Inhalt der Kolbenprober bei 7°C und $30000 \times g$ für zehn Minuten in einer Differentialkühlzentrifuge der Firma Heraeus Christ zentrifugiert. Dabei setzte sich die feste Phase, bestehend aus Mikroorganismen und Futterresten, ab, so dass die flüssige Phase als partikelfreier Überstand mit Hilfe einer Spritze abgesaugt werden konnte. Dieser wurde im Kjehldahlkolben mit konzentrierter Natronlauge versetzt. Als Vorlage diente eine $0,05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$, in der das durch Dampfdestillation (Firma: Gerhardt Vapodest 2) ausgetriebene Ammonium aufgefangen wurde. Anschließend wurden

die Schwefelsäure mit 0,05 M NaOH gegen Mischindikator 5 titriert und der Ammoniumgehalt berechnet.

3.2.8 Berechnung der Gasbildung

Die Gasbildung wurde analog dem bei Steingass (1983) beschriebenen System berechnet. In Abweichung zu diesem Verfahren konnte bei der Inkubation kein Standard-Heu und kein Standard-Kraftfutter mitgeführt werden, so dass der Korrekturfaktor nicht berechnet wurde.

Die Nettogasbildung wurde aus der Differenz der abgelesenen Volumina der jeweiligen Inkubationseinheit (V_4 , V_8 , V_{12} , V_{24}) und dem Ausgangsvolumen (V_0) nach Abzug des aus dem Blindwert (Bl) gebildeten Gases berechnet. Wurde der Kolben während der Inkubation entlüftet, wie unter 3.2.6 beschrieben, und der Kolben auf die 30 mL-Marke zurückgestellt, musste dies in der Berechnung berücksichtigt werden.

Von der von Steingass und Menke (1986) publizierte allgemeine Formel zur Berechnung der korrigierten Gasbildung wurde für diesen Versuchsansatz abgewichen, da eine Mitführung des Standards nicht erfolgte.

Die Formeln zur Berechnung der Gasbildung lauten mit Entgasung:

$$Gb_{24} \text{ (mL)} = V_{24} - V_{12} + Gb_{12} - (Bl_{24} - Bl_{12})$$

$$Gb_{12} \text{ (mL)} = V_{12} - 30 + V_8 - V_0 - Bl_{12}$$

$$Gb_8 \text{ (mL)} = V_8 - 30 - (Bl_8 - Bl_4) + Gb_4$$

und ohne Entgasung:

$$Gb_{24} \text{ (mL)} = V_{24} - V_0 - Bl_{24}$$

$$Gb_{12} \text{ (mL)} = V_{12} - V_0 - Bl_{12}$$

$$Gb_8 \text{ (mL)} = V_8 - V_0 - Bl_8$$

$$Gb_4 \text{ (mL)} = V_4 - V_0 - Bl_4$$

mit

$$V_{24} = \text{Volumen nach 24 Stunden (mL)}$$

$$V_0 = \text{Volumen nach Befüllen des Kolbens (mL)}$$

$$V_8 = \text{Volumen nach 8 Stunden (mL)}$$

$$V_4 = \text{Volumen nach 4 Stunden (mL)}$$

$$Bl = \text{mittlere Blindwert: Gasvolumen, das allein durch Fermentation der Bestandteile des Pansensaft-Puffer-Gemischs entsteht}$$

Eine Korrektur der Gasbildung nach 4 (Gb₄) Stunden Inkubation um 30 mL, ist bei der Berechnung nicht notwendig, da eine Entlüftung des Kolbens nicht erforderlich war.

3.2.9 Berechnung des IVDN (%)

Die Berechnung des IVDN erfolgte analog der Formel nach Raab et al. (1983)

3.3 Beispielberechnung

Die bereits beschriebene Berechnung für die Gasbildung (mL) und den IVDN (%) aus den analysierten Rohdaten sollen beispielhaft am Futtermittel Soja 6, mit und ohne Stärkezulage, des zweiten Versuchsansatzes dargestellt werden. Die Berechnung der übrigen Ergebnisse erfolgte analog. In Tabelle 3 sind die zur Berechnung notwendigen Daten des Beispiels zusammengestellt. Die Futtermittelprobe für die Beispielberechnung wurde 12 Stunden inkubiert, wobei eine Belüftung des Kolbens nach 8 Stunden notwendig war. Die Einwaage betrug bei alleiniger Inkubation von Soja 6 130 mg, bei Stärkezulage betrug sie 130 mg Soja + 130 mg Stärke.

Tabelle 3: Analyisierte Rohdaten der Futtermittel-Proben Soja 6 und Soja 6 + Stärke:
Volumen (mL) und Ammonium-Stickstoff (NH₃-N/30 mL)

Futtermittel	Kolben	V ₀	V ₈	-30 ¹⁾	V ₁₂	NH ₃ -N/30 mL
Soja 6	37	29,0	56,0	*	38,0	10,72
	38	29,0	55,0	*	38,0	11,09
	39	29,0	55,0	*	37,5	10,52
Soja 6 + Stärke	40	29,0	87,0	*	41,0	5,28
	41	29,0	86,0	*	42,0	5,21
	42	28,5	85,0	*	43,0	5,11
Blindwert	49	29,0	36,5		38,5	7,44
	50	29,0	36,0		38,0	7,16
	51	29,0	36,0		38,0	7,11
	52	29,0	35,5		38,0	7,14

¹⁾* Kolben entgast, d. h. zurückgestellt auf 30-ml-Marke

3.3.1 Beispielberechnung der Gasbildung

Nach der unter 3.2.8 beschriebenen Formel (G_{b12}) belief sich die nach 12 Stunden gebildete Gasmenge für den Kolbenprober 37 auf:

$$\begin{aligned} G_{b12} \text{ (mL)} &= (38,0 - 30) + (56,0 - 29,0) - 9,1 \\ &= 25,9 \text{ mL} \end{aligned}$$

mit einem mittleren Blindwert von 9,1 mL, der sich aus der Differenz $V_{12} - V_0$ der Kolben 49 bis 52 ergab.

Analog wurde die Gasbildung der Kolbenprober 38 bis 42 berechnet, deren Ergebnisse in Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tabelle 4: Ergebnisse der Gasbildung (mL) der Futtermittelproben Soja 6 und Soja 6 + Stärke

Futtermittel	Kolben	G_{b12}
Soja 6	37	25,9
	38	24,9
	39	24,4
Soja 6 + Stärke	40	59,9
	41	59,9
	42	60,4

3.3.2 Beispielberechnung des IVDN (%)

Die Berechnung des IVDN erfolgte nach der unter 2.4 dargestellten Formel. Teil der Formel ist die theoretische $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration bei null Gasbildung, die als y-Achsen-Abschnitt der Beziehung zwischen $\text{NH}_3\text{-N}$ (y, mg) und Gasbildung (x, mL) der Futtermittelproben Soja 6 und Soja 6 + Stärke beschrieben wurde. Diese Beziehung und die daraus resultierende Regressionsgleichung dieser Proben ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

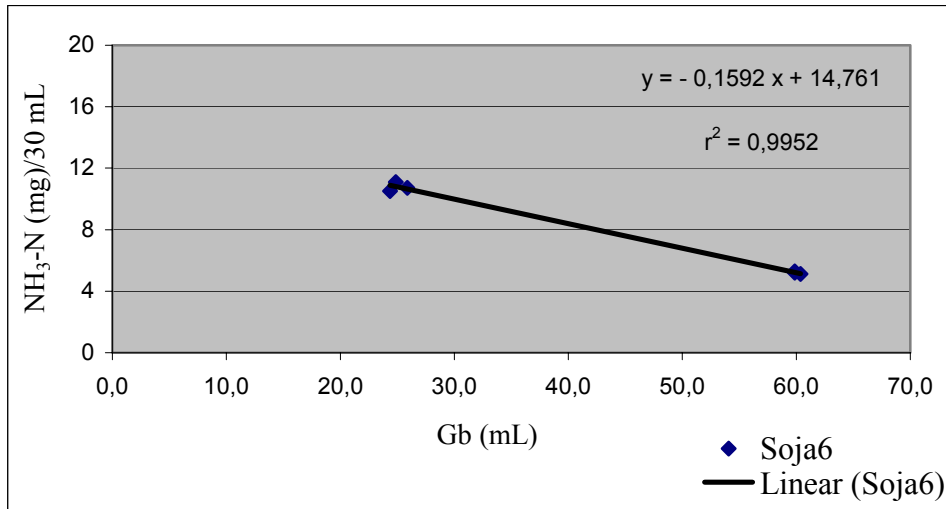


Abbildung 2: Regressionsgleichung der Beziehung zwischen der NH₃-N-Konzentration (mg)/30 mL und der Gasbildung (mL) der Beispielproben

Die theoretische NH₃-N-Konzentration (s. auch Abb. 1, Punkt A), setzte sich aus der Summe der NH₃-N-Konzentrationen aus Futtermittel und Blindwert zusammen und beträgt für dieses Beispiel 14,8 mg. Die mitgeführten Kolben, die ausschließlich Pansensaft-Puffer-Gemisch enthielten, wiesen im Mittel eine NH₃-N-Konzentration von 7,21 mg auf. Die Differenz beider Werte stellte den NH₃-N aus dem Abbau des Futterproteins oder anderer im Futter enthaltenen N-Quellen dar, und betrug 7,55 mg. Bezogen auf die Einwaage (mg T) und deren Rohproteingehalt (mg XP) beträgt der IVDN₁₂ der Futtermittelprobe Soja 6 81,7 %.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Berechnung der Gasbildung

In Tabelle 5 sind die gemessenen und um den Blindwert korrigierten Gasbildungen (mL) der Versuche (I, II, III, IV) dokumentiert.

Tabelle 5: Berechnete mittlere Gasmenge (mL) um den jeweiligen Blindwert (mL) korrigiert

Futtermittel	Gasbildung (mL/200 mg T)							
	Gb ₄		Gb ₈		Gb ₁₂		Gb ₂₄	
	I	II	I	II	III	IV	III	IV
Raps 3	15,8	17,4	25,5	27,3	21,0	22,4	25,4	26,7
Raps 3 + Stärke	45,0	57,9	75,0	83,5	57,3	58,0	67,5	65,3
Raps 7	16,3	18,7	27,2	30,0	21,8	23,5	26,2	27,3
Raps 7 + Stärke	40,8	58,0	76,5	86,3	59,3	59,0	70,0	66,5
Soja 3	16,8	19,1*	18,3	18,6	22,3	26,5	28,2	30,7
Soja 3 + Stärke	38,0	57,4	51,2	54,1	59,3	61,5	72,0	71,7
Soja 6	18,0	20,0	17,0	18,0	21,8	25,0	28,2	30,8
Soja 6 + Stärke	38,8	57,7	48,7	53,3	59,3	60,0	72,7	70,3

* Mittelwert aus zwei gemessenen Werten

Die berechneten Gasmengen überschritten nicht die 90-mL-Marke, so dass die von Menke und Steingass (1986) geforderten Bedingungen erfüllt wurden. Die stärkere Gasbildung der Futtermittelproben Soja 6 und Soja 3 des Versuchsansatzes II bei 4 Stunden Inkubation sind auf die größere Stärkezulage zurückzuführen. Die Futtermittelproben Raps 3 und Raps 7 weisen im Vergleich zu den Sojaprobe 3 und 6, bezogen auf die Einwaage nach 8 Stunden Inkubation, eine höhere Gasbildung auf. Nach weiteren 16 Stunden bilden die Sojaprobe mehr Gas als die Rapsproben. Bei allen Futtermittelproben, denen Stärke zugelegt wurde, ist eine deutliche Zunahme der Gasbildung festzustellen.

4.2 Ergebnisse der analysierten NH₃-N-Konzentration (mg/30 mL)

Die NH₃-N-Konzentrationen der Proben ohne Stärkezulage stiegen tendenziell in Abhängigkeit von der gebildeten Gasmenge über den gesamten Inkubationszeitraum an.

