Sachbericht zum Verwendungsnachweis (Projekt Rye-SaFe)
Teil I: Kurzbericht

Roggen-basierte Mischfutterkonzepte zur Minimierung des Vorkommens von Zoonoseerregern (Salmonellen) in der Sauenhaltung und Ferkelaufzucht

Förderkennzeichen
2813IP027 / Teilprojekt 2

Projektlaufzeit
August 2020 bis Juni 2024

1. Forschungsziel und Aufgabenstellung

Das übergeordnete Ziel des Projekts „Rye-SaFe“ ist es, mit einem Roggen-basierten Mischfutterkonzept eine Möglichkeit zur Verfügung zu stellen, um das Salmonellenvorkommen in Sauenbeständen zu reduzieren. Da der Roggen mehr als andere Getreidearten Inhaltsstoffe (v. a. Fructane, Pentosane) enthält, die im Darm zu Buttersäure fermentiert werden, kann er wesentlich zur Reduktion von Salmonellen im Schweinedarm beitragen.
Der Fokus am Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft (IUE) lag dabei auf der Analyse der Inhaltsstoffe mit Fokus auf den Polysacchariden (v. a. Fructane, Pentosane). Für deren Quantifizierung und Charakterisierung sollten verschiedene Analysemethoden etabliert und fortlaufend Analysen durchgeführt werden. Anhand der Ergebnisse sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den Inhaltsstoffen im Korn und der Wirkung im Schwein untersucht werden.
Darüber soll ein Prozess zur gezielten Abtrennung derartiger Stoffe für einen Einsatz im Tierfutter entwickelt und untersucht werden.

2. Projektverlauf

Zu Beginn wurde eine geeignete quantitative Analytik zur Bestimmung der relevanten Inhaltstoffe (Fructane und Pentosane) am Institut aufgebaut. Zusätzlich wurde eine Analytik zur Charakterisierung der Inhaltsstoffe hinsichtlich ihrer molekularen Struktur entwickelt.
Auf Basis dieser analytischen Methoden wurde für die Prozessentwicklung zunächst ein Rückstand identifiziert, der aufgrund seines mengenmäßigen Aufkommens und seiner geringen Nutzungskonkurrenz als vielversprechendes Substrat angesehen werden kann. Anschließend wurden verschiedene Verfahren zur Abtrennung der relevanten Polysaccharide im Labormaßstab untersucht. Darauf aufbauend wurde ein technisch sinnvoller Prozess abgeleitet, der eine Anreicherung dieser Stoffe, insbesondere der Pentosane, ermöglicht. Auf Grundlage der gewonnenen Daten wurde abschließend eine techno-ökonomische Bewertung durchgeführt.

3. Ergebnisse

Zur **Quantifizierung der Fructane** wurde eine Methode entwickelt, die eine schwefelsaure Hydrolyse und anschließende chromatographische Analyse nutzt [1]. Als Referenzanalytik wurde ein spektroskopisches Verfahren etabliert, das auf einer vorgeschalteten enzymatischen Hydrolyse der Fructane basiert (Megazyme Fructan Assay Kit).
Zur **Quantifizierung der Pentosane** wurden die Methoden von Sluiter et al. [2,3] adaptiert. Dabei werden die polymeren Pentosane schwefelsauer hydrolysiert und die freigesetzten Monomere chromatographisch bestimmt. Analog zu den Fructanen kann so auf die Polysaccharide geschlossen werden.

Die **charakterisierende Analytik erfolgte mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie**. Dafür wurde eine Prozedur zur Probenvorbereitung in Anlehnung an Buksa et al. [4] angepasst und eine chromatographische Methode zusammen mit einem nationalen Säulenhersteller entwickelt.
Mit Hilfe der entwickelten Analytik konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Roggenproben im Vergleich zu anderen Getreidearten (v. a. Weizen) einen signifikant höheren Fructangehalt besitzen. Für den Pentosangehalt zeigen die Roggenproben ebenfalls höhere Werte. Hinsichtlich der molekularen Struktur konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen Weizen- und Roggenproben identifiziert werden.

Ein **Zusammenhang zwischen einer roggenreichen Fütterung und der Wirkung im Schwein** konnte aufgrund multikausaler Zusammenhänge nicht gefunden werden.

Zusätzlich wurden verschiedene potentielle Substrate zur **Gewinnung von Fructanen und Pentosanen** für einen möglichen Einsatz in Futtermitteln identifiziert. Dabei war Schlempe, das Hauptnebenprodukt der Bioethanolproduktion, potentiell vielversprechend. Umfangreiche Analysen zeigten, dass insbesondere Dünnschlempe (die wässrige Fraktion nach Fest-Flüssig-Trennung von Schlempe) zur Gewinnung von Pentosanen genutzt werden kann. Fructane hingegen konnten nur in geringen Mengen in Schlempe nachgewiesen werden. Der Fokus der anschließenden Prozessentwicklung wurde daher auf die Abtrennung von Pentosanen aus Schlempe gelegt. Die diesbezüglich wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Prozessschritte lauten wie folgt.

- **Wässrige Extraktion mit anschließender Fest-Flüssig-Trennung.** Anreicherung der Pentosane in der resultierenden flüssigen Phase. Im abgeschiedenen Feststoff verbleiben insbesondere Proteine und zum Teil ungelöste Pentosane.
- **Solubilisierung von Pentosanen.** Die ungelösten Pentosane im Feststoff können mit Hilfe von hydrothermischen, enzymatischen oder alkalischen Verfahren in Lösung gebracht werden. Dabei kommt es in allen Fällen zu einer ungewünschten Co-Solubilisierung anderer Stoffe aus dem Schlempe-Feststoff (z. B. Proteine). Da der anschließende Reinigungsaufwand für die so solubilisierten Pentosane zunimmt, wird dieser Schritt als technisch nicht sinnvoll bewertet.
- **Aufreinigung von Pentosanen.** Eine weitere Anreicherung der Pentosane (aus der flüssigen Phase) kann mit Hilfe von Fällung und Filtration erreicht werden (d. h. eine Erhöhung des Pentosangehalts). Dabei konnte mittels Filtration ein Produkt mit höherem Pentosangehalt gewonnen werden.

Als Ergebnis wurde ein zweistufiger Prozess zur Anreicherung von Pentosanen aus Bioethanolschlempe abgeleitet, mit dem ein **festes Produkt mit über 50 % Pentosangehalt in der Trockensubstanz (TS)** gewonnen werden kann.
Aus technischer Sicht ist dieser Prozess als grundsätzlich gut skalierbar zu bewerten. Eine techno-ökonomische Analyse hat gezeigt, dass mit Hilfe dieses Prozesses **angereicherte Pentosane aus Dünnschlempe für ca. 4000 €/t** bereitgestellt werden könnten. Für eine Anwendung im Futtermittelbereich ist der zugrundeliegende Prozess daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ökonomisch darstellbar. Für den Nahrungsmittelsektor kann der Prozess jedoch ein Ansatz für weitere Forschungsbemühungen sein.

4. Quellen

[1] Zimmermann et Kaltschmitt, Cereal Chemistry, 2022
[2] Sluiter et al., NREL Procedure, 2006
[3] Sluiter et al., NREL Procedure, 2012
[4] Buksa et al., Journal of Food Science Technology, 2016
[5] Zimmermann et al., Bioresources and Bioprocessing, 2023

Sachbericht zum Verwendungsnachweis (Projekt Rye-SaFe)
Teil II: Eingehende Darstellung

Roggen-basierte Mischfutterkonzepte zur Minimierung des Vorkommens von Zoonoseerregern (Salmonellen) in der Sauenhaltung und Ferkelaufzucht

Förderkennzeichen
2813IP027 / Teilprojekt 2

Projektlaufzeit
August 2020 bis Juni 2024

Gefördert durch
Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Projektträger
Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

Projektverbund

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo)
Institut für Tierernährung
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Technische Universität Hamburg (TUHH)
Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft (IUE)
Eißendorfer Straße 40
21073 Hamburg

Universität Rostock (im Projektverlauf ausgeschieden)
Institut für Ernährungsphysiologie und Tierernährung
Justus-von-Liebig-Weg 6
18059 Rostock

KWS Lochow GmbH
Ferdinand-von-Lochow-Straße 5
29303 Bergen

Inhaltsverzeichnis

1. Forschungsziel und Aufgabenstellung 1
2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse nach Arbeitspakten 2
2.1. Quantitative Analytik für Fructane und Pentosane (AP 1.1) 2
2.2. Analytik zur Charakterisierung von Fructanen und Pentosanen (AP 1.2) 7
2.3. Korrelation zwischen Futtermittelinhaltsstoffen und Wirkung (AP 1.3) 13
2.4. Gewinnung einer pentosanreichen Fraktion (AP 1.4) 15
3. Anhänge 19
3.1. Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises 19
3.2. Notwendigkeit und Angemessenheit der Projektarbeiten 19
3.3. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse 20
3.4. Stand der Forschung im Projektzeitraum 20
3.5. Veröffentlichung der Ergebnisse 20
4. Referenzen 21

1. Forschungsziel und Aufgabenstellung

Ziel des Projekts Rye-SaFe war die Entwicklung eines Mischfutterkonzept auf Roggenbasis, welches eine einfache, kosteneffiziente und tiergesundheitsfördernde Lösung zur Reduktion des Salmonellenvorkommens in Sauenbeständen bietet. Roggen enthält mehr als andere Getreidearten Inhaltsstoffe, die im Darm zu Buttersäure fermentiert werden (z. B. Fructane). Buttersäure ist ein wesentliches Agens, welches eine Salmonellenreduktion im Darm von Schweinen erreichen kann. Am Ende des Projektes sollte mit der gezielten Nutzung dieser präbiotisch wirkenden Inhaltsstoffe des Roggens eine neue Perspektive für die gezielte Nutzung von Roggen vorliegen. Roggen bildet dabei das Fundament für ein kosteneffizientes, nachhaltiges, regional umsetzbares Konzept zur Salmonellenreduktion für die Ferkelproduktion – von der Jungsau bis zum verkaufsfähigen Läuferschwein.

