

Zum Potential alternativer Futterpflanzen (Wiesenkräuter und Leguminosen) hinsichtlich des Proteinbindungsvermögens sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe

M. Hamacher, R. Loges und F. Taube

CHRISTIAN-ALBRECHTS UNIVERSITÄT ZU KIEL, INSTITUT FÜR PFLANZENBAU UND PFLANZENZÜCHTUNG, GRÜNLAND UND FUTTERBAU/ÖKOLOGISCHER LANDBAU, Hermann-Rodewald-Str. 9, 24118 Kiel, mhamacher@gfo.uni-kiel.de

1. Einleitung und Problemstellung

Grünlandwirtschaft und Ackerfutterbau als Grundlage für Haltung und Ernährung der Wiederkäuer stehen aktuell der Herausforderung einer verbesserten Stickstoffnutzungseffizienz (NUE) gegenüber. Hohe Stickstoffverluste sind auf hohe ruminale Abbauraten des Futterproteins zurückzuführen und führen neben unproduktiver Belastungen des tierischen Stoffwechsels zu negativen Umweltwirkungen. Insbesondere kleereiche Aufwüchse verfügen über hohe Anteile an schnell löslichem Protein.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der NUE in der Wiederkäuerernährung besteht im Einsatz tanninhaltiger Futtermittel. Der Effekt beruht auf dem Vermögen kondensierter Tannine in Abhängigkeit des pH-Wertes Proteine reversibel zu binden und so den Anteil an pansenstabilem Protein zu erhöhen (JONES und MANGAN, 1977). Neben dem tropischen Quebracho enthalten auch einheimische Futterleguminosen wie Esparsette und Hornklee kondensierte Tannine (HÄRING ET AL., 2008). Kräutern wird neben einer allgemeinen Heilwirkung ein erhöhtes Vorkommen an phenolischen Verbindungen zugesprochen. Bisher fehlt jedoch eine umfassende Beurteilung verschiedener Kräuter- und Leguminosenarten hinsichtlich des Effekts auf den ruminale Proteinabbau.

Ein breites Sortiment an Wiesenkräutern und Futterleguminosen wurde auf die Zusammensetzung des Rohproteins gemäß dem Cornell Net Carbohydrate and Protein System (SNIFFEN ET AL., 1992), die Gehalte an kondensierten Tanninen und Gesamtphenolen, sowie das Bindungsvermögen des Modellproteins Bovines Serum Albumin (BSA) untersucht. Übergeordnetes Ziel des Projektes ist die Analyse des Potentials alternativer Futterpflanzen und Wiesenkräuter zu einer verbesserten Stickstoffnutzung in der Wiederkäuerernährung beizutragen.

2. Material und Methoden

Eine Auswahl von sechs Wiesenkräutern, Deutschem Weidelgras und zehn Futterleguminosen wurde 2009 als Untersaat in Sommergetreide auf dem ökologisch bewirtschafteten Versuchsgut „Lindhof“ (sL, durchschnittlich 40 Bodenpunkte) im Split-Plot-Design in drei Wiederholungen etabliert (Tab. 1).

Die Futterqualitätsparameter wurden anhand gefriergetrockneter Proben des ersten Aufwuchses im ersten Hauptnutzungsjahr 2010 bestimmt. Erntezeitpunkt war der 31.05.2010. Die Bestimmung der Stickstofffraktionen A, B1, B2, B3 und C beruht auf dem Verfahren der Nah-Infrarot-Reflex-Spektroskopie. Als Referenzmethode diente die Bestimmung nach LICITRA ET AL. (1996), sowie die Messung des Stickstoffgehalts nach Dumas mit einem CN-Analyser Vario Max (Fa. Elementar).

Tab. 1: Untersuchtes Artenspektrum, Vollparzellen 13*3m

Leguminosen		Nicht-Leguminosen	
Rotklee	<i>Trifolium pratense</i> L.	Dt. Weidelgras	<i>Lolium perenne</i> L.
Gelber Steinklee	<i>Melilotus officinalis</i> L.	Zichorie	<i>Cichorium intybus</i> L.
Galega	<i>Galega orientalis</i>	Kleiner Wiesenknopf	<i>Sangisorbia minor</i>
Esparsette	<i>Onobrychis viciifolia</i> L.	Spitzwegerich	<i>Plantago lanceolata</i> L.
Schwedenklee	<i>Trifolium hybridum</i> L.	Löwenzahn	<i>Taraxacum officinalis</i> L.
Gelbklee	<i>Medicago lupulina</i> L.	Kümmel	<i>Carum Carvi</i> L.
Hornklee	<i>Louts corniculatus</i> L.	Schafgarbe	<i>Achillea millefolium</i> L.
Luzerne	<i>Medicago sativa</i> L.		
Weißklee	<i>Trifolium repens</i> L.		
Weißer Steinklee	<i>Melilotus alba</i> Med.		