Eine negative Beziehung bestand zwischen der NH₃-N-Konzentration und der Stärkezulage, da wie erwartet bei Stärkezulage die NH₃-N-Konzentrationen bei allen Proben geringer ausfielen. Die NH₃-N-Konzentrationen der Proben Soja 3 und Soja 6 mit Stärkezulage nahmen bis zur Inkubationsdauer von 12 Stunden, wiederum in Abhängigkeit von der

gebildeten Gasmenge, ab und wiesen nach 24-stündiger Inkubation höhere Konzentrationen auf.

Eine weitere Beurteilung der Futtermittelproben allein anhand der analysierten $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentrationen ist wegen der unterschiedlichen Einwaagen nur begrenzt möglich.

Die gemessenen $\text{NH}_3\text{-N}$ -Mengen wurden, für jede Inkubationsdauer und jedes Futtermittel (mit und ohne Stärkezulage), zu den ermittelten Gasmengen in Beziehung gesetzt, so dass sich aus den linearen Regressionsrechnungen die in Tabelle 6 und 7 dargestellten Geraden ergaben:

Tabelle 6: Regressionsgleichungen beider Versuchsansätze zur Darstellung der Beziehung zwischen Gasbildung und $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration nach 4 und 8 Stunden

Vers. Ansatz	Futtermittel	4 Stunden		8 Stunden	
		Regressionsgleichung	r^2	Regressionsgleichung	r^2
I n = 3	Raps 3	$y = 6,59 - 0,093 x$	0,91	$y = 7,42 - 0,059 x$	0,94
	Raps 7	$y = 9,57 - 0,117 x$	0,90	$y = 10,38 - 0,089 x$	0,99
	Soja 3	$y = 8,81 - 0,060 x$	0,92	$y = 11,67 - 0,120 x$	0,99
	Soja 6	$y = 8,61 - 0,091 x$	0,72	$y = 10,16 - 0,132 x$	0,94
II n = 3	Raps 3	$y = 8,66 - 0,099 x$	0,99	$y = 10,08 - 0,095 x$	0,98
	Raps 7	$y = 9,00 - 0,077 x$	0,96	$y = 12,68 - 0,104 x$	0,99
	Soja 3	$y = 11,27 - 0,110 x$	0,99	$y = 12,42 - 0,134 x$	0,96
	Soja 6	$y = 10,62 - 0,118 x$	0,99	$y = 10,10 - 0,120 x$	0,99

Tabelle 7: Regressionsgleichungen beider Versuchsansätze zur Darstellung der Beziehung zwischen Gasbildung und $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration nach 12 und 24 Stunden

Vers.	Futtermittel	12 Stunden		24 Stunden	
		Regressionsgleichung	r^2	Regressionsgleichung	r^2
III n = 3	Raps 3	$y = 10,67 - 0,125 x$	0,99	$y = 13,34 - 0,101 x$	0,99
	Raps 7	$y = 10,37 - 0,101 x$	0,98	$y = 11,71 - 0,075 x$	0,80
	Soja 3	$y = 13,51 - 0,132 x$	0,99	$y = 16,27 - 0,105 x$	0,95
	Soja 6	$y = 12,20 - 0,149 x$	0,96	$y = 14,10 - 0,090 x$	0,93
IV n = 3	Raps 3	$y = 11,40 - 0,130 x$	0,99	$y = 14,20 - 0,103 x$	0,92
	Raps 7	$y = 12,15 - 0,138 x$	0,99	$y = 14,40 - 0,101 x$	0,98
	Soja 3	$y = 14,46 - 0,136 x$	0,95	$y = 18,69 - 0,115 x$	0,99
	Soja 6	$y = 14,76 - 0,159 x$	0,99	$y = 18,26 - 0,128 x$	0,93

Aus der Steigung der Geraden wurde die mikrobielle Effizienz der Proteinsynthese abgeleitet, wobei ein 1 mg Mikrobenprotein-N pro 1 mL gebildete Gasmenge gebildet wurde. Die theoretische $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration die aus dem Futter und dem Blindwert freigesetzt wurde, konnte aus dem y-Achsen-Abschnitt der Geraden abgeleitet werden, die zur Berechnung des Proteinabbaus diente.

4.3 Ergebnisse der berechneten Effizienz der Proteinsynthese (mg MP-N/mL Gb)

Die Steigungen der Geraden, also die gebildeten Mengen an Mikrobenprotein-Stickstoff in mg/mL Gasmenge, sind in Tabelle 8 dokumentiert.

Tendenziell war festzustellen, dass die gebildete Menge an Mikrobenprotein-N pro mL Gasbildung bis zu einer Inkubationseinheit von 12 Stunden anstieg und ab 24 Stunden Inkubation abfiel. Des Weiteren ist aus der Tabelle 9 ersichtlich, dass die Steigung der Futtermittelproben Raps 3 und 7 im Vergleich zu den Proben Soja 3 und 6 geringer war, die Geraden demnach nicht parallel verliefen. Bis zu einer Inkubationsdauer von 8 Stunden waren die Werte zwischen den Versuchsansätzen nicht vergleichbar, die Werte nach 12 und 24 Stunden Inkubation waren es sehr wohl.

Tabelle 8: Effizienz der Proteinsynthese aus den Versuchen I, II und III, IV nach verschiedenen Inkubationszeiten (4, 8, 12 und 24 h)

Futtermittel	mg Mikrobenprotein-N/mL Gb nach Inkubationszeit (h)							
	4		8		12		24	
	I	II	I	II	III	IV	III	IV
Raps 3	0,09	0,10	0,06	0,10	0,13	0,13	0,10	0,10
Raps 7	0,12	0,08	0,09	0,10	0,10	0,14	0,08	0,10
Soja 3	0,06	0,11	0,12	0,13	0,13	0,14	0,11	0,12
Soja 6	0,09	0,12	0,13	0,12	0,15	0,16	0,09	0,13

4.4 Ergebnisse des berechneten IVDN (%)

Die Ergebnisse des *in vitro* abgebauten N (IVDN %) am insgesamt inkubierten Stickstoff nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Vergleich der IVDN (%) zwischen den Versuchsansätzen (I, II und III, IV) nach verschiedenen Inkubationszeiten (4, 8, 12 und 24 h)

Futtermittel	IVDN ₄		IVDN ₈		IVDN ₁₂		IVDN ₂₄	
	I	II	I	II	III	IV	III	IV
Raps 3	11,6	26,2	20,0	37,9	67,6	53,8	85,7	62,3
Raps 7	39,4	31,3	48,2	64,2	68,6	68,5	69,7	69,8
Soja 3	20,3	32,3	68,6	70,9	80,5	72,0	95,4	92,7
Soja 6	20,8	31,2	57,7	51,0	73,3	81,7	80,3	96,2

Der *in vitro* abgebaute N stieg mit zunehmender Inkubationsdauer an. Diese Tendenz war in beiden Versuchsansätzen zu erkennen, wobei ein direkter Vergleich der Werte nicht immer möglich war.

Die Futtermittelproben Soja 3 und Soja 6 wurden während der gesamten Inkubation schneller und stärker abgebaut als die Futtermittelproben Raps 3 und Raps 7. Nach einer Inkubation

von 24 Stunden waren sie fast vollständig abgebaut. Die Rapsproben hingegen wurden nach 12 Stunden Inkubation nur zu zwei Dritteln abgebaut. Dieser Wert erhöhte sich nach weiteren 12 Stunden Inkubation nur geringfügig.

5. DISKUSSION

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, kann die Quantifizierung des Mikrobenproteins (MP) und des im Pansen nicht abgebauten Futterproteins (UDP) bislang nur in aufwendigen Tierversuchen erfolgen. Einfache und weniger zeitaufwendige *in vitro* Verfahren sind in der praktischen Handhabung sicherlich leichter, und auch die Beprobung einer großen Menge an Futtermitteln ist gewährleistet. Offen ist jedoch noch, ob die ermittelten Werte qualitativ den *in vivo* ermittelten Werten entsprechen und ob tatsächlich eine Übertragung der ermittelten Werte auf das nXP-System möglich ist.

Der mikrobielle Proteinstoffwechsel stellt ein komplexes System mit vielen Einflussgrößen dar. Da diese voneinander abhängig sind und sich gegenseitig beeinflussen, sind sie keinesfalls einzeln zu betrachten. Zur besseren Darstellung und Überprüfung dieser Größen werden sie jedoch getrennt diskutiert.

Zunächst soll eine Beurteilung der Methode hinsichtlich möglicher Fehler und Auswirkungen auf die Ergebnisse erfolgen.

5.1 Fehlerdiskussion

Für die Fehlerbetrachtung lassen sich drei Teilgebiete unterscheiden. Mögliche Fehlerquellen stellen dar:

- das System Hohenheimer Futterwerttest (HFT)
- die Aufarbeitung der Proben
- die Analytik
-

Ein hohes Maß an Routine ist zur sicheren Anwendung der Methode HFT notwendig. Trotz dieser lassen sich kaum zu beeinflussende Fehler nicht vermeiden, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

Bei der Handhabung des Wägeschiffchens während der Einwaage war darauf zu achten, dass die Futtermittelprobe am Kolbenboden abgelegt wurde. Blieben Futterpartikel am Kolbenrand haften, konnte dies zu einem Verkannten des Stößels im Kolben und zu einem falsch interpretierten Gasvolumen führen. Dieser Fehler konnte in dieser Arbeit vermieden werden.

Auch bei ausreichendem Einfetten der Stößel vor dem Befüllen war ein Auslaufen des Pansensaftes aus dem Kolben während der Inkubation im Brutschrank nicht immer zu vermeiden. Dies stellt einen der Gründe für den bereits bei Menke et al. (1979) erfolgten Vorschlag der dreifachen Wiederholung jeder Futterprobe innerhalb der Inkubation dar.

Die Befüllung der Kolben musste möglichst schnell erfolgen, um eine Auskühlung des Pansensaft-Puffer-Gemischs an der Umgebungstemperatur zu verhindern und um einen zeitlich möglichst einheitlichen Inkubationsbeginn zu gewährleisten. Für die Befüllung der Kolben wurden 30 Minuten benötigt. Daraus resultierende mögliche Einflüsse auf die Inkubation und die Gasbildung zwischen dem ersten und dem zuletzt befüllten Kolben konnte nicht festgestellt werden.

Mögliche bei der Befüllung eingebrachte Luftblasen sollten bei Senkrecht halten und nach Schütteln des Kolbens durch langsames Hochschieben des Stößels entfernt werden. Jedoch konnte ein vollständiges Entfernen der Luft nicht erreicht werden. Nach Steingass (1983) hatten 0,21 und 1,05 mL O₂ (1 bzw. 5 mL Luft) keinen negativen Einfluss auf die Fermentation und damit auf die Gasbildung. Da in dieser Untersuchung weniger als 1 mL Luft im Kolben zurückblieb, war somit ein Einfluss des Sauerstoffs auf die Gasbildung auszuschließen.

Aufgrund des Fassungsvermögens des HFT-Schranks konnten nicht alle Proben jeder Inkubationszeit gleichzeitig untersucht werden, so dass an verschiedenen Tagen Pansensaft gezogen werden musste. Um die Wiederholbarkeit und das Feststellen täglicher Unterschiede in der Fermentationsaktivität gewährleisten zu können, ist das Mitführen eines Standards mit bekannter Gasbildung ratsam und wird bereits von Menke et al. (1979) vorgeschlagen.

Bei diesem Standard handelt es sich um ein Standard-Heumehl und ein Standard-Krafftutter mit bekannter Gasbildung von 44,16 mL und 59,8 mL Gas/200 mg T.