In diesem Zusammenhang war es die Aufgabe des Instituts für Umwelttechnik und Energiewirtschaft (IUE), eine adäquate Analytik zur Untersuchung der Futtermittelinhaltsstoffe aufzubauen und das Projekt mit fortlaufenden Analysen der Futtermittel zu begleiten (Arbeitspaket (AP) 1.1 und AP 1.2). Dabei sollten insbesondere die Kohlenhydratgruppen Fructane und Pentosane betrachtet werden, welche aufgrund ihrer Ballaststoffeigenschaften die Gesundheit und das Wohlbefinden von Tieren und auch Menschen beeinflussen können [1].
Basierend auf diesen Ergebnissen und den durch die Projektpartner gesammelten Daten am Schwein bzw. im Stall (z. B. Salmonellenbefall), sollte ein Zusammenhang untersucht und nach Möglichkeit eine Korrelation abgeleitet werden (AP 1.3).
Darüber hinaus war es in AP 1.4 das Ziel, einen Prozess zur Bereitstellung von derartigen Kohlenhydraten (Fructane und Pentosanen) zu entwickeln. Auf diese Weise sollte eine Möglichkeit zur kostengünstigen Bereitstellung von angereicherten Kohlenhydraten für den Einsatz in Futtermitteln aufgezeigt werden. Aus diesem Grund sollten als Ausgangsmaterial (für eine Anreicherung) anfallende und bisher kaum genutzte Nebenströme genutzt werden. Abschließend soll der vorgeschlagene Prozess ökonomisch bewertet werden.

2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse nach Arbeitspakten

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse zu den Arbeitspaketen des Projektpartners IUE vorgestellt.

2.1. Quantitative Analytik für Fructane und Pentosane (AP 1.1)

Ziel dieses Arbeitspakets war es, eine Analytik zur Quantifizierung von Fructanen und Pentosanen in den relevanten Proben zu entwickeln; d. h. in Getreideproben (insbesondere Roggen) sowie den eingesetzten Futtermitteln und den Proben aus AP 1.4 und damit aus der Prozessentwicklung. Zunächst wurde daher eine umfassende Literaturrecherche zu potentiellen Analysenverfahren durchgeführt. Basierend darauf erfolgte eine Adaption vielversprechender Analyseverfahren an die zu analysierenden Probenmatrices. Als Ergebnis der Methodenentwicklung wurden analytischen Methoden sowohl zur Quantifizierung der Fructane als auch der Pentosane etabliert.

Pentosananalytik. Für die Pentosane wurde je ein Verfahren zu Bestimmung der löslichen Pentosane und zur Bestimmung des gesamten Pentosangehalts in einer Probe adaptiert. Das Vorgehen orientiert sich an Sluiter et al. [2; 3] mit kleinen Modifikationen und erfolgt prinzipiell zweistufig:

- Schritt 1: Hydrolyse der Pentosane mit Schwefelsäure unter Freisetzung der monomeren Pentosen (d. h. Xylose, Arabinose).
- Schritt 2: Quantitative Bestimmung der freigesetzten Pentosen mittels Chromatographie (HPLC-RID) und entsprechender Standards.

Abb. 1 zeigt eine Übersicht des methodischen Vorgehens. Aus der Menge an freigesetzten monomeren Pentosen kann über Gleichung (1) schlussendlich auf die Menge bzw. Konzentration c_P an polymeren Pentosanen geschlossen werden. Dabei sind $c_{X,frei}$ und $c_{A,frei}$ die Konzentration an freigesetzter Xylose (X) und Arabinose (A). Über den anhydrogenen Faktor (d. h. molare Masse der Pentose und deren wasserfreier Form) wird die wasserfreie Form der Pentosen im Pentosan-Makromolekül berücksichtigt.

$$c_P = \frac{132}{150}\left(c_{X,frei} + c_{A,frei}\right) \tag{1}$$

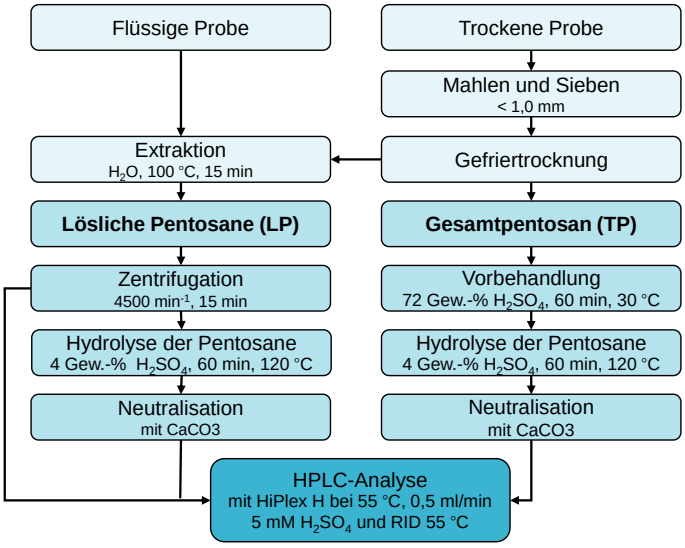


Abb. 1 Übersicht zum methodischen Vorgehen bei der Pentosananalytik (hellblau: Vorbehandlung, mittelblau: Pentosanhydrolyse, dunkelblau: Quantifizierung mit High Performance Liquid Chromatography (HPLC))

Im Fall des Probenmaterials Bioethanolschlempe, wie sie in AP 1.4 Anwendung findet, wurde zudem eine weitere Optimierung der Methode durchgeführt. Ziel dabei war es, die Wiederfindung der Pentosane in dieser komplexen Probenmatrix zu maximieren. Die Ergebnisse zeigen ein Optimum für eine Hydrolyse bei 120 °C mit 2 Gew.-% Schwefelsäure (H_2SO_4) für 60 min. Die Quantifizierung erfolgt ebenfalls mittels HPLC; d. h. einer HiPlex H Säule bei einer Säulentemperatur von 55 °C mit 5 mM H_2SO_4 als Laufmittel bei einem Volumenstrom von 0,5 mL/min.

Fructananalytik. Zur Bestimmung der Fructane in Getreide- und Futtermittelproben wurde eine enzymatische Methode etabliert, wobei die eigentliche Quantifizierung spektroskopisch erfolgt [4]. Im Gegensatz zu den Pentosanen wird im Fall der Fructane eine aufwändige, mehrstufige Vorbereitung benötigt, die eigentlich Analyse erfolgt aber ebenfalls zweistufig:

- Schritt 1: Hydrolyse der Fructane in die monomeren Hexosen (v. a. Fructose) mit Hilfe von spezifischen Enzymen (d. h. Fructanasen).
- Schritt 2: Bestimmung der freigesetzten Hexosen nach einer Farbreaktion (mit einem Reagenz aus p-Hydroxybenzoesäurehydrazid (PAHBAH)) mittels Spektroskopie bei 410 nm gegen Fructosestandards bekannter Konzentration.

Abb. 2 zeigt eine Übersicht des methodischen Vorgehens zur Bestimmung des Fructangehalts. Auch hier kann über die Menge an freigesetzter monomerer Fructose (F) bzw. Glucose (G) und damit $c_{F,frei}$ und $c_{G,frei}$ auf die Menge an polymeren Fructanen geschlossen werden (Gleichung (2); der wasserfreie Faktor (Verhältnis von molarer Masse der wasserfreien Hexose zur Hexose) berücksichtigt die Abspaltung von Wasser durch die enzymatische Hydrolyse.

$$c_P = \frac{162}{180}\left(c_{F,frei} + c_{G,frei}\right) \tag{2}$$

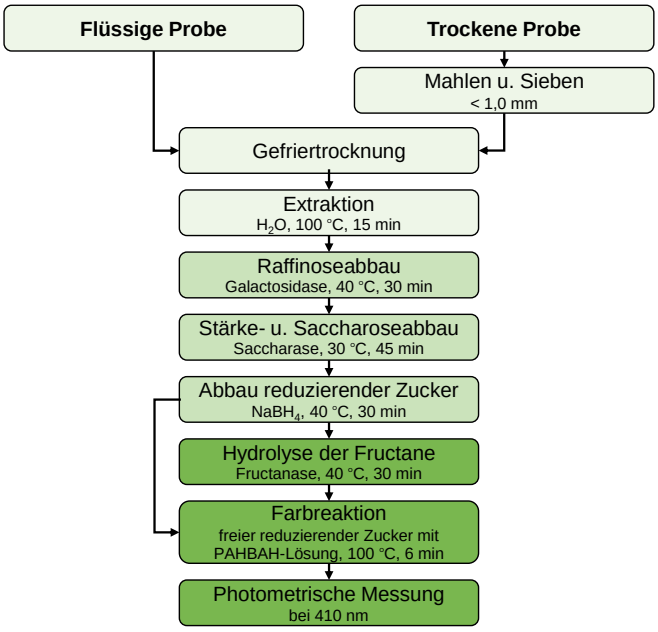


Abb. 2 Übersicht zum methodischen Vorgehen bei der Fructananalytik (hellgrün: Vorbehandlung; grün: Aufreinigung durch Abbau von Störstoffen; dunkelgrün: Fructanhydrolyse und -analyse)

Darüber hinaus wurde für die Probenmatrix Bioethanolschlempe (v. a. AP 1.4) auch im Fall der Fructane eine eigenständige Methode mittels Chromatographie (HPLC-RID) entwickelt. Grund hierfür war der geringe Probendurchsatz mittels enzymatischer Methode, der auf diese Weise gesteigert werden kann [5]. Die vorgeschaltete saure Hydrolyse wurde dabei ebenfalls an die Probenmatrix angepasst; d. h. hinsichtlich einer maximalen Fructan-Wiederfindung optimiert. Die Ergebnisse zeigen ein Optimum für eine Hydrolyse bei 100 °C mit 0,25 Gew.-% Schwefelsäure (H_2SO_4) für 80 min [5]. Für die Analytik wird eine angepasste HPLC-Methode mit zwei Säulen genutzt:

- Agilent HiPlex H: 55 °C Säulentemperatur; 5 mM H_2SO_4 als Laufmittel mit 0,5 mL/min.
- Agilent HiPlex Pb: 50 °C Säulentemperatur; H_2O als Laufmittel mit 0,6 mL/min und einer Vorsäule zur Entsalzung der Probe (mit einer Bio-Rad De-Ashing Kartusche).

