

# **Untersuchungen zur Biosynthese und Degradation sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in der Rinderernährung**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Chem. Selvihan Özmen  
geboren am 26.01.1979 in Findikli

Hannover, 2014

**Referent:** Prof. Dr. Thomas Scheper  
Institut für Technische Chemie  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

**Korreferentin:** Prof. Dr. Martina Hoedemaker  
Klinik für Rinder  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

**Tag der Promotion:** 13.01.2014

### **Erklärung**

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Diese Dissertation wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 2014

---

Selvihan Özmen

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover in Kooperation mit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Klinik für Rinder angefertigt. Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper möchte ich für die fachliche Betreuung und der großen Unterstützung dieser Doktorarbeit danken.

Frau Prof. Dr. Martina Hoedemaker danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Herr Prof. Dr. Detlef W. Bahnemann möchte ich für die Übernahme des Drittprüferamtes bei meiner Promotionsprüfung danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Martin Höltershinken für dieses interessante Thema, für die äußerst engagierte Betreuung und insbesondere für das jederzeit offene Ohr bei Problemen jeglicher Art.

Dr. Sascha Beutel danke ich für die freundliche Betreuung sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt der Evonik-Stiftung sowohl für die finanzielle als auch ideelle Förderung während der Promotion. Außerdem konnte ich dank der perfekt organisierten Programme und der Exkursionen viele verschiedene Industriestandorte der Evonik-Industries in Europa kennenlernen.

Weiterhin bedanke ich mich beim Milchförderungsfonds Hannover-Braunschweig für die gewährte finanzielle Unterstützung der Untersuchungen.

Dr. Gerald Dräger und Dr. Jörg Fohrer aus dem Institut für Organischen Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover danke ich für die Hilfe und der Bereitstellung der UPLC-MS und der NMR-Spektroskopie.

Bedanken möchte ich mich auch bei Martina Weiss für die freundliche Unterstützung bei den MALDI-TOF-Messungen und Dipl.-Chem. Marko Sandor für die Durchführung der FT-IR-Analysen.

Vielen Dank an Jörg Senkpiel aus der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover für die Unterstützung bei den technischen Problemen.

Dipl.-Math. Heinz Geerlings möchte ich für das Engagement bei den statistischen Auswertungen danken.

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank auch meinen Kolleginnen und Freundinnen Dr. Anika Wichern, Dr. Nina Gresner, Dr. Sarah Theermann, Dr. Annika Irle, TÄ Tanja Hunger für die gute Zusammenarbeit. Liebe Anika und Nina, vielen Dank für die jederzeit erreichbare Hilfestellung.

Dr. Öznur Kökpinar möchte ich mich ganz herzlich für die moralische Hilfe und für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Freunden für die moralische Unterstützung während der gesamten Studium- und Promotionszeit. Mein größtes Dankeschön gilt meinen Eltern Sehriye und Ali Haldan, meinem Sohn Mustafa und meinem Ehemann Suat Özmen, die mich jederzeit unterstützt und mich immer motiviert haben.

---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>Kurzbeschreibung .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 Einleitung und Aufgabenstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Grassilage und Pansensaftfermentation.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Grassilage-Herstellung und ihre Inhaltsstoffe.....	3
2.1.2 Die Ursachen der auffällig niedrigen Reineiweißanteile in Grassilagen .....	5
2.1.3 Proteinabbau während der Silierung .....	7
2.1.4 Pansenmikroorganismen und Proteinmetabolismus im Pansen .....	8
<b>2.2 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Primär- und Sekundärstoffwechsel in Pflanzen .....	10
2.2.2 Flavonoide .....	12
2.2.3 Biosynthese der Polyphenole .....	13
2.2.4 Reaktionen und antioxidative Wirkungen der Polyphenole.....	18
2.2.5 Physiologische Bedeutung der Polyphenole .....	20
2.2.6 Metabolismus .....	22
<b>3 Experimenteller Teil .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Konzeptvorstellung .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 RUSITEC-Fermentationssystem mit Fermentationsparameter.....</b>	<b>29</b>
3.2.1 Fazit des Kapitels .....	32
<b>3.3 Isolierung und Charakterisierung der Fermenter-Proben .....</b>	<b>33</b>
3.3.1 RP-HPLC-Analysen .....	33
3.3.2 LC-ESI-MS/MS- und UPLC-MS-Analysen .....	33
3.3.3 NMR-Spektroskopie.....	41
3.3.4 FT-IR-Spektroskopie.....	43
3.3.5 Fazit des Kapitels .....	44

---

<b>3.4 Vergleich der Grassilagen zu Fermenter .....</b>	<b>45</b>
3.4.1 Grassilage-Identifikation .....	48
3.4.2 Biosynthese der identifizierten Komponenten in Grassilagen .....	54
3.4.3 Quantifizierung der identifizierten Komponenten in Grassilagen, Gras, Heu und Fermenter .....	61
3.4.3.1 Auswirkungen der Lagerungszeit und Lagerungstemperatur auf die Messkomponenten.....	61
3.4.3.2 Einfluss des prozentualen Reineiweißanteils (RE/Rp) auf die Konzentration der identifizierten Komponenten in Grassilagen, Gras und Heu.....	66
3.4.3.3 Auswirkungen der RUSITEC-Fermentation auf die Grassilagekomponenten	76
3.4.4 Fazit des Kapitels .....	78
<b>3.5 Abbaumechanismus der Flavonoide im Pansen.....</b>	<b>80</b>
3.5.1 Fazit des Kapitels .....	84
<b>3.6 Resorption und Zusammenhang der Fermenter-Proben mit Serum-Proben .....</b>	<b>85</b>
3.6.1 Fazit des Kapitels .....	87
<b>3.7 Zusammenhang der Peaks 1-3 mit diversen sekundären pflanzlichen Substanzklassen.....</b>	<b>88</b>
3.7.1 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Flavonoiden .....	88
3.7.2 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Chalkonen.....	90
3.7.3 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Phenylpropanoiden .....	91
3.7.4 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Diarylheptanoiden.....	97
3.7.5 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Lignanen .....	99
3.7.6 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Cumarinen und Mykotoxinen.....	101
3.7.7 Fazit des Kapitels .....	102
<b>4 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>105</b>
<b>5 Anhang .....</b>	<b>110</b>
<b>5.1 Ergänzungen der Analyseergebnisse.....</b>	<b>110</b>
5.1.1 Identifizierung der Aminosäuren, Biogenen Amine, Peptide und Proteine .....	110
5.1.1.1 Identifizierung der Aminosäuren und Biogenen Amine durch FMOC-Methode .....	110
5.1.1.2 Bestimmung der Protein- und Peptid-Konzentration .....	113
5.1.1.3 MALDI-TOF-MS.....	113
5.1.1.4 SDS-PAGE.....	114