Die Aufbereitung der Proben für die Destillation erfolgte mittels Zentrifugation. Der partikelfreie Überstand wurde hierbei mittels einer Spritze abgesaugt, wobei die Gefahr bestand, dass Reste des festen Bestandteils in die Spritze gelangten und den Gehalt an NH₃-N

in der Probe verfälschte. Dieser mögliche Fehler ist jedoch bei den hier untersuchten Proben nahezu auszuschließen.

5.2 Gasbildung aus den Futtermittelproben ohne Stärkezulage

Die von Menke et al. (1979) vorgestellte *in vitro* Methode zur Ermittlung des energetischen Futterwertes aus der Gasbildung mittels HFT, bei der Inkubation von Futtermitteln mit Pansensaft, hat sich zur Schätzung des energetischen Futterwertes sehr gut bewährt.

Die Schätzung erfolgt auf der Basis der gebildeten Gasmenge und der Weender Roh Nährstoff-Analyse. Alle Werte gehen in die Schätzgleichung der GfE (1996) zur Schätzung des Energiegehalts in Mischfuttermitteln für Milchvieh ein.

Zunächst sollen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten der gebildeten Gasmengen der Futtermittelproben Soja 3 und 6, sowie Raps 3 und 7, der Versuche I, II, III und IV, bei alleiniger Inkubation ohne Stärkezulage betrachtet werden. Um eine Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten, wurden die gebildeten Gasmengen auf die von Menke et al. (1979) vorgeschlagene Einwaagemenge von 200 mg T korrigiert und sind in Tabelle 10 dargestellt. Wird die Voraussetzung erfüllt und werden nach 24 Stunden nicht mehr als 90 mL Gas gebildet, so gilt nach Menke et al. (1979) Proportionalität zwischen der Gasbildung und der inkubierten Substratmenge, so dass die Zulässigkeit der linearen Umrechnung hier gegeben ist.

Tabelle 10: Berechnete mittlere Gasmenge (mL/200 mg T) um den jeweiligen Blindwert (mL) korrigiert

Futtermittel	Gasbildung (mL/200 mg T)							
	Gb ₄		Gb ₈		Gb ₁₂		Gb ₂₄	
	I	II	I	II	III	IV	III	IV
Raps 3	15,8	17,4	25,4	27,3	32,1	34,3	38,9	40,9
Raps 7	16,3	18,6	27,1	29,9	33,4	36,1	40,2	41,9
Soja 3	14,6	16,6*	29,2	29,7	34,2	40,7	43,2	47,0
Soja 6	15,6	17,4	27,1	28,6	33,4	38,4	43,2	47,2

* Mittelwert aus zwei gemessenen Werten.

Die gebildeten Gasmengen sind innerhalb eines Futtermittels (Raps oder Soja) für jede Inkubationszeit vergleichbar, zwischen den Futtermitteln Raps und Soja jedoch unterschiedlich.

Es lässt sich feststellen, dass mit Ausnahme der kurzen Inkubationszeit von 4 Stunden die gebildete Gasmenge aus den Sojaprobe tendenziell immer größer ist. Nach 24 Stunden beträgt sie 47,0 mL für die Probe Soja 3, bzw. 47,2 mL für Soja 6. Das gebildete Gasvolumen der Rapsextraktionsschrote 3 und 7 betragen 40,9 und 41,9 mL. Menke und Huss (1987) gaben in der Futtermitteltabelle für Rapsextraktionsschrot mit einem Rohproteingehalt von 390 g/kg T einen Wert für die gebildete Gasmenge von 44 mL an. 53 mL Gasbildung werden für ein Sojaextraktionsschrot mit 510 g XP/kg T deklariert. Beide Werte beziehen sich ausschließlich auf die Inkubation von 24 Stunden, wobei nicht zu erkennen ist, ob diese Werte durch den Standardfaktor korrigiert wurden.

Auch Getachew et al. (2002) gibt Gasbildungen für Sojaextraktionsschrot an, die denen in dieser Arbeit vergleichbar sind. In einer Ringuntersuchung von 16 Futtermitteln, in 7 Laboratorien (USA (1), Italien (2), Spanien (1), Indien (2), Deutschland (1)), für die die Universität Hohenheim als Referenzlabor galt, sollte die Vergleichbarkeit der Werte (Gasbildung (mL) und ME (MJ/kg T) sowohl innerhalb als auch zwischen den Laboratorien überprüft werden. Die Erfassung der Gasproduktion wurde von allen Untersuchungsstätten routinemäßig durchgeführt unter Verwendung des nach Menke und Steingass (1988) konzipierten Medium-Puffer-Gemisches. Die Inkubation der Futtermittel erfolgte in dreifacher Ausführung im Brutschrank (Steingass und Menke, 1986) oder im 39 °C warmen Wasserbad nach Blümmel und Ørskov (1993). Die Art und Anzahl der Spendertiere, sowie deren Rationen und weitere Unterschiede in der Handhabung der Methode sind bei Getachew et al. (2002).

Nur drei der sechs getesteten Untersuchungsstätten ermittelten die Werte des Referenzlabors, so dass nur diese in Tabelle 11 angegeben werden.

Tabelle 11: Ergebnisse des Referenzlabors und der Testlaboratorien zur gebildeten Gasmengen (mL/200 mg T) aus Sojaextraktionsschrot

Futtermittel	XP g/kg T	Gasbildung (mL)			
		Referenzlabor D	Testlaboratorien		
			A	C	F
Sojaextraktionsschrot	541	46,7	49,5	49,3	49,2

Werden die in dieser Arbeit gebildeten Gasmengen, der jeweiligen Inkubationszeiten gegen die Zeit aufgetragen, so erhält man die in Abbildung 4 dargestellten Kurvenverläufe. Es ist darauf zu achten, dass es sich in den Abbildungen um einen theoretischen Verlauf handelt, da, wie bereits erwähnt wurde, die Inkubation der unterschiedlichen Zeiten an verschiedenen Tagen stattfand. Da keine Untersuchungen zu kürzeren Inkubationen als 4 Stunden durchgeführt wurden, kann keine Aussage über eine mögliche Gasbildung vor diesem Zeitintervall getroffen werden.

Während der gesamten Inkubationszeit von 24 Stunden ist der Kurvenverlauf aller Futtermittelproben in beiden Versuchsansätzen ansteigend, wobei die Menge des gebildeten Gases im Zeitraum von 12 bis 24 Stunden der Inkubation gering ist. In den ersten 4 Stunden treten keine großen Unterschiede zwischen den Proben auf. Nach 12 Stunden Inkubation lassen sich Unterschiede für die jeweiligen Raps- und Sojaprobe feststellen. Generell ist in beiden Versuchsansätzen das Niveau der Sojaprobe höher, ein deutlicher Anstieg ist nach 12 Stunden im zweiten Versuch festzustellen.

Die berechneten Gasbildungen (mL) der Blindwerte aus den Versuchsansätzen unterschiedlich sind. Sie schwanken bei einer Inkubation von 24 Stunden von 9,5 mL im Versuchsansatz III, bis 15,0 mL im Versuchsansatz IV. Die gebildeten Gasmengen aus den Futtermittelproben wurden zwar um den jeweiligen Blindwert korrigiert, eine Aussage über den Einfluss einer möglicherweise veränderten Aktivität des Pansensaftes konnte jedoch nicht getroffen werden. Wie unter 5.1 erklärt wurde ist das Mitführen sogenannter Standardfuttermittel zur Überprüfung der Aktivität des Pansensaftes notwendig, deren Quotienten (aus Sollwert und gemessener Gasbildung) zwischen 0,9 und 1,1 liegen sollten. Das wiederum bedeutet, dass eine Abweichung der gebildeten Gasmenge von $\pm 10\%$ toleriert wird.

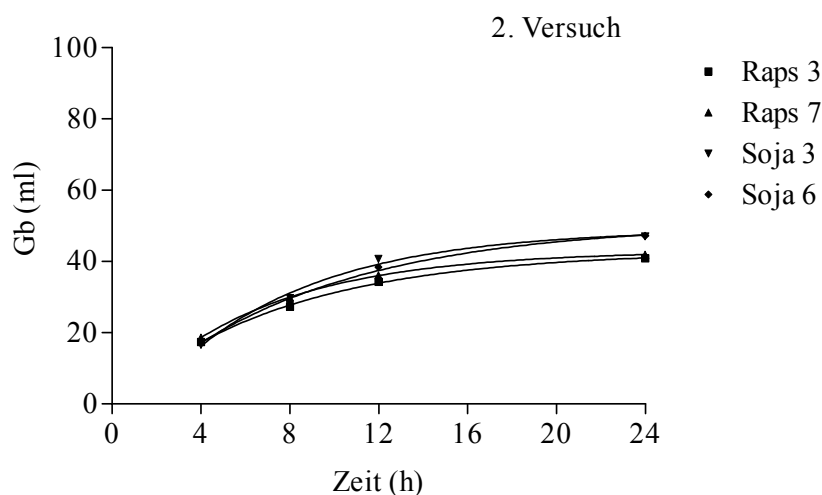
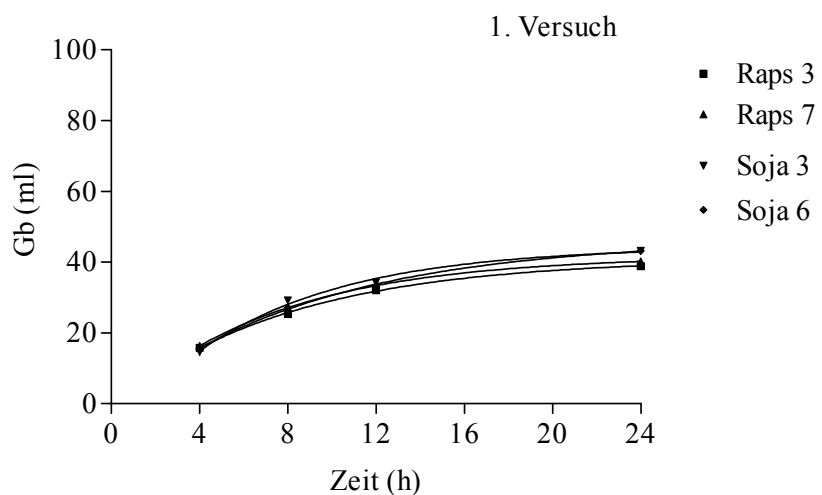


Abbildung 3: Theoretischer Verlauf der korrigierten Gasmengen (mL/200 mg T) während der gesamten Inkubationszeit

Die berechneten Gasmengen der Futtermittelproben aus Tabelle 11, die nach dem herkömmlichen System HFT inkubiert wurden, scheinen jedoch stabil zu sein. Eventuelle Veränderungen in der Aktivität und Zusammensetzung des Pansensaftes scheinen keine negativen Auswirkungen auf die gebildete Gasmenge zu haben. Dies wird auch durch die oben dargestellten Ergebnisse bestätigt.

Werden die ermittelten Werte der beiden Läufe für jede Inkubationszeit gemittelt, so liegen alle gemessenen Gasbildungen bei einer Abweichung von $\pm 10\%$ im tolerierten Bereich.

5.3 Effekt der Stärkezulage auf die Gasbildung

In Tabelle 12 sind die gebildeten Gasmengen (mL) dokumentiert, die allein auf die Zulage von Stärke (200 mg T) zurückzuführen sind. Sie wurden durch die Gasbildungen der Kolben mit Stärkezulage abzüglich der Gasbildungen der Kolben ohne Stärkezulage berechnet. Es ließ sich feststellen, dass während der Inkubationsdauer von 12 und 24 Stunden innerhalb eines Versuchsansatzes tendenziell die gleiche Gasmenge aus Stärke gebildet wurde. Die gebildeten Gasmengen innerhalb des Versuchsansatzes I nach 8 Stunden Inkubation sind zwischen den Futtertypen (Raps/Soja) verschieden, innerhalb der Proben (Raps 3 und 7/Soja 3 und 6) jedoch gleich groß. Unterschiedliche Gasmenge innerhalb des Versuchsansatzes I für eine Inkubation von 4 Stunden lassen sich verzeichnen, als auch Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen aller Inkubationszeiten.

