

# Tanninhaltige Pflanzenextrakte und ihre Proteinausfällungskapazität *in vitro*

M. Schweigmann<sup>1</sup>, M. Gierus

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung,  
Grünland und Futterbau/Ökologischer Landbau

<sup>1</sup> corresponding author: mschweigmann@email.uni-kiel.de

## Einleitung und Problemstellung

Tannine sind Gerbstoffe, welche die Eigenschaft besitzen, Komplexe mit Proteinen einzugehen. Mit dieser Komplexbildung wird die Abbaugeschwindigkeit durch Mikroorganismen im Pansen reduziert, wodurch mehr Futterprotein unabgebaut den Pansen passieren kann (BARRY und McNABB, 1999; CASSIDA *et al.*, 2000; GRABBER, 2009). Das pansenbeständige Protein (UDP) erhöht sich dadurch. Es wird angenommen, dass die Komplexbildung pH-abhängig ist und die Proteine im sauren Milieu des Labmagens wieder freigelassen werden (HASLAM, 1996; JONES und MANGAN, 1977). Sie wären so für das Tier zur Verdauung verfügbar.

Dieser Zusammenhang sollte *in vitro* untersucht werden. Hierfür wurden Extrakte aus Quebracho (*Schinopsis lorentzii*), Mimose (*Acacia mearnsii*), Tara (*Caesalpinia spinosa*) und Gambier (*Uncaria gambir*) zur Bindung von Bovinem Serum Albumin (BSA) verwendet und mittels Farbreaktion photometrisch gemessen. Durch Variation des pH-Wertes sollten unterschiedliche Reaktionsbedingungen, wie sie z.B. im Pansen und Labmagen vorliegen, abgebildet werden.

Viele Wiesenkräuter und Futterleguminosen enthalten zwar Tannine, allerdings nur in relativ geringen Konzentrationen. Somit wäre der effektive Einsatz von Tanninextrakten als Futtermittelzusatzstoff ein großer Fortschritt. Projektziel ist die Entwicklung einer Methode, um die optimale Zulagemenge eines Extraktes in der Fütterung von Milchkühen bestimmen zu können.

## Material und Methoden

Quebracho-, Mimosen- und Tara-Extrakt stellte Otto Dille® (Norderstedt; Handelsmarke der Baeck & Co. Hamburg (GmbH & Co. KG)) bereit. Den Gambier-Extrakt lieferte die Christian D. Markmann GmbH (Hamburg). Während Quebracho, Mimose und Gambier die kondensierten Tannine vertreten, liegt der Hauptteil der Tannine in Taraextrakt laut Hersteller

in der hydrolysierbaren Form vor. Alle Extrakte wurden im Kühlschrank bei 4°C dunkel gelagert. Das BSA für die Analysen lieferte die Merck KGaA (Darmstadt). Auch dieses wurde dunkel im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Bestimmung der Gehalte an kondensierten Tanninen erfolgte mittels Butanol/HCl-Methode nach TERRILL *et al.* (1992), die Gesamtphenole wurden mit der Folin-Ciocalteu-Methode nach SINGLETON und ROSSI (1965) ermittelt. Zur Messung der Proteinbindung am Photometer wurde die Methode von OSBORNE und MCNEILL (2001) wie im Folgenden beschrieben modifiziert. Alle Analysen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung.

Es wurden Extrakt und pH-Werte variiert. Der jeweilige Tanninextrakt wurde in Mengen von 0 bis 10mg eingewogen. Natrium-Acetat-Puffer (0.2M Acetat, 0.17M NaCl) wurde auf die sechs verwendeten pH-Werte zwischen 7 und 2 eingestellt. BSA wurde mit 1.5mg/ml im Puffer gelöst und davon 1950µl in jedes Cap eingebracht. Die Caps wurden gevortext, gefolgt von einer Ruhephase von 15min (dunkel), in der die Tannin-Protein-Bindung stattfinden konnte. In 20min Zentrifugation bei 2400 x g konnten sich die Komplexe als Pellet absetzen.