---

5.1.2	Untersuchte Komponenten zur Identifikation der Peaks 1-6 .....	116
5.1.3	Mittels Literaturscreening in Fermenter-Proben untersuchte Diarylheptanoide...	120
5.1.4	Statistische Auswertung der identifizierten Komponenten in Futtermitteln.....	120
5.1.4.1	Lagerungszeiteffekte der Grassilage-Extrakte (Faktor 1) .....	121
5.1.4.2	Prozentualer RE-Anteil vom Rohprotein (Faktor 2) .....	123
<b>5.2</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>140</b>
5.2.1	Analytische Anlagen .....	140
5.2.2	Geräte .....	142
5.2.3	Verbrauchsmaterialien .....	143
5.2.4	Reagenzien und Chemikalien.....	143
<b>5.3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>149</b>
5.3.1	Rumen Simulation Technique (RUSITEC)-Fermentationssystem .....	149
5.3.1.1	Beladung des RUSITEC-Systems .....	151
5.3.1.2	Zusammensetzungen der Futterkomponenten.....	153
5.3.1.3	Spendertier .....	156
5.3.1.4	Bestimmungen der RUSITEC-Parameter .....	156
5.3.2	Probenaufbereitung .....	157
5.3.2.1	Fermenter-Proben.....	158
5.3.2.2	Grassilage-, Gras- und Heu-Proben .....	158
5.3.2.3	Serum-Proben.....	163
5.3.2.4	Standard-Chemikalien .....	163
5.3.3	Proteinanalytik .....	164
5.3.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	164
5.3.3.2	Proteinfällungen .....	165
5.3.3.3	SDS-PAGE.....	166
5.3.4	FMOC-HPLC .....	167
5.3.5	RP-HPLC-Techniken .....	169
5.3.6	LC-MS/MS .....	172
5.3.7	UPLC-MS/MS.....	174
5.3.8	MALDI-TOF-MS .....	175
5.3.9	NMR-Spektroskopie.....	175
5.3.10	FT-IR-Spektroskopie.....	176
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>178</b>



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 2.1</b> Der mikrobielle Stickstoffmetabolismus der Wiederkäuer.....	<b>10</b>
<b>Abbildung 2.2</b> Biosynthetischer Zusammenhang zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel und die Bildung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe .....	<b>11</b>
<b>Abbildung 2.3</b> Strukturformeln der zwölf Flavonoidhauptgruppen .....	<b>12</b>
<b>Abbildung 2.4</b> Shikimisäureweg zur Biosynthese von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Aromaten .....	<b>14</b>
<b>Abbildung 2.5</b> Schematische Darstellung der Biosynthese der Polyphenole .....	<b>16</b>
<b>Abbildung 2.6</b> Deaktivierungsreaktion reaktiver Radikale durch Flavonoide.....	<b>18</b>
<b>Abbildung 2.7</b> Postulierte Abbaumechanismen von Quercetin und Rutin .....	<b>24</b>
<b>Abbildung 3.1</b> Beispiel-Chromatogramm für die Messung der Fermenter-Probe Fr-1 an der RP-HPLC. ....	<b>27</b>
<b>Abbildung 3.2</b> Flächenintegral von Peak 1 nach Zulage unterschiedlicher Silagen in den RP-HPLC-Analysen der Fermenter-Proben.....	<b>28</b>
<b>Abbildung 3.3</b> Gemittelte pH-Werte, NH <sub>3</sub> -Konzentrationen, Überstandsvolumina und Fermentationsgasmenge des RUSITEC-Fermentationslaufs während 12-tägiger Inkubation.	<b>30</b>
<b>Abbildung 3.4</b> MS-ESI-Fullscan der Fermenter-Probe Fr-1 und LC-ESI-MS-Spektren von Peak 1-6 der Fermenter-Probe Fr-1 .....	<b>34</b>
<b>Abbildung 3.5</b> LC-MS-ESI-Fullscans der isolierten Substanz 1-3 und 6 von der Fermenter-Probe Fr-1.....	<b>35</b>
<b>Abbildung 3.6</b> Eine mögliche Variante der Fragmentierungen von Peak 5.....	<b>37</b>
<b>Abbildung 3.7</b> LC-ESI-MS/MS-Spektren der Peaks 1 und 3, Palmatin und Ajmalicin.....	<b>39</b>
<b>Abbildung 3.8</b> LC-ESI-MS-Fullscan-Chromatogramm der Fermenter-Probe Fr-1 mit der Zugabe der Zimtaldehyd- und Zimtsäure-Standard-Lösungen .....	<b>39</b>
<b>Abbildung 3.9</b> Die Strukturen von Zimtaldehyd, Zimtsäure und 3-Phenylpropionsäure für die Peak 6-Identifikation .....	<b>40</b>
<b>Abbildung 3.10</b> LC-ESI-MS-Nachweis-Chromatogramme der Fermenter-Probe Fr-1 für Peak 6 bei Zugabe des 3-Phenylpropionsäure-Standards und LC-ESI-MS/MS-Überlappungs-chromatogramme für Masse 133 m/z [M-18] <sup>+</sup> von 3-Phenylpropionsäure-Standard, Fermenter-Probe Fr-1, 3-Phenylpropionsäure-Standard mit der Fermenterprobe Fr-1 .....	<b>41</b>
<b>Abbildung 3.11</b> Die vergrößerte Darstellung des <sup>1</sup> H-NMR-Spektrums von dem isolierten Peak 1 in Methanol-d <sub>4</sub> bei einer Frequenz von 400 MHz .....	<b>42</b>
<b>Abbildung 3.12</b> FT-IR-Spektrum der Fermenter-Probe Fr-1 mit den Schwingungsdaten. ....	<b>43</b>