Dies lässt auf mögliche Fehlerquellen schließen. Ein möglicher Ansatz zur Erklärung ist eine schlechtere Verfügbarkeit der Stärke innerhalb kurzer Inkubationen. Da die Stärke dazu neigt bei Kontakt mit dem Pansensaft-Puffer-Gemisch am Kolbenrand zu verkleben, wird dadurch die Angriffsfläche für die Mikroorganismen verkleinert, so dass weniger Energie zur Verfügung steht. Demnach wird weniger Gas produziert.

Vor allem für die kurze Inkubationszeit von 4 Stunden, in denen die Mikroorganismen weniger Zeit für den „Aufschluss“ dieser Stärkeklumpen zur Verfügung hatten, scheint diese Erklärung plausibel, da es zu unterschiedlichen Gasbildungen innerhalb der Triplets kommt. Der erste Versuchsansatz scheint davon besonders betroffen zu sein.

Da eine Vergleichbarkeit der Werte innerhalb der Versuchsansätze I und II für 8 Stunden Inkubation gegeben scheint, und die Inkubation für 4 und 8 bzw. 12 und 24 Stunden jeweils gemeinsam in einem Durchgang geprüft wurde, ist eine mögliche Auswirkung durch den Pansensaft auszuschließen.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass es zu Unterschieden in der Gasbildung kommt, die auf eventuelle Einflüsse aus dem Futtermittel zurückzuführen sind. Die bei den Rapsproben festgestellte größere Menge an gebildetem Gas aus der Stärke in beiden Versuchsansätzen nach 4 Stunden Inkubation, lässt auf diese Annahme schließen. Die Klärung dieser Frage ist in dieser Arbeit nicht möglich, eventuell kann die Beeinflussung der

Mikrobenpopulation durch die Ration und damit die Bevorzugung bestimmter Mikroben ein möglicher Ansatz sein.

Wie schon erwähnt ist eine Parallelität der gebildeten Gasmenge nach 12 bzw. 24 Stunden Inkubation innerhalb eines Versuchsansatzes gegeben. Mögliche oben genannte Einflüsse auf die Gasbildung aus der Stärke, bei längerer Inkubation, spielen demnach keine Rolle. Auch Raab (1980) konnte bei der Inkubation von 24 Stunden feststellen, dass die Bildung von Gas aus einer bestimmten Menge an Stärke konstant und unabhängig von den Futtermittelproben war, so dass Zweifel an der Anwendbarkeit kurzer Inkubationszeiten zulässig sind und durch weitere Untersuchungen geklärt werden müssen.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die gebildete Gasmenge aus der Stärkezulage zwischen den Versuchsansätzen unterschiedlich ist, so dass diese Gasbildung für jeden Versuchsansatz sowie für jede Probe immer wieder neu ermittelt werden muss.

Tabelle 12: Gebildete mittlere Gasmenge (mL) durch die Stärkezulage (200 mg T) in den Inkubationszeiten jedes Versuchs

Futtermittel	4 Stunden		8 Stunden		12 Stunden		24 Stunden	
	I	II	I	II	III	IV	III	IV
Raps 3	29,1	40,4	49,4	56,0	55,9	54,9	64,9	59,5
Raps 7	24,4	39,2	49,2	56,2	57,7	54,6	67,4	60,3
Soja 3	33,7	33,3	52,3	56,8	56,9	53,8	67,4	63,1
Soja 6	33,2	32,8	50,5	56,5	57,7	53,8	68,5	60,8

* Stärkezulage im zweiten Versuchsansatz für 4 Stunden Inkubation: 230 mg

Die große Stärkeeinwaage in den Versuchsansätzen I und II für die Inkubation von 4 Stunden ist kritisch zu betrachten. Die von Steingass und Menke (1986) geforderte und bereits erwähnte Bedingung ($G_b < 90$ mL), wurde für die Inkubation von 24 Stunden aufgestellt. Raab (1980) konnte ebenfalls bei der Inkubation von 24 Stunden feststellen, dass bei einer Stärkezulage von 200 mg zu Sojaschrot keine Linearität zwischen der Gasbildung und der

Stärkezulage mehr bestand, dies war bei der Untersuchung von Rapsschrot bei der Zulage von 250 mg Stärke erreicht.

Das Ausmaß von 230 mg Stärkezulage zu den Futtermittelproben Soja 3 und Soja 6 kann für die kurze Inkubationsdauer nicht beurteilt werden, da die Gasbildung nach 24 Stunden Inkubation für diese Einwaagemenge nicht erfasst wurde und Daten aus der Literatur fehlen. Nach Steingass (1983) „ist eine geringere Gasbildung bei höheren Substratmengen wahrscheinlich auf eine Erschöpfung des Hydrogencarbonatpuffers zurückzuführen“. Da dies für die 24-stündige Inkubation galt, dürfte nach 4 Stunden Inkubation dieser Fall nicht eintreten, so dass eine Linearität womöglich noch gegeben war.

5.4 Mikrobielle Proteinsynthese

Die mikrobielle Proteinsynthese ist eine schwer zu erfassende Größe, da der Aufbau von Mikrobenprotein und der Abbau von Futterprotein im Pansen gleichzeitig ablaufen. Auch die N-Quellen für die Synthese sind unterschiedlich. So nutzen Bakterien vornehmlich $\text{NH}_3\text{-N}$ für den Aufbau von Aminosäuren. Dieser stammt aus der Desaminierung von Futterprotein, oder aus dem Abbau von über den Rumino-Hepathischen-Kreislauf rezykliertem Harnstoff. Protozoen hingegen können diese Quelle nicht nutzen. Für die mikrobielle Syntheseleistung brauchen sie Aminosäuren und kurzkettige Peptide, die in freiliegender Form aus dem Futterprotein, oder durch Inkorporierung von Bakterien und kleinen Protozoen aufgenommen werden (Coleman, 1975).

Auch die Rationszusammenstellung scheint nach Meinung vieler Autoren einen Einfluss auf die Mikrobenpopulation im Pansen zu haben (Rodehutsord, 1992). So ist bei Rationen mit leichtfermentierbaren Kohlenhydraten ein Anstieg der Konzentration an Protozoen feststellbar.

5.4.1 Beurteilung der mikrobiellen Proteinsynthese

Die mikrobielle Proteinsynthese wurde in dieser Arbeit über die Abnahme der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration durch die zusätzlich zur Verfügung stehende Energiequelle in Form von Stärke bestimmt. Es wurde angenommen, dass die verschwundene $\text{NH}_3\text{-N}$ -Menge den Mikroben als N-Quelle für die mikrobielle Proteinsynthese zur Verfügung stand.

Als Ausgangsgröße diene die theoretische $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration aus dem Futter, die aus der gemessenen $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration im Überstand der Probe und der Probe mit Stärkezulage durch Extrapolation ermittelt wurde. Die Differenz der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration zwischen der theoretischen Ammoniumkonzentration und der Probe spiegelt die Proteinmenge wieder, die von den Mikroben synthetisiert wurde. Die Differenz zwischen dieser $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration und der Konzentration aus der Probe mit Stärkezulage stellt die Menge an Mikrobenprotein dar, die allein aufgrund der zusätzlichen Energie gebildet werden konnte.

Das bedeutet, dass sowohl die mikrobielle Nettoproteinsynthese als auch der Proteinabbau allein aufgrund der gemessenen $\text{NH}_3\text{-N}$ -Mengen aus der Probe berechnet werden. Die gemessene Proteinsynthese ist um die Menge an Proteinfreisetzung durch Lysis der Bakterien geringer als die Gesamtsynthese, jedoch ist die Lysis systembedingt und tritt auch *in vivo* auf.

Mögliche freie Aminosäuren oder Peptide, die sich im partikelfreien Überstand befinden, werden durch die Messung nicht erfasst, genauso wenig bleibt ihr Anteil, der von den bereits erwähnten Mikroorganismen inkorporiert wurde, unberücksichtigt. Diese Umstände könnten dazu führen, dass der Anteil des IVDN (%) unterschätzt wird, in welcher Größenordnung kann in dieser Untersuchung nicht geklärt werden.

Für Raab (1980) spielt dies keine Rolle. Er geht davon aus, dass die Differenz der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration, um die der NH_3 -Pool geringer wird, genau die Menge darstellt, die als mikrobielles Protein gebunden wird und als abgebaut gilt.

In Tabelle 13 sind die berechneten Werte für die mikrobielle Proteinsynthese der verschiedenen Futtermittel (korrigiert auf 200 mg T Einwaage) in den jeweiligen Inkubationszeiten angegeben. Es lässt sich feststellen, dass das gebildete Mikrobenprotein-N zwischen den Futtermitteln innerhalb eines Versuchs, als auch zwischen den Versuchen unterschiedlich ist. Tendenziell lässt sich feststellen, dass über die gesamte Inkubationszeit mehr Mikrobenprotein-N aus den Sojaprobe, als aus den Rapsproben gebildet wird. Nach 12 Stunden Inkubation wird die maximale hier feststellbare Menge an Mikrobenprotein-N gebildet, die nach 24-stündiger Inkubation in beiden Versuchen für alle Futtermittelproben geringer ausfällt. Diese Problematik wird in Kapitel 5.4.3 ausführlich erläutert.

Tabelle 13: Menge des gebildeten Mikrobenprotein-N aus der Probe (mg/200 mg T)

Futtermittel	4 Stunden		8 Stunden		12 Stunden		24 Stunden	
	I	II	I	II	III	IV	III	IV
Raps 3	1,47	1,73	1,50	2,58	3,94	4,58	3,92	4,21
Raps 7	1,94	1,45	2,40	3,10	3,63	4,97	2,99	4,23
Soja 3	0,87	1,83	3,51	3,98	4,51	5,50	4,55	5,39
Soja 6	1,44	2,05	3,57	3,41	4,98	6,10	3,88	5,98

5.4.2 NH₃-N-Konzentration der Futtermittel ohne Stärkezulage

Für die mikrobielle Proteinsynthese ist neben der Energie, als limitierende Größe, auch die N-Anflutung, als Quelle für den Aufbau von Aminosäuren von Bedeutung. Wird die NH₃-N-Menge die nach der Inkubation vorhanden ist um den Blindwert (also die NH₃-N-Menge, die auch ohne die Probe vorhanden ist) korrigiert, so kann eine Aussage über die Nettostickstoffbilanz getroffen werden. Zur Darstellung dieser Größe siehe Abbildung 5.