Überstände wurden abpipettiert und die Pellets mit je 500µl Puffer wieder rückgelöst. In Lösung befindliche Proteine wurden mittels Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) am Photometer bei 595nm gemessen (Biochrom Libra S32PC UV, Biochrom Ltd., Cambridge, UK). Hierfür wurde vorab eine Standardkurve für BSA erstellt. Extrakteigenes Protein wurde von den Ausfällungskurven abgezogen.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der statistischen Software R, wobei die Daten in eine log-logistic Funktion der Form  $f(x) = 0 + d\{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))\}$  gefittet wurden. Parameter  $d$  entspricht dabei der maximal erreichten Ausfällung (Plateau), Parameter  $e$  entspricht der Extraktmenge, mit der 50% von  $d$  erzielt wurden (ED50). In der Auswertung wurde  $p < 0.05$  als signifikant angesehen.

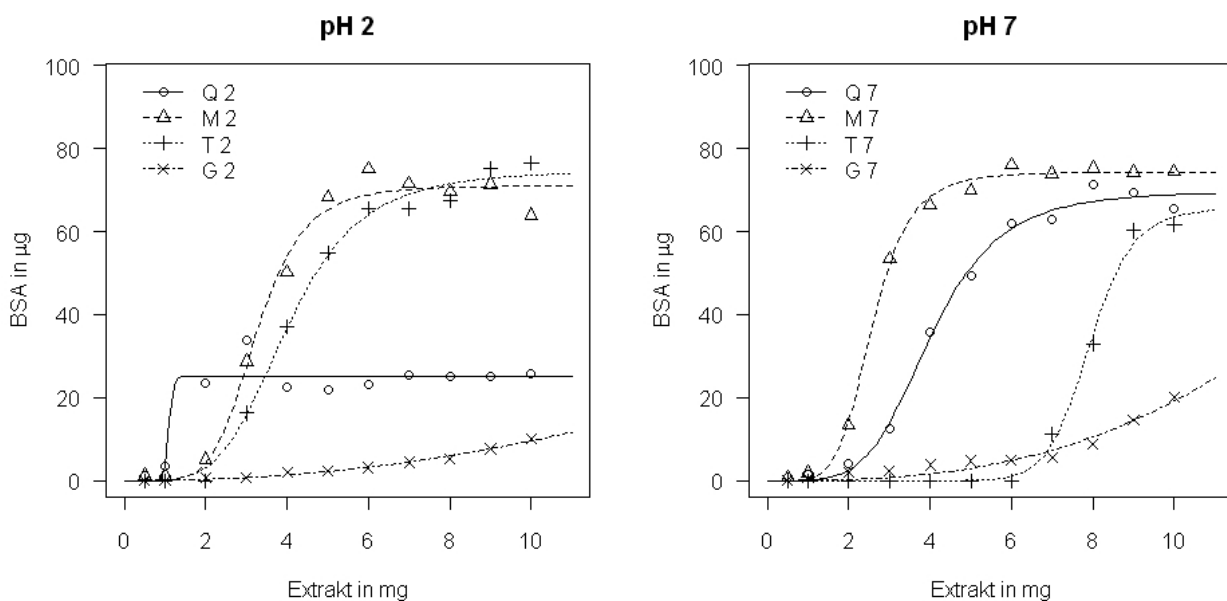
## Ergebnisse und Diskussion

Wie in Tabelle 1 zu sehen, unterschieden sich die CT-Gehalte zwischen den Extrakten stark, während die Gesamtphenole bei allen verhältnismäßig hoch lagen. Vergleicht man mit der Literatur, wird dort vor allem bei Quebrachoextrakten von höheren CT-Werten ausgegangen (BENCHAAR und CHOUINARD, 2009; ROBBINS *et al.*, 1991). Diese sind aber oft nicht oder nicht selbst gemessen worden (z.B. EL-WAZIRY *et al.*, 2007, VASTA *et al.*, 2009). Auch bei selbst gemessenen Werten schwanken die Angaben (BEAUCHEMIN *et al.*, 2007; BUENO *et al.*, 2008), wobei letztere ähnliche Mengen fanden wie im vorliegenden Projekt.

**Tab. 1:** Extraktgehalte an kondensierten Tanninen (CT) und Gesamtphenolen (GP) in %

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

Die BSA-Analysen zeigten teilweise große Differenzen im Ausfällungsverhalten der Extrakte untereinander sowie im Einfluss des pH-Wertes auf (auszugsweise in Abb. 1 für pH 7 und 2).