---

<b>Abbildung 3.13</b> LC-ESI-MS/MS-Überlappungschromatogramm der Grassilage-Probe S-09, Fermenter-Probe Fr-6 (S-09) und RP-HPLC-Chromatogramm der Grassilage-Probe S-09 ...	<b>46</b>
<b>Abbildung 3.14</b> MS-ESI-Fullscan der Grassilage-Probe von S-09 .....	<b>49</b>
<b>Abbildung 3.15</b> UV-Spektrum von Diosmin mit charakteristischen Wellenlängen in S-09, vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Diosmin und vergrößerte Darstellung bei geringer Intensität des LC-ESI-MS-Spektrums von Diosmin 609 m/z [M+H] <sup>+</sup> in S-09 .....	<b>50</b>
<b>Abbildung 3.16</b> Grundlegende Strukturen der identifizierten Aglykone, Glucoside und Glykoside in Grassilage, Gras und Heu .....	<b>51</b>
<b>Abbildung 3.17</b> Schematische Darstellung der Biosynthesewege der Polyphenole in Grassilagen, Gras und Heu .....	<b>57</b>
<b>Abbildung 3.18</b> Enzymatische Synthese der identifizierten Flavonoide in Grassilage, Gras und Heu .....	<b>61</b>
<b>Abbildung 3.19</b> Stabilität der identifizierten Komponenten L-Phenylalanin, <i>p</i> -Cumarsäure, Apigenin, Diosmetin und Diosmin in den Grassilage-Extrakten (K-03 und K-20) über einen Lagerzeitraum von 14 Tagen bei 18 °C, 4 °C und -18 °C.....	<b>63</b>
<b>Abbildung 3.20</b> Stabilität von 2-Phenylethylamin in dem Grassilage-Extrakt K-03 über einen Lagerungszeitraum von 14 Tage bei 18 °C, 4 °C und -18 °C .....	<b>65</b>
<b>Abbildung 3.21</b> Auswirkungen der unterschiedlichen prozentualen RE-Anteile vom Rp auf den Mittelwert der Konzentrationen der Edukte (L-Phenylalanin, L-Tyrosin) der Polyphenolsynthese und L-Tryptophan für die Fragmentionen in den LC-ESI-MS-Analysen der Grassilage-, Gras- und Heu-Proben .....	<b>67</b>
<b>Abbildung 3.22</b> Auswirkungen der unterschiedlichen prozentualen RE-Anteile vom Rp auf den Mittelwert der Konzentrationen der Zwischensubstanzen <i>p</i> -Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure der Polyphenolsynthese und das Produkt Chlorogensäure aus Kaffeesäure für die Fragmentionen in den LC-ESI-MS-Analysen der Grassilage-, Gras- und Heu-Proben .....	<b>69</b>
<b>Abbildung 3.23</b> Auswirkungen der unterschiedlichen prozentualen RE-Anteile vom Rp auf den Mittelwert der Konzentrationen der Flavon-Aglykone (Apigenin, Luteolin, Diosmetin, Acacetin) für die Fragmentionen in den LC-ESI-MS-Analysen der Grassilage-, Gras- und Heu-Proben.....	<b>70</b>
<b>Abbildung 3.24</b> Auswirkungen der unterschiedlichen prozentualen RE-Anteile vom Rp auf den Mittelwert der Konzentrationen des Hauptprodukts Diosmin, der Nebenprodukte Isoorientin und Vitexin für die Fragmentionen in den LC-ESI-MS-Analysen der Grassilage-, Gras- und Heu-Proben.....	<b>72</b>

---

<b>Abbildung 3.25</b> Auswirkungen der unterschiedlichen prozentualen RE-Anteile vom Rp auf den Mittelwert der Konzentrationen der identifizierten Flavonole der Polyphenolsynthese für die Fragmentationen in den LC-ESI-MS-Analysen der Grassilage-, Gras- und Heu-Proben ....	<b>73</b>
<b>Abbildung 3.26</b> Mittelwert der Konzentrationen der Edukte der Polyphenolsynthese und 2-Phenylethylamin für die Fragmentationen in den LC-ESI-MS-Analysen der Fermenter-Proben.....	<b>77</b>
<b>Abbildung 3.27</b> Abbaumechanismus der in Grassilagen identifizierten Flavon 7- <i>O</i> -rutinoside durch Pansenbakterien zu 3-Phenylpropionsäure.....	<b>81</b>
<b>Abbildung 3.28</b> Mittelwert der Konzentrationen von 3-Phenylpropionsäure in den LC-ESI-MS-Analysen der Fermenter-Proben .....	<b>83</b>
<b>Abbildung 3.29</b> MS-ESI-Fullscan der Serum-Probe 2768/10-09. ....	<b>86</b>
<b>Abbildung 3.30</b> LC-ESI-MS-Spektrum der Serum-Probe 2768/10-09 vom isolierten Peak b. ....	<b>86</b>
<b>Abbildung 3.31</b> Überlappendes Chromatogramm der Grassilage S-09, der Fermenter-Probe Fr-6 für Diosmin, Peak 1-3, Pectolinarin, Acaciin, Peak 5-6 und LC-ESI-MS-Spektren der Peaks 1-3 im Fermenter, Rutin, Kaempferol, Hesperetin .....	<b>89</b>
<b>Abbildung 3.32</b> Biosynthetischer Einbau der Phenylpropanoide, Cumarine, Lignane, Chalkone, Diarylheptanoide und Flavonoid-Glykoside aus Flavan.....	<b>90</b>
<b>Abbildung 3.33</b> LC-ESI-MS-Spektren der Peaks 1-3, 2',4-Dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalkon .....	<b>91</b>
<b>Abbildung 3.34</b> Die Strukturen von Sinapinsäure, 3-Phenylpropionsäure, 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure, 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure und LC-ESI-MS-Spektren von Peaks 1-3, Sinapinsäure, 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure, vergrößerte Darstellung des Spektrums von 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure .....	<b>92</b>
<b>Abbildung 3.35</b> LC-ESI-MS/MS-Fragmentationen-Chromatogramm vom isolierten Peak 1 der Fermenter-Probe Fr-1 .....	<b>93</b>
<b>Abbildung 3.36</b> Die Strukturen von Caftarinsäure, Chlorogensäure, (-)-Dibenzyl-D-tartarat, Cichoriensäure und Rosmarinsäure.....	<b>94</b>
<b>Abbildung 3.37</b> LC-ESI-MS-Spektren der Peaks 1-3, Caftarinsäure, Chlorogensäure, (-)-Dibenzyl-D-tartarat, Cichoriensäure und Rosmarinsäure.....	<b>95</b>
<b>Abbildung 3.38</b> Die Strukturen von 2,3-Bis-(4-methoxy-benzyliden)succiniylsäure und 4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure .....	<b>95</b>
<b>Abbildung 3.39</b> LC-ESI-MS-Spektren der Peaks 1-3, 2,3-Bis-(4-methoxy-benzyliden)succiniylsäure und 4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure.....	<b>96</b>