Für die weiteren Analysen wurden je zweimal 300 mg des gemahlten Pflanzenmaterials in Aceton extrahiert. Der Gesamtphenolgehalt wurde colorimetrisch mit dem Folin-Ciocalteu-Ansatz nach SINGLETON UND ROSSI (1965) ermittelt. Der Gehalt an kondensierten Tanninen wurde ebenfalls colorimetrisch mittels des Butanol-HCl-Ansatzes nach TERRILL ET AL. (1992) bestimmt. Für die Erfassung des BSA-Fällungsvermögens wurde die Methode von OSBORNE UND MCNEILL (2001) wie folgt modifiziert: BSA wurde entsprechend einer Zielkonzentration von 1,5 mg/ml in Natrium-Acetat-Puffer (pH = 5,0) gelöst. Pflanzenextrakt, Puffer und Aceton wurden in 1950 µl Ansätzen nach einer 15minütigen Ruhezeit bei 2400 x g zentrifugiert. Es folgte das Abpipettieren des Überstandes und Rücklösen der Pellets in 500 µl Acetat-Puffer ohne BSA-Zugabe. Die Bestimmung des Proteins in der Lösung erfolgte nach BRADFORD (1976) mit BioRad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Der Reaktionsblindwert sowie extrakteigenes Protein wurden jeweils von den Messwerten abgezogen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistik-Software „R“ unter Verwendung eines linear mixed-effects Modells und Grand-Mean-Tests.

3. Ergebnisse und Diskussion

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Sowohl für den Gesamtphenol- und Tanningehalt, das BSA-Fällungsvermögen, als auch die Verteilung der Stickstofffraktionen konnte ein signifikanter Einfluss der Art nachgewiesen werden.

Entsprechend den Erwartungen konnten für Esparsette und Hornschotenklee überdurchschnittliche Gehalte an kondensierten Tanninen gemessen werden. Alle weiteren Arten erzielten lediglich Gehalte zwischen 0,05% und 0,3% der TM. Eine deutlichere Variation zeigte sich in den Gesamtphenolgehalten (Tab. 2). Für die Kräuter konnten gegenüber den Leguminosen und Deutschem Weidelgras tendenziell höhere Gesamtphenolgehalte gezeigt werden. Ausnahmen bei den Leguminosen bilden Hornklee und Esparsette, deren Gesamtphenolgehalte, die der anderen Leguminosen ums doppelte bzw. fünffache überstiegen. Im Gegensatz zu Esparsette und Hornklee sind die deutlich hohen Phenolkonzentrationen von Schafgarbe, Spitzwegerich, Zichorie, Kümmel und Kleiner Wiesenknopf nicht auf ebenso hohe CT-Konzentrationen zurückzuführen.

Tab. 2: Durchschnittliche Gehalte an kondensierten Tanninen (CT), Gesamtphenolen (GP) und dem BSA-Fällungsvermögen der untersuchten Arten im ersten Aufwuchs 2010. +/- kennzeichnen signifikante Abweichungen vom Gesamtmittel aller Arten ($p < 0,001$).

Art	CT [% i. d. TM]	GP [% i. d. TM]	BSA-Fällungsvermögen [mg gPflanzenTM ⁻¹]
Kümmel	0,04 -	4,44	1,05 -
Dt. Weidelgras	0,04 -	1,58 -	0,03 -
Galega	0,05 -	3,98 -	1,09 -
Gelber Steinklee	0,06 -	1,59 -	2,15 -
Weißer Steinklee	0,06 -	1,67 -	0,98 -
Löwenzahn	0,07 -	3,54 -	2,81 -
Schafgarbe	0,07 -	9,45	0,99 -
Luzerne	0,08 -	1,37 -	0,41 -
Gelbklee	0,09 -	1,62 -	0,57 -
Zichorie	0,09 -	6,14	0,96 -
Weißklee	0,11 -	1,80 -	0,31 -
Rotklee	0,11 -	3,14	0,64 -
Schwedenklee	0,12 -	2,75 -	2,72 -
Kleiner Wiesenknopf	0,17 -	18,56 +	28,15 +
Spitzwegerich	0,30 -	6,61 +	2,01 -
Hornklee	1,93 +	4,80	18,62 +
Espartette	8,39 +	10,33 +	125,44 +
Mittelwert	0,69	4,90	11,11