Ergebnisse und Diskussion. Mit den im Rahmen von AP 1.1 entwickelten und zuvor beschriebenen Methoden stehen verschiedene Möglichkeiten zur Quantifizierung von Fructanen und Pentosanen zur Verfügung. Tab. 1 zeigt einen Auszug der im Rahmen von Rye-SaFe analysierten Getreide- und Futtermittelproben, die von den anderen Projektpartnern bezogen wurden. Ein Großteil der analytischen Arbeit war in AP 1.4 zu leisten, wobei nicht alle Ergebnisse explizit aufgeführt sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die Roggenproben im Vergleich zu den anderen Getreideproben (v. a. Weizen) einen signifikant höheren Massenanteil an relevanten Kohlenhydraten aufweisen, insbesondere hinsichtlich der Fructane. Für den Pentosangehalt zeigt sich dieser Trend ebenfalls, allerdings ist der Gesamtpentosangehalt im Roggen bzw. in den Futtermitteln mit erhöhtem Roggenanteil zum Teil nur geringfügig höher. In Tab. 1 wird dies beispielsweise für Proben mit der Endung „Kontrolle“ im Vergleich zur Endung „Roggen“ erkennbar, die sich in ihrer Zusammensetzung nur hinsichtlich des Weizenanteils respektive Roggenanteils unterscheiden.
Für Roggenkleie bzw. Weizenkleie zeigen sich sowohl für den Gehalt an Fructanen als auch Pentosanen im Vergleich zum Korn höhere Werte. Dies ist auch in der Literatur [6] beschrieben, da insbesondere die äußeren Schalen des Korns und damit die Kleie derartige Kohlenhydrate beinhalten. Wird Roggenkleie im Mischfutter anstelle von Roggen- bzw. Weizenkörnern eingesetzt, ist daher zu erwarten, dass aufgrund der höheren Quantität von Fructanen bzw. Pentosanen die tiergesundheitlichen Effekte insbesondere auftreten.
Darüber hinaus wurden auch andere Bestandteile des Mischfutters (z. B. Sojamehlpellets) analysiert. Dabei wird ersichtlich, dass auch diese Bestandteile relevante Mengen an insbesondere Pentosanen beinhalten. Damit können potentielle Effekte, die durch vor allem Pentosane induziert werden, nicht eindeutig nur dem Roggen bzw. Roggenanteil im Futter zugeordnet werden. Von Relevanz ist dies insbesondere für AP 1.3, da in diesem Kontext ein möglicher Zusammenhang zwischen einer roggenreichen Fütterung und der Wirkung im Tier untersucht werden soll.

Tab. 1 (Teil 1) Übersicht zu den analysierten Futtermittelproben (Massenanteil an der Trockensubstanz (%TS); Mittelwerte von Duplikaten für die Fructane; Mittelwerte von Triplikaten für die Pentosane; ab dem Jahr 2021 wird bei der Fructananalytik zusätzlich eine Galactosidase-Behandlung, wie in Abb. 2 dargestellt, vorgeschaltet; fettgedruckt: Probenmaterial für die SEC-Analytik in AP 1.2 mit entsprechender Nummerierung in Klammern)

Jahr	Proben	Fructan-Gehalt (%TS)	Gehalt gelöster Pentosane (%TS)	Gehalt gesamter Pentosane (%TS)
2020	**Weizenkörner (7)**	**1,76**	**0,4**	**7,6**
2020	Weizenkleie	3,39	1,3	28,9
2020	Weizenkleie (Semolina)	3,37	1,3	24,8
2020	Cellulosematerial	< 0,1	< 0,1	19,9
2020	Molasse-Faserpellets	0,63	1,3	23,9
2020	Sonnblumenmehlpellets	1,38	< 0,1	18,3
2020	Sojamehlpellets	n. a.	< 0,1	15,9
2020	Gerstenkörner	1,11	< 0,1	8,4
2020	**Roggenkörner (6)**	**2,91**	**0,9**	**9,2**
2021	Hinterer Dünndarm (Inhalt) 8056/19	3,83	6,7	21,2
2021	Caecum (Inhalt) 8056/19	0,54	1,0	16,7
2021	Hinterer Dünndarm (Inhalt) 8055/19	4,58	0,5	26,2
2021	Caecum (Inhalt) 8055/19	0,07	0,2	14,8
2021	P21-133	1,20	-	-
2021	P21-134	3,00	-	-
2021	**Roggenkleie (1)**	**6,15**	**2,0 bis 3,0**	**13,0 bis 15,0**
2021	**Weizenkleie (3)**	**3,78**	**1,0 bis 1,5**	**13,5 bis 15,0**
2021	Futtermittel 4003-12	0,67	1,5	11,8
2021	Futtermittel 4003-26	1,44	2,8	12,1
2021	Futtermittel 4003-29	0,55	1,0	11,6
2021	Futtermittel 4003-30	1,74	3,3	13,1
2021	Futtermittel 4003-31	0,80	2,1	10,9
2021	Futtermittel 4003-32	1,51	2,8	13,0
2021	Futtermittel 4003-33	0,94	1,4	12,0
2021	Futtermittel 4003-34	0,88	1,1	13,3
2021	Futtermittel 4003-35	1,52	2,3	13,4
2021	Futtermittel 4003-37	0,64	1,6	11,7
2021	Futtermittel 4003-38	1,43	2,9	12,1
2021	Futtermittel 4003-39	0,52	0,6	13,0
2022	**Futtermittel 39/21-1 (8)**	**2,41**	**3,2**	**14,1**
2022	**Futtermittel 39/21-2 (9)**	**2,50**	**3,8**	**14,2**
2022	**FF-TOP-Kontrolle 44-21 (10)**	**1,68**	**2,5**	**10,1**
2022	**FF-TOP-Roggen 37-22 (11)**	**2,17**	**3,3**	**10,8**
2022	**FP1-Kontrolle 42-21 (12)**	**1,64**	**2,2**	**9,7**
2022	**FP1-Roggen 326-22 (13)**	**2,31**	**3,1**	**10,9**
2022	**4003-39-21 NT Roggen Wübbel (14)**	**0,75**	**0,9**	**16,1**
2022	**4003-29-21 NT Kontrolle Wübbel (15)**	**0,84**	**0,7**	**14,4**
2022	**4003-334-22 FD1 Roggen Wübbel (16)**	**0,96**	**0,6**	**14,3**
2022	**4003-329-22 FD1 Kontrolle Wübbel (17)**	**0,80**	**0,7**	**14,2**
2022	**4003-335-22 FD3 Roggen Wübbel (18)**	**0,68**	**0,8**	**15,4**
2022	**4003-330-22 FD3 Kontrolle Wübbel (19)**	**0,97**	**0,7**	**13,9**

Tab.1 (Teil 2) Übersicht zu den analysierten Futtermittelproben (Massenanteil an der Trockensubstanz (%TS); Mittelwerte von Duplikaten für die Fructane; Mittelwerte von Triplikaten für die Pentosane; ab dem Jahr 2021 wird bei der Fructananalytik zusätzlich eine Galactosidase-Behandlung, wie in Abb. 2 dargestellt, vorgeschaltet)

Jahr	Proben	Fructan-Gehalt (%TS)	Gehalt gesamter Pentosane (%TS)
2022	Lac Kontrolle	0,55	10,8
2022	Lac Versuch	0,81	10,7
2022	JS Kontrolle	0,55	13,9
2022	JS Versuch	0,81	12,8
2022	Weizenkleie	1,91	19,0
2022	Roggenkleie	4,78	24,7
2022	GS Twistungen Roggen Zelle 2071	4,07	10,1
2022	GS Twistungen Roggen Zelle 2071	3,50	11,8
2022	GS Twistungen Roggen Zelle 2071	3,97	10,4
2023	Futter mit Roggenkleie 4002-2/23 Lac Versuch	0,86	10,4
2023	Futter mit Weizenkleie 4002-1/23 Lac Kontrolle	0,78	10,8
2023	Roggenkleie	4,10	21,5

2.2. Analytik zur Charakterisierung von Fructanen und Pentosanen (AP 1.2)

Neben der Menge an Fructanen und Pentosanen im Futtermittel kann auch deren molekulare Struktur einen Einfluss auf die Eigenschaften und die Wirkweise in einem Organismus haben [7]. Daher sollte zur Charakterisierung der Fructane und Pentosane hinsichtlich ihrer Molekülgröße in diesem Arbeitspaket eine entsprechende Analytik etabliert werden. Basierend auf einer umfangreichen Recherche wurde zu diesem Zweck eine Methode mittels Größenausschlusschromatographie (engl. Size Exclusion Chromatography (SEC)) entwickelt.

Charakterisierende Analytik. Für die eigentliche chromatographische Analyse mittels SEC müssen die zu untersuchenden Analyten (d. h. Fructane, Pentosane) möglichst separiert vorliegen. Daher ist zunächst eine aufwändige Probenvorbereitung notwendig, um die wasserlöslichen Fructane bzw. Pentosane zu isolieren. Abb. 3 zeigt die Prozedur, welche in Anlehnung an Buksa et al. [8] etabliert wurde. Anschließend werden die aufgereinigten Proben im Laufmittel gelöst. Die Trennung erfolgt mit Hilfe von bis zu drei chromatographischen Säulen in Reihenschaltung (in Flussrichtung: AppliChrom ABAO Super-OH 250, 350 und 400), die eine Trennung von Molekülen im Bereich von 100 Da bis 5 MDa ermöglichen (Säulentemperatur 35 °C). Für die Erfassung der Analyten kommt in allen Fällen ein Brechungsindexdetektor (RID) zum Einsatz. Dabei wurden drei unterschiedliche Laufmittel verwendet und jeweils mit einem Volumenstrom von 1 mL/min gearbeitet:

- Reinstwasser
- 0,075 M Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) in Reinstwasser
- 0,1 Gew.-% Natriumnitrat ($NaNO_3$) in Reinstwasser

Grundsätzlich sind mit dieser Analytik nur qualitative Aussagen für beide Stoffgruppen (d. h. Fructane und Pentosane in Summe) gegenüber Standards bekannten Molekulargewichts (z. B. Dextran, Polyethylenglykol (PEG)) möglich. Darüber hinaus kann das Molekulargewicht der untersuchten Pentosane und Fructane über eine Kalibrierung näherungsweise abgeschätzt werden. Wird dann ein linearer Aufbau der Makromoleküle unterstellt, kann über

das Molekulargewicht eines einzelnen Monomers (d. h. 132 g/mol für eine Pentose im Pentosan-Makromolekül) die Kettenlänge näherungsweise abgeschätzt werden.

