

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Wirkung polyphenolreicher Futterzusätze auf die
Verdaulichkeit der Nährstoffe, Darmmikrobiota und
Darmgesundheit bei Absetzferkeln

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und
Umweltmanagement

vorgelegt von

M. Sc. agr. Anja Fiesel

geboren am 22.05.1988 in Friedrichshafen

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Agrarwissenschaften,
Ökotoxikologie und Umweltmanagement der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter

Prof. Dr. Klaus Eder

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35292 Gießen

Prof. Dr. Steffen Hoy

Institut für Tierhaltung und Haltungsbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Leihgesterner Weg 52
35392 Gießen

Tag der Disputation: 08.07.2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Polyphenole.....	2
1.2. Entzündung	5
1.3. Einfluss des Absetzens auf die Entwicklung des Darms von Ferkeln.....	8
1.4. Wirkung von Polyphenolen auf Entzündungsprozesse	10
1.5. Einfluss von Polyphenolen auf den Mineralstoffhaushalt	13
2. Zielstellung.....	15
2.1. Untersuchung zu den Wirkungen polyphenolreicher Pflanzenprodukte auf das Entzündungsgeschehen im Darm, die Nährstoffverdaulichkeit und die fäkale Mikroflora von abgesetzten Ferkeln.....	15
2.2. Untersuchung zu den Wirkungen polyphenolreicher Pflanzenprodukte auf den Mineralstoffhaushalt von Ferkeln.....	16
3. Originalarbeiten	18
3.1. Wirkungen polyphenolreicher Pflanzenprodukte auf das Entzündungsgeschehen im Darm, der Nährstoffverdaulichkeit und der Mikroflora im Darm von Ferkeln.....	18
3.2. Wirkungen polyphenolreicher Pflanzenprodukte auf den Mineralstoffhaushalt von Ferkeln	30
4. Diskussion	40
5. Zusammenfassung.....	47
6. Summary	48
7. Literaturverzeichnis.....	49
Erklärung.....	56
Lebenslauf	57
Danksagung.....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Strukturen polyphenolischer Komponenten in den Beeren der Weinrebe (modifiziert nach Xia <i>et al.</i> , 2010).....	3
Abbildung 2: Mechanismus der signalinduzierten NF- κ B Aktivierung (modifiziert nach Wegener, 2006).....	8

Abkürzungsverzeichnis

Cu	Kupfer
CYP	Cytochrom P450-Oxygenasen
Fe	Eisen
GAE	<i>gallic acid equivalent</i>
GLUT	<i>glucose transporter</i>
IL	Interleukin
I κ B	inhibitorisches Protein
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
PEPT1	<i>intestinal peptide transporter 1</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
SGLT1	<i>sodium glucose transporter 1</i>
RHD	<i>Rel Homology Domäne</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Zn	Zink

1. Einleitung

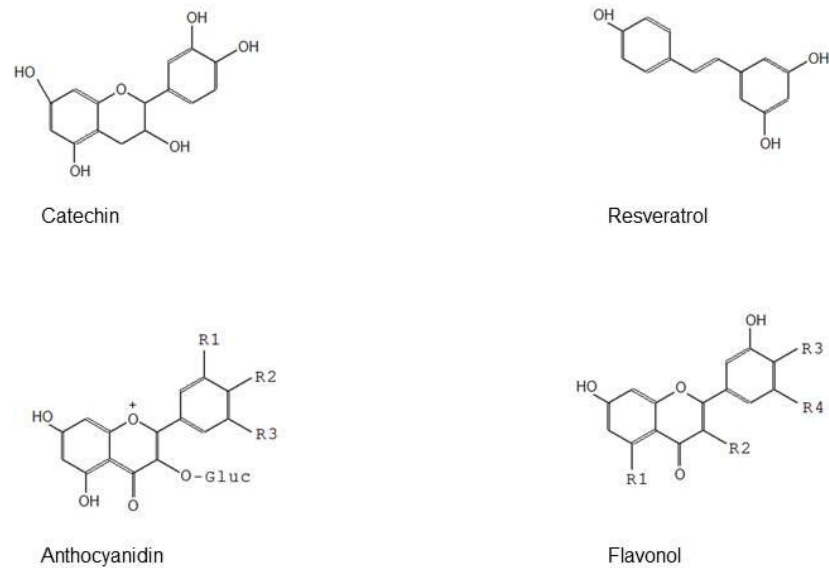
In den meisten europäischen Ländern erfolgt das Absetzen von Ferkeln zwischen dem 21. und 28. Lebenstag und ereignet sich somit deutlich vor dem Termin der natürlichen Entwöhnung. Dieses frühe Absetzen stellt eine kritische Lebensphase für Jungtiere dar, da bedingt durch den Stress der Umstallung, die Trennung von Muttertier und Geschwistern, sowie besonders durch den abrupten Futterwechsel das Allgemeinbefinden der Tiere häufig stark beeinträchtigt wird (Pluske *et al.*, 1997; Stokes *et al.*, 2004; Lallès *et al.*, 2007). In der ersten Woche nach dem Absetzen wird zudem oft eine reduzierte Nahrungsaufnahme beobachtet (Pluske *et al.*, 1997). Der Entzug der Muttermilch bedeutet einen Verlust an immunologischen Schutzfaktoren, den die Tiere wegen ihres erst unvollständig ausgereiften Immunsystems nicht sofort kompensieren können (Stokes *et al.*, 2004). Auf Grund all dieser Faktoren steigt das Risiko für Infektionen. So werden in der Praxis häufig Magen-Darm- und Durchfallerkrankungen beobachtet, die zu verminderten Zunahmen und einer verlängerten Mastperiode führen. Gleichzeitig werden im Darm Veränderungen in der Struktur und Funktion beobachtet (Pluske *et al.*, 1997). Um den Tieren diese kritische Phase zu erleichtern, wurden in der Vergangenheit häufig antibiotische Futterzusatzstoffe eingesetzt, welche leistungsfördernd wirken und einen reduzierenden Effekt auf die Prävalenz von Durchfallerkrankungen haben (Gaskins *et al.*, 2002). Nachdem 2006 jedoch der Einsatz von Antibiotika in der Nutztierhaltung als Leistungsförderer und zur prophylaktischen Anwendung in Deutschland und der EU verboten wurde (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung), steht als Alternative zunehmend die Supplementierung von frischen, getrockneten oder als Extrakt verarbeiteten Pflanzen und Pflanzenteilen (Wurzeln, Knollen, Blätter, Stängel, Früchte, Samen) im Fokus aktueller Untersuchungen. Die pflanzlichen Inhaltsstoffe, die hier zum Einsatz kommen, gehören zu unterschiedlichen chemischen Gruppen: unter anderem sind es ätherische Öle, Senföolverbindungen, Gerbsäuren und Phenole. Diese speziellen pflanzlichen Inhaltsstoffe haben vielseitige Effekte. Sie wirken beispielsweise

appetitanregend, beeinflussen die Zusammensetzung der Mikroflora des Verdauungstraktes und fördern die Sekretion von Verdauungssäften. Darüber hinaus sind antioxidative und stimulierende Wirkungen auf das Immunsystem sowie entzündungshemmende, präbiotische aber auch antinutritive Effekte bekannt (Gollnisch, 2002; Landete, 2012).

1.1. Polyphenole

Polyphenole gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und sind Bestandteil vieler Nahrungs- und Futtermittel, wie Getreide, Gemüse, Ölsaaten und Obst. Alle Polyphenole besitzen als Grundstruktur einen aromatischen Ring mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen (Shi *et al.*, 2003) und sind in natürlicher Form meist an Zuckermoleküle (Glukose oder Rhamnose) oder eine organische Säure gebunden. Grundsätzlich lassen sich Polyphenole in Flavonoide und Nicht-Flavonoide unterteilen (Bravo, 1998; Xia *et al.*, 2010). Flavonoide sind einfache Moleküle, bestehend aus zwei Benzolringen, welche durch einen heterozyklischen Pyranring miteinander verbunden sind und in weitere Unterklassen unterteilt werden können: Flavonole, Flavone, Flavanole, Flavanone, Anthocyanidine und Isoflavone. Bedeutende Vertreter von Flavonoiden sind u.a. Quercetin, Kaempferol und Catechin. Nicht-Flavonoide Polyphenole besitzen eine komplexere Struktur und werden weiter unterteilt in kondensierte Tannine (Proanthocyanidine), hydrolysierbare Tannine und Lignane, wobei als wichtige Vertreter Resveratrol und Phenolsäuren zu nennen sind (Bravo, 1998; Lewandowska *et al.*, 2013).

Beispielhaft sind in **Abbildung 1** die chemischen Grundstrukturen unterschiedlicher Polyphenole in den Beeren der Weinrebe dargestellt.



	R1	R2	R3	R4
Quercetin	OH	OH	OH	-
Rutin	OH	O-Rutinose	OH	-
Morin	OH	OH	-	OH
Myricetin	OH	OH	OH	OH
Fisetin	-	OH	OH	OH

Abbildung 1: Chemische Strukturen polyphenolischer Komponenten in den Beeren der Weinrebe (modifiziert nach Xia *et al.*, 2010)

Polyphenole können wasser- oder fettlöslich sein. So sind Catechine fettlöslich, während Proanthocyanidine einen wasserlöslichen Charakter vorweisen. Eine weitere Eigenschaft von Polyphenolen ist ihre Anfälligkeit gegenüber Sauerstoff, Licht, Säuren und Basen. Gleichzeitig sind sie jedoch thermostabil (Shi *et al.*, 2003), was für Verarbeitungsprozesse der Ausgangsprodukte von großer Bedeutung ist. Polyphenole spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf die sensorischen Eigenschaften von Nahrungs- und Futtermitteln. Neben der Bitterkeit von Früchten beeinflussen Anthocyane die Farbe von u.a. Äpfeln, Beeren und Zwiebeln. Ebenfalls haben Polyphenole durch Reaktionen mit Sauerstoff einen großen Effekt auf die Konservierung, Reifung und Alterung von

Wein. Die Absorption von Polyphenolen im Dünndarm von Mensch und Tier ist mit 5 – 10% gering. Bis zu 95% der aufgenommenen Polyphenole erreichen in freier oder konjugierter Form den Dickdarm, wo sie mikrobiellen Fermentationen unterliegen (Clifford, 2004). Die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen variiert mit der chemisch vorliegenden Struktur. Auch die Art des Futter- oder Lebensmittels spielt eine entscheidende Rolle. In Lebensmitteln liegen die Phenolsäuren vielfach verestert mit organischen Säuren, Zuckern oder Lipiden vor, die aufgrund mangelnder körpereigener Esterasen erst durch mikrobielle Tätigkeiten im Kolon metabolisiert werden (Olthof *et al.*, 2001). Ähnlich verhält es sich mit den Flavonoiden, die in glykosylierter Form vorliegen. Diese Eigenschaft verleiht ihnen einen hydrophilen Charakter, der das Passieren der Bürstensaummembran des Dünndarms unmöglich macht (Hollman *et al.*, 1995).

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten polyphenolreichen Pflanzenpräparate stammen von Traube und Hopfen und stellen Nebenprodukte der Wein-/Saft- oder Bierherstellung dar. Die Hauptfraktion der Polyphenole in Traubenkernen sind Flavonoide, zu denen neben der Gallensäure auch Catechin, Epicatechin, Gallocatechin, Epigallocatechin und Epicatechin 3-O-gallate gehören. Zu den Phenolsäuren gehören die Zimt- und Benzoessäuren (Shi *et al.*, 2003). Die Weinrebe ist eine sehr polyphenolreiche Pflanze, allerdings variiert der Polyphenolgehalt zwischen Fruchtfleisch, Fruchthaut und Kernen sehr stark. Er liegt zwischen 23,8 mg GAE (*gallic acid equivalent*)/g im Fruchtfleisch und 2178,8 mg GAE/g in den Kernen. Auch die Art des Polyphenols ist für spezifische Eigenschaften von großer Bedeutung. So sind deutlich höhere Gehalte an Quercetin (15-37 mg/kg Frischsubstanz) als an Myricetin (bis zu 4,5 mg/kg) in roten Trauben vorhanden (Hollman und Arts, 2000). Ebenfalls beeinflusst wird der Polyphenolgehalt von Sorte, Anbauort und -verfahren, sowie Klima und Extraktionsverfahren (Pastrana-Bonilla *et al.*, 2003). Der maximal extrahierbare Polyphenolgehalt liegt bei 10% im Fruchtfleisch, 60-70% in den Kernen und 28-35% in der Fruchthaut. Dabei liegt der Polyphenolgehalt in Traubenkernen bei 5-8% des Frischgewichts (Arora *et al.*, 2010). Der Polyphenolgehalt in Hopfen variiert ebenfalls stark nach Sorte und Anbauort und liegt durchschnittlich bei 40-140 mg/g. Ein bedeutender Vertreter der

Polyphenole in Hopfenprodukten ist wegen seiner antikanzerogenen Wirkung das Xanthohumol (Bartsch *et al.*, 2002/2003, Biendl 2002/2003), welches 0,1-1% der Hopfentrockenmasse ausmacht. Neben Xanthohumol enthalten Hopfenprodukte ebenfalls einen hohen Anteil an Flavonoiden (Stevens und Page, 2004).

1.2. Entzündung

Eine Entzündung ist die Reaktion des Immunsystems auf eine Gewebsschädigung. Dies geschieht beispielsweise durch das Eindringen von Mikroorganismen in Körpergewebe, indem diese mechanische und chemische Barrieren der Körperoberfläche überwinden. Der Körper versucht, den auslösenden Reiz zu beseitigen und im Anschluss den Heilungsprozess einzuleiten. Entzündungen treten meist örtlich begrenzt auf (Entzündungsherd), können aber Reaktionen des gesamten Organismus hervorrufen. Nach dem Eindringen von Mikroorganismen treffen diese im Gewebe auf Makrophagen und Mastzellen und werden von deren *Toll-like*-Rezeptoren erkannt. Auf diesen Reiz erfolgt die Sekretion zahlreicher Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise Histamin, Prostaglandine und Leukotriene (Medzhitov, 2001; Engelhardt, 2010). Diese sorgen unter anderem für eine Gefäßerweiterung, welche zur Hyperämie und zum Austritt von Plasmabestandteilen in das Gewebe führt. So gelangen auch Proteine des Komplementsystems, welche an der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt sind, zum Ort der Infektion und steigern dort die Phagozytose der Mikroorganismen, indem Spaltprodukte der Komplemente und Chemokine, wie beispielsweise Interleukin 8, neue Granulozyten und Makrophagen anlocken (Baggiolini, 2001). Voraussetzung hierfür ist neben dem chemotaktischen Gradienten die Aktivierung des Endothels. Dies geschieht hauptsächlich durch den Tumornekrosefaktor α (TNF α), welcher von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet wird und am Endothel die Neubildung von Adhäsionsmolekülen bewirkt. Diese ermöglichen die Anhaftung der Granulozyten und Makrophagen an das Endothel und die Einwanderung zwischen den

Endothelzellen in das Gewebe. Der Verbrauch der Granulozyten bedingt die Neubildung von Granulozyten-Vorstufen aus dem Knochenmark, welche an das Blut abgegeben werden. Das vermehrte Auftreten dieser sogenannten stabkernigen Granulozyten dient als diagnostischer Wert von bakteriellen Infektionen (Engelhardt, 2010).

Die beschriebenen Vorgänge lösen neben der Eliminierung der Mikroorganismen die klassischen Entzündungssymptome aus: Rötung, Schwellung, Wärme, Schmerz und Funktionsverlust. Bei schweren bakteriellen Entzündungen kommt es zudem zu einer stärkeren Aktivierung von Makrophagen und Bildung von Zytokinen, welche auch systemisch wirksam werden (Kracht und Saklatvala, 2002). Zytokine sind physiologische Botenstoffe der inflammatorischen Antwort und haben vielfältige Funktionen. Die Hauptmoleküle sind TNF, Interleukine (IL), Interferone und Chemokine (Engelhardt, 2010). IL1, IL6 und TNF α induzieren Fieber, welches das Bakterienwachstum hemmt. IL6 bewirkt zudem in der Leber eine gesteigerte Synthese von Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren und zweier Plasmaproteine (C-reaktives Protein und Serum-Amyloid), welche diagnostisch als Entzündungsmarker dienen.

Die durch eine Entzündung eingeleiteten Reaktionen werden durch antiinflammatorische Mechanismen negativ reguliert. So wird die Zytokinsekretion von Makrophagen durch Glukokortikoide und dem Melanozytenstimulierenden Hormon α gehemmt. Die Ausschüttung dieser Stoffe ist auf die Wirkung von IL1 im Hypothalamus und die Stimulation efferenter Fasern des vegetativen Nervensystems zurückzuführen (Engelhardt, 2010).

Der NF- κ B Signalweg

Um nach einer Infektion eine spezifische Reaktion starten und ablaufen zu lassen, wird im Organismus durch Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen eingeleitet. Der bedeutendste Transkriptionsfaktor im Zusammenhang mit Entzündungsgeschehen ist der *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B). Durch die Einleitung der Genexpression unterschiedlichster Gene, hauptsächlich

Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Akute-Phase-Proteinen, nimmt er eine entscheidende Rolle in der Immunantwort ein (Wegener, 2006; Gutscher, 2002). Eine wichtige Rolle spielt NF- κ B zudem für die Regulation der Zellproliferation und des Zelltodes.

NF- κ B besteht aus einem Dimer fünf strukturell verwandter Proteine RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) und NF- κ B2 (p100/p52), deren gemeinsames strukturelles Merkmal die N-terminale „*Rel Homology*“-Domäne (RHD) ist (Wegener, 2006).

In Zellen sind diese Proteine ständig präsent, werden aber durch die Bindung an inhibitorische Proteine (I κ B) inaktiv im Zytosol zurückgehalten (Wegener, 2006; Gutscher, 2002). Die Aktivierung erfolgt durch zelluläre Stimuli wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Zytokine (z.B. TNF α , IL1B) und Lipopolysaccharide (LPS), aber auch durch bakterielle und virale Antigene, sowie chemisch-physikalische Noxen und reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die Stimuli werden von spezialisierten Oberflächenrezeptoren, den *Toll-Like*-Rezeptoren der Zelle erkannt und lösen daraufhin die Phosphorylierung des I κ B durch die I κ B Kinase aus, welches in Folge im Proteasom abgebaut wird. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B liegt daraufhin frei vor und ist in der Lage, zur Aktivierung seiner Zielgene in den Zellkern zu translozieren (Wegener, 2006). Eine Übersicht des NF- κ B Signalwegs ist in **Abbildung 2** zu sehen.

Zielgene von NF- κ B sind auto-, para- und endokrin wirksame Zytokine wie IL1, TNF α , IL6 und IL8 (Barton und Medzhitov, 2003).