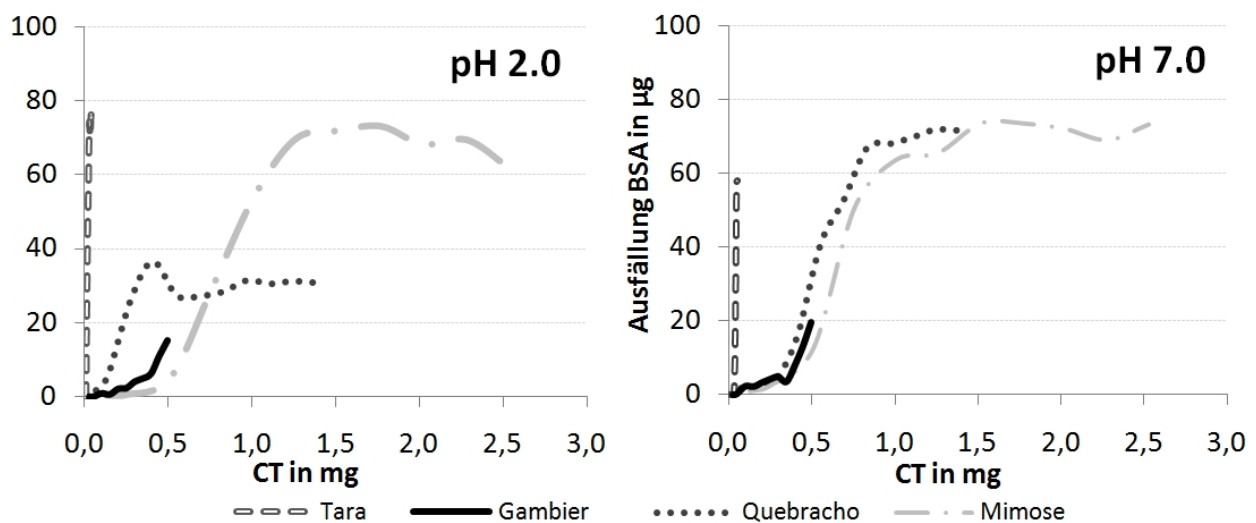
**Abb. 1:** Ausfällung von BSA in µg durch die Tanninextrakte bei pH-Wert 2 und 7 für die Extrakteinwaage in mg (Q: Quebracho, M: Mimose, T: Tara, G: Gambier).

Für Tara ergaben sich teils fragwürdige Ausfällungen, die das eingewogene BSA (60µg) überstiegen. Eventuell ist dies auf Interaktionen mit der Farbreagenz zurückzuführen, da in den Messküvetten nach einiger Standzeit Flockenbildung beobachtet werden konnte. Mimose erreichte immer vergleichbare Plateaus, sodass die Proteinbindung hier relativ pH-unabhängig zu sein scheint. Plateaus von Mimose waren außerdem immer höher als von Quebracho ( $p < 0.001$ ), abgesehen von pH 7. Sie erreichte also in allen pH-Umgebungen die maximal mögliche BSA-Bindung. Tara erreichte statistisch vergleichbare Plateaus wie Mimose, nur bei pH 3 und 6 war  $p < 0.05$ . Gambier fällte meist deutlich weniger aus als die anderen Extrakte. Ein signifikanter Einfluss des pH-Wertes konnte für Parameter  $d$  nicht nachgewiesen werden. Innerhalb der Messreihen bis 10mg Extrakt erreichte Gambier außerdem nicht immer ein Plateau, was vielleicht durch den geringen CT-Gehalt zu erklären

wäre. Auch war die Steigung der Ausfällungskurven immer deutlich flacher als bei den anderen Extrakten. Tara lag allerdings im CT-Gehalt noch deutlich niedriger, was darauf hindeuten könnte, dass hier die hydrolyisierbaren Tannine und Phenole einen beträchtlichen Anteil der Ausfällung geleistet haben.

Die ED50 entwickelte sich mit Änderung des pH-Wertes nicht geradlinig. Tendenziell stieg die ED50 bei Quebracho von niedrigeren zu höheren pH-Werten an, was jedoch nur für die Schritte von pH 3 nach 6, von 3 nach 7 und von 6 nach 7 signifikant war ( $p < 0.0001$ ). Bei Mimose war zu beobachten, dass die ED50 zwischen pH 2 und 4 abfiel, anschließend zwischen pH 4 und 7 aber wieder anstieg ( $p < 0.01$ ). Gemeinsam mit der statistisch gleichbleibenden Plateauhöhe betrachtet, weisen die Daten darauf hin, dass Mimose je mg Extrakt bei pH 4 am effizientesten das BSA gebunden hat. Für Tara ließ sich dieselbe Entwicklung beobachten, auch dieser Extrakt schien bei pH 4 am effizientesten zu arbeiten ( $p < 0.0001$ ). Gambier zeigte keinen Einfluss des pH-Wertes auf die ED50 ( $p > 0.05$ ).