NH₃-N mg/30 mL

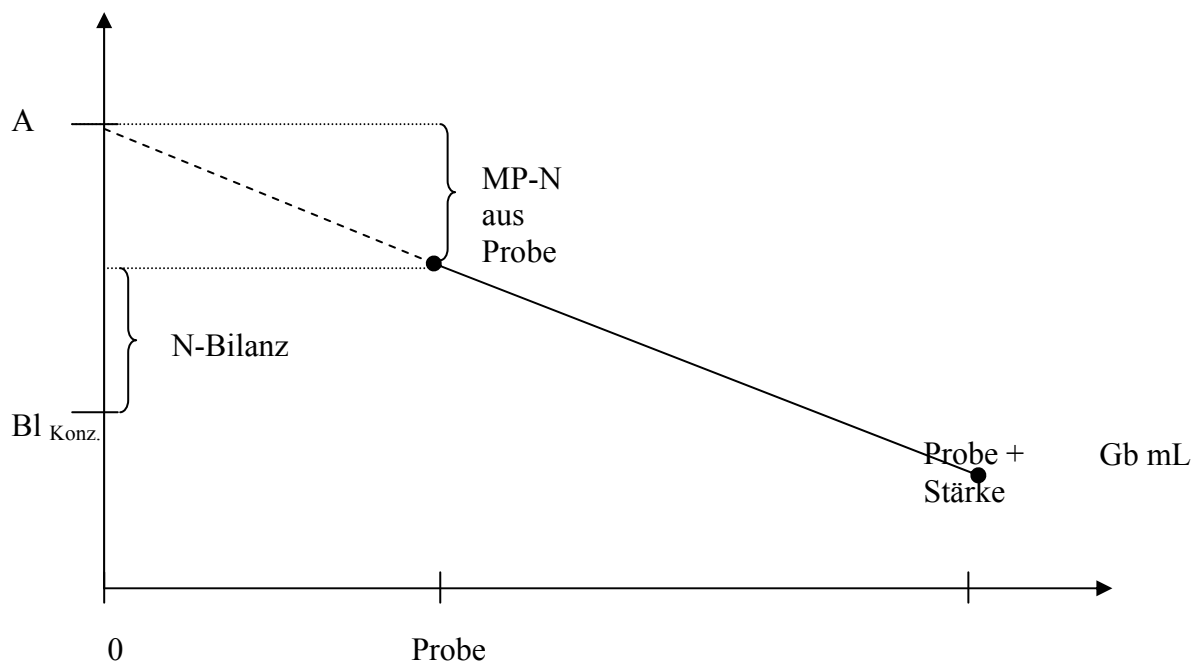


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Nettostickstoffbilanz

(Weitere Erläuterung s. 2.4)

Die Ergebnisse der um den Blindwert korrigierten $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentrationen der Futtermittelproben (200 mg T) sind in Tabelle 14 dokumentiert und in der Abbildung 6 dargestellt.

Tabelle 14: N-Bilanz (mg $\text{NH}_3\text{-N}$ /30 mL)

Futtermittel- Probe	4 Stunden		8 Stunden		12 Stunden		24 Stunden	
	I	II	I	II	III	IV	III	IV
Raps 3	-0,10	1,38	0,88	1,90	6,99	5,71	7,68	8,26
Raps 7	2,40	2,00	2,92	3,97	6,89	6,50	6,10	8,54
Soja 3	1,56	2,18	10,05	10,24	10,84	9,52	11,57	13,96
Soja 6	0,82	1,63	7,60	7,10	8,33	9,37	8,91	12,73

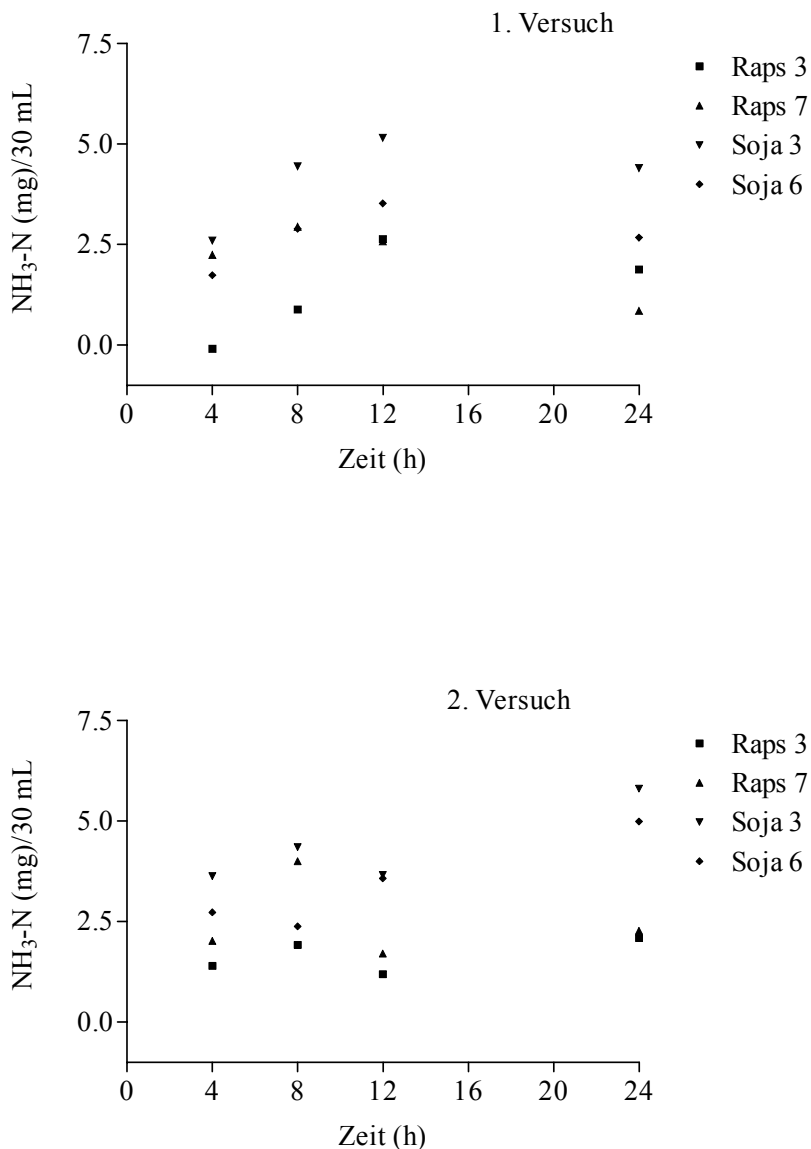


Abbildung 5: N-Bilanz (mg NH₃-N/30 mL)

Es lässt sich feststellen, dass die gemessenen NH₃-N-Konzentrationen sowohl zwischen als auch innerhalb der Versuchsansätze stark schwanken. Das Niveau der NH₃-N-Konzentration aus den Rapsextraktionsschroten ist über den gesamten Inkubationszeitraum deutlich geringer als das der Sojaextraktionsschrote, mit Ausnahme der Probe Raps 7. Diese zeigte in der ersten Inkubationszeit im ersten Versuch Werte die zwischen den ermittelten Werten der Sojaprobe lagen und nach 8 Stunden Inkubation gleiche Werte wie die Probe Soja 6. Im zweiten Versuch war die freiwerdende NH₃-N-Menge aus derselben Probe deutlich erhöht und lag nur geringfügig unter den Werten der Probe Soja 3.

Auffällig ist die negative N-Bilanz der Futtermittelprobe Raps 3 des ersten Versuchsansatzes nach 4 Stunden Inkubation, die nicht erklärt werden kann. Allgemein lässt sich feststellen, dass die $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration aus der Probe Soja 3 auf einem hohen Niveau beginnt und bereits nach 8 Stunden stark ansteigend ist, während die Proben Raps 3 erst nach weiteren vier Stunden an Konzentration gewinnen.

Die *in vivo* freigesetzte Menge an Protein aus dem Futtermittel sowie die gleichzeitig stattfindende Einlagerung von Protein in die Mikroorganismen, stellt die Nettostickstoffbilanz dar, die als ruminale N-Bilanz (RNB) bezeichnet wird. Sie berechnet sich aus der Differenz zwischen dem Futterrohprotein (XP) und dem nutzbaren Rohprotein (nXP) dividiert durch 6,25. Jedes Futtermittel liefert demnach einen positiven oder negativen Beitrag zur ruminale N-Bilanz (GfE, 2001). Ein Vergleich der in dieser Arbeit aufgestellten N-Bilanz zur RNB ist jedoch nur bedingt durchführbar. Eine Abschätzung der N-Bilanz eines Futtermittels ist zwar möglich, jedoch ist auf Grund der Inkubation im geschlossenen System eine Übertragung dieser Werte auf die *in vivo* festgestellten Werte nicht zulässig. Ein Mangel an verfügbarem Stickstoff aus dem Futtermittel *in vitro* könnte zu einer Beeinträchtigung der Fermentation führen, die je nach Größenordnung *in vivo* keine Rolle spielen würde, da als zusätzliche N-Quelle der rezyklierte Harnstoff aus dem Speichel zu Verfügung steht.

Die analysierten NH_3 -Mengen der Blindwerte hatten eine Streuung zwischen 0,3 und 1,3 mg N/30 mL lag. Dies und die dokumentierten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Parameter $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration sensibler reagiert als der Parameter Gasbildung. Aus diesen Gründen wäre ein Standardfuttermittel, wie es für die Korrektur der Gasbildung bekannt ist, auch zur Korrektur der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration hilfreich. Ein Standardfuttermittel wäre, analog zum Standardfuttermittel für die Gasbildung, durch ein bekanntes Verhalten in der *in vitro* Inkubation gekennzeichnet. Es müsste demnach bekannt sein, zu welchem Zeitpunkt und welche Menge des Protein aus dem Standardfuttermittel freigesetzt werden würde. Da die Löslichkeit des Stickstoffs futtermittelspezifisch ist, muss es auch für die Berechnung dieses Korrekturfaktors unterschiedliche Standardfuttermittel geben, eines für leicht und eines für schwer löslichen $\text{NH}_3\text{-N}$.

5.4.3 Effekt der Stärkezulage auf die $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration

Es konnte gezeigt werden, dass die $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration durch die gesteigerte Stärkezulage bei gleichzeitig gesteigerter Gasbildung (mL) abnahm. Da die Abnahme des $\text{NH}_3\text{-N}$ auf die vermehrte mikrobielle Proteinsynthese zurückzuführen war und die Gasbildung das Maß für die zu Verfügung stehende Energie darstellte, konnte die gebildete Mikrobenproteinmenge mg pro ml Gasbildung angegeben werden.

Nach Satter und Slyter (1974) werden mindestens 50 mg nach Okorie et al. (1977) 90 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ Pansen saft benötigt, um eine ausreichende Versorgung für die mikrobielle Proteinsynthese zu gewährleisten. Auf die vorliegende Arbeit bezogen bedeutet dies eine Menge an $\text{NH}_3\text{-N}$ in 30 mL von 1,5 bzw. 2,7 mg. Eine eingeschränkte mikrobielle Effizienz bei der Futtermittelprobe Raps 3 mit einer negativen N-Bilanz ist nicht feststellbar, so dass ein Effekt der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration auf die mikrobielle Synthese in diesem Versuch nicht zu sehen ist.

Die gemessene $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration im partikelfreien Überstand nahm bei der Inkubation der Rapsproben mit Stärkezulage bis zu einer Inkubationsdauer von 8 Stunden ab, stieg jedoch in Abhängigkeit der gebildeten Gasmenge nach 12 Stunden gering, nach 24 Stunden Inkubation deutlich an. Die $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration der Sojaprobe verlief ähnlich, wobei eine Zunahme der Konzentration erst nach 24 Stunden Inkubation festzustellen war.

Der Anstieg der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration nach 24 Stunden ist möglicherweise auf die in Lysis gehenden Mikroben zurückzuführen. Durch den Abbau der Mikroorganismen wird erneut Energie freigesetzt, die für die mikrobielle Synthese genutzt werden kann, jedoch dürfte der Abbau den Aufbau quantitativ übertreffen. Auch die Abnahme der mikrobiellen Effizienz in dieser Inkubationszeit deutet darauf hin. Raab (1980) stellte, trotz kontinuierlich ansteigender Gasproduktion ebenfalls eine Abnahme der Nettosynthese der Mikroben nach 24-stündiger Inkubation fest. Nach Van Nevel und Demeyer (1977) spielt die Erschöpfung des Substrats, neben vielen anderen Faktoren eine Rolle bei der Zunahme der in Lysis gehenden Mikroben. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die bereits erwähnten Protozoen, deren Wachstum durch die Zulage von Stärke gefördert wurde, auch nach 24 Stunden Bakterien inkorporieren können, während das Bakterienwachstum bereits erschöpft ist. Nach Coleman (1975) werden jedoch 50 % des über die Inkorporation der Bakterien aufgenommene

Stickstoff wieder in Form freier Aminosäuren oder als Ammonium abgegeben, so dass diese Abgabe einen Anstieg der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration bewirkt haben könnte. Ein Energiemangel kann nicht der Grund für eine verminderte Effizienz gewesen sein, auch nach 24 Stunden Inkubation Gas aus der Stärkezulage gebildet wurde.