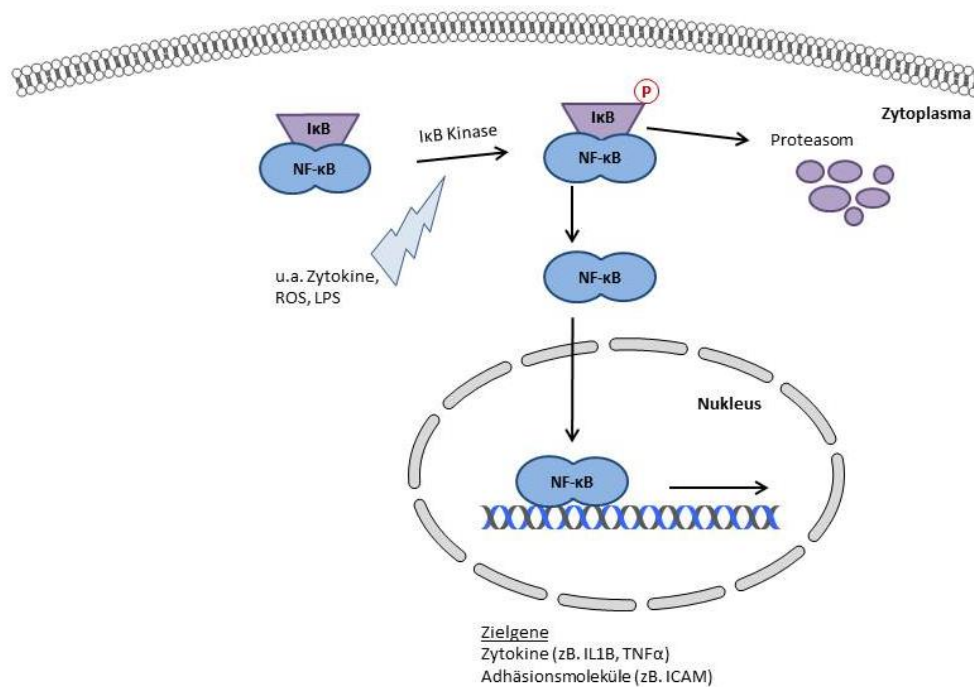


Abbildung 2: Mechanismus der signalinduzierten NF-κB Aktivierung
(modifiziert nach Wegener, 2006)

1.3. Einfluss des Absetzens auf die Entwicklung des Darms von Ferkeln

Der Darm ist ein sehr anpassungsfähiges Gewebe, das je nach Bedarf in seinen Funktionen wandelbar und eines der am stärksten beanspruchten Organe ist. Dies beinhaltet sowohl die Anpassung an veränderte Nahrungsverhältnisse, als auch eine ständige Belastung mit einer Vielzahl an Antigenen. Aus diesem Grund sind wirksame Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung dieser Funktionen von großer Bedeutung (Engelhardt, 2010).

Der Gastrointestinaltrakt hat zwei wesentliche Aufgaben. Die primäre Funktion liegt in der Verdauung von Nahrungsbestandteilen und der Absorption von Nährstoffmolekülen, wozu eine hohe Oberfläche nötig ist. Die sekundäre unabdingbare Aufgabe ist die Abwehrfunktion, da die Darmoberfläche ständig mit einer Vielzahl an pathogenen Mikroorganismen und antigenen Substanzen konfrontiert wird. Die Abwehrfunktion wird einerseits mechanisch von der

Darmmukosa und andererseits durch das darmständige Immunsystem gewährleistet (Gutscher, 2002).

Zur Nährstoffaufnahme ist eine möglichst große Resorptionsfläche nötig, die entsteht, indem sich die Mukosa in zahlreiche Falten legt. Diese Falten werden als „Kerckringsche Falten“ bezeichnet. Eine weitere Oberflächenvergrößerung wird durch fingerförmige Ausstülpungen, Zotten oder Villi *intestinales* genannt, und Einstülpungen an der Zottenbasis, Lieberkühnsche Krypten, erzielt. Die Zotten werden von einer einzelligen Schicht an Epithelzellen bedeckt, welche hauptsächlich aus Saumzellen, schleimbildenden Drüsenzellen (Becherzellen), endokrinen Zellen und Panethschen Zellen bestehen. Die Saumzellen sind der vorherrschende Zelltyp und werden im Dünndarm als Enterozyten, im Dickdarm als Kolonozyten, bezeichnet. Ihre zentrale Aufgabe liegt in der Sekretion von Verdauungsenzymen und der Absorption von Nährstoffen (Wright, 1997). Ein weiterer Zelltyp sind die Becherzellen, welche an der Sekretion von alkalischem Schleim beteiligt sind. Dieser schützt das Epithel vor aggressiven Substanzen und leitet die Regeneration des Epithels durch Stammzellmitose ein (Engelhardt, 2010). Die Panethschen Zellen produzieren Lysozym, die endokrinen Zellen sezernieren eine Vielzahl an Hormonen und Peptiden. Im Vergleich zum Dünndarm befindet sich im Dickdarm eine deutlich höhere Anzahl schleimbildender Becherzellen. Die Abgrenzung gegen das Darmlumen wird durch *tight junctions* realisiert (Gutscher, 2002; Engelhardt, 2010).

Das Absetzen von Jungtieren ist mit großen Veränderungen in der Darmmorphologie und -funktion verbunden. So führt eine Futterumstellung nach dem Absetzen häufig zu einer reduzierten Futteraufnahme, einem Wachstumseinbruch und entzündlichen Darmerkrankungen (Bruininx *et al.*, 2002; Lallès *et al.*, 2004). Auch die intestinale Genexpression von Enzymen, Nährstofftransportern und Wachstumsfaktoren wird durch das Absetzen und die Futterumstellung gehemmt (Ziegler *et al.*, 1995; Ihara *et al.*, 2000). Die zu beobachtenden Effekte des Absetzens auf die Darmmorphologie umfassen Aktivitätsabweichungen von Verdauungsenzymen der Bürstensaummembran sowie Veränderungen der Zotten-Krypten Architektur. Besonders im Dünndarm wird eine Zottenatrophie von 45-70% beobachtet (Pluske *et al.*, 1997). In Studien,

die sich mit dem Absetzen von Jungtieren befassen, wird von vielen Hinweisen auf Entzündungsgeschehen berichtet. So kann eine Steigerung der Genexpression von Zytokinen und von Genen, die an der oxidativen Abwehr und der Immunantwort beteiligt sind, beobachtet werden (Pié *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Die von Pié *et al.* (2004) untersuchten Zytokine IL1B, IL6 und TNF α stellen frühe Mediatoren einer Entzündung dar und beeinflussen den epithelialen Transport und die Permeabilität. Eine modifizierte epitheliale Barriere ermöglicht das Eindringen von pathogenen Mikroorganismen, welche den absetztypischen Durchfall hervorrufen können (Lallès *et al.*, 2004). Ein weiterer Hinweis auf Entzündungsgeschehen im Darm nach dem Absetzen sind eine vermehrte Anzahl an T-Helferzellen und eine erhöhte Expression von Matrix-Metalloproteasen. Diese sind an pathologischen Prozessen mit unerwünschtem Abbau von extrazellulärer Matrix und Basalmembranen beteiligt (McCracken *et al.*, 1999).

1.4. Wirkung von Polyphenolen auf Entzündungsprozesse

Die biologische Aktivität von Polyphenolen im Hinblick auf die menschliche und tierische Gesundheit ist von großem Interesse für die Forschung. Es bestehen bereits umfassende Kenntnisse im Bereich ihrer antioxidativen, kardioprotektiven, antikanzerogenen, antiinflammatorischen und antimikrobiellen Wirkung. Anthocyanidine, Flavonoide und Resveratrol sind die hauptverantwortlichen Moleküle für diese gesundheitlich bedeutsamen Wirkungen von Polyphenolen (Xia *et al.*, 2010).

Die antioxidative Wirkung von Polyphenolen, besonders von Flavonoiden, besteht in der Fähigkeit, eine große Zahl ROS zu neutralisieren und damit unschädlich zu machen (Halliwell *et al.*, 2005). Zu den ROS zählen sowohl Radikale (Superoxid-, Hydroxylradikale u.a.) und Singulett-Sauerstoff, als auch nicht-radikalische Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid (Middleton *et al.*, 2000). ROS entstehen im oxidativen Stoffwechsel der Zellen und besitzen ein hohes Reaktionspotenzial, welches zu Schädigungen wichtiger Zellstrukturen

nach Überlastung der zelleigenen Schutzmechanismen führt. Ebenfalls aktivieren ROS den Transkriptionsfaktor NF- κ B und damit die Expression proinflammatorischer Gene. Das antioxidative Potenzial von Polyphenolen durch das Neutralisieren von ROS ist vier- bis fünffach so hoch wie das von Vitamin C oder E (Shi *et al.*, 2003).

Nach Terra *et al.* (2009) weisen Polyphenole aus Trauben, besonders aus Traubenkernen, signifikante antiinflammatorische Effekte bei Ratten, Mäusen und Menschen auf. Die entscheidenden Moleküle für die antiinflammatorischen Reaktionen sind Flavonole (Morin, Quercetin, Rutin, Kaempferol, Myricetin, Isorhamnetin, Fisetin), Flavanole (Catechin, Gallocatechin, Epicatechin, Epigallocatechingallat) und Procyanidine (Proanthocyanidine, welche nur aus Catechin- bzw. Epicatechin-Einheiten aufgebaut sind) (Terra *et al.*, 2009). Die Untersuchung des Mechanismus der Procyanidine zeigte, dass diese entzündungsfördernde Faktoren inhibieren. Dies geschieht hauptsächlich über Immunmodulation, aber auch über antioxidative Reaktionen (Li *et al.*, 2001). Ein grundlegender Mechanismus hierbei ist die Hemmung bzw. Reduzierung der Genexpression von Zytokinen (Terra *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2001). Terra *et al.* (2009) berichten ebenfalls von einer Hemmung des Anstiegs von IL6 und TNF α im mesenterialen Fettgewebe und schließen daraus auf eine Entzündungshemmung durch Procyanidine der Trauben auf mRNA-Ebene.

Neben ihrer antioxidativen und antiinflammatorischen Wirkung haben Polyphenole auch Effekte auf die Genexpression und Signaltransduktion von Enzymen. Somit sind sie in der Lage in Schlüsselreaktionen des Metabolismus einzugreifen. Eine umfangreiche Übersicht involvierter Enzyme wurde von Middleton *et al.* (2000) veröffentlicht. So hemmen Polyphenole aus Traubenkernen Enzyme, welche die Freisetzung von Histamin katalysieren, das mitunter für die Auslösung von Entzündungsprozessen und Allergiereaktionen verantwortlich ist. Ebenfalls sind sie an der Inhibierung von Enzymsystemen beteiligt, die für die Entstehung von freien Radikalen und damit für die Einleitung von Entzündungsreaktionen verantwortlich sind. Besonders Procyanidine greifen in die Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen wie Histamin ein (Amella, 1985). Viele der antiinflammatorischen Effekte beruhen

allerdings auf der Beeinflussung des Arachidonsäuremetabolismus, bzw. der Eicosanoidsynthese. Flavonoide können als Inhibitoren der Lipoxy- und Cyclooxygenasen die Produktion der Entzündungsmediatoren (Leukotriene, Thromboxane und Prostaglandine) hemmen. Auch hierbei gibt es artspezifische Wirkungen. So gelten Flavonole wie Quercetin mit drei oder mehr Hydroxylgruppen als selektive Lipoxygenasehemmer, während Verbindungen mit weniger OH-Gruppen selektiv die Carboxylase hemmen (Middleton *et al.*, 2000). Wie Jang *et al.* (1997) aufzeigen konnten, vermittelt besonders Resveratrol antiinflammatorische Effekte und inhibiert die Funktion der Cyclooxygenasen und Hydroperoxidasen.

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Flavonoiden ist die Interaktion mit Enzymen des Phase I Metabolismus, den Cytochrom P450-Oxygenasen (CYP). Eine Konjugation und anschließende Ausscheidung endogener und exogener Verbindungen wird erst durch die Hydroxylierung der CYP ermöglicht. Eine Hemmung oder Induktion dieser Enzyme in Leber- und Dünndarmepithelzellen durch Flavonoide hat direkte Auswirkung auf die Bioverfügbarkeit von Xenobiotika. Dabei nehmen Flavonoide nicht nur Einfluss auf die Enzymaktivität, sondern auch auf die Gentranskription. Die durch Polyphenole ausgelösten Wirkungen können dabei sehr unterschiedlich sein. So wirkt Kaempferol beispielsweise als Inhibitor, während Quercetin als Stimulator auf die Transkription der gleichen Isoform wirkt. Nach Ciolino *et al.* (1999) haben jedoch Flavonole (u.a. Quercetin) und Flavone allgemein einen stark inhibitorischen Effekt auf CYP, was eine verminderte Ausscheidung von Xenobiotika bedingt. Weitere Studien zeigen eine flavonoidinduzierte Inhibierung auch von CYP3A4 und des *Multidrug Resistance* Gens (Cermak, 2008). Der Eingriff in Signaltransduktion und Genexpression durch Modulation von Enzymen und Transkriptionsfaktoren zieht nachhaltige Veränderungen grundlegender zellulärer Mechanismen wie Proliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung und Zellalterung nach sich (Williams *et al.*, 2004). Quercetin besitzt ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Sen und Packer, 1996).

Die beschriebenen Effekte sind nur einige Beispiele aus einer Vielzahl an komplexen Wirkmechanismen. Sie lassen erkennen, dass Polyphenole ein zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig erforschtes hohes Potenzial zur Beeinflussung von Stoffwechselfvorgängen besitzen.

1.5. Einfluss von Polyphenolen auf den Mineralstoffhaushalt

Studien an Menschen und Tieren haben gezeigt, dass Polyphenole grundsätzlich eine Vielzahl an positiven Effekten auf die Gesundheit haben. Dies sind unter anderem die oben beschriebenen entzündungshemmenden und antioxidativen Wirkungen. Dennoch muss die Supplementierung von polyphenolreichen Produkten auf Grund des hohen Anteils an Proanthocyanidinen kritisch betrachtet werden. Proanthocyanidine (auch Tannine genannt) sind komplexe phenolische Komponenten mit einer relativen molaren Masse von 500-3000 Dalton, welche in Getreide, Gemüse, Obst und Kräutern vorkommen. Tannine werden auf Grund ihres chemischen Charakters in kondensierte und hydrolysierbare Tannine eingeteilt. Kondensierte Tannine sind Polymere von flavonoiden Phenolen wie beispielsweise Catechin, Epicatechin und Anthocyanen. Hydrolysierbare Tannine bestehen aus Gallussäure verestert mit der Hydroxylgruppe von Glukose. Aus Studien an wachsenden Tieren geht hervor, dass kondensierte Tannine für eine reduzierte Futteraufnahme, Wachstumsrate und Futtereffizienz verantwortlich sind. Sie besitzen weiterhin eine antinutritive Wirkung, da sie unlösliche Komplexe mit divalenten Metallionen (besonders Eisen) und Proteinen bilden. Die komplexierten Nährstoffe stehen dann dem Organismus für die Absorption und Metabolisierung nicht zur Verfügung (Afsana *et al.*, 2004; Gaffney *et al.*, 2004). Somit reduzieren Tannine die scheinbare Verdaulichkeit von Proteinen, Aminosäuren und zu einem geringeren Grade auch von Energie (Jansman, 1993). Studien am Menschen zeigen, dass Rotwein (Cook *et al.*, 1995) und polyphenolreiches Gemüse die Eisenabsorption inhibieren (Gillooly *et al.*, 1983). Auch beim Schwein und Broiler zeigen Untersuchungen, dass eine Tanninsupplementierung die Absorption von

Eisen, Calcium, Phosphor und Magnesium signifikant hemmt (Hassan *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2010). Aus diesem Grund muss bei einer ganzheitlichen Betrachtung von Polyphenolsupplementierungen neben den positiven Auswirkungen auf gesundheitliche Aspekte auch die möglicherweise antinutritiven Effekte beachtet werden.

2. Zielstellung

Das Absetzen von Jungtieren wird oftmals von entzündlichen Darmerkrankungen, intestinalen Dysfunktionen und einer Zottenatrophie begleitet. Um diesen absetzbedingten Erkrankungen vorzubeugen und den Tieren die Zeit nach dem Absetzen zu erleichtern, steht der Einsatz pflanzlicher Produkte im Fokus aktueller Studien.

2.1. Untersuchung zu den Wirkungen polyphenolreicher Pflanzenprodukte auf das Entzündungsgeschehen im Darm, die Nährstoffverdaulichkeit und die fäkale Mikroflora von abgesetzten Ferkeln

In einer eigenen vorhergehenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Supplementierung eines polyphenolreichen Futterzusatzes positive Effekte auf die Wachstumsleistung hat (Gessner *et al.*, 2013). Neben einer verbesserten Futtermittelverwertung konnte ein vermindertes Entzündungsgeschehen im Duodenum beobachtet werden. Dieser antiinflammatorische Effekt durch die Verfütterung von Polyphenolen wurde auch bei anderen Nutztierspezies beobachtet (Viveros *et al.*, 2011). Viveros *et al.* (2011) berichten neben einer entzündungshemmenden Wirkung bei Broilern von einer Veränderung der Mikroflora durch die Verfütterung von Traubenextrakt. Bislang beschränken sich die Untersuchungen zur Genexpression proinflammatorischer und antioxidativer Zielgene meist auf einen Darmabschnitt, weshalb in **Studie 1** der Effekt polyphenolreicher Pflanzenprodukte auf zwei Dünndarmabschnitte (Duodenum, Ileum), sowie auf einen Dickdarmabschnitt (*Colon ascendens*) ausgeweitet werden soll. Um zu klären, ob die zuvor beobachtete verbesserte Futtermittelverwertung auf eine gesteigerte Nährstoffverdaulichkeit zurückzuführen ist, wurde in Studie 1 der Ration Titandioxid als unverdaulicher Marker zugesetzt und die scheinbare Verdaulichkeit der Rohnährstoffe bestimmt. Um eine mögliche Veränderung der Mikroflora durch die polyphenolreiche Fütterung zu

untersuchen, wurden Kotproben mittels absolut quantitativer PCR auf ihre bakterielle Zusammensetzung hin untersucht.

Weitere Einzelheiten zur Versuchsdurchführung, Material und Methodik sowie die ausführliche Darstellung und Diskussion der Ergebnisse dieser Studie sind ersichtlich in:

Studie 1

Fiesel A, Gessner DK, Most E, Eder K (2014) Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs. *BMC Veterinary Research* 10: 196.