---

<b>Abbildung 3.40</b> Der Mögliche strukturelle Aufbau der Peaks 1-3 .....	<b>97</b>
<b>Abbildung 3.41</b> Überlappendes LC-ESI-MS/MS-Chromatogramm von Curcumin-Standard und Fermenter-Probe Fr-1 (K-01) mit Zugabe von [6]-Gingerol-Standard, Strukturen von Curcumin, [6]-Gingerol und LC-ESI-MS/MS-Chromatogramm vom isolierten Peak 2.....	<b>98</b>
<b>Abbildung 3.42</b> LC-ESI-MS-Spektren der Peaks 1-3, Curcumin und [6]-Gingerol.....	<b>99</b>
<b>Abbildung 3.43</b> LC-ESI-MS/MS-Spektren der Peaks 1-3, Coniferylalkohol, Enterodiol, Pinoresinol und die Strukturen von Coniferylalkohol, Enterodiol, Pinoresinol .....	<b>100</b>
<b>Abbildung 3.44</b> LC-ESI-MS-Spektren von Peaks 1-3, Cumarin, Umbelliferon, Aflatoxin und die Strukturen von Cumarin, Umbelliferon, Aflatoxin B1.....	<b>102</b>
<b>Abbildung 3.45</b> Der strukturelle Aufbau der möglichen Substanzen nach der LC-ESI-MS/MS- und RP-HPLC-Analyse zur Identifikation der Peaks 1-3.....	<b>104</b>
<b>Abbildung 5.1</b> SDS-PAGE-Gele (12 %-ig, Silberfärbung) zur Untersuchung der enthaltenen Proteinbanden in Pansensaft-Proben .....	<b>114</b>
<b>Abbildung 5.2</b> SDS-PAGE-Gele (12 %-ige Gele, Silberfärbung) zur Untersuchung der Proteine nach der Fällung in Fermenter-Probe Fr-6 (S-09) .....	<b>116</b>
<b>Abbildung 5.3</b> Schematischer Aufbau einer Fermentereinheit des RUSITEC-Systems .....	<b>150</b>
<b>Abbildung 5.4</b> RUSITEC-System mit sechs Fermentern .....	<b>151</b>
<b>Abbildung 5.5</b> Aufarbeitungsschema und Lagerungszeiten der analysierten Grassilage-, Gras- und Heu-Proben.....	<b>163</b>
<b>Abbildung 5.6</b> Beispiel-Chromatogramm für die Messung des Peptidstandards an der RP-HPLC .....	<b>171</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1</b> Darstellung der Rohproteinfraktionen in Futtermitteln und deren enzymatischer Abbaugeschwindigkeit .....	<b>4</b>
<b>Tabelle 2.2</b> Die Grassilagequalität bewertet nach dem Reineiweißanteil vom Rohprotein .....	<b>5</b>
<b>Tabelle 2.3</b> Die Reaktionstypen der Polyphenole .....	<b>19</b>
<b>Tabelle 2.4</b> Übersicht der bisher nach oraler Applikationen im Urin nachgewiesenen Ringspaltungsprodukte von verschiedenen Flavonoiden .....	<b>25</b>
<b>Tabelle 3.1</b> Analyseergebnisse der Fermenter-Proben durch die RP-HPLC-Methode .....	<b>33</b>
<b>Tabelle 3.2</b> Zusammenstellung der charakteristischen Massendifferenzen von Zielkomponenten (Peaks 1-6) in Fermenter-Proben .....	<b>37</b>
<b>Tabelle 3.3</b> Die Retentionszeiten, Massen und Fragmentionen der Fermenter-Proben an der LC-ESI-MS/MS und UPLC-ESI-MS/MS .....	<b>38</b>
<b>Tabelle 3.4</b> Vergleich der sechs Zielsubstanzen (Peaks 1-6) in Fermenter-Proben mit den Substanzen in Grassilagen mit ähnlichen Retentionszeiten .....	<b>47</b>
<b>Tabelle 3.5</b> Identifizierte Komponenten in Heu-, Gras-, Grassilage- und Fermenter-Proben mittels RP-HPLC und LC-ESI-MS/MS-Methode .....	<b>53</b>
<b>Tabelle 3.6</b> LC-ESI-MS/MS-Quantifikation der identifizierten Komponenten in Grassilage, Gras und Heu .....	<b>75</b>
<b>Tabelle 3.7</b> Angaben zu den untersuchten Serum-Proben aus zwei Problembetrieben mit dem klinischen Krankheitsbild „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ .....	<b>85</b>
<b>Tabelle 5.1</b> Die Retentionszeiten und Konzentrationen der identifizierten Aminosäuren sowie Biogene Amine in Fermenter-Proben durch FMOC-Methode an der HPLC .....	<b>112</b>
<b>Tabelle 5.2</b> Gesamtproteinmenge in [ $\mu\text{g/mL}$ ] der 12 RUSITEC Fermenter-Proben am 12. Tag des Versuches nach Bradford- und Lowry-Test .....	<b>113</b>
<b>Tabelle 5.3</b> Die analysierten Proben an der MALDI-TOF-MS .....	<b>114</b>
<b>Tabelle 5.4</b> Liste der analysierten Substanzen in Grassilagen, Gras, Heu und Fermenter .....	<b>117</b>
<b>Tabelle 5.5</b> Mittels der angegebenen Literaturquellen in Fermenter und Futtermittel untersuchte Diarylheptanoid-Verbindungen an der LC-ESI-MS/MS .....	<b>120</b>
<b>Tabelle 5.6</b> Mittels t-Test ausgewerteten signifikanten Veränderungen der Flächenintegralwerte der in den Futtermitteln identifizierten Komponenten durch die Gruppierung der Lagerzeiteffekte .....	<b>122</b>

---

<b>Tabelle 5.7</b> Mehrfachvergleiche-Post-Hoc-Test der Flächenintegrale für die identifizierten Komponenten in den gelagerten Grassilage-Extrakten (LnE-GS) nach der Gruppierung ihrer RE-Anteile.....	<b>123</b>
<b>Tabelle 5.8</b> Gruppenstatistiken mittels t-Test für die Flächenintegralwert bei unabhängigen Stichproben der in den Futtermitteln identifizierten Komponenten durch die Gruppierung der Lagerzeiteffekte und RE-Anteile.....	<b>124</b>
<b>Tabelle 5.9</b> Einfaktorielle ANOVA-Statistiken der Flächenintegrale für die identifizierte Komponenten in den gelagerten und nicht gelagerten Grassilage-Extrakten mit der Gruppierung der RE-Anteile .....	<b>132</b>
<b>Tabelle 5.10</b> Mehrfachvergleiche-Post-Hoc-Test der Flächenintegrale für die identifizierte Komponenten in den gelagerten und nicht gelagerten Grassilage-Extrakten nach der Gruppierung ihrer RE-Anteile.....	<b>134</b>
<b>Tabelle 5.11</b> Beladung des Fermenters für den ersten Versuchstag des RUSITEC-Systems. .....	<b>152</b>
<b>Tabelle 5.12</b> Versuchsphasen .....	<b>153</b>
<b>Tabelle 5.13</b> Nährstoffgehalte des eingesetzten Heus .....	<b>153</b>
<b>Tabelle 5.14</b> Nährstoffgehalte, Zusatzstoffe, NEL und Zusammensetzung des eingesetzten Kraftfutters laut Herstellerangabe .....	<b>154</b>
<b>Tabelle 5.15</b> Die eingesetzten Grassilagen im RUSITEC-System.....	<b>155</b>
<b>Tabelle 5.16</b> Nährstoffanalyse der eingesetzten Kontrollsilagen im RUSITEC-System .....	<b>155</b>
<b>Tabelle 5.17</b> Nährstoffanalyse der eingesetzten Schadsilagen im RUSITEC-System .....	<b>156</b>
<b>Tabelle 5.18</b> Ergebnisse der Nährstoffanalyse der untersuchten Grassilage-, Gras- und Heu-Proben.....	<b>159</b>
<b>Tabelle 5.19</b> Eingesetzte Puffer für die Extraktion von Grassilagen, Gras und Heu .....	<b>162</b>
<b>Tabelle 5.20</b> Laufbedingungen zur FMOC-Methode an der HPLC .....	<b>168</b>
<b>Tabelle 5.21</b> Eingesetzter Gradient an der HPLC bei der FMOC-Methode .....	<b>168</b>
<b>Tabelle 5.22</b> Laufbedingungen zur Screeninguntersuchung an der HPLC .....	<b>170</b>
<b>Tabelle 5.23</b> Laufbedingungen zur Substanzfraktionierung an der HPLC .....	<b>170</b>
<b>Tabelle 5.24</b> Eingesetzter Gradient für die beiden verwendeten RP-HPLC-Anlagen .....	<b>170</b>
<b>Tabelle 5.25</b> Zusammensetzung des analysierten Peptidstandards .....	<b>171</b>
<b>Tabelle 5.26</b> Ergebnisse der fünfmaligen Präzisionsmessungen an der RP-HPLC für die Peptidstandards.....	<b>171</b>
<b>Tabelle 5.27</b> Laufbedingungen an der LC-MS/MS .....	<b>173</b>
<b>Tabelle 5.28</b> Eingesetzter Gradient an der LC-MS/MS .....	<b>173</b>