Unter gegebenen Versuchsbedingungen konnten für Espartette, Hornklee und Kleinen Wiesenknopf nennenswerte Mengen an gefälltem BSA ermittelt werden. In Bezug auf alle untersuchten Arten verhalten sich das BSA-Bindungsvermögen und die CT-Konzentration der Arten, ausgenommen des Kleinen Wiesenknopfs gleich gerichtet: Über das gesamte Artenspektrum konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Konzentration an kondensierten Tanninen und dem BSA-Bindungsvermögen festgestellt werden ($R^2 = 0,93$, $p \leq 0,001$). Das Beispiel des Kleinen Wiesenknopfs zeigt jedoch, dass die CT-Konzentration nicht als alleiniges Kriterium zur Bewertung eines potentiellen Bindungsvermögens gelten kann. Neben der CT-Konzentration beeinflussen die Größe und molekulare Zusammensetzung der Tannine das Bindungsvermögen (MUELLER-HARVEY, 2006). Dies zeigt sich in den unterschiedlichen Verhältnissen der CT-Konzentration von Espartette und Hornklee (4:1) und dem BSA-Fällungsvermögen beider Arten (8:1).

Proteinqualität:

Hohe Gehalte an kondensierten Tanninen in Espartette und Hornklee werden mit einem geringen Proteinabbau in Verbindung gebracht (SCHARENBERG ET AL. 2005; HEDQVIST ET AL. 2000). Dem Kieler Versuch lag die Hypothese zu Grunde, dass für tanninhaltige Arten eine hinsichtlich der NUE günstigere Verteilung der Stickstofffraktionen (geringere Anteile Fraktion A zu Gunsten der Fraktionen B3 und C) zu erwarten ist. Signifikant überdurchschnittliche Anteile der unerwünschten Fraktion A konnten in abnehmender Reihenfolge für Gelben Steinklee, Kümmel, Weißen Steinklee, Löwenzahn und Rotklee gezeigt werden (Abb. 1). Die im Vergleich zu Leguminosen und Dt. Weidelgras geringeren Anteile der leichtlöslichen Fraktionen A und B1 bei

gleichzeitig höheren Anteilen der langsam bis unlöslichen Fraktionen B3 und C der Kräuter, stehen im Einklang mit einem verringerten ruminalen Proteinabbau kräuterreicher Aufwüchse (ISSELSTEIN ET AL., 2003).

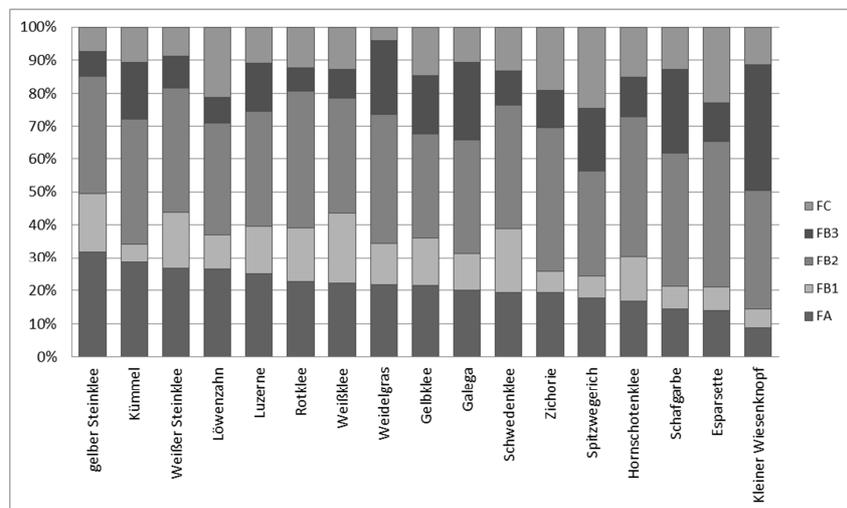


Abb. 1: Verteilung der Stickstofffraktionen (gemessen in g kg^{-1}) der untersuchten Arten

Im Hinblick auf die Menge des potentiell am Darm verfügbaren Stickstoffs ist der Kleine Wiesenknopf mit knapp 40% Stickstoff in Fraktion B3 und lediglich 15% leicht löslichem Stickstoff positiv hervorzuheben (Abb. 1).