2.2. Untersuchung zu den Wirkungen polyphenolreicher Pflanzenprodukte auf den Mineralstoffhaushalt von Ferkeln

Die Ergebnisse von Studie 1 belegen die positiven Effekte polyphenolreicher Pflanzenprodukte auf die Gesundheit von Ferkeln. Um allerdings ein möglichst umfassendes Bild der Auswirkungen zu gewinnen, müssen auch die eventuell auftretenden negativen Effekte von Tanninen auf den Mineralstoffhaushalt untersucht werden. In **Studie 2** soll deshalb der Effekt der polyphenolreichen Pflanzenprodukte (Traubentrester und Hopfentreber) aus Studie 1 auf den Status von Eisen (Fe), Zink (Zn) und Kupfer (Cu) untersucht werden, um einen möglichen Mineralstoffmangel der Ferkel auf Grund der Komplexbildung durch Tannine aufzudecken. Die untersuchten Mineralstoffe wurden den Tieren in bedarfsdeckenden, praxisnahen Mengen gefüttert. Um den Status von Fe, Zn und Cu zu bewerten, wurden die Konzentrationen der jeweiligen Elemente in Plasma und Leber gemessen. Zusätzlich wurde im Plasma die Totale Eisenbindungskapazität und die Transferrinsättigung als Marker der Eisenversorgung ermittelt.

Weitere Einzelheiten zur Versuchsdurchführung, Material und Methodik sowie die ausführliche Darstellung und Diskussion der Ergebnisse dieser Studie sind ersichtlich in:

Studie 2

Fiesel A, Ehrmann M, Gessner DK, Most E, Eder K (2015) Effects of polyphenol-rich plant products from grape or hop as feed supplements on iron, zinc and copper status in piglets. *Archives of Animal Nutrition* DOI: 10.1080/1745039X.2015.1057065. Reproduced with permission of Taylor & Francis Online.

3. Originalarbeiten

3.1. Wirkungen polyphenolreicher Pflanzenprodukte auf das Entzündungsgeschehen im Darm, der Nährstoffverdaulichkeit und der Mikroflora im Darm von Ferkeln

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs

Anja Fiesel, Denise K Gessner, Erika Most and Klaus Eder*

Abstract

Background: Feeding polyphenol-rich plant products has been shown to increase the gain:feed ratio in growing pigs. The reason for this finding has not yet been elucidated. In order to find the reasons for an increase of the gain:feed ratio, this study investigated the effect of two polyphenol-rich dietary supplements, grape seed and grape marc meal extract (GSGME) or spent hops (SH), on gut morphology, apparent digestibility of nutrients, microbial composition in faeces and the expression of pro-inflammatory genes in the intestine of pigs.

Results: Pigs fed GSGME or SH showed an improved gain:feed ratio in comparison to the control group ($P < 0.10$ for GSGME, $P < 0.05$ for SH). Villus height:crypt depth ratio in duodenum and jejunum as well as apparent total tract digestibility of nutrients were unchanged in the groups receiving GSGME or SH in comparison to the control group. However, the groups receiving GSGME or SH revealed an increased faecal pH value, lower levels of volatile fatty acids and lower counts of *Streptococcus* spp. and *Clostridium* Cluster XIVa in the faecal microbiota ($P < 0.05$). Moreover, both treatment groups had a lower expression of various pro-inflammatory genes in duodenum, ileum and colon than the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: The present study suggests that dietary plant products rich in polyphenols are able to improve the gain:feed ratio in growing pigs. It is assumed that an alteration in the microbial composition and anti-inflammatory effects of the polyphenol-rich plant products in the intestine might contribute to this effect.

Keywords: Polyphenol, Pig, Intestine, Microbiota

Background

Many studies in humans and rodents have shown that dietary polyphenols exert a broad spectrum of beneficial effects with respect to health issues including anti-oxidative or anti-inflammatory properties [1-3]. In contrast, effects of dietary polyphenols on health-related aspects in farm animals have been scarcely investigated so far. In a recent study, we have observed that feeding grape seed and grape marc meal extract (GSGME), a polyphenol-rich by-product of wine or juice processing, improves the gain:feed ratio in weaned pigs [4]. In that study, pigs fed GSGME as a

supplement showed also a lower expression of various pro-inflammatory genes and a higher villus height:crypt depth ratio in the duodenum than control pigs. These findings suggest that GSGME as a feed supplement inhibited pro-inflammatory conditions and had a beneficial effect on the absorptive function of the intestine as a result of an increased absorptive surface. However, analyses performed in that study were restricted to duodenum. Thus, it remains unclear whether similar effects of the polyphenol-rich supplement are also occurring in other parts of the digestive tract. Moreover, it is unclear whether these observations are the main reasons for an improvement of feed conversion ratio by feeding GSGME observed in that study. While less is known about the effects of polyphenol-rich plant products in pigs, studies in broilers have shown that plants

* Correspondence: klaus.eder@ernaehrung.uni-giessen.de
Institute of Animal Nutrition and Nutrition Physiology,
Justus-Liebig-Universität Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen,
Germany

rich in polyphenols can also influence the microbial composition in a beneficial manner [5]. However, there are also some studies in broilers, mice and rats which exerted adverse effects of polyphenols on nutrient transport in intestinal cells [6-8] and on apparent total tract digestibility of nutrients [8,9]. Thus, the aim of the present study was to investigate the hypothesis that feeding plant products rich in polyphenols not only influences the expression of pro-inflammatory genes and the villus height:crypt depth ratio in the intestine of pigs but might also influence the microbial composition and the expression of nutrient transporters in the intestine and the digestibility of nutrients. It is well known, that the effects of polyphenols on bacterial growth and metabolism vary according to their chemical structure and to their composition in natural products [2]. While a positive effect of GSGME on feed efficiency and health related issues in the small intestine of pigs has been already shown, it is unclear whether plant products with a polyphenol spectrum different from that of grape products exert similar beneficial effects in pigs. In order to address that question, pigs were fed diets supplemented with either grape marc meal extract (GSGME) or spent hops (SH), two inexpensive natural polyphenol-rich sources with a broad, but different, spectrum of native polyphenols.

Results

Growth performance of the pigs

There were no differences in average daily gains, daily feed intakes and final body weights between the three groups of pigs (Table 1). However, the SH group showed an improvement of the gain:feed ratio in comparison to the

Table 1 Growth performance data and apparent total tract nutrient digestibility of crude nutrients in weaned pigs fed a control diet or a diet supplemented with 1% grape seed and grape marc meal extract (GSGME) or 1% spent hops (SH)

	Control	GSGME	SH
<i>Growth performance data</i>			
Initial body weight (kg)	9.8 ± 0.5	10.0 ± 0.5	9.9 ± 0.6
Final body weight (kg)	23.7 ± 2.6	24.1 ± 2.1	23.4 ± 2.0
Daily feed intake (g) ¹	828 ± 115	789 ± 85	762 ± 53
Daily body weight gain (g)	497 ± 63	509 ± 74	497 ± 77
Gain:feed (g/kg) ¹	579 ± 68	620 ± 53 [#]	638 ± 83 [*]
<i>Apparent total tract digestibility (%)</i>			
Crude protein	81.9 ± 3.5	81.0 ± 2.3	78.0 ± 1.4 [*]
Crude fiber	55.1 ± 11.8	51.4 ± 7.6	45.1 ± 8.7 [*]
Crude fat	65.0 ± 3.4	70.0 ± 3.0 [*]	66.2 ± 3.3
N-free extract	90.1 ± 2.4	89.9 ± 2.8	89.4 ± 1.1
Organic matter	80.3 ± 2.5	80.1 ± 2.3	78.7 ± 1.5 [#]

Results are shown as mean ± SD (n = 16/group). ¹Means of two pigs per pen were averaged. ^{*}Significantly different from control ($P < 0.05$). [#]Tended to differ from control ($0.05 \leq P \leq 0.10$).

control group ($P < 0.05$, Table 1). In the GSGME group, there was a tendency towards an increased gain:feed ratio in comparison to the control group ($P \leq 0.10$, Table 1).

Nutrient digestibility and relative mRNA abundance of nutrient transporters in duodenum and jejunum

In order to investigate the effect of the polyphenol-rich supplements on nutrient digestibility, apparent total tract digestibilities of crude protein, crude fat, crude fiber and N-free extracts were determined. In the GSGME group, apparent total tract digestibilities of crude protein, crude fiber, N-free extracts and total organic matter were not different from the control group. Apparent total tract digestibility of crude fat increased in comparison to the control group ($P < 0.05$, Table 1). The SH group showed a decrease in the apparent total tract digestibility of crude protein and crude fiber in comparison to the control group ($P < 0.05$, Table 1). The apparent total tract digestibility of organic matter showed a tendency towards a reduction in the SH group compared to the control group ($P < 0.10$, Table 1).

To characterise the effect of the polyphenol-rich supplements on nutrient transporters in the small intestine, relative mRNA abundances of *SLC5A1* (encoding sodium glucose transporter 1; SGLT1), *SLC2A2* and *SLC2A5* (encoding glucose transporter 2 and 5; GLUT2, GLUT5) and *SLC15A1* (encoding intestinal peptide transporter 1; PEPT1) in duodenal and jejunal mucosa were determined. In duodenum, there were no differences in the relative mRNA abundances of the nutrient transporters between the two experimental groups and the control group, with the only exception of a reduced mRNA abundance of *SLC2A5* in the GSGME group ($P < 0.05$, Table 2). In contrast, in jejunum there was a significant down-regulation of various nutrient transporters in the GSGME and SH groups. In the GSGME group, mRNA abundances of *SLC2A2* ($P < 0.10$), *SLC2A5* and *SLC15A1* ($P < 0.05$) in jejunum were reduced in comparison to the control group (Table 2). In the SH group, mRNA abundances of the glucose transporters considered (*SLC5A1*, *SLC2A2*, *SLC2A5*) in jejunum were reduced in comparison to the control group ($P < 0.05$, Table 2).

Gut morphology

To address potential effects of the polyphenol-rich plant products on absorptive capacity by a changed villus height:crypt depth ratio, histological sections from duodenum and jejunum were analysed as these parts of the small intestine are the main sites of absorption of nutrients and histological changes can be expected in these parts of the small intestine [4]. There was generally less effect of the treatments on gut morphology. While there was no alteration of villus height and crypt depth in both segments of the small intestine in pigs of the GSGME

Table 2 Normalised relative mRNA abundances of nutrient transporters and gut morphology (villus height, crypt depth, villus height: crypt depth ratio) in duodenum and jejunum of weaned pigs fed a control diet or a diet supplemented with 1% grape seed and grape marc meal extract (GSGME) or 1% spent hops (SH)

	Control	GSGME	SH
<i>Relative mRNA abundance of nutrient transporters¹</i>			
Duodenum			
<i>SLC5A1</i>	1.00 ± 0.30	0.81 ± 0.26	0.96 ± 0.19
<i>SLC2A2</i>	1.00 ± 0.29	0.93 ± 0.22	1.27 ± 0.34 [#]
<i>SLC2A5</i>	1.00 ± 0.42	0.47 ± 0.34 [*]	0.73 ± 0.27 [#]
<i>SLC15A1</i>	1.00 ± 0.44	0.97 ± 0.60	1.03 ± 0.56
Jejunum			
<i>SLC5A1</i>	1.00 ± 0.38	0.78 ± 0.45	0.62 ± 0.29 [*]
<i>SLC2A2</i>	1.00 ± 0.49	0.67 ± 0.48 [#]	0.54 ± 0.29 [*]
<i>SLC2A5</i>	1.00 ± 0.63	0.47 ± 0.28 [*]	0.46 ± 0.43 [*]
<i>SLC15A1</i>	1.00 ± 0.51	0.53 ± 0.29 [*]	0.69 ± 0.65
<i>Gut morphology²</i>			
Duodenum			
Villus height (µm)	503 ± 29	520 ± 73	562 ± 81
Crypt depth (µm)	311 ± 51	326 ± 38	354 ± 76
Villus height: crypt depth ratio	1.65 ± 0.27	1.56 ± 0.12	1.58 ± 0.25
Jejunum			
Villus height (µm)	471 ± 94	415 ± 33	425 ± 75
Crypt depth (µm)	277 ± 44	236 ± 42	210 ± 34 [*]
Villus height: crypt depth ratio	1.74 ± 0.27	1.86 ± 0.29	1.98 ± 0.33

SLC2A2 = solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) 2; *SLC2A5* = solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) 5; *SLC5A1* = sodium-glucose transporter 1; *SLC15A1* = solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1. Results are shown as mean ± SD (¹n = 16/group; ²n = 6/group) expressed as fold of relative mRNA abundance of the control group. ^{*}Significantly different from control ($P < 0.05$). [#]Tended to differ from control ($0.05 \leq P \leq 0.10$).

group in comparison to the control group, pigs of the SH group showed a lower crypt depth in jejunum ($P < 0.05$, Table 2). The villus height: crypt depth ratio in both intestinal segments remained unchanged in both experimental groups in comparison to the control group (Table 2).

Relative mRNA abundances of pro-inflammatory genes in duodenum, ileum and colon

To investigate the hypothesis that supplementation of polyphenol-rich plant products exert anti-inflammatory effects in the intestine, mRNA abundances of various pro-inflammatory genes (*CCL2*, *ICAM1*, *IL1B*, *IL8*, *TNF*) in duodenal mucosa were determined. In order to clarify whether active components of the polyphenol-rich plant products are still available and active in the posterior sections of the intestine, we additionally measured mRNA abundances of these genes in mucosa samples from ileum and colon. Both experimental groups showed significantly

lower mRNA abundances of several pro-inflammatory genes in mucosa samples of the three parts of the intestine than the control group. In the GSGME group, there was a reduction of mRNA concentrations of *ICAM1* and *IL8* in duodenum, of *ICAM1*, *IL1B*, *IL8* and *TNF* in ileum and of *ICAM1*, *IL1B*, *IL8* and *TNF* in colon in comparison to the control group ($P < 0.05$, Figure 1). In the SH group, mRNA concentrations of *IL1B* and *IL8* in duodenum, of *IL1B* and *IL8* in ileum, and of *IL1B* and *TNF* in colon were lower than in the control group ($P < 0.05$, Figure 1).

Microbial profile and fermentation characteristics

In order to test the hypothesis that supplementation of polyphenol-rich plant products influences the microbial composition, gene copy numbers of *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. and *Clostridium* Cluster XIVa in faecal samples were determined. Gene copy numbers of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. were not different between the two experimental groups and the control group (Figure 2). However, the GSGME group had a lower number of *Streptococcus* spp. in faecal samples than the control group ($P < 0.10$, Figure 2). The SH group had a lower gene copy number of *Streptococcus* spp. and *Clostridium* Cluster XIVa than the control group ($P < 0.05$, Figure 2).

The GSGME group had a lower concentration of total volatile fatty acids (VFA, $P < 0.05$) in faeces than the control group, due to decreases in the concentrations of acetic ($P < 0.10$), propionic ($P < 0.05$) and valeric acid ($P < 0.10$, Table 3). The SH group showed a tendency towards a reduction of total VFA in faeces compared to the control group ($P < 0.10$, Table 3), due to decreases in the concentrations of propionic ($P < 0.10$), butyric ($P < 0.05$) and valeric acid ($P < 0.10$, Table 3). In line with reduced concentrations of VFA, both experimental groups showed increased faecal pH values in comparison to the control group ($P < 0.05$, Table 3).

Discussion

Many studies in humans and rodents have shown that dietary polyphenols exert a range of beneficial effects with respect to health issues [2,3,10]. In contrast, potential effects of polyphenols in farm animals on health related aspects have been scarcely investigated so far. In the present study, growing pigs were fed diets supplemented with either GSGME or SH as dietary supplements rich in polyphenols. GSGME is a by-product of wine and juice processing with gallic acid, catechin, epigallocatechin-3-gallate, epigallocatechin, epicatechin-3-gallate, epicatechin, proanthocyanidins, and anthocyanins as most abundant polyphenols [11]. Hop products are rich in gallic acid, chlorogenic acid, epicatechin, rutin, hyperoside, kaempferol-3-resveratrol, isoquercitrin, xanthohumol and proanthocyanidins [12].

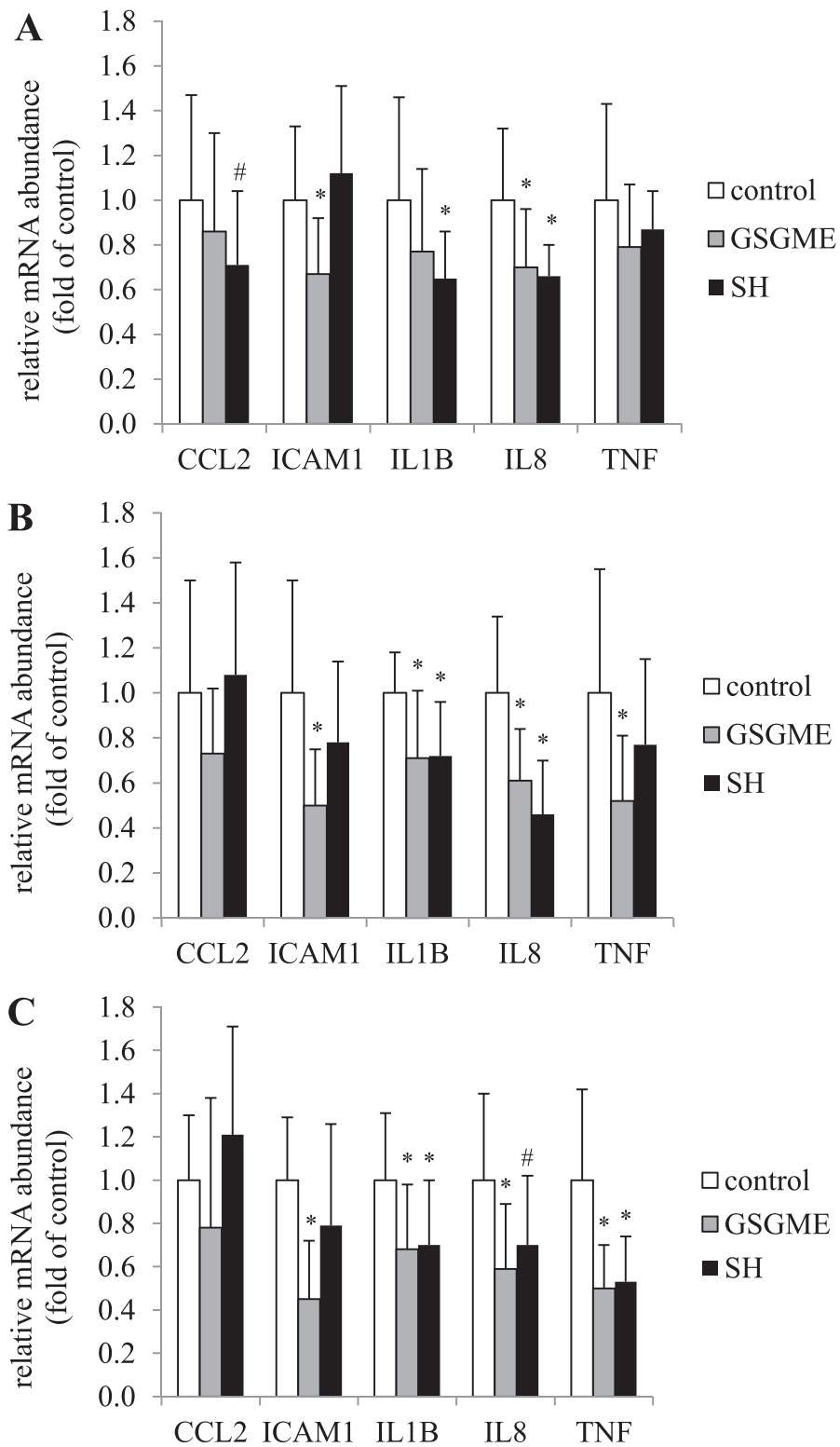


Figure 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 1 Relative mRNA abundances of *ICAM1*, *IL1B*, *IL8*, *CCL2* and *TNF* in the mucosa of duodenum (A), ileum (B) and colon *ascendens* C of pigs fed the control diet or diets supplemented with 1% grape seed and grape marc meal extract (GSGME) or 1% spent hops (SH). Bars represent mean \pm SD of 16 pigs per group and are expressed as fold of relative mRNA abundances of the control group. *Significantly different from control ($P < 0.05$). #Tended to differ from control ($0.05 \leq P \leq 0.10$). *ICAM1*, intercellular adhesion molecule; *CCL2*, chemokine (C-C motif) ligand 2; *TNF*, tumor necrosis factor; *IL8*, interleukin 8; *IL1B*, interleukin 1 beta.