Die in dieser Arbeit ermittelten Steigungen und damit die Effizienz der Proteinsynthese sind nicht in allen Versuchsansätzen für ein und dasselbe Futtermittel gleich. Das Verhältnis zwischen gebildetem Mikrobenprotein mg pro mL gebildeter Gasmenge muss für jede Untersuchung einer Probe immer wieder neu bestimmt werden. Dies wird auch von Raab et al. (1983) bestätigt.

Krishnamoorthy et al. (1991) zeigte das die Effizienz der mikrobiellen Nettoproteinsynthese von der Fermentationsrate und der Art des Substrats abhängig ist. Die kumulative Gasproduktion als Index für die mikrobielle Proteinsynthese ist nur dann zulässig, wenn die Zusammensetzung und die Gasbildung der Kohlenhydratzulage bekannt sind.

5.5 Überprüfung der IVDN-Werte und Beurteilung des Proteinabbaus

Um den Proteinabbau, bezeichnet als IVDN (%), mittels der von RAAB et al. (1983) aufgestellten und unter 2.4 erklärten Formel zu beurteilen, muss zunächst die Stabilität dieser Werte überprüft werden. Da diese Größe von zwei Faktoren (Gasbildung (mL) und $\text{NH}_3\text{-N}$ -Menge (mg/30 mL)) beeinflusst wird, müssen Auswirkungen möglicher Fehler dieser beiden Faktoren auf die ermittelten IVDN-Werte einzeln betrachtet werden. Daran anschließend erfolgt ein Vergleich dieser Werte mit den in der Literatur gefundenen Daten.

5.5.1 Überprüfung der Stabilität der IVDN-Werte anhand der Abweichungen in der Gasbildung

Zur Überprüfung inwieweit Streuungen in der gebildeten Gasmenge einen Einfluss auf die IVDN-Werte haben, wurden diese Schwankungen in der Gasbildung für jedes Triplet der Versuchansätze ermittelt.

Die in dieser Arbeit festgestellten Streuungen der Gasbildung innerhalb eines Triplets reichten von 0,0 mL bis 4,5 mL. Zur Überprüfung der IVDN-Werte wurden Streuungen von 1,5 mL bis 4,5 mL als mögliche Abweichung interpretiert. Die festgestellten NH₃-N-Konzentrationen und Gasbildungswerte des Kolbens mit der größten Abweichung vom Mittel innerhalb des Triplets gingen in die anschließende Berechnung der IVDN, als Test für die Stabilität der Werte, nicht mit ein und wurden dann mit dem unter Berücksichtigung aller Kolben berechneten Werte verglichen. Die ermittelte Spanne in den IVDN-Werten liefert Hinweise auf die Stabilität des ermittelten Wertes.

Im zweiten Versuchsdurchlauf konnte keine Überprüfung der Stabilität des IVND₁₂-Wertes für die Probe Raps 3 erfolgen, da bereits die NH₃-N-Konzentration eines Kolbens aufgrund Analysefehler fehlte, so dass bei Eliminierung eines weiteren Kolbens nur noch ein Kolben zur Berechnung zur Verfügung stand. Die Ergebnisse der nach Elimination der Werte mit den oben angegebenen Abweichungen Berechneten IVDN-Werte (%) sind in Tabelle 15 dokumentiert

Tabelle 15: Vergleich der mit drei bzw. zwei (in Klammern dargestellt) Kolben berechneten IVDN-Werte (%) in den Versuchansätzen (I, II und III, IV), korrigiert nach Gb

Futtermittel	IVDN ₄		IVDN ₈		IVDN ₁₂		IVDN ₂₄	
	I	II	I	II	III	IV	III	IV
Raps 3	11,6	26,2	20,0	37,9 (38,7)	67,6 (69,3)	53,8 -	85,7 (86,7)	62,3 (61,3)
Raps 7	39,4 (36,6)	31,3	48,2	64,2 (63,8)	68,6	68,5 (72,1)	69,7 (69,7)	69,8 (72,6)
Soja 3	20,3 (20,1)	32,3 (32,6)	68,6	70,9	80,5 (79,7)	72,0 (68,0)	95,4 (91,4)	92,7 (92,0)
Soja 6	20,8 (17,9)	31,2	57,7	51,0	73,3	81,7 (81,0)	80,3	96,2 (91,6)

Es lässt sich feststellen, dass die Stabilität der IVDN-Werte (%) gegeben ist. Die neu berechneten Werte weichen maximal um 4,6 %-Punkte von den ursprünglichen ab. Diese

maximale Abweichung ist jedoch nur für die Futtermittelprobe Soja 6 nach 24 Stunden Inkubation des Versuchs IV zu erkennen. Die Hälfte der neu berechneten Werte zeigen Differenzen von ≤ 1 %-Punkt. Dabei scheint sowohl die Größe der Abweichung der gebildeten Gasmenge, als auch die Herkunft des eliminierten Kolbens (Futtermittelprobe oder Futtermittelprobe + Stärke) nur einen geringen Einfluss zu haben.

5.5.2 Überprüfung der Stabilität der IVDN-Werte aufgrund der Abweichungen in der NH_3 -N-Konzentration

Nach dem gleichen Verfahren, wie unter 5.5.1 beschrieben wird auch die Streuung der NH_3 -N-Konzentration berechnet. Diese reicht von 0,1 bis 2,4 mg N/30 mL im ersten Lauf und von 0,1 bis 0,9 mg N/30 mL im zweiten Lauf. Eine Abweichung von 1,5 mg N/30 mL und mehr wurde als Auswahlkriterium gewählt und diese Werte für die Berechnung der IVDN (%) eliminiert. Analog zu 5.5.1 wiederholte sich die Problematik der Probe Raps 3. Die Ergebnisse der neu berechneten IVDN (%) sind in Tabelle 16 ersichtlich.

Tabelle 16: Vergleich der mit drei bzw. zwei (in Klammern dargestellt) Kolben berechneten IVDN-Werte (%) in den Versuchansätzen (I, II und III, IV), korrigiert nach NH_3 -N

Futtermittel	IVDN ₄		IVDN ₈		IVDN ₁₂		IVDN ₂₄	
	I	II	I	II	III	IV	III	IV
Raps 3	11,6	26,2	20,0	37,9	67,6	53,8	85,7	62,3
						-		
Raps 7	39,4 (36,6)	31,3	48,2	64,2	68,6	68,5	69,7 (84,1)	69,8
Soja 3	20,3	32,3	68,6	70,9 (68,3)	80,5	72,0 (74,6)	95,4 (92,7)	92,7
Soja 6	20,8 (17,9)	31,2	57,7 (66,1)	51,0	73,3 (70,1)	81,7	80,3 (77,0)	96,2 (91,6)

Die IVDN-Werte korrigiert anhand der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentrationen scheinen, mit einer Ausnahme, weitestgehend stabil zu sein. Die maximale Abweichung liegt für die Probe Raps 7 im Versuch III für 24 Stunden Inkubation bei 14,4 %-Punkten. Alle anderen Werte weichen im Mittel um 3,1-% Punkte von dem ursprünglich berechneten Wert ab. Diese Abweichung ist jedoch im Vergleich zu den von der DLG (1997) angegebenen Spanne sehr gut, die lediglich eine Klassifizierung der Futtermittel nach der intraruminalen Abbaubarkeit angegeben:

65 % (< 70 %)	geringe Abbaubarkeit
75 % (70 - 80 %)	mittlere Abbaubarkeit
85 % (> 80 %)	hohe Abbaubarkeit.

Die hohe Abweichung von den ansonsten so stabil erscheinenden IVDN-Werte der Probe Raps 7 nach 12 und 24 Stunden Inkubation beider Versuchsansätze ist jedoch überraschend und unterstreicht wiederum die Wichtigkeit eines Standardfuttermittels mit bekannter $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration.

5.6 Beurteilung des Proteinabbaus

Ein Unterschied im Proteinabbau eines Futtermittels konnte zwischen den Versuchsansätzen für jede Inkubationszeit festgestellt werden. Vor allem während der Kurzzeitinkubationen war ein direkter Vergleich nicht immer möglich. Der gesteigerte Abbau der Proben Soja 3 und Soja 6 des Versuchs II nach 4 Stunden Inkubation war womöglich auf die erhöhte Ammoniumfreigabe aus den Proben zurückzuführen. Denn wie bereits unter 5.3 gezeigt wurde, war die gebildete Gasmenge aus der Stärkezulage bei allen Proben zu diesem Messzeitpunkt gleich.

Generelle Unterschiede lassen sich jedoch zwischen den Extraktionsschroten (Raps/Soja) feststellen, wobei Unterschiede zwischen den Chargen nur tendenziell zu verzeichnen sind. Für eine grobe Einstufung des Proteinabbaus von Futtermitteln scheint die Methode demnach geeignet zu sein, jedoch sind zur sicheren Aussage weitere Untersuchungen notwendig.

RAAB inkubierte (1980) Soja- und Rapsextraktionsschrot für 12 und 24 Stunden. Die um den mittleren Blindwert von 4,68 mg $\text{NH}_3\text{-N}/30$ mL korrigierten theoretische $\text{NH}_3\text{-N}$ -

Konzentrationen, bezogen auf die eingewogene N-Menge, ergaben sodann die in Tabelle 17 dargestellten IVDN-Werte (%). Eine Aussage über eine Wiederholung der durchgeführten Versuche zur Überprüfung der ermittelten Ergebnisse kann nicht gemacht werden, da hierzu konkrete Angaben fehlen.

Tabelle 17: Ergebnisse des IVDN (%) für Soja- und Rapsextraktionsschrot nach RAAB (1980)

Futtermittel	XP (g/kg T)	Einwaage (mg T)	IVDN ₁₂ (%)	IVDN ₂₄ (%)
Rapsextraktionsschrot	389	68,4	71	84
Sojaextraktionsschrot	487	55,4	78	94

Die in dieser Arbeit untersuchten Soja- und Rapsextraktionsschrote unterschieden sich leicht im Rohproteingehalt zu den oben dargestellten. Da auch der Pansensaft nicht von fistulierten Hammeln, sondern von einer Kuh stammte, sowie die Zusammensetzung des Medium-Gemisches eine andere war, ist ein direkter Vergleich der hier ermittelten Werte zu denen von RAB et al. (1983) nicht möglich, sondern nur als Tendenz zu betrachten.

Vor allem die Ergebnisse der IVDN von Raps fielen unterschiedlich aus. So konnte eine Zunahme des Abbaus von 12 nach 24 Stunden Inkubation, aber auch ein Abbau von über 80 % nicht festgestellt werden. Gute Übereinstimmungen fanden sich jedoch in den Ergebnissen der Sojaprobe mit den hier untersuchten. Die unterschiedlichen Ergebnisse der untersuchten Rapsextraktionsschrote geben Anlass zur Spekulation über mögliche Ursachen die für einen verringerten Proteinabbau verantwortlich sein könnten. Diese könnten zum einen im züchterischen Fortschritt von 00-Rapstypen liegen zum anderen aber auch in einer verbesserten Produktionstechnik. So wird bei der Verarbeitung der Rapssaat in den Ölmühlen die Proteinqualität durch hohen Druck und Temperatur dahingehend verändert, das die Löslichkeit des Proteins verringert wird.

In einem weiteren Versuch nach Raab et al. (1983) wurde der *in vitro* abgebaute Stickstoff von fünf verschiedenen Rationen, mit den *in vivo* ermittelten Daten an der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) Braunschweig verglichen. Für die genaue Rationsgestaltung siehe Raab et al. (1983). Die Inkubation erfolgte für 8 und 24 Stunden. Die

Proteinabbaubarkeit im Pansen *in vivo* (RDN) wurde mittels eines ^{15}N Marker nach Brandt und Rohr (1981) bestimmt.