Demnach unterschieden sich die Tanninextrakte in ihrer Ausfällungskapazität. Bezieht man die Ausfällungskurven statt auf den Extrakt allerdings auf das enthaltene CT, liegen diese für die verschiedenen Quellen in den oberen pH-Werten noch sehr nah beieinander (Abb. 2). Nur Tara weicht ab, was ein weiteres Indiz für die Aktivität der hydrolysierbaren Tannine sein kann. Bei pH 2 sieht man hingegen deutlichere Unterschiede. In der Grafik wird außerdem erkennbar, dass Gambier-CT scheinbar ähnlich agiert wie Mimosen-CT, wenn es auch im Extrakt in viel geringerer Konzentration vorhanden ist.



**Abb. 2:** Vergleich der Ausfällung von BSA in µg bezogen auf die Einwaage in mg kondensierte Tannine (CT) für pH-Wert 2 und 7.

## Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die CT-Quelle in Verbindung mit dem pH-Wert das Komplexierungsverhalten der Tannine beeinflusst. Auch die Anwesenheit anderer phenolischer Verbindungen scheint hier Bedeutung zu haben. Somit werden die Extrakte vermutlich im Pansen-bzw. Labmagenmilieu unterschiedlich reagieren. Von den untersuchten Extrakten scheint nur Quebracho deutlich pH-abhängige Bindungen einzugehen und somit am ehesten zur Steigerung der Protein-Nutzungseffizienz geeignet zu sein.

## Literatur

- OSBORNE, N.J.T. und MCNEILL, D.M. (2001): Characterisation of *Leucaena* condensed tannins by size and protein precipitation capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1113-1119.
- SAS (2008): SAS Software Release 9.2., SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.
- SINGLETON, J. und ROSSI, P. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- TERRILL, T.H., ROWAN, A.M., DOUGLAS, G.B., BARRY, T.N. (1992): Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58, 321-329.
- BARRY, T.N. und MACNABB, W.C. (1999): The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition* 81, 263-272.
- CASSIDA, K.A., GRIFFIN, T.S., RODRIGUEZ, J., PATCHING, S.C., HESTERMANN, O.B., RUST, S.R. (2000): Protein degradability and forage quality in maturing alfalfa, red clover and birdsfoot trefoil. *Crop Science* 40, 209-215.
- GRABBER, J. H. (2009): Protein fractions in forage legumes containing protein-binding polyphenols: Freeze-drying vs. conservation as hay or silage. *Animal Feed Science and Technology* 151, 324-329.
- HASLAM, E. (1996): Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Production* 59, 205-215.
- BUENO, I.C.S., VITTI, D.M.S.S., LOUVANDINI, H., ABDALLA, A.L. (2008): A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. *Animal Feed Science and Technology* 141, 151-170.
- EL-WAZIRY, A.M., NASSER, M.E.A., SALLAM, S.M.A., ABDALLA, A.L., BUENO, I.C.S. (2007): Processing methods of soybean meal 2. Effect of autoclaving and quebracho tannin treated-soybean meal on gas production and rumen fermentation *in vitro*. *Journal of Applied Sciences Research* 3, 17-24.
- BENCHAAR, C. und CHOUINARD, P.Y. (2009): Short communication: assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92, 3392-3396.
- VASTA, V., MELE, M., SERRA, A., SCERRA, M., LUCIANO, G., LANZA, M., PRIOLO, A. (2009): Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. *Journal of Animal Science* 87, 2674-2684.
- JONES, W.T. und MANGAN, J.L. (1977): Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) with Fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 126-136.

VAN SOEST, P.J. (1994): Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca.

ROBBINS, C.T., HAGERMAN, A.E., AUSTIN, P.J., MCARTHUR, C., HANLEY, T.A. (1991): Variation in mammalian physiological responses to a condensed tannin and its ecological implications. *Journal of Mammalogy* 72, 480-486.

MCDUGALL, E.I. (1948): Studies on ruminant Saliva. *Biochemical Journal* 43, 99-109.