The present study confirms a recent study showing that plant products rich in polyphenols are effective in increasing the gain:feed ratio in growing pigs. In the present study, pigs supplemented with SH exerted a significant improvement of the gain:feed ratio by 10% ($P < 0.05$), while pigs supplemented with GSGME showed a tendency towards an improved gain:feed ratio (+7%, $P < 0.10$). Our recent study in pigs found that supplementation of GSGME causes an increase in the villus height: crypt depth ratio in the duodenum [4]. In agreement with that finding, Viveros *et al.* [5] observed an improved gain:feed ratio and an increased villus height: crypt depth ratio in jejunum in broilers fed a diet supplemented with polyphenol-rich grape pomace extract. Based on the finding of an increased villus height: crypt depth ratio, it was assumed that the plant supplements rich in polyphenols might improve the digestibility of nutrients due to an increased absorptive surface of the intestine. However, in disagreement with our recent pig study and the broiler study of Viveros *et al.* [5], feeding both plant extracts did not influence the villus height: crypt depth ratio in duodenum or jejunum in this study. Interestingly, another study in weaned pigs observed

that feeding polyphenol-rich red-wine pomace exerts even an inhibitory effect on jejunal villi growth [13]. These findings suggest that polyphenol-rich plant products do not have a consistent effect on the gut morphology. It rather seems that the effects of polyphenol-rich plant products on villi heights and crypt depths depend on various factors, probably including the concentrations of diverse polyphenols. In addition, the plant products did not improve the apparent total tract digestibility of the crude nutrients and organic matter. Indeed, the digestibilities of crude protein and crude fiber were even slightly reduced in pigs fed SH as a supplement. The finding of a decreased apparent digestibility of protein is in agreement with a recent study in broilers which found a decreased apparent ileal digestibility of protein after feeding grape seed extracts [6]. In overall, these findings indicate that the improved gain:feed ratio by feeding either GSGME or SH was not due to alterations in gut morphology (villus height: crypt depth ratio) or an increased digestibility of nutrients from the diet.

Several studies have shown that dietary polyphenols are able to influence nutrient uptake into intestinal cells. For instance, flavonoid glycosides and non-glycosylated

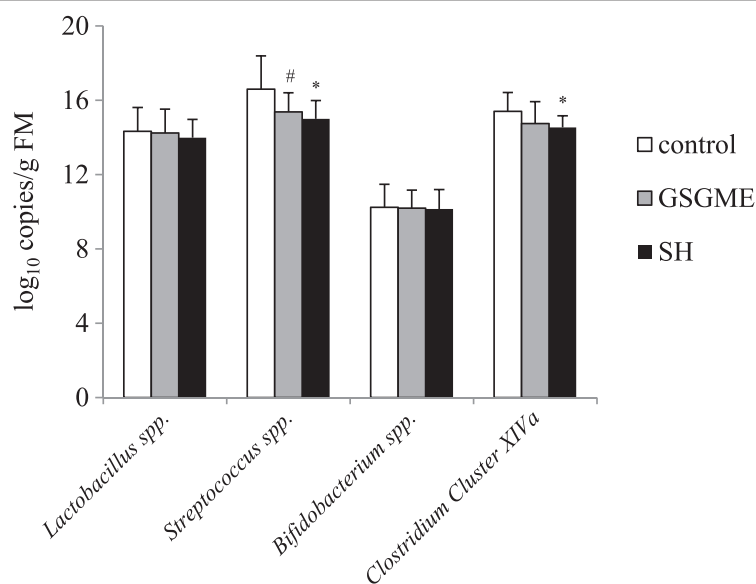


Figure 2 Occurrence of bacterial groups in faecal samples of pigs fed the control diet or diets supplemented with 1% grape seed and grape marc meal extract (GSGME) or 1% spent hops (SH), determined by qPCR (log₁₀ 16S rRNA gene copy number/g fresh matter). Bars represent mean \pm SD of 16 pigs per group. *Significantly different from control ($P < 0.05$). #Tended to differ from control ($0.05 \leq P \leq 0.10$).

Table 3 Concentrations of volatile fatty acids (VFA) and pH value in faeces samples of weaned pigs fed a control diet or a diet supplemented with 1% grape seed and grape marc meal extract (GSGME) or 1% spent hops (SH)

	Control	GSGME	SH
<i>VFA (μmol/g digesta)</i>			
Total VFA	581 ± 111	497 ± 90*	524 ± 41#
Acetic acid	332 ± 75	282 ± 64#	310 ± 31
Propionic acid	141 ± 33	115 ± 21*	120 ± 16#
Isobutyric acid	10.4 ± 2.5	10.6 ± 2.3	11.8 ± 2.3
Butyric acid	66.1 ± 9.6	61.9 ± 18.5	53.5 ± 13.0*
Isovaleric acid	12.9 ± 3.3	13.2 ± 3.9	13.5 ± 2.2
Valeric acid	17.7 ± 4.4	14.2 ± 3.7#	14.8 ± 3.8#
Faecal pH value	5.9 ± 0.1	6.2 ± 0.2*	6.2 ± 0.3*

Results are shown as mean ± SD (n = 16/group). *Significantly different from control (P < 0.05). #Tended to differ from control (0.05 ≤ P ≤ 0.10).

polyphenols including epigallocatechingallate, epigallocatechin or epicatechingallate have been shown to decrease glucose uptake in Caco-2 cells [14]. Other studies observed an interaction of polyphenols with SGLT1 [15,16] or GLUT2 [17] in a non-competitive manner, associated with a reduced intestinal uptake of glucose. Based on these findings, it has been suggested that polyphenols might act as potent inhibitors of glucose absorption, and thus might be promising agents in the treatment of obesity [17]. Indeed, human intervention studies showed a reduction in glycemic index after ingestion of red wine, sugar cane extract, coffee, berries or apple juice, indicating that polyphenols present in these foods might have slowed down the absorption of glucose [18]. In the present study, we observed that feeding GSGME and SH leads to a strong down-regulation of SGLT1, GLUT2, GLUT5 and PEPT1 at the transcriptional level in the jejunum. SGLT1 is considered as the apical intestinal transporter responsible for the majority of luminal glucose transport across intestinal epithelium [19]. GLUT2, which is located at the basolateral membrane of the enterocyte, is a facilitative transporter for glucose and fructose which operates with low affinity and high capacity [20]. GLUT5 is a low affinity and high capacity transporter specific for fructose, located at both, the apical and the basolateral site of the enterocyte [20]. PEPT1 is an apical electrogenic proton/peptide symporter which is responsible for the absorption of the majority of amino acids as di- or tripeptides [21]. We are not aware of any other study dealing with the effects of polyphenols on the expression of nutrient transporters in intestinal cells. However, our study suggests that a reduced expression of the nutrient transporters involved in transport of glucose could contribute to a reduction of the glycemic index observed in humans after ingestion of sources rich in polyphenols [18]. In a similar manner, a reduced expression of PEPT1 in pigs fed polyphenol-rich plant

products could cause a reduction of the absorption of di- and tripeptides. Irrespective of this, we observed that the apparent total tract digestibility of N-free extracts, the fraction consisting mainly of starch, was not diminished by supplementation of the polyphenol-rich plant products. This suggests that the reduction of glucose transporters was uncritical with respect to total tract digestibility of glucose. On the other hand, a down-regulation of PEPT1 could have contributed to the slightly decreased apparent digestibility of dietary protein observed in the pigs fed the diet supplemented with SH. However, we are aware that determination of total tract digestibility is confounded by losses of nutrients due to microbial activity in colon. Thus, determination of praecaecal digestibility of nutrients would provide a more reliable picture of the effect of polyphenols on the digestibility of nutrients in the small intestine.

Previous studies in rats and broilers have shown that polyphenols are able to cause a shift in the microbial population in the intestinal tract [5,22,23]. In a rat model of colon cancer administration of polyphenols from red wine caused a decrease of *Propionibacteria*, *Bacteroides* and *Clostridia* and an increase of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in colonic content [23]. In a study with broilers feeding grape pomace extract or grape seed extract increased counts of beneficial ileal bacteria populations such as *Enterococcus* and decreased counts of potential pathogens such as *Clostridium* were observed [5]. Moreover, *in vitro* studies demonstrated antibacterial activities of polyphenols from grape seed extract or phenolic compounds from different wines against different bacteria, including *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Streptococcus enteritidis* [24-26]. In agreement with those findings, we observed for the first time that plant products rich in polyphenols may be able to influence the microbial population in the intestine of pigs. Our analyses in faecal samples showed a reduction of *Streptococcus* spp. and *Clostridium* Cluster XIVa in pigs fed polyphenol-rich plant products, a finding which is similar with that of the broiler study of Viveros et al. [5]. While *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* are considered beneficial for intestinal function [27,28], *Clostridia* have detrimental effects in intestinal mucosa [29,30]. The findings of a reduced concentration of total volatile fatty acids and an increased pH value in faecal samples of pigs fed the plant products rich in polyphenols indicate that there was generally a reduced microbial fermentation in these pigs which confirms the view that polyphenols could have an antimicrobial effect.

In agreement with our recent study [4], we observed that feeding polyphenol-rich plant products cause a down-regulation of various pro-inflammatory cytokines, including *ICAM1*, *IL1B*, *IL8* and *TNF* in the mucosa of various segments of the intestine. Noteworthy, these genes are regulated by nuclear factor κB (NF-κB), the master regulator of inflammation [31-33]. Several *in vitro* or *in vivo* studies,

mainly performed in rodent models of acute or chronic colitis have already shown that dietary polyphenols are able to act anti-inflammatory by inhibiting transactivation of NF- κ B [1,4,34,35]. Although a direct inhibitory effect of polyphenols on the activity of NF- κ B has been well established, it is possible that the anti-inflammatory effects observed in this study could be - at least in part - due to antimicrobial effects of the polyphenol-rich plant products. The finding that anti-inflammatory effects were observed not only in duodenum but also in ileum and colon indicates that the active components of the polyphenol-rich plant products were not completely absorbed or degraded in the anterior part of the small intestine but were at least in part available and active in the posterior parts of the intestine.

It has been shown that mucosa-associated bacteria can trigger pro-inflammatory gene transcription by invading epithelial cells, interacting with specific receptors (e.g. toll-like receptors) or through direct inhibition or activation of NF- κ B transcriptional activity [36-38]. Irrespective of the exact mode of action NF- κ B inhibition, the present study confirms the concept that dietary polyphenols might provide a useful dietary strategy to inhibit inflammation in the gut of pigs.

One aim of this study was to compare the effects of plant products which vary in their spectrum of polyphenols. We found that the effects on the parameters considered in this study, including gain:feed ratio, digestibility of nutrients, effects on nutrient transporters as well as microbial composition and production of volatile fatty acids - were largely similar for both plant sources of polyphenols. From this finding we conclude that the effects observed were probably not induced by few individual polyphenols but by a greater range of different polyphenols.

In overall, the present study confirms that feeding polyphenol-rich plant products improves the gain:feed ratio in growing pigs. It has become apparent that this effect was not induced by effects on gut morphology (villus height:crypt depth ratio) or digestibility of nutrients. More likely, alterations of the microbial composition as well as anti-inflammatory properties might contribute to the beneficial effects on the gain:feed ratio. Moreover, it is possible that dietary polyphenols exert beneficial effects in intermediary metabolism which could contribute to an increased efficiency of nutrients for animal growth.

Conclusions

In conclusion, the present study confirms that supplementation of GSGME or SH, two polyphenol-rich plant products, improves the gain:feed ratio in growing pigs. As gut morphology (villus height:crypt depth ratio) and apparent total tract digestibility of nutrients were in overall not influenced, the improvement of the gain:feed ratio by feeding the plant products was probably not due to enhanced nutrient digestibility. It is shown that

feeding GSGME or SH causes an alteration in the microbial composition, with a decrease of *Streptococcus* spp. and *Clostridium* Cluster XIVa, and a down-regulation of several pro-inflammatory genes in the mucosa of various parts of the intestine. It is assumed that these effects may contribute to the increased gain:feed ratio observed in the pigs fed the polyphenol-rich plant products.

Methods

Animals and diets

The feeding trial was performed with forty-eight five week old crossbreed pigs [Piétrain x (German Landrace x German Edelschwein)], which were randomly assigned to three groups of 16 pigs each and housed in pairs in flat-deck in a room with controlled temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), relative humidity (50-60%), and light from 06.00 to 19.00. The pigs were fed two nutritionally adequate basal diets in phases I (<15 kg body weight) and II (>15 kg body weight) which were composed to meet the recommendations of the German Society for Nutrition Physiology (GfE) for growing pigs in the respective body weight ranges [39]. Composition and nutrient concentration of these diets are shown in Table 4. The first group (control group) received the basal diet without any supplement. The second group (GSGME group) received the basal diets supplemented with 1% GSGME (Anta[®]Ox E, Dr. Eckel GmbH, Niederrissen, Germany) in exchange for 1% wheat. Crude nutrient concentrations of GSGME were (in g/kg): crude fiber (346), crude protein (110), crude fat (41), crude ash (29). The total polyphenol content was 8.5% according to the manufacturers' specifications. The third group (SH group) received the basal diet supplemented with 1% SH (Anta[®]Phyt H, Dr. Eckel GmbH, Niederrissen, Germany) in exchange for 1% wheat. Crude nutrient concentrations of SH were (in g/kg): crude fiber (218), crude protein (212), crude fat (13), crude ash (86). The total polyphenol content was around 5% according to the manufacturers' specifications. The diets were offered for free access. Unconsumed feed was weighed daily. Water was also provided *ad libitum* from a nipple drinker system. The pigs were weighed once per week. All experimental procedures were in strict accordance with the recommendations in the guidelines for the care and use of laboratory animals [40] and the Appendix A of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes [41]. In accordance with article 4 par. 3 of the German Animal Welfare Law [42] all animals were humanely killed for scientific purpose approved by the Animal Welfare Officer of the Justus-Liebig-University, JLU No. 439_M.

Sample collection

After 4 weeks of feeding, the pigs were anaesthetised and exsanguinated for sample collection. Blood samples were

Table 4 Composition of the basal experimental diets fed in phase I (body weight < 15 kg) and II (body weight > 15 kg)

	Phase I	Phase II
<i>Composition (g/kg)</i>		
Wheat	381.7	406.4
Barley	315	302
Soy bean meal (44% crude protein)	250	240
Soy oil	15	15
Mineral and vitamin premix*	33.5	33.4
L-Lysine	2.6	1.5
DL-methionine	1.0	0.5
L-threonine	1.2	0.7
Titanium dioxide	-	0.5
<i>Concentration of nutrients</i>		
Metabolizable energy (MJ/kg) [†]	13.7	13.3
Dry matter (%) [‡]	88.8	88.2
Crude protein (%) [‡]	19.8	18.5
Crude fiber (%) [‡]	3.3	4.3
Crude fat (%) [‡]	3.5	4.0
Crude ash (%) [‡]	5.1	5.0
Digestible lysine (%) [‡]	1.16	1.05
Digestible methionine + cysteine (%) [‡]	0.62	0.57
Digestible threonine (%) [‡]	0.69	0.63
Digestible tryptophan (%) [‡]	0.21	0.21

*The mineral and vitamin premix (Bergin Novamast, Berggophor, Kulmbach, Germany) provided the following per kg diet: 1.34 g lysine, 1,020 FYT phytase, 102 mg iron, 102 mg manganese, 102 mg zinc, 20.4 mg copper, 2.21 mg iodine, 0.44 mg selenium, 13,400 IE vitamin A, 2,244 IE vitamin D₃, 102 mg vitamin E, 2.55 mg vitamin K, 2.55 mg vitamin B₁, 6.8 mg vitamin B₂, 5.1 mg vitamin B₆, 34 µg vitamin B12, 34 mg nicotinic acid, 17 mg Ca-D-pantothenic acid, 1 mg folic acid, 136 µg biotin, 340 g choline chloride.[†]Calculated according to recommendations of German Society for Nutrition Physiology.

[‡]Analysed (mean values of three analyses per diet).

[‡]calculated using tabular values from AMINODat® 4.0 (Evonik Industries AG, Essen, Germany).

collected into EDTA polyethylene tubes (Sarstedt, Nürnberg, Germany) and plasma was separated by centrifugation (1100 g, 10 min) at 4°C. Plasma samples were stored at -20°C. The gastrointestinal tract was removed and duodenum, jejunum (medial part), ileum and colon *ascendens* (proximal part of *gyri centripetales*) were sampled. Mucosal samples of all picked segments were taken by scraping off the mucosa with a cell lifter (Corning Incorporated, Corning, USA) after removing and flushing with 0.9% NaCl (w/v). Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C pending analysis. For histological analysis, tissue samples of duodenum and jejunum (medial part) were washed three times in 0.9% NaCl (w/v) and PBS and stored for 24 hours in 4% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) at 4°C. Faecal samples were removed from the rectum rapidly after slaughtering. pH

value was measured with a pH meter (pH-Meter 646, Knick, Berlin, Germany) and the samples were stored at -20°C.