In Tabelle 18 sind die *in vitro* ermittelten IVDN (%) nach 8 und 24 Stunden sowie die *in vivo* ermittelten RDN (%) vergleichend dargestellt. Die Inkubation der Rationen für eine Inkubationsdauer von 24 Stunden erfolgte in zweifacher Ausführung.

Tabelle 18: Ergebnisse des IVDN (%) im Vergleich zum RDN (%) nach RAAB et al. (1983)

Ration Nr.	Einwaage <i>in vitro</i> (mg T)		IVDN ₈	IVDN ₂₄		RDN
	mg T	g XP/kg T		I	II	
1	174	149	67	76	78	78
2	170	153	49	83	-	64
3	188	138	67	86	87	82
4	188	138	55	72	65	74
5	255	102	74	74	75	76

Eine gute Übereinstimmung des Proteinabbaus der *in vitro* ermittelten Daten zu den *in vivo* festgestellten Abbaubarkeiten der untersuchten Rationen konnte, mit Ausnahme der Ration 2 festgestellt werden.

Nibbe et al. (2001) untersuchten den Proteinwert von Raps- und Sojaextraktionsschrot vergleichend mit *in vitro* und *in situ* Verfahren. Es wurden 10 Rapsextraktionsschrote mit einem XP-Gehalt von 376 - 429 g/kg T und 7 Sojaextraktionsschrote mit 475 - 518 g/kg T untersucht. Zunächst soll nur die Übereinstimmung der Schätzung des nXP mittels *in vitro* Verfahren zu den *in situ* ermittelten Werten betrachtet werden. Unter anderem wurde der modifizierte Hohenheimer Futterwerttest als ein pansensaftabhängiges *in vitro* System, als auch die mittels chemischer Analyse mögliche Rohproteinfraktionierung verwendet. Eine Übereinstimmung ($r^2 = 0,679$) in der Schätzung des nXP konnte zwischen *in situ* und dem modifizierten HFT festgestellt werden. Der Vergleich mittels der Rohproteinfraktionierung lag wesentlich niedriger ($r^2 = 0,291$).

In der Gesamtbeurteilung des Proteinabbaus der in dieser Arbeit untersuchten Raps- und Sojaextraktionsschrote ließ sich feststellen, dass der Proteinabbau der Rapsextraktionsschrote geringer ausfiel als der der Sojaextraktionsschrote. Nach 24 Stunden Inkubation konnte ein mittlerer Abbau der Rapsproben von etwa 70 % festgestellt werden, die Sojaprobe wurde in dieser Zeit fast vollständig (etwa 90 %) abgebaut. Dies bestätigt die in den letzten Jahren festgestellte veränderte Qualität der Rapsextraktionsschrote, wie sie von einigen Autoren publiziert wurden (Nibee et al., 2001; Spiekers et al., 2000 a, b; Südekum et al., 1998; Steingass et al., 2001; Südekum und Spiekers, 2002).

5.7 Einfluss der Kohlenhydratquelle auf die IVDN-Werte

Wie bereits berichtet wurde, hat die Fermentationsrate als auch die Kohlenhydratquelle einen Einfluss auf die mikrobielle Proteinsynthese und daraus resultierend einen Einfluss auf den Proteinabbau. Raab et al. (1983) konnten Unterschiede der IVDN₂₄-Werte bei der Inkubation von Cellulose statt Stärke feststellen. Der IVDN-Wert bei der Inkubation mit Cellulose war im Vergleich zu dem mit einer Stärkezulage leicht erhöht. Auch die erwähnte Arbeit von Krishnamoorthy et al. (1991) zeigte einen Einfluss der Kohlenhydratquelle. Dieser wurde anhand drei verschiedener Substrate (Stärke, Cellulose und eine Mischung aus 10 % Glucose, 40 % Stärke und 50 % Cellulose) und deren Auswirkung auf die mikrobielle Proteinsynthese überprüft. Es konnte festgestellt werden, dass die Steigung der Kurven von Cellulose über die Mischung bis zur Inkubation mit Stärke abnahmen, der folglich auch einen Einfluss auf den Proteinabbau haben muss, so dass die Aussage von Raab et al. (1983) bestätigt wird.

Da in dieser Arbeit ausschließlich Kartoffelstärke als Kohlenhydratquelle verwendet wurde, kann ein möglicher Einfluss durch die Art des gewählten Substrats auf die IVDN-Werte nicht beurteilt werden, muss aber in zukünftigen Untersuchungen näher betrachtet werden. Von Interesse wäre, wann, wie viel und wie gleichmäßig Energie frei werden würde und vor allem ob ein Gleichgewicht zwischen der Energie- und der Proteinfreisetzung bestünde. Dieser Synchronitätsgedanke scheint in einem geschlossenen *in vitro* System von noch größerer Bedeutung zu sein, als er *in vivo* ohnehin schon ist, da hier nach GFE (2001) „die Pansenmikroben ihren N-Bedarf zu etwa 20 % aus rezukliertem Stickstoff decken können“.

5.8 Beurteilung des *in vitro* unabgebauten Futterproteins (IVUDN)

Für die Schätzung des nutzbaren Rohproteins am Darm (nXP) nach GfE (1996) ist nicht die abgebaute Proteinmenge von Bedeutung, sondern der Anteil des UDP. Da dieser häufiger als der Proteinabbau in der Literatur angegeben wird, erfolgt die Umrechnung mittels einfacher Differenzrechnung, und ist für alle Proben und alle Inkubationszeiten als IVUDN „in vitro undegraded protein“ (g/kg XP) in Tabelle 19 angegeben.

Tabelle 19: IVUDN (g/kg XP)

Futtermittel	IVUDN ₄		IVUDN ₈		IVUDN ₁₂		IVUDN ₂₄	
	I	II	I	II	III	IV	III	IV
Raps 3	887	739	800	621	324	462	143	377
Raps 7	606	686	517	358	314	315	303	302
Soja 3	796	676	314	291	195	280	46	73
Soja 6	793	689	423	490	267	183	197	38

Eine Passagerate von 8 % pro h entspricht in etwa einer mittleren Verweildauer im Pansen von 12 h, so dass ein Vergleich der IVUDN₁₂ mit den in der Literatur angegebenen UDP8-Werten möglich ist. Allerdings entspricht dieser Wert nicht dem effektiven Proteinabbau im Pansen, da der Abfluss der Partikel systembedingt unberücksichtigt bleibt. Aus diesem Grund wäre eine Ableitung der von Ørskov und McDonald (1979) beschriebenen Funktion sinnvoll, jedoch wird auf eine genaue Darstellung der Funktion verzichtet, da insgesamt die Anzahl der Messpunkte in dieser Untersuchung für eine sichere Abweichung nicht ausreichen.

Auch Steingass et al. (2001 a) konnten die hier festgestellten Ergebnisse nicht bestätigen. Sie untersuchten mit der von Raab et al. (1983) vorgestellten Methode 10 Raps- und 7 Sojaextraktionsschrote aus deutscher Produktion, mit folgenden Ergebnissen für eine Passagerate von 8 % pro h, deren UDP-Anteile deutlich niedriger lagen. Die Sicherheit dieser Daten kann jedoch nicht beurteilt werden:

	Rapsextraktionsschrot (n = 10)	Sojaextraktionsschrot (n = 7)
XP (g/kg T)	392 ± 16	507 ± 15
effektives nXP (g/kg T)		
mit 5 % pro h	221 ± 16	236 ± 20
8 % pro h	271 ± 15	311 ± 20
UDP (g/kg T, 8 % pro h)	195 ± 27	180 ± 40
mikrobiellen XP (g/kg T, 8 % pro h)	76 ± 4	131 ± 11

5.9 Einschätzung des Proteinwertes von Raps- und Sojaextraktionsschrot

Nach Angabe der DLG-Futterwerttabelle für Wiederkäuer (1997) ist der Gehalt an nXP (g/kg T) verschiedener Soja- und Rapsextraktionsschrote sowie deren Anteil des UDP (%) wie folgt dokumentiert:

Futtermittel	XP (g/kg T)	UDP-Anteil (%)	nXP (g/kg T)
Sojaextraktionsschrot:			
- aus ungeschälter Saat, dampferhitzt	510	35	308
- aus ungeschälter Saat, dampferhitzt mit überhöhtem Schalenanteil	485	35	298
Rapsextraktionsschrot:			
- „00“ Typ	399	25	219
- alte Sorten	394	25	213

Moss und Givens (1994) untersuchten an pansenfistulierten Schafen, Voigt et al. (1990) an duodenalfistulierten Kühen ebenfalls Raps- und Sojaextraktionsschrot. Sie gaben Werte von 25 % und 52 %, sowie 36,9 % und 54,5 % UDP für einen Passagerate von 8 % pro h an, die denen der DLG-Tabelle (1997) ähneln.

Die in dieser Arbeit festgestellten IVUDN-Werte der untersuchten Proben, zeigten jedoch tendenziell höhere UDP-Werte für Rapsextraktionsschrot gegenüber den Sojaprogenen.

Mit der Gleichung nach Ørskov und McDonald (1979) und einer angenommenen Passagerate von 6 % pro h ermittelten LIU et al. (1994) einen UDP-Anteil für Sojaextraktionsschrot von 35 % und für Rapsextraktionsschrot von 42 %.

Auch durch Vergleichende Untersuchungen zum Einsatz von Soja- und Rapsextraktionsschrot im Milchleistungsfutter (Spiekers et al., 2000 a) konnte festgestellt werden, dass der Anteil des unabbaubaren Futterproteins von Rapsextraktionsschrot deutlich höher lag als bisher angenommen. Die Mischfutterrationen mit pelletiertem Rapsextraktionsschrot ergaben bei einer Abschätzung des Rohproteinabbaus mittels chemischer Fraktionierung und einer angenommenen Passagerate von 8 % pro h, einen mittleren UDP Anteil von 44 % am Rohprotein. Die Sojaextraktionsschrothaltigen pelletierten Mischfutter wiesen dagegen einen Gehalt von 23 % UDP auf und stehen demnach konträr zu den in der DLG-Tabelle (1997) dargestellten Werte. Auch die von Südekum et al. (2001), mittels der *in situ* Methode geschätzten UDP-Werte der untersuchten Rapsextraktionsschrote zeigten einen höheren Anteil von 22, 35, 44 % im Vergleich zu den Sojaextraktionsschroten 12, 23, 32 %, für die verschiedenen Passageraten von 2,5 und 8 % pro h. Die Ergebnisse neuerer Untersuchungen in der Literatur und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Rapsextraktionsschrote deutlich höhere UDP bzw. IVUDN-Anteile enthalten, im Gegensatz zu den in der DLG-Futterwerttabelle angegebenen Werten.

Diese Tatsache lässt auf ebenfalls unterschätzte nXP-Werte schließen, die die eigentliche Größe zur Proteinbewertung darstellen. Mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode ist die Berechnung der IVUDN-Werte möglich, wenngleich sie auch, auf Grund des verwendeten Systems, nicht eins zu eins auf *in vivo* ermittelte Werte übertragbar sind. Unterschiede zwischen den Extraktionsschroten (Raps/Soja) lassen sich jedoch feststellen, so dass die ermittelten Werte in die Schätzgleichung Nr. 9, für die Bestimmung der Menge an nutzbarem Rohprotein am Duodenum, (GFE, 2001) eingesetzt werden können, die bereits unter 2.1 dargestellt wurde.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit dem Hohenheimer Futterwerttest (HFT) kann auf Grund der Gasbildung die Umsetzbare Energie (ME) in Futtermitteln, unter Einbeziehung der Roh Nährstoffanalyse geschätzt werden. Für weitere Untersuchungen und zur Überprüfung des Proteinabbaus von Futtermitteln *in vitro*, sollte diese Methode um die Messung des *in vitro* abgebauten Protein-Stickstoffs (IVDN) erweitert werden. Mit Hilfe des ermittelten IVDN-Wertes kann der Anteil des *in vitro* nicht abgebauten Proteins, bezeichnet als IVUDN, berechnet werden.