---

<b>Tabelle 5.29</b> Die Präzision der LC-ESI-MS/MS Messergebnisse der dreimaligen Peptidstandard-Analyse.....	<b>173</b>
<b>Tabelle 5.30</b> Laufbedingungen an der Q-Tof Premier UPLC-MS/MS .....	<b>174</b>
<b>Tabelle 5.31</b> Eingesetzter Gradient an der Q-Tof Premier UPLC-MS/MS.....	<b>174</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius	CHS	Chalkon-Synthase
Da	Dalton	Cit	Citrullin
g	Gramm	CL	<i>p</i> -Cumaroyl-CoA-Ligase
xg	mal Erdbeschleunigung	CoA	Coenzym A
h	Stunde	COMT	Kaffeesäure- <i>O</i> -methyltransferase
Hz	Hertz		
J	Joule	Cys	Cystein
k	Kilo (10 <sup>3</sup> )	DAH	3-Deoxy-D-arabino-2-heptulonsäure
L	Liter		
min	Minute	DAHP	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )		
m	Meter	df	Freiheitsgrad
M	Mega (10 <sup>6</sup> )	DMSO	Dimethylsulfoxid
M	Molar	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
mol	Mol (6,023 · 10 <sup>23</sup> )		
m/z	Masse/Ladung Verhältnis	ESI	Elektrospray-Ionisation
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )	EtOH	Ethanol
ppm	<i>parts per million</i>	F	empirische Verteilungsfunktion
psi	<i>pound-force per square inch</i>		
rpm	Umdrehungen/Minute	FA	Ameisensäure
s	Sekunde	Fmoc	9-Fluorenylmethyloxy-carbonyl
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )		
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert	Fr	Fermenter
V	Volt	FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometer
(v/v)	<i>Volume per Volume</i>		
(w/w)	<i>Weight per Weight</i>	G	Gras
$\lambda_{\max}$	maximalen Wellenlängen	GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
%	Prozent	Gln	Glutamin
Abb.	Abbildung	Glu	Glutamat
ACN	Acetonitril	Gly	Glycin
ADAM	Adamantanamin	GS	Grassilage
ADF	Saure Detergenz-Faser	H	Heu
AdoMet	S-Adenosylmethionin	HCl	Salzsäure
Ado-Hcy	S-Adenosylhomocystein	His	Histamin
Agm	Agmatin	HIV	Humane Immundefizienz-Virus
Ala	Alanin		
APCI	Atmosphärendruck-Ionisation	IAA	Indol-3-essigsäure
APS	Ammoniumpersulfat	Ile	Isoleucin
aq.	aqua	<i>J</i>	Kopplungskonstante
Arg	Arginin	K	Kontrollsilage
Art.-Nr.	Artikelnummer	k. A.	keine Angabe
As	Aminosäuren	Kap.	Kapitel
Asp	Asparaginsäure	LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
ATP	Adenosintriphosphat		
AU	Absorptionseinheit	LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
BA	Biogene Amine	Leu	Leucin
BZD-R	Benzodiazepinrezeptor	LnE	Lagerung nach Extraktion
bzw.	beziehungsweise	Lys	Lysin
ca.	circa		



MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation-Time of flight</i>	TS	Trockensubstanz
		Tyr	Tyrosin
		u.	und
MeOH	Methanol	u. a.	unter anderem
N	Stickstoff	UDF	unabbaubares Rohprotein
NaOH	Natronlauge	UDP	Uridindiphosphat
ND	Neutrale Detergentienlösung	UPLC	<i>Ultra Performance Liquid</i>
n. d.	nicht detektiert	uS	ursprüngliche Substanz
NDF	Neutrale Detergenz-Faser	usw.	und so weiter
NEL	Netto-Energie-Laktation	UV	Ultraviolett
NfE	N-freie Extraktstoffe	Val	Valin
n. i.	nicht identifiziert	VK	Variationskoeffizient
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	vs.	versus
NPN	Nicht-Protein-Stickstoff	z.B.	zum Beispiel
n. q.	nicht quantifiziert	*	schwach signifikant
OPA	$\sigma$ -Phthaldialdehyd		(p < 0,05)
p	Differenzsignifikanzen	**	signifikant
PAL	Phenylalaninammoniumlyase		(p < 0,01)
PEP	Phosphoenolpyruvat	***	hoch signifikant
Phe	Phenylalanin		(p < 0,001)
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat		
Pro	Prolin		
RE	Reineiweiß		
Rp	Rohprotein		
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>		
R <sub>t</sub>	Retentionszeit		
Rubisco	Ribulosebisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase		
RUSITEC	<i>RUMen SIMulation TECnique</i>		
s	Standardabweichung		
S	Schadsilage		
s.	siehe		
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>		
Ser	Serin		
Sert	Serotonin		
sf	Standardfehler		
sog.	so genannt		
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>		
Std.	Standard		
STS	Stilbensynthase		
sVnE	sofortige Vermessung nach der Extraktion		
T	Testgröße		
Tab.	Tabelle		
TAL	Tyrosinammoniumlyase		
TCA	Trichloressigsäure		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin		
TFA	Trifluoressigsäure		
TGS	Tris-Glycine-SDS		
Thr	Threonin		
TMR	Total-Misch-Ration		
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		
Trp	Tryptophan		

## Kurzbeschreibung

Für die Charakterisierung des Futterwertes von Silagen werden im Bereich der Tierernährung die Begriffe Reineiweiß (RE), Rohprotein (Rp) und Nicht-Protein-Stickstoff-Verbindungen (NPN: Non-Protein-N) genutzt. Zu Letzteren zählen die N-Verbindungen der freien Aminosäuren sowie der N-haltigen Säuren und Basen. Der Begriff Rohprotein umfasst alle N-haltigen Verbindungen, sowohl die Proteine als auch die NPN-Verbindungen. Fällbares Protein (entweder mit Kupfersulfat- oder Tanninlösung) wird als Reineiweiß bezeichnet. Es ergibt sich aus der Differenz zwischen Rohprotein und NPN-Verbindungen.