Nutrient digestibility

Feed and faecal samples were stored at -20°C until digestibility was determined using titanium dioxide (TiO₂) as an indigestible marker. The samples were analysed for dry matter (DM), crude ash (CA), crude protein (CP), crude fat (CL), crude fiber (CF) and TiO₂. DM, CA, CL and CF were analysed according to the official German VDLUFA methodology [43]. CP (N × 6.25) was determined by CN-Analysator (vario MAX N/CN, elemental Analyseysteme GmbH, Hanau, Germany). The concentrations of TiO₂ in diets and faecal samples were measured photometrically by the method of Brandt and Allam [44]. Apparent total tract digestibility coefficients of organic matter and crude nutrients were calculated with following formula:

$$\begin{aligned} \text{Apparent total tract digestibility (\%)} &= 100 \\ &- \{ (\% \text{ TiO}_2 \text{ in diet} / \% \text{ TiO}_2 \text{ in faeces}) \\ &\times (\% \text{ nutrient in faeces} / \% \text{ nutrient in diet}) \times 100 \} \end{aligned}$$

Total RNA isolation, cDNA synthesis and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis

For qPCR analysis, all removed parts of the intestine (duodenum, jejunum, ileum, colon *ascendens*) were selected. RNA isolation, cDNA synthesis and qPCR analysis were performed as described recently in detail [45]. In brief, total RNA was extracted from 20 mg mucosa aliquots using TRIzol reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's protocol. Purity and concentration of total RNA were estimated from the optical density at 260 and 280 nm (Infinite 200 M microplate reader, Tecan, Männedorf, Switzerland). RNA integrity was confirmed by visualisation of 18S and 28S rRNA bands by formaldehyde-agarose gel electrophoresis. qPCR analysis was performed using KAPA SYBR FAST qPCR Universal Mastermix (Peqlab, Erlangen, Germany) and gene-specific primer pairs from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) in a Rotor-Gene 2000 system (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). Gene-specific primer pairs are listed in Table 5. Expression values were normalised using GeNorm normalisation factor according to Vandesompele *et al.* [46]. The normalisation factor was calculated as the geometric mean of expression data of the three most stable out of six tested potential reference genes. Means and SD were calculated from normalised expression data for samples of the same treatment group. The mean of the control group was set to 1 and mean and standard deviation (SD) of the GSGME or SH group were scaled proportionally.

Table 5 Characteristics of primers used for qPCR analysis

Gene ¹	Forward primer (from 5'to 3') Reverse primer (from 5'to 3')	PCR product size (bp)	NCBI GenBank
Reference genes			
<i>ATP5G1</i>	CAGTCACCTTGAGCCGGGCGA TAGCGCCCCGGTGGTTTGC	94	NM_001025218.2
<i>ACTB</i>	GACATCCGCAAGGACCTCTA ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	205	XM_003124280.3
<i>GAPDH</i>	AGGGGCTCTCCAGAACATCATCC TCGCGTGCTCTTCTGGGGTTGG	446	NM_001206359.1
<i>GPI</i>	CACGAGCACCGCTCTGACCT CCACTCCGGACACGCTTGCA	365	NM_214330.1
<i>RPS9</i>	GTCGCAAGACTTATGTGACC AGCTTAAAGACCTGGGTCTG	327	XM_005664825.1
<i>SDHA</i>	CTACGCCCCGTCGCAAAGG AGTTTGCCCCAGGCGGTTG	380	DQ402993
NF-κB and nutrient transporter target genes			
<i>CCL2</i>	GGTCCTTGCCCAGCCAGATGC CTGCACAGATCTCCTTGCCCCG	170	NM_214214.1
<i>ICAM1</i>	CGGTGGCAGCCGTGGCTATC TTGATGCAGCCCCGCTCGTC	208	NM_213816.1
<i>IL1B</i>	GTTCTCTGAGAAATGGGAGC CTGGTCATCATCAGAAAGG	143	NM_214055.1
<i>IL8</i>	ACTTCCAACTGGCTGTTGC GGAATGCGTATTTATGCACTGG	120	NM_213867.1
<i>SLC2A2</i>	GCTGGATGGGAAGCCAAAGCA AGAGCGTCGCCCTGCCTTCT	355	NM_001097417.1
<i>SLC2A5</i>	CTGACACTGGTGCTTGCTTT TTCGCTCATGTATCCCCGA	156	EU012359.2
<i>SLC5A1</i>	GTGGCGGACAGTAGTAACA AGAAGGCAGGATTTCCAGGCA	89	NM_001164021.1
<i>SLC15A1</i>	CAGACTTCGACCACAACGGGA TTATCCCCCAGTACCCAGA	99	NM_214347.1
<i>TNF</i>	CATGAGCACTGAGAGCATGA CGATAACTTCGAAGTGCAGT	170	NM_214022.1
Bacterial group			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	TCGCGTC(A/T)GGTGTGAAAG CCACATCCAGC(A/G)TCCAC	243	
<i>Clostridium</i> Cluster XIVa	AAATGACGGTACCTGACTAA CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	485	
<i>Lactobacillus</i> spp.	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	341	
<i>Streptococcus</i> spp.	AGAGTTTGATCCTCCGTCAG GTTAGCCGTCCTTTCTGG	144	

¹*ATP5G1* = ATP synthase lipid-binding protein; *ACTB* = actin beta; *GAPDH* = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *GPI* = glucose-6-phosphate isomerase; *RPS9* = ribosomal protein; *SDHA* = succinate dehydrogenase complex, subunit A; *CCL2* = chemokine (C-C motif) ligand 2; *SLC2A2* = solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) 2; *SLC2A5* = solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) 5; *SLC5A1* = sodium-glucose transporter 1; *SLC15A1* = solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1; *ICAM1* = intercellular adhesion molecule; *IL* = interleukin; *TNF* = tumor necrosis factor.

Cryosectioning for light microscopy

Tissue samples of duodenum and jejunum were removed and fixed in 4% paraformaldehyde (MERCK, Darmstadt, Germany). After 24 hours, samples were washed three times with 1× PBS followed by incubation in a cryoprotectant 1× PBS solution containing 30% sucrose until embedding the samples in Tissue-Tek (Hartenstain, Würzburg, Germany) and cryosectioning on a cryostat microtome (Microme HM 500, MICROM international GmbH, Walldorf, Germany) to 20 µm thickness. The unstained sections were analysed by light microscopy (Leica DMI 6000B) at 100× magnification for measuring villus height and crypt depth and calculating the ratio of villus height to crypt depth, which were reported as mean length of 15 well oriented and representative villi and crypts from 6 pigs per group.

DNA extraction and qPCR analysis of faecal bacteria composition

Total bacterial DNA was extracted from 30 mg lyophilised faeces with the Repeated Bead Beating Plus Column Method [47]. This protocol includes two steps of bead beating, which were done by TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany) and 0.1 mm zirconium-silica beads (Biospec Products, Bartlesville, USA). Using the QIAamp DNA Stool Mini Kit columns (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol, the DNA was isolated by sequential precipitations and finally purified. Purity of total DNA was estimated from the optical density at 230, 260 and 280 nm (Infinite 200 M microplate reader, Tecan, Männedorf, Switzerland). A 260/280 value of ~ 1.8 is generally accepted as pure DNA. The 260/230 ratio is also an indicator of contamination. The expected 260/230 values are commonly in the range of 2.0 - 2.2. For the analysed faecal samples the observed 260/280 ratio was 1.82 ± 0.03 , and the 260/230 ratio 2.07 ± 0.18 .

Quantitative PCR analysis was performed as described above on all faecal DNA extracts using group-specific primers targeting the 16S rRNA gene of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp. and *Clostridium* Cluster XIVa which are listed in Table 5. Standard curves were generated using serial dilutions of the purified and quantified PCR products.

Faecal volatile fatty acid composition

The faecal volatile fatty acid composition was analysed by gas chromatography. 100 mg aliquots of the faecal samples were mixed with 1 ml internal standard working solution consisting of 0.03 g crotonic acid and 5 ml o-phosphoric acid in 100 ml [48]. The mixture was extracted by vortexing for 1 min and centrifugation at 20,000 g at 4°C for 10 min. 1 µl of the extract was injected into a gas chromatograph (Clarus 580 GC system, Perkin Elmer, Waltham, USA) equipped with a flame-ionisation detector and a split

injector. Fatty acids were separated on a polar capillary column (10 m free fatty acid phase, 0.32 mm internal diameter, 0.25 µm film thickness; Macherey and Nagel, Düren, Germany). Individual fatty acids were identified by comparing their retention times with those of individually purified standards. The fatty acid concentrations were calculated from the peak areas relative to the peak area of crotonic acid as the internal standard.

Statistical analysis

Data were statistically evaluated by one-way ANOVA using the Minitab Statistical Software (Rel. 13.0, State College, PA, USA). The Student's *t* test was used for the comparison of two groups (control vs. GSGME or control vs. SH). Means were considered significantly different for $P < 0.05$ and tended to differ when $0.05 \leq P \leq 0.10$. Data in the text are presented as mean \pm SD.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AF and DKG participated in the study design, development of hypothesis and wrote the manuscript. AF carried out the laboratory and statistical analyses. EM performed volatile fatty acid analyses. KE participated in the study design and development of hypothesis, interpretation of results and writing the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Anja Fiesel was supported by H. Wilhelm Schaumann-Stiftung (Hamburg, Germany).

Received: 9 April 2014 Accepted: 15 August 2014

Published: 4 September 2014

References

1. Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A: Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev* 2009, **67**:363–378.
2. Landete JM: Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism and health. *Food Sci Nutr* 2012, **52**:936–948.
3. Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB: Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci* 2010, **11**:622–646.
4. Gessner DK, Fiesel A, Most E, Dinges J, Wen G, Ringseis R, Eder K: Supplementation of a grape seed and grape marc meal extract decreases activities of the oxidative stress-responsive transcription factors NF-κB and Nrf2 in the duodenal mucosa of pigs. *Acta Vet Scand* 2013, **55**:18.
5. Vivero A, Chamorro S, Pizarro M, Arijia I, Centeno C, Brenes A: Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poult Sci* 2011, **90**:566–578.
6. Chamorro S, Vivero A, Centeno C, Romero C, Arijia I, Brenes A: Effects of dietary grape seed extract on growth performance, amino acid digestibility and plasma lipids and mineral content in broiler chicks. *Animal* 2013, **7**:555–561.
7. Barrenetxe J, Aranguren P, Grijalba A, Martínez-Peñuela JM, Marzo F, Urdaneta E: Effect of dietary quercetin and shingomyelin on intestinal nutrient absorption and animal growth. *Br J Nutr* 2006, **95**:455–461.
8. Freijnagel S, Wroblewska M: Comparative effect of green tea, chokeberry and honeysuckle polyphenols on nutrient and mineral absorption and digestibility in rats. *Ann Nutr Metab* 2010, **56**:163–169.
9. Martín-Carrón N, Saura-Calixto F, Göni I: Effects of dietary fibre- and polyphenol-rich grape products on lipidaemia and nutritional parameters in rats. *J Sci Food Agric* 2000, **80**:1183–1188.

10. Denis MC, Furtos A, Dudonné S, Montoudis A, Garofalo C, Desjardins Y, Delvin E, Levy E: **Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation.** *PLoS One* 2013, **8**:e53725.
11. Auger C, Gérain P, Laurent-Bichon F, Portet K, Bornet A, Caporiccio B, Cros G, Teissédre PL, Rouanet JM: **Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect.** *J Agric Food Chem* 2004, **52**:5297–5302.
12. Wang X, Yang L, Yang X, Tian Y: **In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.).** *J Sci Food Agric* 2013, doi:10.1002/jsfa.6534.
13. Sehm J, Linder Mayer H, Dummer D, Pfaffl MW: **The influence of polyphenol rich apple pomace or red-wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets.** *J Anim Physiol Anim Nutr* 2007, **91**:289–296.
14. Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L: **Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells.** *FEBS Lett* 2005, **579**:1653–1657.
15. Ader P, Blöck M, Pietsch S, Wolfram S: **Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT1).** *Cancer Lett* 2001, **162**:175–180.
16. Cermak R, Landgraf S, Wolfram S: **Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum.** *Br J Nutr* 2004, **91**:849–855.
17. Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, Levine M: **Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids.** *FASEB J* 2007, **21**:366–377.
18. Hanineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K: **Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism.** *Int J Mol Sci* 2010, **11**:1365–1402.
19. Wright EM, Martin MG, Turk E: **Intestinal absorption in health and disease - sugars.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003, **17**:943–956.
20. Jones HF, Butler RN, Brooks DA: **Intestinal fructose transport and malabsorption in humans.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011, **300**:202–206.
21. Daniel H: **Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport.** *Annu Rev Physiol* 2004, **66**:361–384.
22. Larrosa M, Yañez-Gascón MJ, Selma MV, González-Sarriás A, Toti S, Cerón JJ, Tomás-Barberán F, Dolara P, Espín JC: **Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model.** *J Agric Food Chem* 2009, **57**:2211–2220.
23. Dolara P, Luceri C, De Filippo C, Femia AP, Giovannelli L, Caderni G: **Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats.** *Mutat Res* 2005, **591**:237–246.
24. Papadopoulou C, Soulti K, Roussis IG: **Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.** *Food Technol Biotechnol* 2005, **43**:41–46.
25. Baydar NG, Sagdic O, Ozkan G, Cetin S: **Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts.** *Int J Food Sci Technol* 2006, **41**:799–804.
26. Rodríguez Vaquero MJ, Alberto MR, Macanda De Nadra MC: **Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines.** *Food Control* 2007, **18**:93–101.
27. Rowland IR: **Gut microflora and cancer.** In *Gut Flora and Health – Past, Present and Future*. Edited by Leeds AR, Rowlands IR. London: The Royal Society of Medicine Press; 1996:19–25.
28. Beaumont A, Gibson GR: **An overview of human colonic bacteriology in health and disease.** In *Gut Flora and Health – Past, Present and Future*. Edited by Leeds AR, Rowlands IR. London: The Royal Society of Medicine Press; 1996:3–11.
29. Onoue M, Kado S, Sakaitani Y, Uccida K, Morotomi M: **Specific species of intestinal bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats.** *Cancer Lett* 1997, **113**:179–186.
30. Nakamura J, Kubota Y, Miyaoka M, Saitoh T, Mizuno F, Benno Y: **Comparison of four microbial enzymes in *Clostridia* and *Bacteroides* isolated from human faeces.** *Microbiol Immunol* 2002, **46**:487–490.
31. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Schölmerich J, Gross V: **Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa.** *Gastroenterology* 1988, **115**:357–369.
32. Barnes PJ, Karin M: **Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases.** *N Engl J Med* 1997, **336**:1066–1071.
33. Li Q, Verma IM: **NF- κ B regulation in the immune system.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:725–734.
34. Biesalski HK: **Polyphenols and inflammation: basic interactions.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007, **10**:724–728.
35. Rahman I, Biswas SK, Kirckham PA: **Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols.** *Biochem Pharmacol* 2006, **72**:1439–1452.
36. Ohkusa T, Yoshida T, Watanabe S, Tajiri H, Okayasu I: **Commensal bacteria can enter conolic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis.** *J Med Microbiol* 2009, **58**:535–545.
37. Lakshadri O, Tap J, Béguet-Crespel F, Le Roux K, De Wouters T, Cultrone A, Nepelska M, Lefèvre F, Doré J, Blottière HM: **Identification of NF- κ B modulation capabilities within human intestinal commensal bacteria.** *J Biomed Biotechnol* 2001, doi:10.1155/2011/282356.
38. Kelly D, Campbell JI, King TP: **Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA.** *Nature Immunol* 2004, **5**:104–112.
39. German Society for Nutrition Physiology (GfE), German Society for Nutrition Physiology (GfE): *Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen.* Frankfurt am Main, Germany: DLG-Verlag; 2006.
40. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 8th edition. Washington, D.C: National Academy Press; 1996.
41. Council of Europe: **European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes.** In *European Treaty Series No. 123.* Strasbourg: Council of Europe, Section des Publications; 1986.
42. German Federal Parliament: **The German Animal Welfare Act (TierSchG).** *BGBI. I S. 1206.* In *Bundesgesetzblatt I No. 25.* Bonn: 2006.
43. Bassler R, Buchholz H: **Methodenbuch Band III.** In *Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, Ergänzungslieferung.* 3rd edition. Darmstadt: VDLUFA-Verlag; 1993.
44. Brandt M, Allam SM: **Analytik von TiO₂ in Darminhalt und Kot nach Kjeldahlaufschluss.** *Arch Anim Nut* 1987, **37**:453–454.
45. Gessner DK, Ringseis R, Siebers M, Keller J, Kloster J, Wen G, Eder K: **Inhibition of the pro-inflammatory NF- κ B pathway by a grape seed and grape marc meal extract in intestinal epithelial cells.** *J Anim Physiol Anim Nutr* 2011, **96**:1074–1083.
46. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**:Research0034.
47. Yu M, Morrison M: **Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples.** *BioTechniques* 2004, **36**:808–812.
48. Stanier G, Davies A: **Effects of the antibiotic monensin and an inhibitor of methanogenesis on in vitro continuous rumen fermentations.** *Br J Nutr* 1981, **45**:567–578.

doi:10.1186/s12917-014-0196-5

Cite this article as: Fiesel et al.: Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs. *BMC Veterinary Research* 2014 **10**:196.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3.2. Wirkungen polyphenolreicher Pflanzenprodukte auf den Mineralstoffhaushalt von Ferkeln

Effects of polyphenol-rich plant products from grape or hop as feed supplements on iron, zinc and copper status in piglets

Anja Fiesel, Melanie Ehrmann, Denise K. Geßner, Erika Most and Klaus Eder*

Institute of Animal Nutrition and Nutrition Physiology, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Germany

(Received 24 March 2015; accepted 21 May 2015)

Polyphenol-rich plant products as feed supplements have been shown to exert beneficial effects on feed efficiency in piglets. However, tannins as components of polyphenol-rich plant products are able to reduce the absorption of various trace elements. The present study investigated the effect of two polyphenol-rich dietary supplements, grape seed and grape marc meal extract (GME) and spent hops (SH), on iron (Fe), zinc (Zn) and copper (Cu) status in piglets supplied adequately with those trace elements. A trial with three groups of piglets which received a Control diet or the same diet supplemented with either 1% GME or 1% SH over a period of 4 weeks was performed. Concentrations of Fe, Zn and Cu in plasma, total iron binding capacity and saturation of transferrin in plasma did not differ between the three groups. Piglets fed the diet supplemented with SH showed no differences in the concentrations of Fe, Zn and Cu in the liver in comparison to the Control group. Piglets fed the diets supplemented with GME showed slightly lower concentrations of Zn and Cu in the liver than Control piglets ($p < 0.05$); however, concentrations of both elements remained in the physiological range. Overall, this study shows that the polyphenol-rich plant products GME and SH had marginal effect on the status of Fe, Zn and Cu in piglets.