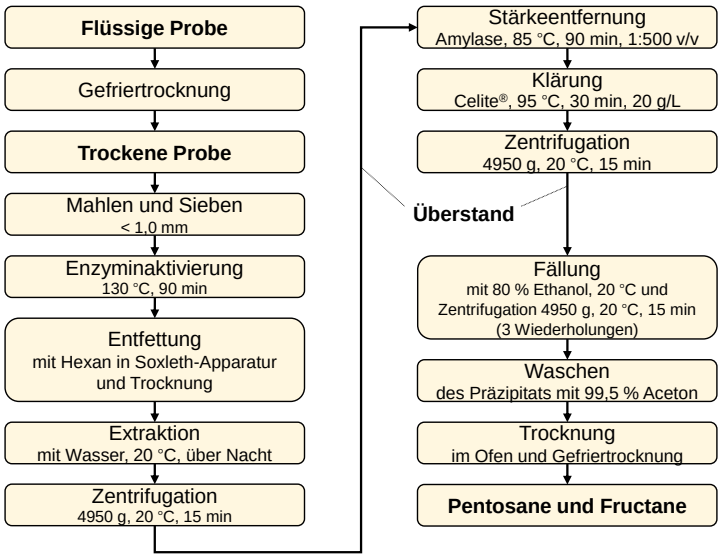


Abb. 3 Übersicht zum Vorgehen bei der Probenvorbereitung für die Größenausschlusschromatographie (SEC) zur Bestimmung der Molekülgröße wasserlöslicher Analyten in Anlehnung an Buksa et al. [8]

Ergebnisse und Diskussion. Etwa 20 repräsentative Futtermittelproben, die in den Betrieben A, B und C [9; 10] eingesetzt und von den Projektpartnern bezogen wurden, wurden mit Hilfe der beschriebenen Methode(n) hinsichtlich ihrer Molekülgröße analysiert. Einige ausgewählte Chromatogramme sind in den Abb. 4 bis Abb. 6 dargestellt.

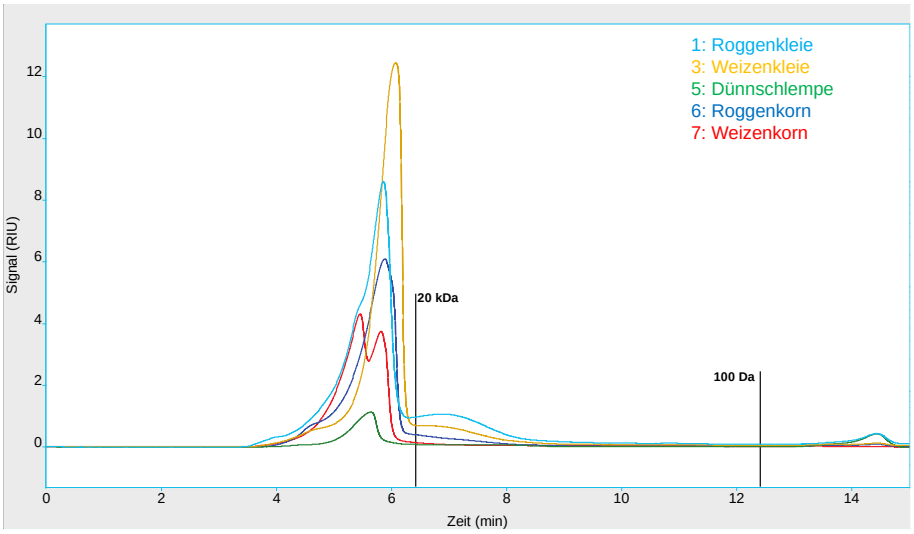
Abb. 4 zeigt die Chromatogramme mit dem Laufmittel Wasser. Es wird deutlich, dass die isolierten Pentosane und Fructane im Bereich oberhalb von 20 kDa im Vergleich zu Polyethylenglykol bzw. Polyethylenoxid (PEG/PEO) liegen. Für die unterschiedlichen Proben zeigen sich dabei nur marginale Unterschiede, vielmehr scheinen die isolierten Kohlenhydrate (unterschiedlichen Ursprungs) eine ähnliche molekulare Größe bzw. Molekulargewicht zu besitzen. Aus Gesprächen mit dem Säulenhersteller hat sich ergeben, dass es in reinem Wasser zur Bildung hochmolekularer Komplexe (aus Kohlenhydraten) kommen kann.

Um dieses Phänomen auszuschließen, wurde eine weitere Analysereihe mit einem Laufmittel größerer Ionenstärke durchgeführt; d. h. mit wässriger Na_2HPO_4 als Eluent. Zudem wurden zur Verbesserung der Auflösung zwei weitere Säulen in Reihe angeschlossen. Abb. 5 zeigt die Chromatogramme der bereits zuvor (mit Reinstwasser) analysierten Proben. Es wird deutlich, dass die isolierten Pentosane und Fructane auf diese Weise besser voneinander getrennt werden können. Dies kann als ein Indiz für die zuvor beschriebene Bildung von Komplexen in Reinstwasser gewertet werden. Folglich sollten derartige Untersuchungen in Laufmitteln mit Salzfracht (z. B. Na_2HPO_4) durchgeführt werden.
Für alle Molmassenverteilungen (der Moleküle) zeigen sich zwei scharfe Peaks bei etwa 1000 und 5000 Da gegenüber Dextran und eine weitere, breite Molmassenverteilung um ca. 50 bis 100 kDa. Zwischen den reinen Roggen- und Weizenproben (Abb. 5 a) einerseits und den Futtermittelproben mit Weizen und Roggen (Abb. 5 b und c) anderseits zeigen sich im hochmolekularen Bereich dabei deutliche Unterschiede; d. h. gegenüber Dextran oberhalb von 150 kDa. Demnach enthalten die Futtermittelproben (d. h. Nummern > 8) auch

höhermolekulare Pentosane und Fructane während die reinen Getreideproben diese Moleküle nicht enthalten. Demnach stammen diese Pentosane und Fructane vermutlich aus den anderen Komponenten des Futtermittels (z. B. aus Soja).

In einer weiteren Analysereihe sollte abschließend die Möglichkeit zur Bestimmung der Molmassenverteilung der isolierten Fructane und Pentosane gegeben werden. Dazu musste eine Kalibrierung über den gesamten Bereich (d. h. über alle Peaks) erfolgen. Da kommerziell keine höhermolekularen Dextranstandards verfügbar waren, wurden hierfür PEG/PEO-Standards mit Molekulargewichten bis 1,2 MDa verwendet. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in wässriger Na_2HPO_4 wurde für die Analysereihe eine wässrige Natriumnitrat-Lösung ($NaNO_3$) als Laufmittel genutzt.
Abb. 6 a zeigt die Chromatogramme der Kalibrierstandards, welche den kalibrierten Bereich von 106 Da bis 1,2 MDa aufspannen. Abb. 6 b macht deutlich, dass roggenbasierte Schlempe im Vergleich zum Substrat (Roggen) keine oder kaum hochmolekulare (oberhalb von 125 kDa im Vergleich zu PEG/PEO) Pentosane und Fructane enthält. Grund hierfür könnte die vorangehende Prozessierung des Roggens im Zuge der Bioethanolproduktion sein, in dessen Verlauf es zu einer Reduktion der Molekülgröße in Folge von erhöhten Temperaturen, Säuren und mikrobieller Behandlung (v. a. Hefe) kommt. Hinsichtlich der Futtermittelproben (Abb. 6 c) kann kein signifikanter Unterschied zwischen roggen- und weizenbasierten Proben (d. h. Kontrolle vs. Roggen) abgeleitet werden. Die isolierten Pentosane und Fructane weisen im Vergleich zu PEG/PEO Molekulargewichte von bis 1,2 MDa auf.

a)



b)

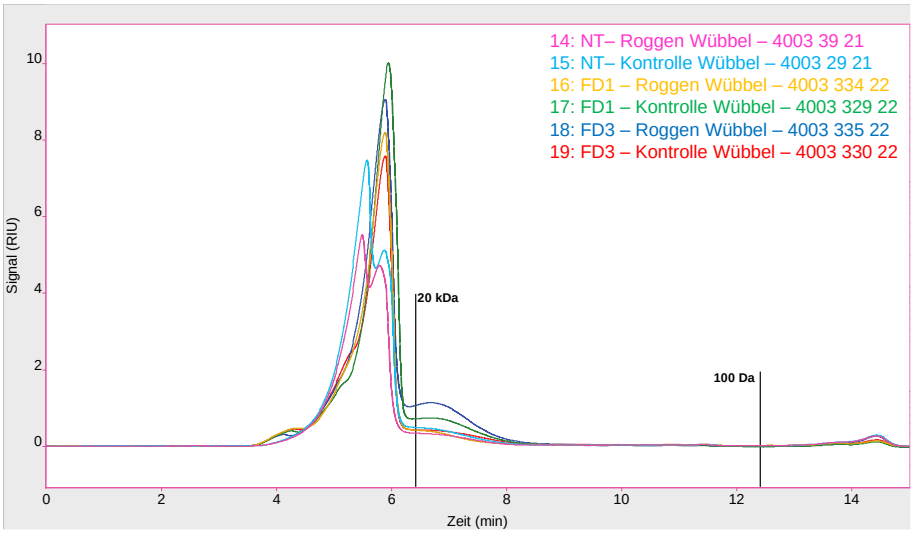


Abb. 4 Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie (SEC) für isolierte Fructane bzw. Pentosane aus den Proben a) 1, 3, 5, 6, 7 und b) 14, 15, 16, 17, 18, 19 (Informationen zur Probennummerierung Tab. 1; Säule: Super-OH 250; Laufmittel: Reinstwasser; qualitative Darstellung gegen Standards aus Polyethylenglykol (PEG))

a)

b)

c)