Qualitativ hochwertige Grünfütter, die der Landwirt selber produziert, sind für jeden Betrieb unabdingbar, da Grassilagen mit niedriger Qualität zu gesundheitlichen Problemen bei Rindern führen können. Die Qualität von Silagen hängt vom Ablauf der Gärprozesse während der Silierung und der Lagerungsdauer nach der Silierung ab. Darüber hinaus wird der initiale Prozess der Silierung und zwar die Trocknung des geschnittenen Grases, erheblich durch das Wetter beeinflusst. Zum einen ist eine schnelle Trocknung mit einer schnellen Abnahme des Zellwassergehalts notwendig, um einen übermäßigen Abbau von Pflanzenproteinen durch pflanzliche Enzyme im Siliermaterial und somit in der Silage zu verhindern. Zum anderen werden abnehmende prozentuale Reineiweißanteile vom Rohprotein von steigenden Gehalten phenolischer Substanzen, welche möglicherweise negative Effekte auf die Rinder haben könnten, begleitet.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst mit Hilfe des in-vitro-Systems RUSITEC (RUmen SIMulation TEchnique) Schadgrassilagen (Silagen, welche einen Reineiweißanteil vom Rohprotein < 50 % (w/w) aufweisen) im Vergleich zu Kontrollsilagen (Silagen, welche einen Reineiweißanteil vom Rohprotein > 50 % (w/w) aufweisen) fermentiert. Die fermentierten Silage-Proben wurden an der RP-HPLC analysiert und sechs Substanzen in allen Fermentern detektiert. Die Schadsilage-Fermentation führte im Vergleich zu Kontrollsilagen zu einem Konzentrationsanstieg der Substanzen 1-3, 5 und 6 (Peaks 1-3, 5 und 6). Darüber hinaus wurden Heu, Gras und Grassilagen mit verschiedenen Reineiweißanteilen an der RP-HPLC und LC-ESI-MS/MS analysiert, um Aussagen über das Vorkommen phenolischer Verbindungen treffen zu können. In insgesamt 70 Heu-, Gras- sowie Grassilage-Proben wurden 13 Flavone, drei Flavonole, drei Isoflavone, fünf Phenolsäuren, drei Aminosäuren und ein Biogenes Amin identifiziert. Mittels tandemmassenspektroskopischer Analyse konnten erstmalig Biosynthese und Stoffwechsel der Phenylpropanoide in Grassilagen, Gras, Heu und Vorkommen der sechs Substanzen im Fermenter definiert werden. Mittels RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS, UPLC-MS, FT-IR-, NMR-Spektroskopie Methoden wurde Substanz 6 als 3-Phenylpropionsäure nachgewiesen. Außerdem wurden Substanzklassen zur Identifikation der Peaks im Fermenter anhand der charakteristischen Summenformel, Fragmentierungsmuster, maximalen Wellenlängen, Retentionszeiten, des pflanzlichen Vorkommens und durch Standardchemikalien an der LC-MS/MS eingegrenzt. Hieraus könnten die Substanzen 1-3 Phenolsäuren-Derivate sein, die durch Pansenbakterien aus Flavonoiden gebildet werden. In den unterschiedlichen Grassilagen konnte der Stoffwechselweg der Flavonoide bestimmt werden. Zudem wurden die in Futtermittel und Fermenter identifizierten Komponenten an der LC-ESI-MS/MS mit einem externen Standard quantifiziert. Somit wurde der Zusammenhang zwischen Futtermitteln mit unterschiedlichen Reineiweißanteilen und ihrem Gehalt an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen bestimmt.

**Schlagwörter:** RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS, Grassilage, erniedrigte Reineiweißanteile am Rohprotein, pflanzliche Sekundärmetabolite, Flavonoide

## Abstract

For the characterization of the nutritional value of forage, the terms true protein, crude protein and non-protein nitrogen compounds (NPN: non-protein-N) are used in the field of animal nutrition. The N-compounds of free amino acids, the N-containing acids and bases are defined as NPN compounds. The term crude protein includes all N-containing compounds, proteins as well as NPN compounds. True protein is referred as precipitable protein (either with copper sulfate or tannin solution) and results from the crude protein subtracted by NPN compounds.

High-quality forages, produced by the farmer himself, are essential on every farm as silage of low quality can lead to health problems in cattle. The quality of silages depends on the progress of fermentation processes during ensiling and the duration of ensiling. Furthermore, the initial processes of ensiling, namely the drying of the cut grass, is influenced significantly by the weather. Fast drying with a rapid decrease of cell water content is necessary to prevent plant enzymes from excessive degradation of plant protein and therefore to preserve high true protein content in the ensiling material and so in the silages on the one hand. On the other hand, decreasing percentages of true protein content are accompanied by increasing contents of phenolic compounds, which may also have negative effects on animals.

In the present study, with the help of the in-vitro-system RUSITEC (RUmen SIMulation TECHnique) suspected grass silages (silages that had a true protein percentage of < 50% (w/w) of crude protein) were fermented and compared to control silages (silages that had a true protein percentage of > 50% (w/w) of crude protein). The fermented silage samples were analyzed on RP-HPLC and six compounds were detected in all fermenters. In comparison to control silages, the fermentation of suspected silages resulted in an increased concentration of compounds 1-3, 5 and 6 (peaks 1-3, 5 and 6). To get more information about the occurrence of the phenolic compounds, hay, grass and grass silages with different true protein contents were analyzed by RP-HPLC and LC-ESI-MS/MS. In total, 13 flavones, three flavonols, three isoflavones, five phenolic acids, three amino acids and one biogenic amine were identified analysing 70 hay, grass and grass silage samples. For the first time, biosynthesis and metabolism of phenylpropanoids in grass silages, grass and hay could be defined by tandem mass spectroscopic analysis. Using RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS, UPLC-MS, FT-IR, NMR spectroscopic methods, substance 6 was identified as 3-phenylpropionic acid. For the characterisation of the other peaks in the fermenter, a substance category was identified by use of the characteristic formula, fragmentation patterns, maximum wavelengths, retention times, plant occurrence and standard chemicals on the LC-MS/MS. Based on this data, the substances 1-3 could be phenolic acid derivatives, which are formed by rumen bacteria from flavonoids. In the different grass silages the metabolic pathway of flavonoids could be determined. In addition, the identified components in fermenter and forage were quantified by LC-ESI-MS/MS using an external standard. Thus, the correlation between low true protein content and the content of secondary plant substances was determined.

**Keywords:** RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS, grass silage, low true protein content of crude protein, plant secondary metabolites, flavonoids

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Für die Rindergesundheit ist ein einwandfrei funktionierender Vormagen lebensnotwendig. Um seine Funktionen zu erhalten, sollte ein gutes Grundfutter, das Rohfaser und in gewissem Umfang auch Proteine liefert, gefüttert werden. Grundfuttermittel, die die Landwirte selber produzieren, sind daher für jeden Betrieb unabdingbar. Gibt es beim Grundfutter Qualitätsprobleme, leiden die Rinder erheblich.

Gras-, Maissilage und Heu gehören zu in den Rationen für Wiederkäuer am häufigsten verwendeten Grundfuttermitteln. Bei der Silierung soll in der Landwirtschaft aus einer hochwertigen Pflanze durch Gärung im Vergleich zum Ausgangsmaterial ein Konservat mit geringen Nährstoffverlusten erzeugt werden. Jedoch aufgrund der Heterogenität des Siliergutes in der Lagerungsdauer kann der Reineiweißanteil am Rohprotein um das Dreifache der Ausgangswerte im Gras abfallen [1] und somit den Futterwert der Grassilagen erheblich mindern. Zusätzlich sind Grassorte, Vegetationsstadium, Witterungsbedingungen (Temperatur, Feuchte, Bodenverhältnisse), Ernteverfahren (Zeitfaktor, Zerkleinerung, Verdichtung), Luftabschluss (Zeitpunkt, Folienabdeckung) und eingesetzte Siliermittel als weitere beeinflussende Faktoren für die verminderten Reineiweißgehalte in Grassilagen zu zählen [2-16]. Andererseits beeinflussen die prozentualen Veränderungen der Reineiweißanteile den Synthesestoffwechsel der phenolischen Substanzen in Grassilagen [17-19]. Die bisherigen Forschungsergebnisse, sowohl epidemiologische als auch aus in-vitro- und in-vivo-Studien, deuten darauf hin, dass sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Polyphenole für das Tier aufgrund ihrer Eigenschaften als Radikalfänger präventive [20-25] und auch toxische Wirkungen wie die Mutagenität, die Verringerung der Eisenverfügbarkeit, die Hemmung von Verdauungsenzymen und der biologischen Funktionen von Proteinen zeigen können [26-32]. Darüber hinaus treten in Norddeutschland seit Jahren in Milchviehbetrieben Gesundheitsprobleme bei der Verfütterung von Grassilagen mit auffällig niedrigen Reineiweißanteilen auf. Diese Erkrankung führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten und wird als „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ bezeichnet [1]. Die Symptome dieser Erkrankung sind z.B. Reproduktionsstörung, Zellzahlerhöhung, Labmagenverlagerung, Festliegen und plötzliche Todesfälle [1].

Demzufolge werden die Grassilagen mit unterschiedlichen Reineiweißanteilen in zwei Hauptgruppen, die Kontroll- und die Schadsilagen, unterteilt. Die Kontrollsilagen weisen einen Reineiweißanteil von  $> 50\%$  (w/w) und die Schadsilagen dagegen  $< 50\%$  (w/w) am Rohprotein auf. Werden diese Schadsilagen mit verringerten Reineiweißanteilen als Futtermittel verwendet, können sie die Erkrankungen in Milchviehbetrieben verursachen [1].

---

Die Aufgabenstellung im Rahmen dieser Dissertation ist die Untersuchung der Auswirkungen von Grassilagen mit auffällig niedrigen Reineiweißanteilen auf die Zusammensetzung des Pansensaftes in-vitro. Dazu werden aufgearbeitete künstliche Pansensaft-Proben aus RUMen SIMulation TECHnique (RUSITEC)-Fermentationsläufen mittels differenzierter Methoden wie RP-HPLC, FMOC-HPLC, LC-ESI-MS/MS, UPLC-MS/MS, FT-IR, NMR, MALDI-TOF, SDS-PAGE analytisch charakterisiert, um mögliche primäre und sekundäre Komponenten (wie z.B. Aminosäuren, Biogene Amine, Peptide, Flavonoide, Alkaloide usw.) zu identifizieren. Die Grassilagen sollen ebenfalls auf Substanzen dieser Stoffklassen hin untersucht werden und die identifizierten Komponenten mit den Substanzen im Pansensaft verglichen werden. Nach der Identifizierung der enthaltenen Substanzen sollen die Biosynthesewege der Zielsubstanzen in Pflanzen definiert werden. Somit können die Ursachen der Rinderkrankheit und die Bedeutungen der identifizierten Komponenten für das Tier diskutiert werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Grassilage und Pansensaftfermentation

#### 2.1.1 Grassilage-Herstellung und ihre Inhaltsstoffe

In Deutschland werden aus der Familie der Süßgräser am häufigsten das Deutsche Weidelgras (*Lolium perenne*) und das Wiesen-Lieschgras (*Pheleum pratense*) angebaut [33]. Aufgrund der gemäßigten Klimazone Mitteleuropas ist die Futterkonservierung zur Fütterung in den Wintermonaten in der Landwirtschaft für die Nutztiere eine Notwendigkeit. In Deutschland kann nur 5 Monate im Jahr genügend Futter aufwachsen, so dass für die anderen/übrigen 7 Monate konserviertes Futter bereit stehen bzw. genutzt werden muss. Silagen können gegenüber Heu auch an nicht sonnigen Tagen gewonnen werden. Aus diesem Grund haben seit den 90-igern Jahren des letzten Jahrhunderts silierte Futtermittel als Grundfutter für Wiederkäuer gegenüber Heu zunehmend an Bedeutung gewonnen. Silagen aus Gras gehören neben Maissilagen zu den am häufigsten verwendeten Grundfuttermitteln in Deutschland [34]. Das Ziel der landwirtschaftlichen Betriebe ist es, eine kostengünstige Grassilage bester Gärqualität und höchster Energiedichte zu erzeugen, welche sich im Vergleich zum Ausgangsmaterial durch lediglich geringe Nährstoffverluste auszeichnet.

Silage wird definiert als durch Milchsäuregärung konserviertes Grünfutter. Für die Produktion von Grassilage werden die auf dem Feld angewelkten Gräser zunächst auf einen Haufen zusammengefahren, verdichtet und luftdicht mit Folie verschlossen. Dann wandeln Milchsäurebakterien unter anaeroben Bedingungen den Pflanzenzucker in Säure um und der pH-Wert reduziert sich auf pH 4,0-4,5. Anschließend hat die Silage durch Milchsäure und ebenfalls gebildete Essig- und Buttersäure einen säuerlich aromatischen Geruch. Die Silage darf für die hygienische Beschaffenheit des Futters nur wenig unerwünschten mikrobiellen Besatz in Form von Hefen, Schimmelpilzen, Clostridien, Listerien u. a. bzw. Toxinen aufweisen [35].

Bei der Silierung werden durch den Ernteschnitt die Pflanze bzw. die Zellen und Zellorganellen beschädigt. Infolge der Freisetzung von pflanzlichen Proteasen findet ein Abbau von Proteinen zu kleinen Peptiden und Aminosäuren statt. Um den Stoffwechsel und die Veränderungen der Stickstoff (N)-Verbindungen während der Silierung genauer zu charakterisieren, werden im Bereich der Tierernährung die Begriffe Reineiweiß (RE), Rohprotein (Rp) und Nicht-Protein-Stickstoff-Verbindungen (NPN: Non-Protein-N) genutzt [9, 36-37]. Die N-Verbindungen der freien Aminosäuren sowie der N-haltigen Säuren und Basen werden in der Tierernährung als NPN-Verbindungen definiert und zusammen erfasst.

Reineiweiß wird in der klassischen deutschen Tierernährung als fällbares Protein (entweder mit Kupfersulfat- oder Tanninlösung) bezeichnet [36]. Aus der Differenz von Rohprotein und NPN-Verbindungen ergibt sich der Reineiweiß-Wert, der lediglich einen Summenparameter darstellt, da bis heute weder untersucht wurde, bis zum welcher molaren Masse Proteine mitgefällt werden, noch es Beschreibungen gibt, welche im Gras vorkommende Inhaltsstoffe erfasst werden. Der Begriff Rohprotein umfasst alle N-haltigen Verbindungen, sowohl die Proteine als auch die NPN-Verbindungen [38]. Gräser der gemäßigten Breiten enthalten durchschnittlich 100-200 g Rohprotein kg<sup>-1</sup> Trockensubstanz (TS) [39], wobei Proteine mit 75-90 % den größten Teil des Gesamtstickstoffs in der Pflanze stellen [40]. Neben der klassischen deutschen Wenderanalyse zur Untersuchung von Grassilagen gibt es international außerdem das amerikanische Cornell-System [41-43]. Das Rohprotein in Grassilagen kann entsprechend ihrer Löslichkeit und ruminalen Abbaubarkeit in fünf Fraktionen eingeteilt werden [41-42]. Die Fraktionen sind nach ihrem Anteil am Rohprotein graphisch in Tabelle 2.1 dargestellt.

**Tabelle 2.1** Darstellung der Rohproteinfraktionen in Futtermitteln und deren enzymatischer Abbaugeschwindigkeit [42].

Differenzierung (Fraktion)		Proteinfraktion		Enzymatische Abbaugeschwindigkeit
Rohprotein	A	A	NPN (Nicht-Protein-Stickstoff)	--
	Reineiweiß	B1	pufferlösliches Reineiweiß	schnell
		B2	pufferunlösliches Reineiweiß (ND <sup>1</sup> -lösl.)	variabel
		B3	zellwandgebundenes lösliches Reineiweiß	variabel bis langsam
		C	zellwandgebundenes unlösliches Reineiweiß	keine (unverdaulich)

<sup>1</sup> neutrale Detergentienlösung

Die erste Fraktion (A) umfasst die NPN-Verbindungen [42-44] und Verbindungen der A-Fraktion werden im Pansen umgesetzt. Die B-Fraktionen bestehen aus Reineiweiß, dass in drei Unterfraktionen gegliedert werden kann. Diese werden differenziert je nach Löslichkeit entweder als nicht fasergebunden (B1), gebunden an neutrale Detergenz-Faser (NDF: Neutrale Detergenz-Faser), jedoch mit variabler Löslichkeit in Puffer (B2) oder gebunden an saure Detergenz-Faser (ADF: Saure Detergenz-Faser) und mit variabler bzw. nur noch langsamer Löslichkeit (B3). Fraktion C setzt sich aus ligninassoziierten Proteinen, Tannin-Protein-Komplexen, denaturierten Proteinen und solchen, die unlöslich an die ADF gebunden sind, zusammen und ist nahezu unverdaulich [42].

### 2.1.2 Die Ursachen der auffällig niedrigen Reineiweißanteile in Grassilagen

Entscheidend für den Begriff der hochwertigen Grundfutter in der Landwirtschaft ist neben der Hygiene- (Hefe-, Schimmelpilze, Rohasche) und der Häckselqualität die Rohproteinqualität. Der prozentuale Reineiweißanteil am Rohprotein (w/w) kann aufgrund der Heterogenität des Siliergutes während der Lagerungsdauer um das Dreifache der ursprünglichen Werte abnehmen [1], wodurch der Futterwert der Grassilagen erheblich vermindert wird. Beispielsweise enthält frisches Gras mehr als 80 % Reineiweiß und weniger als 5 % freie Aminosäuren. Bei der Heutrocknung verringern die intensive UV-Einstrahlung und ein schnell absinkender Wassergehalt des Gewebes die Proteolyse [45]. Deshalb kann Heu Reineiweißwerte von 70-85 % aufweisen. Im Vergleich zu frischem Gras und Heu sind in den Grassilagen bei der Untersuchung durch das Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover geringere bis sehr hohe Reineiweißanteile von 25-70 % festgestellt worden. Daher wird als Bewertungsmaßstab der prozentuale Reineiweißanteil am Rohprotein in Grassilage in fünf Gruppen beurteilt [1, 46] (s. Tab. 2.2).

**Tabelle 2.2** Grassilagequalität, bewertet nach dem prozentualen Reineiweißanteil vom Rohprotein (w/w) [1, 46].

<b>Reineiweißanteil vom Rohprotein [%]</b>	<b>Qualität der Grassilage</b>
> 70	Sehr gut
60-70	Gut
50-60	Mittel
< 50	Beeinträchtigt
< 40	Schlecht, bedenklich

Die Ursachen für die verminderten Reineiweißgehalte in Grassilagen sollen mit dem heterogenen Silierprozess begründet werden. Die Qualität der Silierung von Grassilagen wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst, wie z.B. Grassorte, Vegetationsstadium, Witterungsbedingungen (Temperatur, Feuchte, Bodenverhältnisse), Ernteverfahren (Zeitfaktor, Zerkleinerung, Verdichtung), Luftabschluss (Zeitpunkt, Folienabdeckung) und eingesetzten Siliermitteln [2-16].

Im Laufe einer Vegetationsperiode werden häufig bei Deutschem Weidelgras bis zu fünf Schnitte zur Bereitung von Grassilage genutzt. Von Schnitt zu Schnitt verändert sich die Zusammensetzung der Pflanzeninhaltsstoffe wie z.B. Rohprotein, Reineiweiß, Gerüstsubstanzen (Cellulose, Lignin usw.) und Wassergehalt. Im zweiten Schnitt ist das Rohprotein in geringerer Menge im Vergleich zum ersten Schnitt enthalten [2]. Im Gegensatz dazu nimmt die Menge der Gerüstsubstanzen im Laufe der Vegetationsperiode zu [3]. Somit sinkt die Verdaulichkeit der Pflanze und proportional auch der Energiewert der Silage [4-5].



Des Weiteren steigen die Buttersäuregehalte und bewirken bei laktierenden Kühen eine niedrigere mikrobielle Proteinsynthese im Pansen [47].

Wichtig für die Futterqualität ist neben der Jahreszeit auch die Tageszeit des Schnittes. Die Konzentration der wasserlöslichen Kohlenhydrate nimmt im Tagesverlauf zu und erreicht ihr Maximum in den späten Nachmittags- bis frühen Abendstunden [6]. Wasserlösliche Kohlenhydrate werden für die Milchsäuregärung zur Konservierung des Futters benötigt. Für eine erfolgreiche Silierung sind 30 g wasserlösliche Kohlenhydrate pro kg Siliergut-Frischmasse ideal [7]. Für Gräser führen steigende Tagestemperaturen zwar zu einem Konzentrationsverlust an wasserlöslichen Kohlenhydraten, jedoch werden beim Nachmittagsschnitt mithilfe der Milchsäurebildung niedrigere pH-Wert gegenüber Schnitten vom Morgen erreicht [6]. