

“Charakterisierung von Tanninen aus Pflanzenextrakten und deren Einfluss auf
pansenphysiologische Parameter“

MSc Marika Kardel

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Gierus

With the intention of establishing “functional milk products”, the competence network Food Chain Plus (FoCus) aims at evaluating the value creation chain of milk from animal feeding to product marketing. Situated at the beginning of this process, the present work was conducted to investigate the addition of tannin extracts to ruminant feeding and the effects on physiological rumen parameters.

Tannins are secondary plant compounds able to complex with proteins, supposedly releasing them again in the low pH conditions of the abomasum. The tannin-protein complex would be protected from microbial degradation in the rumen, increasing nitrogen use efficiency for the ruminant. This can help balancing out the highly degradable protein provided by temperate grassland and provide ruminal protection for concentrate protein, reducing the input of expensive concentrates in feeding management. Although many field herbs and legumes contain tannins, these are varying and unpredictable tannin sources. Therefore, the focus of the present work was set to tannin-rich industrial plant extracts as possible feed additives. Quebracho, mimosa, and gambier were selected to represent condensed tannins, while tara contains mainly hydrolyzable tannins. Mimosa and tara are leguminous trees, quebracho is a hardwood tree from the sumac family and gambier is a *Rubiaceae* shrub.

The study was divided into three parts. First, the extracts were analyzed for their tannin content and structure with different methods. Extraction with hot water preceding the analysis by high performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-MS) was most efficient in tannin isolation. All four extracts were diverse in their composition, rendering the attempt to find a universal standard for quantification highly questionable. The ideal solution would be to directly isolate tannins from the sample material to be tested as a basis for exact quantification.

In the second step, the four extracts were evaluated *in vitro* for their ability to precipitate bovine serum albumin (BSA) at different pH values. Only the precipitation ability of quebracho extract decreased remarkably with lowering pH value, while mimosa and tara only shifted in binding efficiency. Gambier extract showed low protein affinity. In another experiment using quebracho in combination with different BSA concentrations, a precipitation threshold was discovered. With higher protein concentration, more quebracho was required to precipitate the same amount of BSA and efficiency decreased accordingly. Therefore, consideration of tannin source as well as protein content is important when evaluating tannin effects.

The third step was conducting quebracho as the most promising extract in a feeding trial with rumen fistulated heifers. Stepwise increasing amounts of 0, 10, 20, 40, and 60 g quebracho extract kg^{-1} dry matter were applied to enable the ruminal microbes to adapt to higher tannin concentrations. Rumen fluid samples were analyzed, but only a slight decrease in pH value and iso-butyrate as well as an increase in butyrate were observed with higher quebracho level. $\text{NH}_3\text{-N}$, total nitrogen, crude protein precipitation, and total volatile fatty acids remained unchanged by tannin level, indicating a successful tannin adaptation. Sampling time resulted in remarkable differences, stressing the importance of constant sampling times for comparability. *In situ* degradation of hay and rape seed meal (RSM) was measured as well, but only degradation rate of RSM was affected by quebracho addition. However, effective degradation was reduced for both feedstuffs at the

highest tannin level. Rumen undegradable protein (RUP) was elevated at the two highest tannin levels. It was concluded that in a feed ration of 1:1 hay:concentrate (150 g crude protein kg⁻¹ dry matter) as in the present trial, given a slow adaptation, 40 g quebracho extract kg⁻¹ dry matter can be beneficial.

Summarizing the present work, the tannin source and concentration as well as the protein source and concentration have huge influence on the resulting effects and should therefore always be taken into account. However, even though the results demonstrate the need for further research, these first analyses show promising potential for the inclusion of tannin extracts in ruminant feeding.

Zusammenfassung

Mit dem Ziel einer Etablierung von "funktionalen Milchprodukten" widmet sich das Kompetenznetzwerk Food Chain Plus (FoCUS) der Optimierung der Wertschöpfungskette der Milch von der Tierfütterung bis zum Marketing. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das Potenzial des Einsatzes von Tanninextrakten in der Wiederkäuerfütterung und deren Effekte auf pansenphysiologische Parameter zu analysieren, und befindet sich damit am Beginn des Wertschöpfungsprozesses.