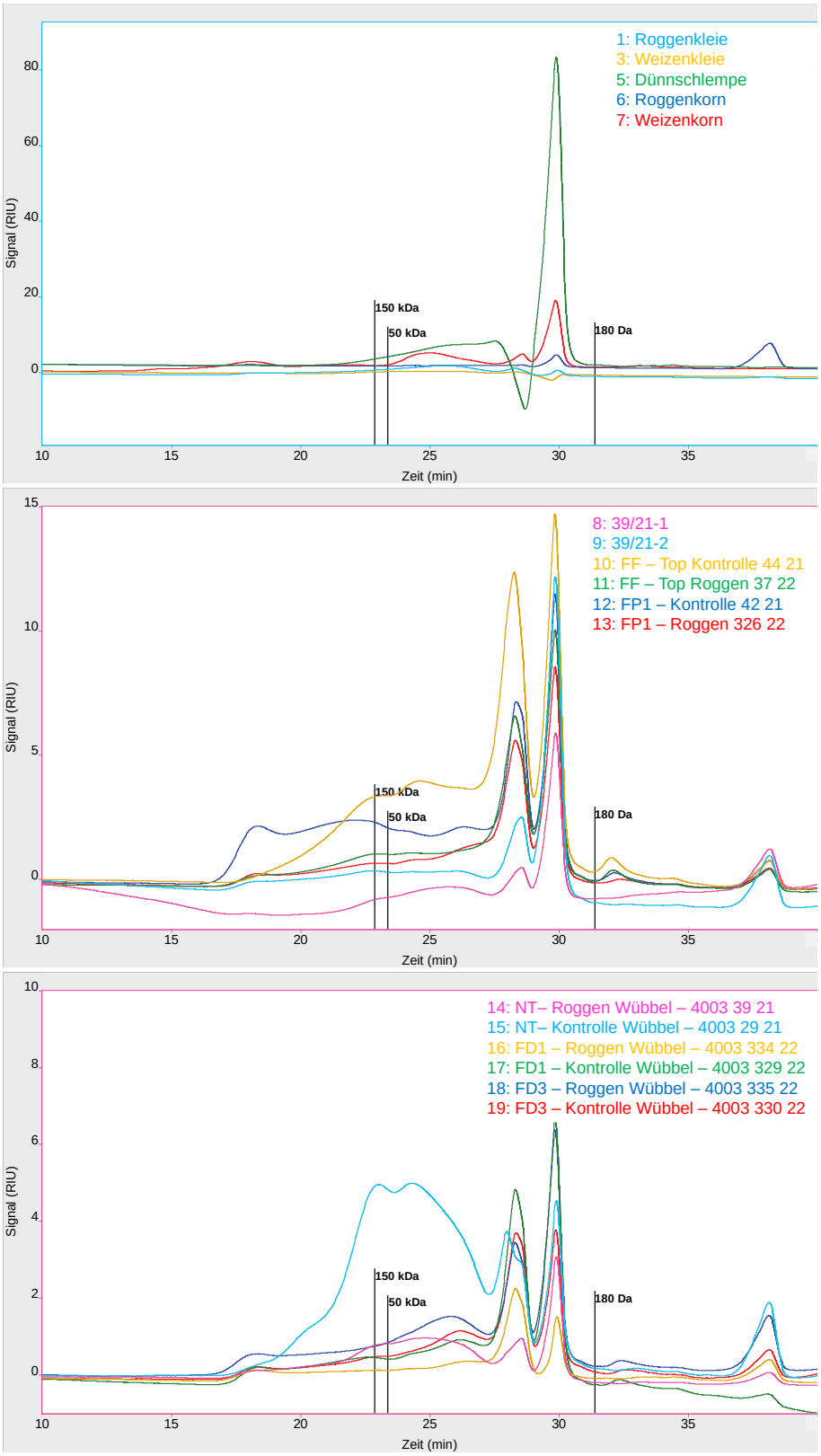
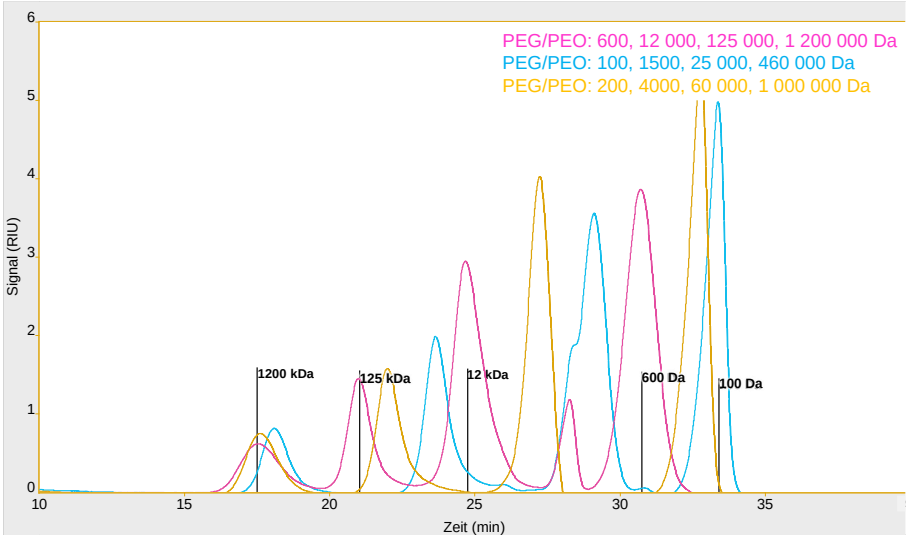
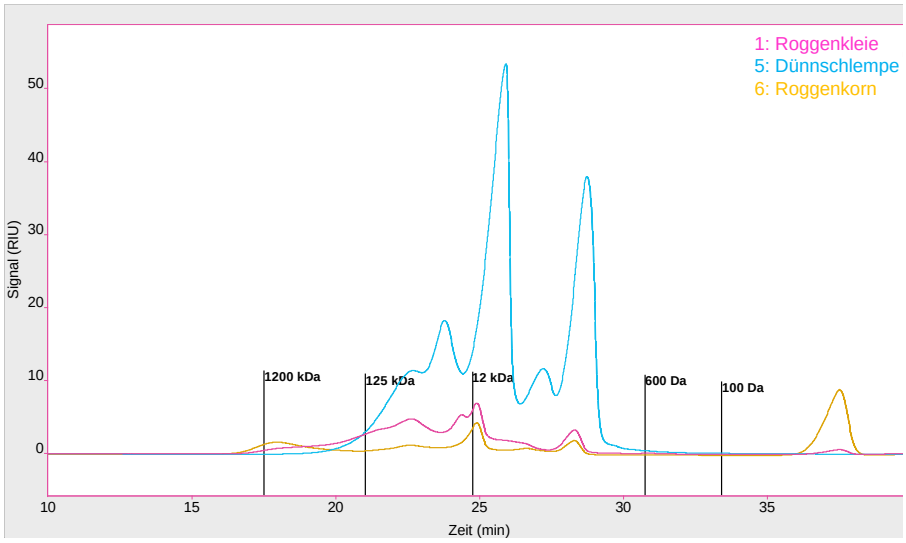


Abb. 5 Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie (SEC) für isolierte Fructane bzw. Pentosane aus den Proben a) 1, 3, 5, 6, 7; b) 8, 9, 10, 11, 12, 13 und c) 14, 15, 16, 17, 18, 19 (Informationen zur Probennummerierung Tab. 1; Säulen: Super-OH 250, 350 und 400; Laufmittel: wässrige 0,075 M Na_2HPO_4; qualitative Darstellung mit Dextranstandards bekannten Molekulargewichts)

a)



b)



c)

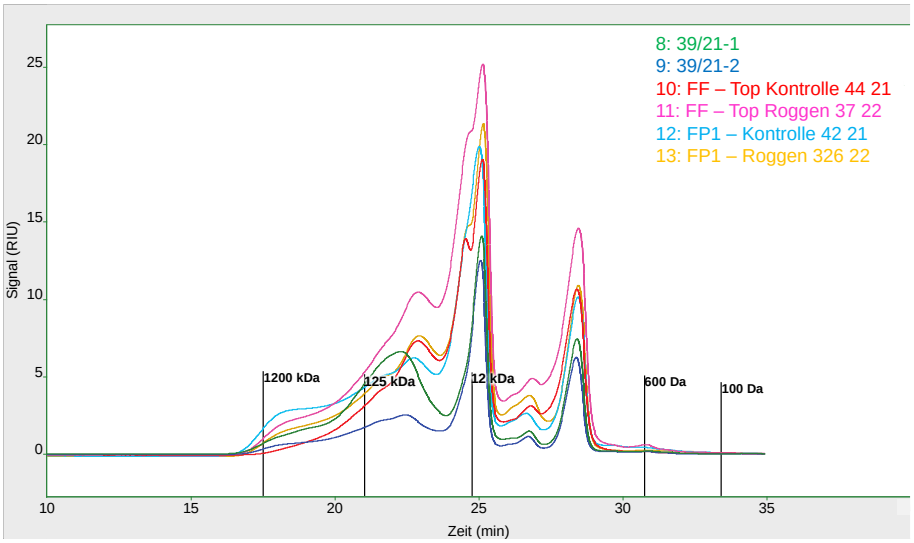


Abb. 6 Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie (SEC) mit den jeweiligen Chromatogrammen; a) Standards b) Proben 1, 5, 6 c) Proben 8, 9, 10, 11, 12, 13 (Informationen zur Probennummerierung Tab. 1; Säulen: Super-OH 250, 350 und 400; Laufmittel: wässrige 0,1 Gew.-% $NaNO_3$; gemessen gegen Polyethylenglycol (PEG) bzw. Polyethylenoxid (PEO) im Bereich 100 bis 1 200 000 Da)

Folgende Schlussfolgerungen lassen sich aus den gesammelten Erfahrungen und anhand der gezeigten Chromatogramme aus der Größenausschlusschromatographie ziehen.

- Aufgrund der beschriebenen Komplexbildung muss für die etablierte Analytik zwingend mit einem Laufmittel hoher Ionenstärke gearbeitet werden (d. h. wässrige Natriumhydrogenphosphat oder Natriumnitrat als Eluent).
- Idealerweise werden Polysaccharide zur Kalibrierung verwendet, aufgrund fehlender kommerzieller Standards kommen dabei Dextrane, Pullulane o. ä. anstelle der Pentosane in Frage, die z. T. in ihrer molekularen Größe limitiert erhältlich sind.
- Hinsichtlich der molekularen Größe bzw. des Molekulargewichts sind keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Futtermitteln, insbesondere zwischen denen mit und ohne Roggen, erkennbar.
- Für Dünnschlempe zeigt sich eine Reduktion der Molekülgröße der isolierten Nicht-Stärke-Polysaccharide (v. a. Pentosane) gegenüber dem Ausgangsmaterial (Weizen und Roggen), insbesondere im hochmolekularen Bereich (Abb. 6 b) oberhalb von 125 kDa gegenüber PEG/PEO.