Um eventuelle Veränderungen in der Aktivität und Zusammensetzung des Pansensaftes und um einen dadurch bedingten möglichen Einfluss auf den Proteinabbau von Futtermitteln beurteilen zu können, ist das Mitführen sogenannter Standardfuttermittel sinnvoll. Diese standardisierten Futtermittel gilt es zu entwickeln, so dass die Menge des freigesetzten $\text{NH}_3\text{-N}$ aus dem Futtermittel korrigiert werden kann.

Auch die bei der Inkubation verwendete Stärkequelle bedarf weiterer Prüfung, da diese einen Einfluss auf die mikrobielle Proteinsynthese zu haben scheint und sich damit zwangsläufig auch auf den Proteinabbau auswirkt.

Weiterhin sollte eine sinnvolle Inkubationszeit ermittelt werden, um eine Vergleichbarkeit der absoluten IVUDN-Werten mit den in der Literatur angegebenen UDP5- und UDP8-Werten zu gewährleisten. Da nach 24 Stunden der Abbau der Mikroorganismen den Aufbau übertraf, wäre eine weitere Unterteilung der Inkubationszeit sinnvoll und die Ergebnisse der Inkubation nach 16 sowie nach 20 Stunden von großem Interesse. Kurzzeitinkubationen scheinen auf Grund der in dieser Arbeit aufgezeigten Problematik zur Beurteilung des Proteinabbaus weniger bedeutungsvoll zu sein.

Wird der effektive Proteinabbau unter Verwendung der von ØRSKOV und MCDONALD (1979) publizierten Formel berechnet, sind weitere Untersuchungen hinsichtlich einer sinnvollen Inkubationszeit und für eine ausreichenden Anzahl an Messpunkten notwendig.

Zur sicheren Ableitung der Funktion sind jedoch auch Inkubationszeiten < 4 Stunden notwendig, um die in der Formel enthaltene a-Fraktion, die lösliche Proteinfraction, widerspiegeln zu können. Der IVDN_4 -Wert scheint nach der relativ langen Inkubationszeit von 4 Stunden hierfür nicht geeignet zu sein.

Mit Hilfe dieser Ableitung kann der effektive Proteinabbau, unter Berücksichtigung des Abflusses aus dem Pansen, berechnet und somit eine Unterschätzung des IVUDN-Anteils vermieden werden.

Mit Hilfe einer einzigen, einfach durchzuführenden Methode könnten die, zur Schätzung der Menge an nutzbarem Rohprotein am Darm (nXP) notwendigen Variablen, die umsetzbare Energie (ME) und der Anteil des *in vitro* nicht abbaubarem Rohproteins (IVUDP), ermittelt werden, die sodann in die Schätzgleichung Nr. 9 der GFE (2001) eingehen könnten. Ob diese Schätzung mit *in vitro* Daten mit den Verhältnissen *in vivo* übereinstimmen, bleibt noch zu prüfen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Blümmel M., Ørskov E. R. (1993):

Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle

Anim. Feed Sci. and Technol. 40, 109-119

Brandt M., Rohr K. (1981):

Beiträge zur Quantifizierung der N-Umsetzungen in den Vormägen von Milchkühen

1. Mitteilung: Bestimmung des Mikrobenstickstoffs im Duodenalchymus mit Hilfe von ¹⁵N
Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde. 46, 39-48

Brandt M., Rohr K., Lebzien P. (1981):

Beiträge zur Quantifizierung der N-Umsetzungen in den Vormägen von Milchkühen

2. Einfluss eines teilweisen Ersatzes von Futterprotein durch Harnstoff sowie einer erhöhten Fütterungsfrequenz auf die mikrobielle Proteinsynthese

Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde. 46, 49-59

Coleman G. S. (1975):

The interrelationships between rumen ciliate protozoa and bacteria. In: Digestion and Metabolism in the Ruminant. (W. Mc Donald, A. C. I. Warner, Hrsg.)

The University of New England Publishing Unit

DLG (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft) (1997):

DLG-Futterwerttabellen Wiederkäuer

DLG-Verlag, Frankfurt am Main

Getachew G., Crovetto G. M., Fondevila M., Krishnamoorthy U., Singh B., Spanghero M., Steingass H., Robinson P. H., Kailas M. M. (2002):

Laboratory variation of 24 h in vitro gas production and estimated metabolizable energy values of ruminal feeds

Anim. Feed Sci. and Technol. 102, 169-180

GfE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie) (1996):

Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder

DLG-Verlag, Frankfurt Main

GfE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie) (1997):

Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder

DLG-Verlag, Frankfurt Main

GfE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie) (2001):

Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder

DLG-Verlag, Frankfurt Main

Hvelplund T. (1985):

Digestibility of rumen microbial protein and undegraded dietary protein estimated in the small intestine of sheep and by in sacco procedure

Acta Agric. Scand., Suppl. 25, 132-144

Krishnamoorthy U., Steingass H., Menke K. H. (1991):

Preliminary observations in the relationship between gas production and microbial protein synthesis in vitro

Arch. Anim. Nutr. 41, 521-526

Lebzien P., Voigt J., Gabel M., Gädeken D. (1996):

Zur Schätzung der Menge an nutzbarem Rohprotein am Duodenum von Milchkühen

J. Anim. Physiol. and Anim. Nutr. 76, 218- 223

Lindberg J. E. (1984):

Nitrogen metabolism in sheep

2. A comparison between rumen degradability of nitrogen and organic matter in sacco and in vivo in sheep fed rations with hay, barley and various protein supplements

Swedish J. agric. Res., 14, 37-43

Liu Y. G., Steg A., Hindle V. A. (1994):

Rumen degradation and intestinal digestion of crambe and other oilseed by-products in dairy cows

Anim. Feed Sci. and Technol. 45, 397-409

Madsen J., Hvelplund T. (1985):

Protein degradation in the rumen

A comparison between in vivo, nylon bag, in vitro and Buffer Measurements

Acta Agric. Scand., Suppl. 25, 103-124

Madsen J., Hvelplund T. (1994):

Prediction of in situ protein degradability in the rumen. Results of a European ringtest

Livestock Prod. Sci. 39, 201-212

Menke K. H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., Schneider W. (1979):

The estimation of the digestibility and metabolisable energy of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro

J. agric. Sci., Camb. 93, 217-222

Menke K. H., Huss W. (1987):

Tierernährung und Futtermittelkunde

Ulmer-Verlag, Stuttgart

Moss A. R., Givens D. I. (1994):

The chemical composition, digestibility, metabolisable energy content and nitrogen degradability of some protein concentrates

Anim. Feed Sci. and Technol. 47, 335-351

NIBBE D., LEBZIEN P., SPIEKERS H., STEINGASS H., SÜDEKUM K.-H. (2001):

Vergleich verschiedener in vitro- und in situ-Verfahren zur Beurteilung des Proteinwertes von Raps- und Sojaextraktionsschrot

113. VDLUFA-Kongress, Berlin, Kurzfassung der Vorträge, 111

Okorie A. U., Buttery P. J., Lewis D. (1977):

Ammonia concentration and protein synthesis in the rumen

Proc. Nutr. Soc. 36, 38A

Ørskov E. R., McDonald I. (1979):

The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage

J. agric. Sci., Camb. 92, 499-503

Raab L. (1980):

Untersuchungen über den Proteinabbau und die Proteinsynthese im künstlichen Pansen
agr. Diss., Hohenheim

Raab L., CAFANTARIS B., JILG T., MENKE K. H. (1983):

Rumen protein degradation and biosynthesis

1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid in vitro

Br. J. Nutr. 50, 569-582

Rodehutschord M. (1992):

Untersuchungen zur Anpassung der mikrobiellen Aktivität im Pansen von Milchziegen an stark variierte Phosphor-Zufuhr

Diss. agr., Bonn

Russell J. B., O'conner J. D., Fox D. G., Van Soest P. J., Sniffen C. J. (1992):

A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets:

I. ruminal fermentation

J. Anim. Sci. 70, 3551-3561

Satter L. D., Slyter L. L. (1974):

Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro

Br. J. Nutr. 32, 199-208

Schafft H. (1983):

Untersuchungen zur Quantifizierung des Abbaus von Futterrohprotein in den Vormägen von Milchkühen

Diss. sc. agr., Göttingen

Shannak S., Südekum K.-H., Susenbeth A. (2000):

Estimating ruminal crude protein degradation with in situ and chemical fractionation procedures

Anim. Feed Sci. and Technol. 85, 195-214

Sniffen C. J., O'connor J. D., Van Soest P.J., Fox D.G., Russell J. B. (1992):

A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets:

II. Carbohydrate and protein availability

J. Anim. Sci. 70, 3562-3577

Spiekers H., Wirtz N., Südekum K.-H., Pfeffer E. (2000 a):

Vergleichende Untersuchungen zum Einsatz von Raps- und Sojaextraktionsschrot im Milchleistungsfutter

VDLUFA-Schriftenreihe 55, Teil 3, 60-67

Spiekers H., Rodehutsord M., Südekum K.-H. (2000 b):

Rapsextraktionsschrot häufig zu hoch bewertet

Kraftfutter 9, 343- 348

Steingass H. (1983):

Bestimmung des energetischen Futterwertes von wirtschaftseigenen Futtermitteln aus der Gasbildung bei der Pansenfermentation in vitro

agr. Diss., Hohenheim

Steingass H., Menke K. H. (1986):

Schätzung des energetischen Futterwertes aus der in vitro mit Pansensaft bestimmten Gasbildung und der chemischen Analyse

Übers. Tierernährung 14, 251-270

Steingass H., Nibbe D., Südekum K.-H., Lebzien P., Spiekers H. (2001):

Schätzung des nXP-Gehaltes mit Hilfe des modifizierten Hohenheimer Futterwerttests und dessen Anwendung zur Bewertung von Raps- und Sojaextraktionsschrot

113. VDLUFA-Kongress, Berlin, Kurzfassung der Vorträge, 114

Südekum K.-H., Andree H. (1997):

Evaluation of three rape seed commodities in the rumen of steers

1. Degradation of dry matter and crude protein and disappearance of amino acids in situ

J. Anim. Feed Sci. 6, 23-40

Südekum K.-H., Spiekers H., Shannak S., Rodehutschord M. (1998):

Schätzung des Proteinwertes von Milchleistungsfutter und Grassilage unter Einbeziehung des in sacco-Abbaus

VDLUFA-Kongress, Gießen, Kurzfassung der Vorträge, 81

Südekum K.-H., Nibbe D., Steingass H., Spiekers H., Lebzien P. (2001):

Untersuchungen zum Umfang und zur Geschwindigkeit des ruminalen Abbaus von Raps- und Sojaextraktionsschroten

113. VDLUFA-Kongress, Berlin, Kurzfassung der Vorträge, 115

Südekum K.-H., Spiekers H. (2002):

Raps- und Sojaextraktionsschrot neu bewerten

Krafftutter 2, 62-68

Tilley J. M. A., Terry R. A. (1963):

A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops

J. of the br. Grassland Soc. 18, 104-111

Van Nevel C. J., Demeyer D. I. (1977):

Determination of rumen microbial growth in vitro from ^{32}P -labelled phosphate incorporation
Br. J. Nutr. 38, 101-114

VDLUFA (VERBAND DEUTSCHER LANDWIRTSCHAFTLICHER
UNTERSUCHUNGS- UND FORSCHUNGSANSTALTEN) (1976):

Die chemische Untersuchung von Futtermitteln

Verlag J. Neumann-Neudamm, Melsungen, Methodenbuch, Band III, Loseblattsammlung
(1997)

Voigt J., Piatkowski B. (1987):

Ruminal protein degradation and protein value of feeds

Arch. Anim. Nutr. 37, 63-68

Zhao G. Y., Lebziern P. (2000):

Development of an in vitro incubation technique for the estimation of the utilizable crude
protein (uCP) in feeds for cattle

Arch. Anim. Nutr. 53, 293-30