Keywords: by-products; mineral nutrition; piglets; polyphenols; trace elements

1. Introduction

Polyphenols are secondary plant metabolites which have several beneficial effects on health. Numerous studies in humans and rodents have shown that polyphenols are exerting antioxidative, anti-inflammatory, cardioprotective, cancer chemopreventive and neuroprotective properties (Xia et al. 2010; Landete 2012). In contrast to humans and rodents, potential beneficial effects of polyphenols on health and performance in farm animals have been given less attention so far. We have recently observed that diets supplemented with polyphenol-rich plant products from either red grapes or hop improve the feed efficiency in piglets, probably by suppressing inflammatory processes in the small intestine (Gessner et al. 2013; Fiesel et al. 2014). Moreover, there are few other studies which showed an improvement of feed utilisation in broiler chicks by supplementation of various types of polyphenol-rich plant extracts (Viveros et al. 2011; Starčević et al. 2015). These findings suggest that polyphenol-rich plant products could be useful feed supplements in farm animal nutrition. However, a potential drawback of polyphenol-rich plant products as feed supplements could be that tannins, a specific subgroup of polyphenols, are able to form insoluble complexes with divalent metal ions, particularly

*Corresponding author. Email: klaus.eder@ernaehrung.uni-giessen.de

iron (Fe), in the small intestine, rendering them less available for absorption (Afsana et al. 2004; Gaffney et al. 2004). Thus, the aim of the present study was to find out whether supplementation of grape seed and grape marc meal extract (GME) or spent hops (SH), both polyphenol-rich plant products which have exerted beneficial effects on feed utilisation in piglets in our recent studies (Gessner et al. 2013; Fiesel et al. 2014), could have adverse effects on Fe, Zn and Cu status in piglets due to their high tannin contents.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diets

A feeding trial with 48 five-week-old cross-breed piglets [Piétrain × (German Landrace × German Edelschwein)] was performed. The piglets had an initial body weight (BW) of around 10 kg. They were randomly assigned to three groups and housed in pairs in flat-decks in a room with controlled temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), relative humidity (50–60%) and light from 06:00 h to 19:00 h. According to a phase feeding system, the piglets received two basal diets. The diet of Phase I was given until a BW of 15 kg, diet of Phase II was given for the remainder of the experimental phase of 4 weeks. Basal diets are shown in Table 1 and were based mainly on wheat, barley and soybean meal. Minerals and vitamins were supplied by adding a commercial available mineral and vitamin premix (Bergin Novamast, Bergophor, Kulmbach, Germany). Resulting concentrations of all the essential minerals and vitamins met or even exceeded national recommended amounts for piglets (GfE 2006). The Control group received the diet without any further supplement.

Table 1. Composition and content of metabolisable energy, crude protein and amino acids of the basal diets fed in Phases I and II.

	Phase I (Body weight < 15 kg)	Phase II (Body weight > 15 kg)
Ingredients [g/kg]		
Wheat	381.7	406.4
Barley	315	302
Soybean meal (44% crude protein)	250	240
Soybean oil	15	15
Mineral and vitamin premix*	33.5	33.4
L-Lysine	2.6	1.5
DL-Methionine	1.0	0.5
L-Threonine	1.2	0.7
Titanium dioxide	-	0.5
Metabolisable energy [MJ/kg] [#]	13.7	13.3
Crude protein [%] [†]	19.8	18.5
Digestible lysine [%] [†]	1.16	1.05
Digestible methionine + cysteine [%] [†]	0.62	0.57
Digestible threonine [%] [†]	0.69	0.63
Digestible tryptophan [%] [†]	0.21	0.21

Notes: *Bergin Novamast (Bergophor, Kulmbach, Germany), provided per kg diet: 1.34 g lysine, 1020 FYT phytase, 102 mg iron, 102 mg manganese, 102 mg zinc, 20.4 mg copper, 2.21 mg iodine, 0.44 mg selenium, 13,400 IU vitamin A, 2244 IU vitamin D₃, 102 mg vitamin E, 2.55 mg vitamin K, 2.55 mg vitamin B₁, 6.8 mg vitamin B₂, 5.1 mg vitamin B₆, 34 µg vitamin B₁₂, 34 mg nicotinic acid, 17 mg Ca-D-pantothenic acid, 1 mg folic acid, 136 µg biotin, 340 mg choline chloride; [#]Calculated according to recommendations of German Society for Nutrition Physiology; [†]Analysed as described in Fiesel et al. (2014) (mean values of three analyses per diet); [‡]Calculated using tabular values from AMINODAT[®] 4.0 (Evonik Industries, Hanau, Germany).

Table 2. Contents of Fe, Zn and Cu in the experimental diets [mg/kg diet].[#]

	Experimental diets		
	Control	GME [†]	SH [‡]
Phase I (body weight < 15 kg)			
Fe	150.9	152.0	152.0
Zn	129.0	128.9	129.1
Cu	25.7	25.9	29.0
Phase II (body weight > 15 kg)			
Fe	150.6	151.8	151.7
Zn	128.5	128.4	128.6
Cu	25.6	25.7	28.8

Note: [#]Results are shown as mean values of three analyses per diet; [†]GME, diet supplemented with 1% grape seed and grape marc meal extract; [‡]SH, diet supplemented with 1% spent hops.

Treatment groups received the basal diet supplemented with 1% GME (Anta®Ox E, Dr. Eckel GmbH, Niederrissen, Germany) or 1% SH (Anta®Phyt H, Dr. Eckel GmbH, Niederrissen, Germany) at the expense of wheat. Analysed concentrations of Fe, Zn and Cu in the diets are shown in Table 2. The diets were offered for free access. Water was also provided *ad libitum* from a nipple drinker system. More details about animals, housing and diets are given by Fiesel et al. (2014). All experimental procedures were in strict accordance with the recommendations in the guidelines for the care and use of laboratory animals (1996) and the Appendix A of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (1986). In accordance with Article 4 §3 of the German Animal Welfare Law (BGBI. 2006), all animals were sacrificed for scientific purpose approved by the Animal Welfare Officer of the Justus-Liebig-University, JLU No. 439_M.

2.2. Sample collection

After the 4-week feeding period, the piglets were anaesthetised and exsanguinated for sample collection. Blood samples were collected into EDTA polyethylene tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and plasma was separated by centrifugation (1100 g, 10 min) at 4°C. Plasma samples were stored at -20°C. Liver samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C till analysis. Faecal samples were removed from the rectum rapidly after slaughtering and were stored at -20°C.

2.3. Determination of total phenols and total tannins

Concentrations of total phenolic (TP) compounds in GME and SH were photometrically measured according to the method of Singelton et al. (1999) using the Folin-Ciocalteu's reagent (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Total tannins (TT) were analysed by a modified method of Makkar (2003) using polyvinyl-pyrrolidone (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) to separate tannin phenols from non-tannin phenols (NTP). Concentrations of NTP were measured with the Folin-Ciocalteu's method and total tannins were estimated as the difference between TP and NTP. All analyses were calibrated against gallic acid (Acros Organics, Geel, Belgium) as a standard and values are expressed as gallic acid equivalents (GAE).

2.4. Analysis of Fe, Zn and Cu, and determination of Fe binding capacity

Concentrations of Zn and Cu in plasma and Fe, Zn and Cu in liver, diet and faeces were determined by a flame atomic absorption spectrometer (Thermo S2 AA System, Thermo Fisher Scientific, Germany), using an air-acetylene flame and $\lambda = 248.3$ nm for Fe, $\lambda = 214.0$ nm for Zn and $\lambda = 324.8$ nm for Cu. For determination of Zn and Cu concentrations in plasma, the samples were diluted [1:20 (v/v) in 0.1 N hydrochloric acid], injected and directly measured by a linear calibration method using a standard solution for each of the two trace elements. Liver, diet and faecal samples were digested with 3 ml nitric acid (65% v/v) and 2 ml of hydrogen peroxide solution (30% v/v) in a microwave digestion system (MLS Start, Retsch GmbH, Germany). After digestion, the samples were injected and the mineral concentrations were determined similar to the plasma samples. Plasma Fe concentration was analysed according to the method of Siedel et al. (1984) by using Fluitest® FE FZ (Analyticon Biotechnologies AG, Germany). To determine the total iron binding capacity (TIBC), the transferrin molecules were saturated with an excess of Fe. After precipitation of the remaining Fe with magnesium hydroxide (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Fe concentrations in the supernatants were determined by using Fluitest® FE FZ as described above.

Saturation of transferrin was calculated after the analysis of total Fe and TIBC according to the following equation:

$$\text{Saturation of transferrin [\%]} = \text{Total Fe } [\mu\text{g/dl}] / \text{TIBC } [\mu\text{g/dl}] \cdot 100$$

2.5. Statistics

The statistical analysis for this study was performed using the Minitab Statistical Software (Rel. 13.0, State College, PA, USA). Conformity of variables to normal distribution was examined with the Anderson–Darling test. Differences between groups were analysed using the Fisher's multiple range test. Means were considered significantly different for $p < 0.05$. Data in the text are presented as mean \pm standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Concentrations of total phenols and total tannins in supplements

Total phenol concentrations in GME and SH were 61.6 and 50.4 mg GAE per g, respectively. Total tannin concentration was 42.9 mg GAE/g in GME, representing 69.6% of the total phenol content. SH had a total tannin content of 27.0 mg GAE/g, representing 53.6% of the total phenol content.

3.2. Growth performance data

Performance data of the piglets of this trial have been recently reported (Fiesel et al. 2014). In brief, there were no significant differences in daily BW gains during the experimental period (mean of the three groups: 501 g), and final BW (mean of the three groups: 23.7 kg). However, the gain:feed ratio was significantly increased in the SH group ($p < 0.05$) and tended to be increased in the GME group ($p < 0.10$) in

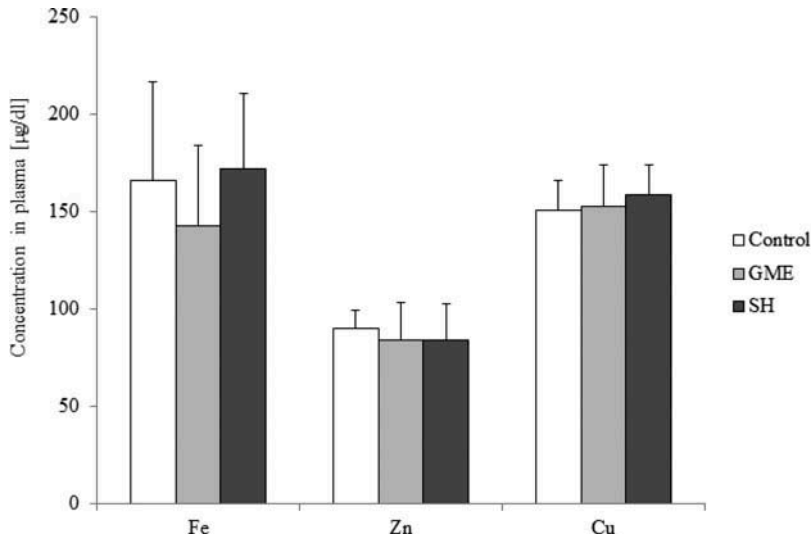


Figure 1. Plasma concentrations of Fe, Zn and Cu of piglets fed the Control diet or diets supplemented with 1% grape seed and grape marc meal extract (GME) or 1% spent hops (SH). Bars represent mean \pm standard deviation of 16 piglets per group.

comparison to the Control group [gain:feed [g/kg]: Control group: 579 ± 68 ; GME group: 620 ± 53 ; SH group: 638 ± 83 (mean \pm SD)].

3.3. Concentrations of Fe, Zn and Cu in plasma, Fe binding capacity and saturation of transferrin

Concentrations of Fe, Zn and Cu in plasma did not differ between the three groups of piglets (Figure 1). Supplementation of both polyphenol-rich plant products showed also no effect on TIBC and on saturation of transferrin in comparison to the Control group (Table 3).

3.4. Concentrations of Fe, Zn and Cu in liver and faeces samples

Fe concentration in liver did not differ between the three groups of piglets (Table 4). Piglets fed the diet supplemented with SH showed also no differences in Zn and Cu

Table 3. Total iron binding capacity (TIBC) and saturation of transferrin in plasma samples of piglets fed the experimental diets.[#]

	Experimental diets		
	Control	GME [†]	SH [‡]
TIBC [$\mu\text{g/dl}$]	487 ± 66	469 ± 97	506 ± 88
Saturation of transferrin [%]	34.8 ± 12.7	31.1 ± 9.0	34.5 ± 8.2

Notes: [#]Results are shown as mean \pm SD ($n = 16/\text{group}$); [†]GME, diet supplemented with 1% grape seed and grape marc meal extract; [‡]SH, diet supplemented with 1% spent hop.

Table 4. Content [mg/kg] of Fe, Zn and Cu in liver and faecal samples of piglets fed the experimental diets.[#]

	Experimental diets		
	Control	GME [†]	SH [‡]
Liver [mg/kg fresh matter]			
Fe	170 ± 30	177 ± 36	167 ± 25
Zn	55 ± 8	48 ± 7*	58 ± 10
Cu	7.6 ± 1.4	6.4 ± 1.6*	6.8 ± 1.7
Faeces [mg/kg dry matter]			
Fe	1101 ± 218	1125 ± 165	1146 ± 80
Zn	760 ± 140	807 ± 119	817 ± 89
Cu	140 ± 34	140 ± 22	155 ± 11

Notes: [#]Results are shown as mean ± SD ($n = 16/\text{group}$); [†]GME, diet supplemented with 1% grape seed and grape marc meal extract; [‡]SH, diet supplemented with 1% spent hop; *Significantly different from Control ($p < 0.05$).

concentrations in the liver compared to Control piglets (Table 4). In contrast, piglets fed the diet supplemented with GME had lower concentrations of Zn and Cu in the liver than Control piglets ($p < 0.05$, Table 4). Fe, Zn and Cu concentrations in faecal samples, collected on the day of slaughter, were not different between the three groups (Table 4).

4. Discussion

This study was designed to investigate whether feeding diets supplemented with either GME or SH, two plant sources rich in polyphenols, could adversely affect the status of Fe, Zn and Cu in piglets. Noteworthy, dietary concentrations of the trace elements considered in this study were in accordance with concentrations of practical diets which, however, were in clear excess of national and international recommendations. Indeed, Fe and Zn concentrations of the diets used were around 50–60% in excess of recommendations given by NRC (1998) and GfE (2006), and the concentration of Cu was even around fivefold higher than recommend by these institutions. The bioavailability of a trace element can be assessed only under the condition of an insufficient supply because absorption is down-regulated by homeostatic control in the case of a supply in excess of the requirement (Windisch 2002). Therefore, the present study is not suited to assess the bioavailability of the trace elements considered between the three treatment groups. Accordingly, the aim of this study was to investigate the effect of feeding polyphenol-rich plant products on the trace element status under practical dietary concentrations rather than comparing the bioavailability of these trace elements between the treatment groups. To assess the status of Fe, Zn and Cu in the body, we measured concentrations of Fe, Zn and Cu in plasma and liver. We are aware that plasma concentrations of most trace elements are not only influenced by the dietary supply but are also influenced by several metabolic factors and thus are compromised by a lack of specificity (King 1990; Wedekind et al. 1994; Hambidge 2003). In contrast, concentrations of Fe, Zn and Cu in the liver are reliable markers of the status of these trace elements as the liver is serving as storage of these elements which can be mobilised in the state of an insufficient supply (Ballatori 1991; Tuerk and Fazel 2009; Linder 2013). Indeed, it

has been shown that concentrations of Fe, Zn and Cu in the liver are decreasing during an insufficient dietary supply (Hansen et al. 2008; Tuerk and Fazel 2009; Ma et al. 2014). For the assessment of the Fe status of the piglets, additionally TIBC and saturation of transferrin in plasma were determined, which in combination with plasma and liver Fe concentrations give a representative picture of the Fe status (Worwood 1997; Baynes 1996). It was found that plasma and liver concentrations of Fe, Zn and Cu as well as TIBC and saturation of transferrin in plasma were not affected by supplementation of SH, indicating that supplementation of SH did not affect the status of all the three trace elements considered. Supplementation of GME did not influence Fe concentration in the liver and TIBC and saturation of transferrin in plasma, showing that GME had no adverse effect on the availability of Fe from the diet. The finding that supplementation of GME caused a slight reduction of Zn and Cu in the liver suggests that supplementation of GME indeed could have reduced the bioavailability of these trace elements from the diet. This suggestion indicates that the dietary requirement of Zn and Cu is increased by supplementation of GME. It should be noted, however, that Zn and Cu concentrations in the liver of piglets supplemented with GME remained within the physiological range of Zn and Cu in liver. The observed concentrations of Zn and Cu in the liver of piglets fed the diets supplemented with GME were similar or even higher than values reported for piglets with adequate supply of Zn or Cu (Heilmann et al. 1975; Schiavon et al. 2000; Rincker et al. 2004; Lee et al. 2008; Bondzio et al. 2013; Brugger et al. 2014). However, based on the fact that the diets in this study were fed over a relatively short period of only 4 weeks, we cannot exclude the possibility that feeding GME over a longer period could have stronger adverse effects on the Zn and Cu status in pigs.

5. Conclusion

Overall, this study shows that supplementation of diets with 1% of either GME or SH has marginal effect on the status of Fe, Zn and Cu in piglets with a nutritionally adequate supply of those trace elements. Thus, these polyphenol-rich plant products can be used as feed additives without having adverse effects on trace element status, at least over a short feeding period. Further studies are required to investigate the effects of polyphenol-rich plant products on trace element status over a longer feeding period, e.g. in growing pigs.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

Anja Fiesel was supported by H. Wilhelm Schaumann-Stiftung (Hamburg, Germany).

References

- Afsana K, Shiga K, Ishizuka S, Hara H. 2004. Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not of zinc, copper and manganese by rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68:584–592.

- Ballatori N. 1991. Mechanisms of metal transport across liver cell plasma membranes. *Drug Metab Rev.* 23:83–132.
- Baynes RD. 1996. Assessment of iron status. *Clin Biochem.* 29:209–215.
- Bondzio A, Pieper R, Gabler C, Weise C, Schulze P, Zentek J, Einspanier R. 2013. Feeding low or pharmacological concentrations of zinc oxide changes the hepatic proteome profile in weaned piglets. *PLoS One.* 25:e81202.
- Brugger D, Buffler M, Windisch W. 2014. Development of an experimental model to assess the bioavailability of zinc in practical piglet diets. *Arch Anim Nutr.* 68:73–92.
- Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 1996. *Guide for the care and use of laboratory animals.* 8th ed. Washington (DC): National Academy Press.
- European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. 1986. European treaty series no. 123. Strasbourg: Council of Europe.
- Fiesel A, Gessner DK, Most E, Eder K. 2014. Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs. *BMC Vet Res.* 10:196.
- Gaffney S, Williams V, Flynn P, Carlino R, Mowry C, Dierenfeld E, Babb C, Fan J, Tramontano WA. 2004. Tannin/Polyphenol effects on iron solubilization in vitro. *Bios.* 75:43–52.
- German Society for Nutrition Physiology (GfE). 2006. Recommendations for the supply of energy and nutrients to pigs. Frankfurt am Main: DLG-Verlags GmbH.
- Gessner DK, Fiesel A, Most E, Dinges J, Wen G, Ringseis R, Eder K. 2013. Supplementation of a grape seed and grape marc meal extract decreases activities of the oxidative stress-responsive transcription factors NF- κ B and Nrf2 in the duodenal mucosa of pigs. *Acta Vet Scand.* 55:18.
- Hambidge M. 2003. Biomarkers of trace mineral intake and status. *J Nutr.* 133:948–955.
- Hansen SL, Schlegel P, Legleiter LR, Lloyd KE, Spears JW. 2008. Bioavailability of copper from copper glycinate in steers fed high dietary sulfur and molybdenum. *J Animal Sci.* 86:173–179.
- Heilmann P, Gürtler H, Wolf H. 1975. Concentration and subcellular distribution of iron and copper in the pig liver. II. Studies on the livers of porkers and swine for slaughter with regard to the addition of copper sulfate to the diet. *Acta Biol Med Ger.* 34:1589–1601.
- King JC. 1990. Assessment of zinc status. *J Nutr.* 120:1474–1479.
- Landete JM. 2012. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism and health. *Food Sci Nutr.* 52:936–948.
- Lee SH, Shinde P, Choi J, Park M, Ohh S, Kwon IK, Pak SI, Chae BJ. 2008. Effects of dietary iron levels on growth performance, hematological status, liver mineral concentration, fecal microflora, and diarrhea incidence in weanling pigs. *Biol Trace Elem Res.* 126:57–68.
- Linder MC. 2013. Mobilization of stored iron in mammals: a review. *Nutrients.* 5:4022–4050.
- Ma J, Wen X, Mo F, Wang X, Shen Z, Li M. 2014. Effects of different doses and duration of iron supplementation on curing iron deficiency anemia: an experimental study. *Biol Trace Elem Res.* 162:242–251.
- Makkar HPS. 2003. Quantification of Tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- National Research Council. 1998. Nutrient requirements of swine. 10th rev ed. Washington (DC): National Academy Press.
- Rincker MJ, Hill GM, Link JE, Rowntree JE. 2004. Effects of dietary iron supplementation on growth performance, hematological status, and whole-body mineral concentrations of nursery pigs. *J Anim Sci.* 82:3189–3197.
- Schiavon S, Bailoni L, Ramanzin M, Vincenzi R, Simonetto A, Bittante G. 2000. Effect of proteinate or sulphate mineral sources on trace elements in blood and liver of piglets. *Anim Sci.* 71:131–139.
- Siedel J, Wahlefeld AW, Ziegenhorn J. 1984. A new iron ferro zinc reagent without deproteinization. *Clin Chem.* 30:975. [AACC Meeting-Abstract].
- Singelton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299:152–178.

- Starčević K, Krstulović L, Brozić D, Maurić M, Stojević Z, Mikulec Ž, Bajić M, Mašek T. 2015. Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. *J Sci Food Agric.* 95:1172–1178.
- The German Animal Welfare Act (TierSchG). 2006. BGBI. I S. Bonn: Federal Ministry of Food and Agriculture.
- Tuerk MJ, Fazel N. 2009. Zinc deficiency. *Curr Opin Gastroentol.* 25:136–143.
- Viveros A, Chamorro S, Pizarro M, Arija I, Centeno C, Brenes A. 2011. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poultry Sci.* 90:566–578.
- Wedekind KJ, Lewis AJ, Giesemann MA, Miller PS. 1994. Bioavailability of zinc from inorganic and organic sources for pigs fed corn-soybean meal diets. *J Anim Sci.* 72:2681–2689.
- Windisch W. 2002. Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of essential trace elements. *Anal Bioanal Chem.* 372:421–425.
- Worwood M. 1997. The laboratory assessment of iron status: an update. *Clin Chim Acta.* 259:3–23.
- Xia E-Q, Deng G-F, Guo Y-J, Li H-B. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci.* 11:622–646.

4. Diskussion

In einer Vielzahl von Studien wurden bereits positive Effekte von Polyphenolen auf die Gesundheit von Mensch und Nager nachgewiesen. Auch beim Nutztier liegen zu dieser Thematik vereinzelt Untersuchungen vor, in denen die Auswirkungen unterschiedlicher polyphenolreicher Futterzusätze jedoch nicht immer vergleichbar sind (Xia *et al.*, 2010; Landete, 2012; Denis *et al.*, 2013). Die mannigfachen Wirkungen von polyphenolreichen Produkten basieren einerseits auf deren pflanzlichen Ursprung, andererseits sind sie stark von der Zielspezies und der Versuchsdurchführung abhängig. Daher variieren die Effekte zum einen je nach Polyphenolzusammensetzung, welche wiederum sehr stark vom Ausgangsprodukt, Anbauverfahren und -ort, sowie Witterung und Verarbeitung abhängig ist. Zum anderen werden die unterschiedlichen Effekte durch die Tierart, das Alter der Tiere und deren Leistungsstadium, sowie Fütterungsdauer und Rationszusammensetzung beeinflusst (Jansman, 1993).

Mit dem Ziel, die antiinflammatorische Wirkung polyphenolreicher Zusätze effektiv zu nutzen, wurde ein Fütterungsversuch mit Ferkeln über einen Zeitraum von vier Wochen nach dem Absetzen durchgeführt. Die Ferkel der beiden Versuchsgruppen erhielten je ein polyphenolreiches Pflanzenprodukt, basierend auf Traubentrester bzw. Hopfentreber. Die Ergebnisse aus Studie 1 belegen die postulierte antiinflammatorische Wirkung der Polyphenole, da eine Inhibierung der Expression proinflammatorischer Zielgene des Transkriptionsfaktors NF- κ B im Darm beobachtet werden konnte. Dies bestätigen andere Untersuchungen am Tier, welche ebenfalls eine Reduzierung bzw. Hemmung der Genexpression von Zytokinen nach Polyphenolgaben dokumentieren (Li *et al.*, 2001; Terra *et al.*, 2009; Gessner *et al.*, 2013). Ferner konnte die Verbesserung der Futterverwertung bestätigt werden, welche bereits in einer vorhergehenden eigenen Untersuchung als auch in Untersuchungen bei anderen Nutztierspezies festgestellt wurde (Biswas und Wakita, 2001; Viveros *et al.*, 2011; Gessner *et al.*, 2013). In Studie 1 verbesserte sich die Futterverwertung durch die Hopfensupplementierung um 10%, durch die Traubentrestersupplementierung um 7% im Vergleich zu den Kontrolltieren, wohingegen weitere

Leistungsparameter nicht beeinflusst wurden. In der Literatur wird sowohl von einer positiven Beeinflussung der Leistungsparametern wie der Futteraufnahme, der Futterverwertung und den täglichen Zunahmen, als auch von Ergebnissen am Tier berichtet, bei denen eine Polyphenol-supplementierung zu negativen Effekten auf genannte Parameter führt (Oliveira *et al.*, 2010; Dal Bosco *et al.*, 2012; Chamorro *et al.*, 2012). In diesem Fall ist zu beachten, dass Faktoren wie z.B. die Polyphenolquelle, Einsatzmenge, Versuchsdauer und Zielspezies einen großen Einfluss auf die zu beobachtenden Effekte haben. Dadurch lassen sich Unterschiede in den Beobachtungen erklären und gleichzeitig Effekte nicht direkt miteinander vergleichen. Auch die Auswirkungen von Polyphenolen auf die Darmmorphologie variieren in der Literatur sehr stark. So konnte in einer eigenen vorhergehenden Untersuchung ein erhöhtes Verhältnis von Zottenhöhe zu Kryptentiefe beobachtet werden. Aus diesem Ergebnis wurde auf eine verbesserte Nährstoffverdaulichkeit auf Grund einer größeren absorptiven Oberfläche und daraus resultierend auf eine verbesserte Futterverwertung geschlossen (Gessner *et al.*, 2013). Andere Studien bestätigen ein erhöhtes Verhältnis von Zottenhöhe zu Kryptentiefe nach dem Einsatz von Polyphenolen, jedoch wurde in diesen Untersuchungen gleichzeitig ein inhibitorischer Effekt auf das Zotten- und Kriptenwachstum beobachtet (Viveros *et al.*, 2011; Sehm *et al.*, 2007). Ein Effekt der polyphenolreichen Pflanzenprodukte auf die Zotten-Kripten Architektur konnte in Studie 1 nicht nachgewiesen werden. Demnach ist die beobachtete verbesserte Futterverwertung nicht auf eine Vergrößerung der absorptiven Oberfläche zurückzuführen.

Neben der Beeinflussung der Zotten-Kripten Architektur berichten Viveros *et al.* (2011) bei Broilern nach Verfütterung eines Traubenextrakts von einem steigenden ilealen Gehalt günstig wirkender Bakterien wie Enterokokken und einem reduzierenden Effekt auf pathogene Mikroorganismen wie Clostridien. Sie schließen daraus auf einen grundsätzlich positiven Einfluss polyphenolreicher Produkte auf die Zusammensetzung der Mikroflora. Weitere Studien bestätigen diese Annahme (Dolara *et al.*, 2005; Larrosa *et al.*, 2009). Nach heutigem Wissensstand ist die Wirkung von Polyphenolen auf das mikrobielle Wachstum abhängig von der Polyphenolstruktur und -dosis, sowie der Bakterienkultur

(Campos *et al.*, 2003; Baydar *et al.*, 2006; Almajano *et al.*, 2008). Auf Grund des unterschiedlichen Zellwandaufbaus sind gramnegative Bakterien (Enterobakterien wie *E.coli* und *Salmonella*) resistenter gegenüber Polyphenolen als grampositive Bakterien (u.a. die Gattungen *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*) (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005). Einer weiterer antimikrobieller Wirkmechanismen beruht auf der Einwirkung von Polyphenolen in den Eisenstoffwechsel der Bakterien. So sind Flavonoide in der Lage, Eisen von eisenabhängigen Mikroorganismen wie *E. coli* abzusondern und somit deren Wachstum zu hemmen (Bruins *et al.*, 2011). Die Ergebnisse aus Studie 1 zeigen, dass die Zusammensetzung der Bakterienflora im Kot der Ferkel nur durch die Supplementierung des Hopfenprodukts beeinflusst wurde. In dieser Versuchsgruppe konnte ein geringerer Gehalt potentiell pathogener Bakterien (*Streptococcus spp.* und *Clostridium Cluster IV*) beobachtet werden. Das Vorhandensein nicht pathogener Bakterien wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst. Die Supplementierung des Traubentresters hatte keinen mittels PCR messbaren Einfluss auf die Zusammensetzung der Bakterienflora. Kritisch zu bemerken ist, dass in Studie 1 nur beispielhaft das Vorhandensein einzelner Bakteriengattungen nachgewiesen wurde und die Aussage deshalb nicht als allgemeingültig betrachtet werden darf. In den Kotproben der Ferkel wurde ebenfalls eine Analyse kurzkettiger Fettsäuren durchgeführt. Kurzkettige Fettsäuren (besonders Essig-, Butter- und Propionsäure) entstehen beim mikrobiellen Abbau von Kohlenhydraten und lassen auf Grund ihrer Menge und Zusammensetzung Rückschlüsse auf die beteiligten Mikroorganismen zu (Macfarlane und Macfarlane, 2003). In beiden Versuchsgruppen konnte ein geringerer Gesamtgehalt an kurzkettigen Fettsäuren und folglich ein erhöhter pH-Wert im Kot im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Auch wenn die beispielhaft untersuchten Bakteriengattungen auf keinen oder nur geringen Effekt der polyphenolreichen Produkte schließen lassen, bestätigen die Ergebnisse der Analyse auf kurzkettige Fettsäuren, dass eine Veränderung der Mikrobiota durch beide polyphenolreichen Pflanzenprodukte stattgefunden hat. Polyphenole können antinutritive Effekte auslösen. Diese äußern sich in einer geringeren Nährstoffaufnahme in intestinale Zellen, einer geringeren

scheinbaren Nährstoffverdaulichkeit und in einer Inhibierung von Verdauungsenzymen. Grund für die antinutritive Auswirkung ist eine Komplexbildung von Polyphenolen mit Nährstoffen, im Besonderen mit Proteinen, welche die Verdaulichkeit von Proteinen und Aminosäuren reduziert (Jansman *et al.*, 1989; Ortiz *et al.*, 1993). Eine direkt vergleichbare Untersuchung zur Nährstoffverdaulichkeit nach dem Einsatz natürlicher polyphenolreicher Produkte beim Schwein liegt in der Literatur nicht vor, jedoch wurde in einer Studie an Broilern nach Verfütterung eines polyphenolreichen Produkts der Traube eine reduzierte Verdaulichkeit von Aminosäuren beobachtet (Chamorro *et al.*, 2012). In Studie 1 wurde die scheinbare Verdaulichkeit der Rohnährstoffe über den Gesamtrakt durch die eingesetzten Pflanzenprodukte aus Traube und Hopfen unwesentlich beeinflusst. Bestätigt werden kann eine reduzierte scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins und der Rohfaser durch die Hopfensupplementierung (-3,9% bzw. -10%). Trotzdem ergab die Analyse der Nährstofftransporter für Glukose und Peptide (SGLT1, *sodium glucose transporter 1*; GLUT2 und GLUT5, *glucose transporter 2* und *5*; PEPT1, *intestinal peptide transporter 1*) im Jejunum eine starke Hemmung auf Expressionsebene. Die beobachtete reduzierte Genexpression scheint allerdings die Verdaulichkeit der Nährstoffe außer im Fall der minimal verringerten Rohproteinverdaulichkeit in der Hopfengruppe nicht negativ zu beeinflussen. Dies ist möglicherweise auf die ausreichende Aktivität der Transporter zurückzuführen. Des Weiteren muss beachtet werden, dass die Analyse der scheinbaren Verdaulichkeit durch die mikrobielle Aktivität im Kolon beeinflusst wird und hier die Analyse der ilealen Verdaulichkeit ein verlässlicheres Bild darstellen würde. Ebenfalls wäre die Analyse des Nährstoffuptakes durch die vorhandenen Nährstofftransporter wichtig, um eine endgültige Aussage über die Beeinflussung der Nährstoffverdaulichkeit treffen zu können. Die verschlechterte Proteinverdaulichkeit führte in Studie 1 ebenfalls nicht zu einer phänotypischen Beeinträchtigung der Ferkel. Die Auswertung der Leistungsdaten und im Besonderen der täglichen Zunahmen ergab keinen Unterschied zu den Kontrolltieren, weshalb der Einfluss der in dieser Studie eingesetzten polyphenolreichen Pflanzenprodukte auf die Nährstoffverdaulichkeit als marginal

zu betrachten ist und den praktischen Einsatz bei gleicher Konzentration und Fütterungsdauer nicht beeinträchtigt.

Zum Einfluss von natürlichen polyphenolreichen Produkten auf den Mineralstoffhaushalt von Ferkeln gibt es bislang kaum Untersuchungen. Es ist jedoch aus *in vitro* Studien und Studien am Nager bekannt, dass unterschiedliche isolierte Polyphenole und Polyphenolgemische einen Einfluss besonders auf den Eisenmetabolismus haben, wobei die Absorption von Eisen gehemmt wird (Gillooly *et al.*, 1983; Cook *et al.*, 1995). Grund hierfür sind besonders Tannine und ihre Eigenschaft, Komplexe mit Metallionen wie Eisen und Zink zu bilden und dadurch die Bioverfügbarkeit dieser Mineralstoffe negativ zu beeinflussen. Die metallchelatierende Eigenschaft von Tanninen, welche in hohen Mengen in Tee und Rotwein vorkommen, wird durch die Anzahl an Catecholringen und Hydroxygruppen ausgelöst. Die genaueren Wirkmechanismen sind bislang nur in *in vitro* Studien untersucht worden. So konnte in einer Arbeit beobachtet werden, dass zwar die Aufnahme von Eisen in Zellen durch Behandlung mit isolierten Polyphenolen erhöht wird, jedoch gleichzeitig der Ausstrom aus der Basolateralmembran inhibiert wird (Kim *et al.*, 2008). In einer weiteren *in vitro* Studie wurde der Einfluss von Tanninsäure, Traubensaft und Extrakt von Schwarztee auf die Aufnahme von Zink und Eisen in Caco-2 Zellen untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass alle polyphenolreichen Quellen die Eisenaufnahme in die Zellen verringern und im Gegensatz dazu die Aufnahme von Zink in die Zellen steigern (Screenicaslul *et al.*, 2008). Eine Beeinflussung der Zinkabsorption durch phenolische Komponenten *in vivo* wurde in vorhergehenden Untersuchungen bislang nicht oder nur in sehr geringem Maße beobachtet (Greger und Lyle, 1988; Ganji und Kies, 1994; Afsana *et al.*, 2004). Afsana *et al.* (2004) dokumentieren bei Ratten nach einer Supplementierung von Tanninsäure eine dosisabhängige Hemmung der Eisenabsorption; eine Wirkung auf die Absorption von Zink, Kupfer und Mangan wurde dabei nicht festgestellt. Da Tannine hauptsächlich für die antinutritiven Eigenschaften des Mineralstoffhaushalts verantwortlich sind, wurde in Studie 2 zunächst die Tanninkonzentration der beiden polyphenolreichen Produkte analysiert. Diese liegt im Traubentrester bei 42,9 mg GAE/g und im Hopfentreber bei 27,0 mg GAE/g. Bei einem 1%igen Einsatz der Produkte liegen die resultierenden

Tanninkonzentrationen in der Diät (429 mg GAE/kg Diät, bzw. 270 mg GAE/kg Diät) deutlich über Werten anderer Studien, in denen beispielsweise 5-20 mg Tanninsäure/kg Diät eingesetzt wurde (Afsana *et al.*, 2004). Trotz der deutlich höheren verabreichten Tanninmengen konnten keine Unterschiede in den Plasmakonzentrationen an Fe, Zn und Cu zwischen den mit Polyphenolen supplementierten Gruppen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch auf die Plasmaparameter „Totale Eisenbindungskapazität“ und „Transferrinsättigung“ hatte die Zugabe der polyphenolreichen Produkte keinen Einfluss. In der Leber konnten jedoch durch die Traubentrestergabe verringerte Konzentrationen an Zn und Cu (Zn: -13%, Cu: -16% im Vergleich zu den Kontrolltieren) beobachtet werden. Die Eisenkonzentration in der Leber wurde jedoch nicht beeinflusst. Auch die Supplementierung des Hopfentrebers hatte keinen Einfluss auf die Mineralstoffkonzentrationen in der Leber. Die Ergebnisse zeigen, dass die Supplementierung mit Traubentrester und Hopfentreber bei der gegebenen Konzentration von 1% und einer Fütterungsdauer von vier Wochen den Eisenstatus im Organismus nicht beeinflusst. Die verringerten Konzentrationen an Zn und Cu in der Leber nach Verabreichen des Traubentresters deuten auf eine reduzierte Absorption dieser Mineralstoffe hin, welche allerdings für die Tiere noch keine Mangelsituation darstellt, da die beobachteten Mineralstoffkonzentrationen in der Leber gleich oder teilweise sogar höher sind, als in Studien, in denen die Tiere ebenfalls bedarfsdeckend mit Zn und Cu versorgt wurden (Heilmann *et al.*, 1975; Rincker *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008). Im Kot konnten ebenfalls keine unterschiedlichen Konzentrationen an Fe, Zn und Cu nach der polyphenolreichen Supplementierung beobachtet werden. Die Ergebnisse aus Studie 2 zeigen nur einen sehr geringen Einfluss des Traubentresters auf den Mineralstoffhaushalt beim Ferkel, welcher aber keine weitere phänotypische Auswirkung auf den Organismus hat. Das Hopfenprodukt zeigte keinen Effekt auf den Mineralstoffhaushalt. Wichtig zu beachten ist, dass die Tiere in Studie 2 bedarfsdeckend bzw. leicht im Überschuss (nach Bedarfsangaben der GfE, 2006) mit Mineralstoffen versorgt wurden. Bei einer geringeren Mineralstoffversorgung, möglicherweise verbunden mit einer längeren Fütterungsdauer oder höheren Einsatzmengen der

tanninreichen Produkte, könnten die beobachteten Effekte eventuell stärker ausfallen und die antinutritive Wirkung würde sich bestätigen.