2.3. Korrelation zwischen Futtermittelinhaltsstoffen und Wirkung (AP 1.3)

Zielsetzung dieses Arbeitspakets war es, eine Korrelation zwischen den Inhaltsstoffen in den Futtermitteln (Tab. 1) Fructane und Pentosane einerseits und der Wirkung im Schwein (d. h. idealerweise Reduktion des Salmonellenbefalls) andererseits abzuleiten. Hinsichtlich der Molekülgröße konnte, wie in AP 1.2 beschrieben, kein relevanter Unterschied zwischen den Futtermittelproben herausgearbeitet werden. Daher wurden die in AP 1.3 durchgeführten Untersuchungen zu möglichen Korrelationen auf den Fructan- bzw. Pentosangehalt im Futtermittel beschränkt.
Zur Bewertung der Salmonellenbelastung wurden durch die Projektpartner Stiefeltupfer und Fäkalien im Stall gesammelt und Blutproben von den Tieren genommen. Die untersuchten Größen sind dabei Salmonellen in Kot und Tupfern (d. h. der Anteil positiver Befunde) bzw. die optische Dichte (OD) des Bluts mit Blick auf Salmonellen-Antikörper [9]. Nennenswerte Befunde ergaben sich dabei im Fall der Tupfer und des OD-Werts, sodass die Ergebnisse der Kotproben hier nicht inkludiert wurden.

Korrelationsanalyse. Zur Untersuchung möglicher Korrelationen (d. h. wechselseitiger Beziehungen zweier Variablen) kann der sogenannte Korrelationskoeffizient herangezogen werden [11]. Dieser ist ein Maß für den Grad eines linearen Zusammenhangs. Es gilt, je näher der Korrelationskoeffizient bei +1 oder -1 liegt, desto größer ist die positive (+1) oder negative (-1) Korrelation zwischen den beiden Variablen. Dabei bedeutet eine positive Korrelation, dass, wenn die Werte für eine Variable bzw. in einem Variablenarray steigen, auch die Werte der anderen Variablen bzw. im anderen Variablenarray steigen. Ein Korrelationskoeffizient, der näher bei 0 liegt, deutet auf keine oder eine nur schwache Korrelation hin. In solchen Fällen kann eine grafische Auftragung der beiden Größen zur Auffindung von nichtlinearen Zusammenhängen hilfreich sein.

Ergebnisse und Diskussion. In Tab. 2 sind die Korrelationskoeffizienten für die Variablenpaare Fructangehalt bzw. Pentosangehalt im Futter und dem Anteil positiver Stiefeltupfer bzw. dem Mittelwert der optischen Dichte (OD) als Maß für den Salmonellenbefall dargestellt. Dabei wurde für die verschiedenen Altersgruppen (d. h. Jungsauen, Tragende Sauen, Ferkel) jeweils eine mögliche Korrelation untersucht.

Nur im Fall der Ferkelaufzucht wird eine Korrelation zwischen den Größen (Inhaltsstoffe einerseits und Salmonellenbefall andererseits) erkennbar. Im Fall der Fructane zeigt sich eine positive Korrelation und folglich ergibt sich für einen höheren Fructangehalt im Futter ein höherer Anteil an positiven Tupfern bzw. ein höherer mittlerer Wert der OD. Dieser Zusammenhang steht diametral zu den Erwartungen, da aufgrund der gesundheitsfördernden Wirkung von Fructanen eine niedrigere Salmonellenprävalenz zu erwarten war. Da bei der Versuchsdurchführung (im Stall) jedoch auch andere Einflussgrößen nicht ausgeschlossen werden können, sind die Zusammenhänge hier multikausaler Natur (z. B. Salmonelleneintrag aus anderen Quellen).

Anders verhält es sich für die inverse Korrelation (d. h. Korrelationskoeffizient < 0) zwischen Pentosangehalt im Futter und dem Anteil positiver Tupfer bzw. der optischen Dichte (OD). Demnach geht ein höherer Pentosangehalt im Futter mit einer niedrigeren Salmonellenbelastung einher. Dieser Zusammenhang steht aufgrund der gesundheitsfördernden Wirkung der Pentosane in Einklang mit den Erwartungen [1]. Allerdings kann auch hier eine Multikausalität nicht ausgeschlossen werden.

Für die anderen Altersgruppen (d. h. Jungsauen, tragende Sauen) sind die Korrelationskoeffizienten vergleichsweise nahe 0 und somit gibt es hier keinen linearen Zusammenhang.

Tab. 2 Korrelationskoeffizienten zwischen Fructan- und Pentosangehalt und dem Anteil positiver Tupfer (hinsichtlich eines Salmonellenbefalls) bzw. der OD im Blut (optische Dichte (OD) der Salmonellen-Antikörper) für die verschiedenen Altersgruppen (rot: keine oder sehr geringe Korrelation; gelb: geringe Korrelation; grün: hohe Korrelation)

	Fructan - Tupfer	**Pentosan - Tupfer**	**Fructan - OD**	**Pentosan - OD**
Gesamt	0,311231477	-0,507737969	-0,261766193	-0,261766193
Jungsauen	-0,365749767	-0,65119909	-0,344581723	-0,309946646
Peripartale Phase	-0,259342738	0,376255101	-0,19894567	0,219258581
Ferkelaufzucht	**0,909729623**	**-0,924347248**	0,686616266	**-0,808943486**

Um potentielle nichtlineare Zusammenhänge erkennbar zu machen, wurden die Daten zusätzlich grafisch gegeneinander aufgetragen.
Abb. 7 zeigt den Fructan- und Pentosangehalt über dem Anteil positiver Tupfer für verschiedene Altersgruppen. Über die gepunkteten Linien sind die linearen Zusammenhänge aus Tab. 2 dargestellt (d. h. für die Ferkelgruppe(n)). Für die anderen Altersgruppen lässt sich kein Zusammenhang erkennen.
Dasselbe gilt für Abb. 8, die den Fructan- und Pentosangehalt über der mittleren optischen Dichte für verschiedene Altersgruppen zeigt. Auch hier verdeutlicht die gepunktete Linie den linearen Zusammenhang aus Tab. 2. Für die anderen Altersgruppen kann kein Zusammenhang abgeleitet werden.

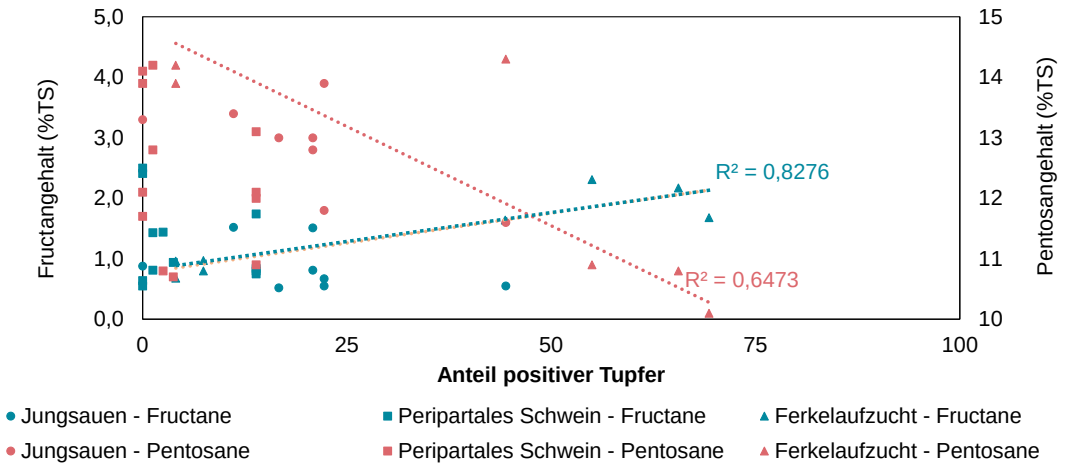


Abb. 7 Darstellung des mittleren Fructan- bzw. Pentosangehalts der jeweiligen Futtermittel ($n \geq 3$) über dem Anteil an positiven Stiefeltupfern (hinsichtlich Salmonellen) aus den Stallungen für unterschiedliche Altersgruppen (rote Linie: Regressionsgerade für den Pentosangehalt der Futtermittel in der Ferkelaufzucht (Antikorrelation); blaue Linie: Regressionsgerade für den Fructangehalt der Futtermittel in der Ferkelaufzucht (Korrelation))

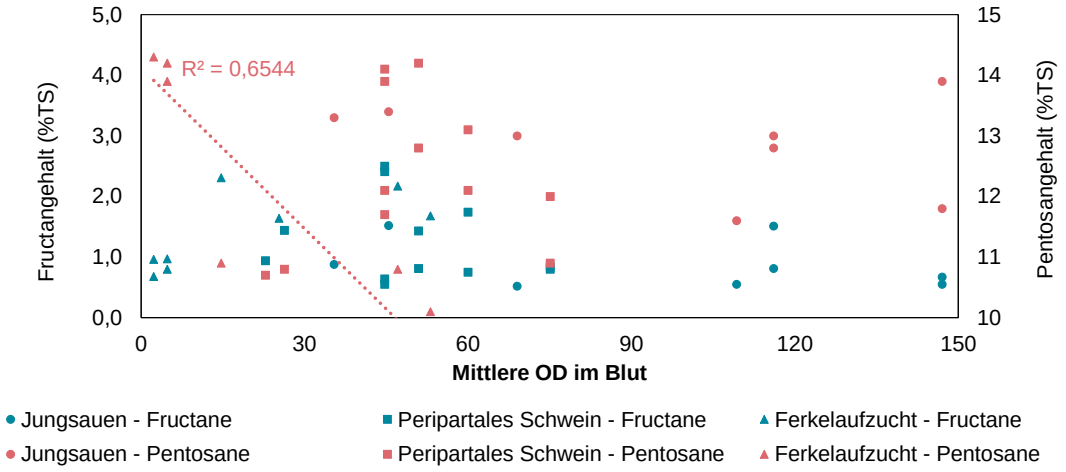


Abb. 8 Darstellung des mittleren Fructan- bzw. Pentosangehalts der jeweiligen Futtermittel ($n \geq 3$) über der optischen Dichte (OD) hinsichtlich der Salmonellen-Antikörper im Blut aus den Stallungen für unterschiedliche Altersgruppen (rote Linie: Regressionsgerade für den Pentosangehalt der Futtermittel in der Ferkelaufzucht (Antikorrelation))

Zusammenfassend bedeutet dies, dass nur für die Ferkelaufzucht der erhoffte Zusammenhang zwischen einer roggenreichen Fütterung und damit höheren Pentosananteilen im Futter einerseits und der Reduktion von Salmonellen im Tierbestand andererseits gezeigt werden konnte.