Tannine sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Sie sind in der Lage, Komplexe mit Proteinen einzugehen und diese vermutlich im negativen pH-Milieu des Labmagens wieder freizugeben. Der Tannin-Protein-Komplex wäre vor mikrobiellem Abbau im Pansen geschützt, was die Stickstoffnutzungseffizienz für den Wiederkäuer steigern würde. Dies kann zum Ausgleich des leicht abbaubaren Proteins von gemäßigttem Grünland beitragen und Kraffuttermaterial vor ruminalem Abbau schützen, was den Bedarf an teurem Kraffutter in der Fütterung reduzieren kann. Obwohl viele Wiesenkräuter und Leguminosen Tannine enthalten, stellen diese eine variable und unberechenbare Tanninquelle dar. Darum lag der Fokus dieser Arbeit auf tanninreichen industriellen Pflanzenextrakten als mögliche Futterzusatzstoffe. Quebracho, Mimose und Gambier wurden repräsentativ für die kondensierten Tannine ausgewählt, während Tara hauptsächlich hydrolysierbare Tannine enthält. Mimosen- und Tarabaum gehören zu den Leguminosen, Quebracho ist ein Hartholzbaum aus der Sumachfamilie und der Gambierstrauch entstammt den *Rubiaceae*.

Die Studie war in drei Teile gegliedert. Zunächst wurden die Extrakte mit verschiedenen Methoden auf ihren Tanningehalt und dessen Struktur untersucht. Die Extraktion mit heißem Wasser vor Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometer (HPLC-MS) erbrachte die besten Resultate. Alle vier Extrakte waren in ihrer Zusammensetzung sehr unterschiedlich, was einen universellen Quantifizierungsstandard sehr anfechtbar macht. Idealerweise müssten zur Quantifizierung Tannine direkt aus dem zu untersuchenden Material isoliert werden.

Im zweiten Schritt wurden die vier Extrakte *in vitro* auf ihre Fähigkeit untersucht, bei verschiedenen pH-Werten Bovines Serumalbumin (BSA) auszufällen. Nur die Ausfällungsfähigkeit von Quebrachoextrakt sank deutlich mit geringerem pH-Wert, während sich bei Mimose und Tara lediglich die Bindungseffizienz verschob. Gambier zeigte eine geringe Proteinaffinität. In einem weiteren Experiment wurde Quebracho verschiedenen BSA-Konzentrationen zugesetzt. Es war ein bestimmtes Verhältnis von Tannin zu BSA zur Ausfällung notwendig. Mit höherer Proteinkonzentration musste mehr Quebracho zugelegt werden, um dieselbe Ausfällung zu erreichen, und die Effizienz sank entsprechend. Demzufolge sollten Tanninquelle und Proteingehalt bei der Bewertung von Tannineffekten immer berücksichtigt werden.

Der dritte Schritt bestand in einem Fütterungsversuch mit pansenfistulierten Färsen, bei dem Quebracho als vielversprechender Extrakt zum Einsatz kam. Schrittweise wurden immer höhere Mengen an Quebracho zugesetzt (0, 10, 20, 40 und 60 g Quebrachoextrakt kg^{-1} Trockenmasse), um den Pansenmikroben eine Anpassung an die steigende Tanninkonzentration zu ermöglichen. Der Pansensaft wurde analysiert, jedoch konnten nur eine leichte Reduktion des pH-Wertes und des Iso-Butyrates sowie ein Anstieg des Butyrates mit höherem Quebracholevel beobachtet werden. $\text{NH}_3\text{-N}$, Gesamtstickstoff, Rohproteinausfällung und Summe der flüchtigen Fettsäuren wurden vom Tanninniveau nicht beeinflusst, was auf eine erfolgreiche Anpassung der Mikroben hindeutet. Der Entnahmezeitpunkt hatte deutliche Auswirkungen, was die Notwendigkeit von konstanten Entnahmezeiten für die Vergleichbarkeit hervorhebt. Weiterhin wurde der *in situ* Abbau von Heu und Rapsschrot gemessen, jedoch war nur die Abbaurate von Rapsschrot durch die Quebrachozugaben beeinträchtigt. Die effektive Abbaubarkeit war im höchsten Tanninlevel allerdings für beide Futtermittel reduziert. Das pansenstabile Protein (UDP) konnte in den beiden höchsten Tanninniveaus gesteigert werden. Folglich kann nach diesen ersten Erkenntnissen eine Gabe von 40 g Quebrachoextrakt kg^{-1} Trockenmasse bei einer Ration wie der vorliegenden (1:1 Heu:Krafftutter bei 150 g Rohprotein kg^{-1} Trockenmasse) und langsamer Gewöhnung zweckdienlich sein.

Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass sowohl die Tanninquelle und Tanninkonzentration als auch Proteinquelle und Proteinkonzentration enormen Einfluss auf die entsprechenden Effekte haben und darum stets berücksichtigt werden sollten. Obwohl hier weiterer Forschungsbedarf besteht, zeigen die Analysen ein vielversprechendes Potenzial für Tanninextrakte in der Wiederkäuerfütterung auf.