Wie eingangs beschrieben, werden die Auswirkungen pflanzlicher Produkte *in vivo* durch verschiedene Faktoren (beispielsweise der lokalen Konzentration, Bioverfügbarkeit, Metabolisierung) beeinflusst, weshalb die in Studien beschriebenen Effekte und Wirkungen häufig variieren. Ebenfalls wird nach einer Aufstellung von Han *et al.* (2007) deutlich, dass es große Wirkunterschiede zwischen einzelnen Polyphenolen gibt. Weshalb je nach gewünschter Wirkung eine Unterscheidung nach Herkunft und Art der Polyphenole vollzogen werden muss. Trotz der kritischen Betrachtung konnten in den vorliegenden Untersuchungen deutliche positive Effekte auf die Gesundheit der Tiere ohne negative Einflüsse auf Nährstoffverdaulichkeit oder Mineralstoffhaushalt beobachtet werden, welche den praktischen Einsatz pflanzlicher Produkte in der Nutztierfütterung sinnvoll erscheinen lassen.

5. Zusammenfassung

Das Absetzen von Ferkeln stellt eine besonders kritische Phase dar, in der häufig Durchfall und Entzündungsprozesse auftreten, welche sich negativ auf Aufzuchterfolge auswirken. Um diesen Prozessen entgegenzuwirken, werden bereits heute polyphenolreiche Pflanzenextrakte eingesetzt, da besonders Polyphenole, neben positiven Effekten auf die Mikroflora des Verdauungstraktes, ein breites Wirkspektrum haben. Sie besitzen antioxidative, entzündungshemmende und präbiotische Eigenschaften.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte polyphenolreicher Ergänzungsfuttermittel von Weinrebe und Hopfen beim abgesetzten Ferkel untersucht. Die Versuchsgruppen erhielten je 1% des polyphenolreichen Produkts zusätzlich zur Kontrolldiät. Nach einer Fütterungsdauer von vier Wochen wurden die Tiere zur Probenentnahme geschlachtet. Die Supplementierung beider Produkte führte zu einer Verbesserung der Futtermittelverwertung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Des Weiteren konnten entzündungshemmende Effekte auf Transkriptionsebene in allen untersuchten Darmabschnitten (Duodenum, Ileum, Colon *ascendens*) festgestellt werden. Die Untersuchung der Mikroflora sowie des Fettsäuremusters im Kot zeigten Veränderungen durch die Zulage der polyphenolreichen Produkte. Mögliche negative Auswirkungen der verwendeten polyphenolreichen Produkte wie eine Reduzierung der Nährstoff- und Mineralstoffabsorption wurden nicht beobachtet.

Auf Grund der beobachteten positiven Effekte auf die Darmgesundheit der Ferkel ist der praktische Einsatz pflanzlicher Produkte in der Nutztierfütterung besonders von Jungtieren im absetznahen Zeitraum zur Erleichterung des Absetzens und zur Minimierung der Prävalenz von Durchfallerkrankungen empfehlenswert.

6. Summary

Weaning of piglets is a critical process, which is often associated with inflammatory processes in the intestine and diarrhea which may lead to a depression of animal growth. Today, polyphenol-rich plant products are used to prevent animals from weaning associated disorders because these products exert positive effects on intestinal microbiota as well as antioxidative, anti-inflammatory and prebiotic effects.

In this study, polyphenol-rich plant products from grape and hop were used in weaned piglets. The animals received either 1% of a grape or a hop product in exchange of wheat from the basal diet. After a feeding period of 4 weeks, the piglets were slaughtered for sampling. The piglets of both treatment groups showed an improved gain:feed ratio in comparison to the control group. In addition, anti-inflammatory effects in all analysed parts of the intestine (duodenum, ileum, colon *ascendens*) were observed. Also a microbial change and a modified composition of volatile fatty acids in fecal samples of both treatment groups were analysed. Feeding both polyphenol-rich products had no negative effects on nutrient and mineral absorption.

Due to the observed anti-inflammatory and positive effects of products from grape and hop on intestinal health in weaned piglets in this study, the utilization of plant products in animal feed, especially in young animals after weaning to minimize gut disorders is recommended.

7. Literaturverzeichnis

- Afsana K, Shiga K, Ishizuka S, Hara H (2004) Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not of zinc, copper and manganese by rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68: 584-592.
- Almajano MP, Carbó R, López-Jiménez JA, Gordon MH (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusion. *Food Chem.* 108(1): 55-63.
- Amella A (1985): Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and bioflavonoids. *Planta Med.* 5: 16-21.
- Arora P, Ansari SH, Nazish I (2010) Bio-Functional Aspects of Grape Seeds - A Review. *Int J Phytomed.* 2: 177-185.
- Baggiolini M (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med.* 250: 91-104.
- Biendl M (2002/2003) Research on the Xanthohumol content in hops. *Hopfenrundschau International* 72-75.
- Bartsch H, Frank N, Gamal-Eldeen A, Gerhäuser C, Heiss E, Klimo K, Knauff J, Neumann I, Scherf H, Alt A, Becker H, Nookandeeh A (2002/2003) Isolierung von Xanthohumol, einem prenylierten Chalcon aus Hopfen (*Humulus lupulus* L.) mit Krebs-chemopräventiver Wirkung. *Hopfenrundschau International* 44-55.
- Barton GM, Medzhitov R (2003) Toll-like receptor signaling pathways. *Science.* 300: 1524-1525.
- Baydar NG, Sagdic O, Özkan G, Cetin S (2006) Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *Int J Food Sci Technol.* 41: 799-804.
- Biswas AH, Wakita M (2001) Effect of Dietary Japanese Green Tea Powder Supplementation on Feed Utilization and Carcass Profiles in Broilers. *J Poult Sci.* 38: 50-57.
- Bravo L (1998) Polyphenolics: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 56: 317-333.

- Bruininx EMAM, Binnendijk GP, van der Peet-Schweing CMC (2002) Effect of creep feed consumption on individual feed intake characteristics and performance of group-housed weanling pigs. *J Anim Sci.* 80: 1413-1418.
- Bruins MJ, Vente-Spreuwenberg MAM, Smits CH, Frenken LG (2011) Black tea reduces diarrhoea prevalence but decreases growth performance in enterotoxigenic *Escherichia coli* -infected post-weaning piglets. *J Anim Physiol a Anim Nutr.* 95: 388-398.
- Campos FM, Couto JA, Hogg TA (2003) Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *J Appl Microbiol.* 94: 167-174.
- Cermak R (2008) Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4 (1): 17-35.
- Chamorro S, Viveros A, Centeno C, Romero C, Arija I, Brenes A (2012) Effects of dietary grape seed extract on growth performance, amino acid digestibility and plasma lipids and mineral content in broiler chicks. *Animal.* 7(4): 555-61.
- Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC (1999): Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J.* 340: 715-722.
- Clifford MN (2004) Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* 70: 1103-1114.
- Cook JD, Reddy MB, Hurrell RF (1995) The effect of red and white wines on nonheme iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 61: 800-804.
- Dal Bosco A, Mourvaki E, Cardinali R, Servili M, Sebastiani B, Ruggeri S, Mattioli S, Taticchi A, Esposito S, Castellini C (2012) Effect of dietary supplementation with olive pomaces on the performance and meat quality of growing rabbits. *Meat Sci.* 92: 783-788.
- Denis MC, Furtos A, Dudonné S, Montoudis A, Garofalo C, Desjardins Y, Delvin E, Levy E (2013) Apple Peel Polyphenols and Their Beneficial Actions on Oxidative Stress and Inflammation. *PLoS ONE* 8: e53725.
- Dolara P, Luceri C, De Filippo C, Femia AP, Giovannelli L, Caderni G, Cecchini C, Silvi S, Orianesi C, Creci A (2005) Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene

- expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat Res Fund Molec Mech Mutag.* 591: 237-246.
- Engelhardt, Wolfgang (Hrsg.) (2010): Physiologie der Haustiere. 3. Auflage Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Gaffney S, Williams V, Flynn P, Carlino R, Mowry C, Dierenfeld E, Babb C, Fan J, Tramontano WA (2004) Tannin/Polyphenol effects on iron solubilization in vitro. *Bios.* 75: 43-52.
- Ganji V und Kies CV (1994) Zinc bioavailability and tea consumption. Studies in healthy humans consuming self-selected and laboratory controlled diets. *Plant Foods Hum Nutr.* 46: 267-276.
- Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB (2002) Antibiotics as growth promotans: mode of action. *Anim Biotechnol.* 13: 29-42.
- Gillooly M, Bothwell TH, Torrance JD, McPhail AP, Derman DP, Bezwoda WR, Mills W, Charlton RO, Mayet F (1983) The effects of organic acids, phytases and polyphenols on iron absorption from vegetables. *Br J Nutr.* 49: 331-342.
- Gollnisch K (2002) Förderung der Mastleistung bei Schwein durch Pflanzenprodukte. *Der Praktische Tierarzt*, S. 1072-1077.
- Greger JL und Lyle BJ (1988) Iron, copper and zinc metabolism of rats fed various levels and types of tea. *J Nutr.* 118: 52-60.
- Halliwel B, Rafter J, Jenner A (2005) Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidants or not? *Am J Clin Nutr.* 81: 268-276.
- Han X, Shen T, Lou H (2007) Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci.* 8: 950-988.
- Hassan IAG, Elzubeir EA, El Tinay AH (2003) Growth and Apparent Absorption of Minerals in Broiler Chicks Fed Diets with Low or High Tannin Contents. *Trop Anim Health Prod.* 35: 189-196.
- Heilmann P, Gürtler H, Wolf H (1975) Concentration and subcellular distribution of iron and cooper in the pig liver. II. Studies on the livers of porkers and swine for slaughter with regard to the addition of copper sulfate to the diet. *Acta Biol Med Ger.* 34: 1589-1601.

- Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 62: 1276-1282.
- Hollman PCH und Arts ICW (2000) Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence, and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 80: 1081-1093.
- Ihara T, Tsujikawa T, Fujiyama Y (2000) Regulation of PepT1 peptide transporter expression in the rat small intestine under malnourished conditions. *Digestion.* 61: 59-67.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Hinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 275: 218-220.
- Jansman AJM, Huisman J, Van der Poel AFB (1989) Faba beans with different tannin contents: ileal and faecal digestibility in piglets and growth in chicks. In: *Recent advances in research of antinutritional factors in legume seeds.* Pudoc, Wageningen, Niederlande. 176-180.
- Jansman AJM (1993) Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. *Nutr Res Rev.* 6: 209-236.
- Kim EY, Ham SK, Shigenaga MK, Han O (2008) Bioactive dietary polyphenolic compounds reduce non heme iron transport across human intestinal cell monolayers. *J Nutr.* 138: 1647-1651.
- Kracht M und Saklatvala J (2002) Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine.* 20: 91-106.
- Lallès JP, Boudry G, Favier C (2004) Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res.* 53: 301-316.
- Lallès JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR (2007) Weaning - A challenge to gut physiologists. *Livestock Sci.* 108: 82-93.
- Landete JM (2012) Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism and Health. *Food Sci Nutr.* 52: 936-948.
- Larrosa M, Yañéz-Gascón MJ, Selma MV, González-Sarrías A, Toti S, Cerón JJ, Tomás-Barberán F, Dolara P, Espín JC (2009) Effect of a Low Dose of Dietary Resveratrol on Colon Microbiota, Inflammation and Tissue

- Damage in a DSS-Induced Colitis Rat Model. *J Agric Food Chem.* 57: 2211-2220.
- Lee SH, Shinde P, Choi J, Park M, Ohh S Kwon IK, Pak SI, Chae BJ (2008) Effects of dietary iron levels on growth performance, hematological status, liver mineral concentration, fecal microflora, and diarrhea incidence in weanling pigs. *Biol trace Elem Res.* 126: 57-68.
- Lee SH, Shinde PL, Choi JY, Kwon IK, Lee JK, Pak SI, Cho WT, Chae BJ (2010) Effects of tannic acid supplementation on growth performance, blood hematology, iron status and faecal microflora in weanling pigs. *Livest Sci.* 131: 281-286.
- Lewandowska U, Szewczyk K, Hrabec E, Janecka A, Gorlach S. (2013) Overview of Metabolism and Bioavailability Enhancement of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 61: 12183-12199.
- Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Tian X (2001) Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol Sin.* 22: 1117–1120.
- Macfarlane S und Macfarlane GT (2003) Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc.* 62: 67-72.
- McCracken BA, Spurlock ME, Roos MA (1999) Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J Nutr.* 129: 613-619.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1.2: 135-145.
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 52: 673-751.
- Motohashi H, Yamamoto M (2004) Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med.* 10 (11): 549-557.
- Oliveira RA, Narciso CD, Bisinotto RS, Perdomo MC, Ballou MA, Dreher M, Santos JEP (2010) Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves. *J Dairy Sci.* 93: 4280-4291.
- Olthof MR, Hollman PC, Katan MB (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr.* 131: 66-71.

- Ortiz LT, Centeno C, Treviño J (1993) Tannin in faba bean seeds: effects on the digestion of protein and amino acids in growing chicks. *Anim Feed Sci Tech.* 41: 271-278.
- Pastrana-Bonilla E, Akoh CC, Sellappan S, Krewer G (2003) Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J Agric Food Chem.* 51: 5497-4503.
- Pié S, Lallès JP, Blazy F (2004) Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr.* 134: 641-647.
- Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH (1997) Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig. A review. *Livest Prod Sci.* 51: 215-236.
- Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Hartmann-Schmidlin S, Kähkönen M, Heinonen M, Määttä-Riihinen K, Oksman-Caldentey KM. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J Appl Microbiol.* 98(4): 991-1000.
- Rincker MJ, Hill GM, Link JE, Rowntree JE (2004) Effects of dietary iron supplementation on growth performance, hematological status, and whole-body mineral concentrations of nursery pigs. *J Anim Sci.* 81: 3189-3197.
- Shi J, Yu J, Pohorly J, Kakuda Y (2003) Polyphenolics in Grape Seeds- Biochemistry and Functionality. *J Med Food.* 6: 291-299.
- Sehm J, Lindermayer H, Dummer D, Pfaffl MW (2007) The influence of polyphenol rich apple pomace or red-wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 91: 289-296.
- Sen CK und Packer L (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J.* 10: 709-720.
- Stevens JF, Page JE (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer to your good health. *Phytochemistry.* 65: 1317-1330.
- Stokes CRB, Haverson MK, Harris C, Jones P, Inman C, Pie S, Oswald IP, Williams BA, Akkermans ADL, Sowa E, Rothkötter HJ, Miller BG (2004) Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. *Anim Res.* 53: 325-334.

- Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardevol A, Blade C, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Salvado J, Arola L (2009) Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem.* 20: 210-218.
- Viveros A, Chamorro S, Pizarro M, Arija I, Centeno C, Brenes A (2011) Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poult Sci.* 90: 566-578.
- Wang J, Chen L, Li P (2008) Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J Nutr.* 138: 1025-1032.
- Wegener E (2006) Modulierung der NF- κ B-Aktivität in T-Zellen durch den Carma1-Bcl10-Malt1 Komplex. *Dissertation, Humboldt Universität Berlin.*
- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 36(7): 838-849.
- Wright NA (1997) Stem cell repertoire in the intestine. Stem cells. *Academic Press Ltd.* 315-329.
- Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB (2010) Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int J Mol Sci.* 11: 622-646.
- Ziegler TR, Almahfouz A, Pedrini MT (1995) A comparison of rat small intestinal insulin and insulin-like growth factor I receptors during fasting and refeeding. *Endocrinology.* 136: 5148-5154.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen,.....

.....

Anja Fiesel

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich auf diesem Weg unterstützt und begleitet haben!

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Eder für die Überlassung des interessanten Themas und die Ermöglichung der Promotion am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der JLU Gießen. Seine stets freundliche und konstruktive Unterstützung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. S. Hoy für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Unterstützung, die er mir bereits während meines Studiums entgegengebracht hat.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktoranden des Instituts, die mir stets mit wertvollen Ratschlägen, Unterstützung bei Tierversuchen und im Labor, konstruktiver Kritik und freundschaftlichen 9-Uhr-Pausen weitergeholfen haben. Ohne eure Hilfsbereitschaft, Geduld, gute Laune und aufmunternden Worte wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Der H. Wilhelm Schaumann Stiftung zur Förderung der Agrarwissenschaften danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Schließlich möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und im Besonderen Björn danken, die mich alle in dieser Zeit begleitet, ertragen, angehört, aufgebaut und unterstützt haben.