Für Esparsette konnten mit 20% ähnlich geringe Anteile an leicht löslichem Stickstoff, sowie ein deutlich über dem Mittel liegender Anteil an Fraktion C-Stickstoff gesichert werden. Obwohl Fraktion C-Stickstoff dem Tier nicht zur Verfügung steht, ist ein erhöhter Anteil hinsichtlich einer Verschiebung der N-Exkretion und geringer Umweltwirkung des ausgeschiedenen Stickstoffs, sowie einer geringeren Belastung des tierischen Stoffwechsels positiv zu bewerten.

Hornklee zeigte im Vergleich zu Rot-, Weißklee und Luzerne eine günstigere Verteilung des Stickstoffs. Im Gegensatz zur ebenfalls tanninhaltigen Esparsette weist die Verteilung nicht auf einen Proteinschutzmechanismus der enthaltenen Tannine sondern auf eine höhere N-Verfügbarkeit und schnellere Abbaurate hin. Die geringere Konzentration und vermutete geringere Bindungskapazität der CT des Hornklees können als Erklärung herangezogen werden.

4. Schlussfolgerungen

Unter norddeutschen Anbaubedingungen konnten für Esparsette und Hornschotenklee sowohl signifikante Anteile an kondensierten Tanninen, als auch ein entsprechendes BSA-Bindungsvermögen gezeigt werden. Ein Zusammenhang zur Verteilung der Stickstofffraktionen ist lediglich für Esparsette deutlich zu erkennen. Da Leguminosen mit unterdurchschnittlichen Gehalten an kondensierten Tanninen höhere Anteile an Fraktion A und B1 Stickstoff zeigten, ist dennoch davon auszugehen, dass das Vorkommen von kondensierten Tanninen hier einen Einfluss hat. Ebenso ist anzunehmen, dass der Effekt von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die Verteilung der Stickstofffraktionen zwischen Arten stark variiert.

Überraschendes Potential konnte für den Kleinen Wiesenknopf ausgemacht werden. Hier sind die für das BSA-Bindungsvermögen sowie die günstige Proteinverteilung verantwortlichen Verbindungen zu identifizieren.

Um die Einschätzung des Potentials der untersuchten Pflanzen realistischer zu gestalten, ist die Methode zur Messung der Proteinfällungskapazität zu optimieren.

Literatur

- BRADFORD, M. (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*: 72, 248–254.
- HÄRING, D., SCHARENBERG, A., HECKENDORN, F., DOHME, F., LÜSCHER, A., MAURER, V., SUTER, D. & H. HERTZBERG (2008): Tanniferous forage plants: Agronomic performance, palatability and efficacy against parasitic nematodes in sheep. *Renewable Agriculture and Food Systems*: 23, 19-29.
- HEDQVIST, H., MUELLER-HARVEY, I., REED, J. D., KRUEGER, C. & M. MURPHY (2000): Characterisation of tannins and in vitro protein digestibility of several Lotus corniculatus varieties. *Animal Feed Science and Technology*: 87, 41-56.
- ISSELSTEIN, J., BONORDEN, S., SENG, M. & H. ABEL (2003): Nährstoffverfügbarkeit und Nährstoffnutzung von klee- und kräuterreichen Aufwüchsen ökologisch bewirtschafteten Grünlands. Georg-August Universität Göttingen. Forschungs- und Studienzentrum für Landwirtschaft und Umwelt.
- 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.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M. & P.J. VAN SOEST (1996): Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*: 57, 347-358.
- MUELLER-HARVEY, I. (2006): Unraveling the conundrum of tannins in animal and nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 86, 2010-2037.
- OSBORNE, N. und MCNEILL, D. (2001): Characterisation of *Leucaena* condensed tannins by size and protein precipitation capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 81, 1113-1119.
- SCHARENBERG, A. und ARRIGO, Y. (2005): Verdaulichkeit und abbaubarkeit von Rohprotein einheimischer tanninhaltiger Futterpflanzen. In: Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften (ed.): 52. Jahrestagung der AG Grünland und Futterbau: 160-163.
- SINGELTON, V. und ROSSI, J. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology & Viticulture*: 16, 144-158.
- SNIFFEN, C. J., O'CONNOR, J. D., VAN SOEST, P. J., FOX, D. G. & J. B. RUSSELL (1992): A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*: 70, 3562-77.
- Terril, T. H., Rowan, A. M., Douglas, G. B. & T. N. Barry (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.