2.4. Gewinnung einer pentosanreichen Fraktion (AP 1.4)

Ziel war es, eine Fraktion mit hohem Fructan- bzw. Pentosananteil zu gewinnen, die in einem Tierfutter gezielt eingesetzt werden kann. Basierend auf der entwickelten Analytik wurden in diesem Arbeitspaket potentielle Verfahren für eine Anreicherung von Fructanen und Pentosanen untersucht.

Zunächst wurden mögliche Ausgangsmaterialien für diese Zielsetzung miteinander verglichen. Im Rahmen des Projekts kamen dabei Getreide und Getreidenachprodukte wie Kleie oder auch Schlempe aus der getreidebasierten (Bio-)Ethanolproduktion in Frage. Dabei wurde

Schlempe als Substrat für eine Abtrennung von Fructanen und Pentosanen als vielversprechend identifiziert und aus den folgenden Gründen schlussendlich ausgewählt:

- Getreide und Kleie sind als Substrate für die Gewinnung von Fructanen und Pentosanen bereits vielfach untersucht [6; 12–14]. Schlempe und insbesondere Dünnschlempe ist als Substrat zur Gewinnung von Pentosanen kaum untersucht. Hinsichtlich der Fructane bzw. deren Gewinnung aus Schlempe ist bis zu den durchgeführten Arbeiten in diesem Projekt nichts dokumentiert. Damit ist eine mögliche Fructangewinnung aus Schlempe besonders aus wissenschaftlicher Sicht interessant.
- Insbesondere Dünnschlempe ist als Nebenstrom in der Bioethanolproduktion ein bisher ungenutzter Stoffstrom, dessen Verwertung einen Beitrag zur ganzheitlichen Nutzung von Biomasse leisten kann. Getreide und Getreidekleie hingegen werden unter anderem als Nahrungsmittel oder Tierfutter genutzt, womit sich eine Nutzungskonkurrenz ergibt.
- Aufgrund des Stärkeabbaus (aus dem eingesetzten Getreide) im Verlauf des Bioethanol-Produktionsprozesses ist zu erwarten, dass es zu einer Anreicherung (d. h. Erhöhung des Anteils) der anderen Getreidebestandteile und damit der Pentosane und Fructane kommt. In der Folge wäre deren Anteil in der Trockensubstanz (TS) dann erhöht.

Ergebnisse und Diskussion zur Prozessentwicklung. Als erster Schritt wurden die Dünnschlempe-Proben einer wässrigen Extraktion bei 80 °C unterzogen und anschließend mittels Zentrifugation in eine feststoffreiche Phase und eine flüssige Phase getrennt. Alle Fraktionen vor und nach der Fest-Flüssig-Trennung wurden auf den Pentosan- und den Fructangehalt analysiert. Tab. 3 zeigt die Ergebnisse, aus denen Folgendes abgeleitet werden kann.

- Fructane. Der Gehalt an Fructanen in der Schlempe ist gering und im Vergleich zum Ausgangsmaterial Getreide (Tab. 1) reduziert; d. h., Fructane werden im Zuge des Bioethanol-Produktionsprozesses abgebaut. Wie zu erwarten, akkumulieren die Fructane in der flüssigen Phase und damit zeigen sich in dieser Fraktion höhere Fructananteile in der Trockensubstanz (TS).
- Pentosane. Der Gehalt an Pentosanen in der Schlempe nimmt im Vergleich zum Substrat (Getreide) zu und damit im Laufe des Bioethanol-Produktionsprozesses (Tab. 1). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Literatur [15]. Analog zu den Fructanen akkumulieren die Pentosane nach der Fest-Flüssig-Trennung in der flüssigen Phase; d. h. es kommt zu einer Anreicherung in der TS.
- Sowohl für die Fructane als auch die Pentosane zeigt die roggenbasierte Schlempe die höheren Anteile, was vermutlich auf die höheren Anteile im Korn zurückzuführen ist (Tab. 1).

Aufgrund des sehr geringen Fructangehalts in der Schlempe (≤ 1 %TS) wurde sich in der Prozessentwicklung auf die Pentosane konzentriert. Für die Abtrennung von Fructanen wäre im Kontext von Rye-SaFe aufgrund des höheren initialen Fructangehalts vorzugsweise Getreide oder Getreidekleie einzusetzen.

Tab. 3 Pentosan- und Fructangehalt repräsentativer Dünnschlempe-Proben und deren Fraktionen nach einer Fest-Flüssig-Trennung mittels Zentrifugation (4500 min^{-1}, 30 min) (Mittelwert und Standardabweichung von Triplikaten; fettgedruckt: Probenmaterial für SEC-Analytik mit entsprechender Nummerierung)

Probenmaterial	Fructangehalt (%TS)	Pentosangehalt (%TS)
Dünnschlempe (Roggen) (5)	**1,0 ± 0,1**	**19,1 ± 0,7**
Flüssiganteil von Dünnschlempe (Roggen)	2,2 ± 0,2	29,9 ± 0,8
Feststoffanteil von Dünnschlempe (Roggen)	0,5 ± 0,0	9,8 ± 0,1
Dünnschlempe (Weizen)	0,2 ± 0,0	15,9 ± 0,8
Flüssiganteil von Dünnschlempe (Weizen)	0,3 ± 0,0	25,4 ± 1,1
Feststoffanteil von Dünnschlempe (Weizen)	0,1 ± 0,0	8,0 ± 0,4
Dünnschlempe (Weizen)	0,2 ± 0,0	13,5± 0,1
Flüssig von Dünnschlempe (Weizen)	0,5 ± 0,0	21,6± 0,2
Feststoffanteil von Dünnschlempe (Weizen)	0,1 ± 0,0	4,8± 0,5

Basierend auf umfangreichen Recherchen und den Ergebnissen aus Tab. 3 wurden im Labormaßstab verschiedenste Untersuchungsreihen durchgeführt [16]; allesamt mit dem Ziel einer Anreicherung (d. h. Erhöhung des Anteils) der Pentosane.
Dabei wurde ein dreistufiger Prozess entsprechend Abb. 9 abgeleitet, der die folgenden Schritte inkludiert:

- Fest-Flüssig-Trennung. Im ersten Schritt wird die Dünnschlempe mit einem Pentosangehalt von ca. 10 bis 15 %TS einer wässrigen Extraktion bei 80 °C unterzogen und anschließend mittels Fest-Flüssig-Trennung (z. B. Zentrifugation) in die feste pentosanabgereicherte und die flüssige pentosanreiche Phase getrennt. Die Pentosanausbeute in der flüssigen Phase beträgt gut 80 % bezogen auf die Dünnschlempe. Hier kommt es auch zu einer Anreicherung, sodass der Pentosangehalt in der flüssigen Phase auf bis zu 20 %TS steigt. Dabei handelt es sich um gelöste und teils ungelöste Pentosane in kleinsten Partikeln, die über die Fest-Flüssig-Trennung nicht abgeschieden werden können. Die knapp 20 % der im Feststoff verbleibenden Pentosane sind hingegen allesamt ungelöst.
- Solubilisierung der Pentosane. Im zweiten Schritt werden die unlöslichen Pentosane mit Hilfe von hydrothermischen Verfahren verflüssigt; d. h., sie werden mit heißem Wasser unter Druck in Lösung gebracht. Durch eine Behandlung mit 150 °C für ca. 30 min können dabei gut 80 % der zuvor im Feststoff befindlichen Pentosane gelöst werden. Allerdings ist die hydrothermische Behandlung nicht selektiv und es lösen andere Stoffe, insbesondere Proteine, in einem noch größeren Ausmaß. In der Folge hat das resultierende Hydrolysat einen relativ geringen Pentosangehalt (bezogen auf die Trockensubstanz). Dieser liegt bei unter 8 %TS und somit ist die weitere Aufreinigung (d. h. das Entfernen der anderen Begleitstoffe) hinsichtlich der Massenanteile aufwändiger als im Fall der initial eingesetzten Dünnschlempe (Pentosangehalt > 10%TS).
- Aufreinigung der Pentosane. Im letzten Schritt erfolgt die weitere Aufreinigung der Pentosane und damit die (weitere) Erhöhung des Pentosananteils im Produkt. Neben Fällungsversuchen mit Ethanol wurde insbesondere eine Mikro- und Ultrafiltration untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Pentosane bzw. pentosanreiche Partikel mit Hilfe einer Mikrofiltration und einer 0,1 µm Membran zurückgehalten werden. Auf diese Weise konnte ein Produkt mit über 50 %TS Pentosangehalt als Retentat gewonnen werden.

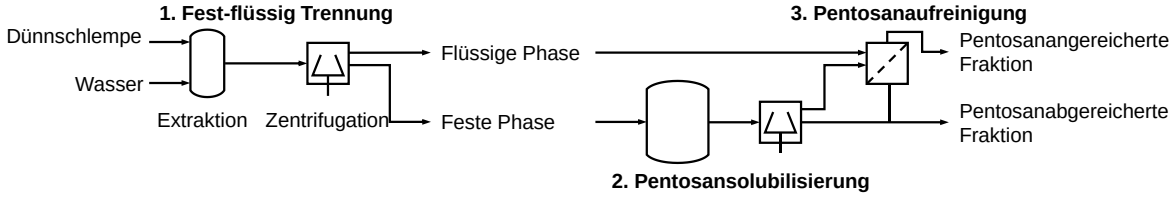


Abb. 9 Darstellung des entwickelten Prozesses zur Anreicherung von Pentosanen aus Dünnschlempe

Ergebnisse und Diskussion zur ökonomischen Bewertung. Mit Hilfe von Aspen Plus wurde der vorgeschlagene Prozess (Abb. 9) in einen industriellen Maßstab als Teil einer Bioethanol-Produktionsanlage skaliert und relevante Massen- und Energiebilanzen ermittelt. Basierend darauf wurden die einzelnen Apparate überschlägig ausgelegt und deren Kosten abgeschätzt (kapitalgebundene Kosten). Zusammen mit den verbrauchsgebundenen und den betriebsgebundenen Kosten wurden so spezifische Produktgestehungskosten für die angereicherten Pentosane ermittelt. Die Kosten wurden wegen der wirtschaftlichen Entwicklungen (in Folge von Corona-Pandemie, Ukraine-Konflikt) für das Referenzjahr 2019 ermittelt. Darüber hinaus wurden verschiedene Prozesskonzepte verglichen mit dem Ergebnis, dass aus wirtschaftlicher Sicht der Prozess idealerweise entsprechend Abb. 10 gestaltet werden sollte; d. h. ohne den Solubilisierungsschritt und mit einer optionalen Verwertung des festen Rückstands zu Biogas.

Für ein getrocknetes Produkt, welches als integrierter Bestandteile einer existierenden Bioethanolanlage (Kapazität 150 kt/a) anfällt, konnten spezifische Gestehungskosten von etwa 3000 bis 4000 € pro Tonne Produkt (mit ca. 52,5 %TS Pentosangehalt) ermittelt werden. Die Ausbeute (bezogen auf die eingesetzte Dünnschlempe liegt bei etwa 60 %. Vor dem Hintergrund eines potentiellen Einsatzes in niedrigpreisigen Futtermitteln, erscheint der Prozess damit nicht wirtschaftlich darstellbar.

Die gewonnen Erkenntnisse und Ergebnisse können jedoch Ausgangspunkt für weitere Forschungsbemühungen und Entwicklungsarbeit sein.

Abb. 10 Darstellung des (weiter-)entwickelten Prozesses zur Anreicherung von Pentosanen aus Bioethanol-Dünnschlempe nach wirtschaftlicher Betrachtung

3. Anhänge

3.1. Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Tab. 4 zeigt die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises mit entsprechenden Erläuterungen. Insgesamt konnte der Finanzierungsplan wie genehmigt eingehalten werden.

Tab. 4 Geplante Ausgaben entsprechend des aktuellsten Finanzierungsplans vom 09.11.2023 und die tatsächlichen Ausgaben (Stundentische Hilfskraft (SUK)) (Stand 01.09.2024)

Pos.	Beschreibung	Soll (€)	Ist (€)	Erläuterungen
0812	Beschäftige E12-E15	243 680,16	237 203,54	Personalkosten für die projektbearbeitenden Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen
0822	Beschäftigungsentgelte	6 031,11	6 977,33	SUK zur Unterstützung bei Routinearbeiten im Labor
0843	Allg. Verwaltungsausgaben	15 000,00	14 640,90	Chemikalien, Labormaterialien (z. B. Handschuhe), Standards
0846	Dienstreisen	1 764,00	1 721,77	Teilnahme an einer Konferenz EUBCE 2023 zur Präsentation von Projektergebnissen
0850	Gegenstände > 800/410/400 €	5 887,66	5 746,71	Chromatographische Säulen für die Analytik, Labormahlkopf zur Probenvorbereitung
0861	Gesamtausgaben	272 510,86	266 290,25	

3.2. Notwendigkeit und Angemessenheit der Projektarbeiten

Für die wissenschaftlichen Untersuchungen war ein erheblicher Arbeitsaufwand zu bewerkstelligen. Ohne die Beschäftigung entsprechender wissenschaftlicher Mitarbeitender wäre die Bearbeitung der in Abschnitt 2 genannten Arbeitspakete nicht möglich gewesen. Die vorgesehenen Personalkosten und Sachmittel wurden bei Antragsstellung entsprechend angemessen dimensioniert, um die erforderlichen Arbeiten erfolgreich durchzuführen (Tab. 4). Durch die COVID-19-Pandemie und entsprechende Einschränkungen im Laborbetrieb (z. B. reduzierte Belegung der Labore, Lieferengpässe, Personalausfälle) konnten Arbeiten im Labor nicht wie ursprünglich vorgesehen durchgeführt werden. In der Folge war eine Projektverlängerung und damit höhere Personalausgaben bzw. eine längere Beschäftigung (gegenüber der Antragstellung aus dem Jahr 2020) notwendig. Durch die Nutzung von Gerätschaften aus Altbeständen und die Verwendung von Laborgeräten aus einer Institutsauflösung konnten entsprechende Mittel eingespart werden, die es wiederum ermöglichten, dass das Projekt (trotz höherer Personalkosten) kostenneutral und erfolgreich beendet werden konnte.
Darüber hinaus wurde mit der techno-ökonomischen Bewertung des in AP 1.4 vorgeschlagenen Prozesskonzepts ein wertvoller Zusatzbeitrag zu den Projektergebnissen geleistet. Aus diesem Grund kann das Projektmanagement, insbesondere die Zeit- und Budgetplanung, als angemessen bewertet werden.

3.3. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse des durchgeführten Projektvorhabens leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen dem eingesetzten Roggen und den Futtermitteln und deren Effekten in der Schweinemast (AP 1.1 bis 1.3).
Darüber hinaus wird mit dem in AP 1.4 entwickelten und vorgeschlagenen Prozess zur Anreicherung von Pentosanen aus Bioethanolschlempe eine grundsätzliche Möglichkeit zur Bereitstellung von derartigen Ballaststoffen bzw. Pentosanen aufgezeigt. Dieser Prozess kann zudem als Ausgangspunkt für weitere Forschungsbemühungen mit dem Ziel einer weiteren Aufreinigung von Pentosanen (d. h. höhere Reinheit) dienen. Interessant wäre dies potentiell für Anwendungen im Futter- aber auch Lebensmittelbereich. Damit können die Ergebnisse auch einen Beitrag zur ganzheitlichen Verwertung von Biomasse in Sinne eines Bioraffineriekonzept leisten.

3.4. Stand der Forschung im Projektzeitraum

Dem Zuwendungsempfänger ist während der Durchführung des Vorhabens kein Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen bekannt geworden.

3.5. Veröffentlichung der Ergebnisse

Alle erfolgten Veröffentlichungen sind nachfolgend aufgelistet und den entsprechenden Abschnitten (z. B. Grants and Funding) als Ergebnisse dieses Projekts gekennzeichnet.

- Zimmermann, A.; Kaltschmitt, M.; Quantification of fructans in cereal-based bioethanol stillage based on a simplified analytical method. Cereal Chemistry, 2022
- Zimmermann, A.; Scherzinger, M.; Kaltschmitt, M.; Process options for the recovery of a pentosan-enriched fraction from wheat-based bioethanol thin stillage. Bioresources and Bioprocessing, 2023
- Homann, C.; Wilke, V.; Eckey, I.; Chuppava, B.; Kaltschmitt, M.; Zimmerman, A.; Visscher, C.; Rye bran as a component in diets for lactating sows – Effects on sow and piglet performance. Animals, 2024
- Homann, C.; Eckey, I.; Chuppava, B.; Teich, K.; Buch, J.; Zimmerman, A.; Kaltschmitt, M.; Grone, R.; Wilke, V.; Visscher, C.; Rye and rye bran as components of diets in piglet production – Effects on salmonella prevalence. Animals, 2023
- Zimmermann, A.; Kaltschmitt, M.: Recovery of prebiotic carbohydrates from side streams of biorefineries exemplified by fructans and pentosans from bioethanol thin stillage; Konferenzbeitrag (Poster); EUBCE in Bologna, Italien, 2023

4. Referenzen

[1] Zimmermann, A.; Visscher, C.; Kaltschmitt, M. (2023) *Plant-based fructans for increased animal welfare: provision processes and remaining challenges* in: Biomass Conversion and Biorefinery 13, H. 4, S. 2667–2685. https://doi.org/10.1007/s13399-021-01473-2

[2] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton (2006) *Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples – Laboratory Analytical Procedure (LAP)* [online].

[3] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker (2012) *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass – Laboratory Analytical Procedure (LAP)* [online].

[4] *Fructan Assay Protocol – K-Fruc* [online]. https://www.megazyme.com [Zugriff am: 30. Dez. 2023].

[5] Zimmermann, A.; Kaltschmitt, M. (2022) *Quantification of fructans in cereal-based bioethanol stillage based on a simplified analytical method* in: Cereal Chemistry 99, H. 4, S. 737–750. https://doi.org/10.1002/cche.10533

[6] Karppinen, S. et al. (2003) *Fructan Content of Rye and Rye Products* in: Cereal Chemistry 80, H. 2, S. 168–171. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2003.80.2.168

[7] Ni, D. et al. (2024) *Production, effects, and applications of fructans with various molecular weights* in: Food chemistry 437, Pt 1, p. 137895. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137895

[8] Buksa, K. et al. (2016) *Characterization of water and alkali extractable arabinoxylan from wheat and rye under standardized conditions* in: Journal of food science and technology 53, Nr. 3, pp. 1389–1398. https://doi.org/10.1007/s13197-015-2135-2

[9] Homann, C. et al. (2023) *Rye and Rye Bran as Components of Diets in Piglet Production-Effects on Salmonella Prevalence* in: Animals : an open access journal from MDPI 13, Nr. 14. https://doi.org/10.3390/ani13142262

[10] Homann, C. et al. (2024) *Rye Bran as a Component in the Diets of Lactating Sows-Effects on Sow and Piglet Performance* in: Animals : an open access journal from MDPI 14, Nr. 3. https://doi.org/10.3390/ani14030380

[11] Schiefer, H.; Schiefer, F. (2018) *Statistik für Ingenieure*. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.

[12] La Rosa, O. de et al. (2019) *Fructooligosaccharides production from agro-wastes as alternative low-cost source* in: Trends in Food Science & Technology 91, H. 5, S. 139–146. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.013

[13] Du, C. et al. (2009) *Evaluating the feasibility of commercial arabinoxylan production in the context of a wheat biorefinery principally producing ethanol. Part 1. Experimental studies of arabinoxylan extraction from wheat bran* in: Chemical Engineering Research and Design 87, H. 9, S. 1232–1238. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2008.12.027

[14] Zhang, Z.; Smith, C.; Li, W. (2014) *Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: A critical review* in: Food Research International 65, H. 1, S. 423–436. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.068

[15] Kosik, O. et al. (2017) *Changes in the arabinoxylan fraction of wheat grain during alcohol production* in: Food chemistry 221, pp. 1754–1762. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.109

[16] Zimmermann, A.; Scherzinger, M.; Kaltschmitt, M. (2023) *Process options for the recovery of a pentosan-enriched fraction from wheat-based bioethanol thin stillage* in:

Bioresources and Bioprocessing 10, H. 1, S. 1049. https://doi.org/10.1186/s40643-023-00679-8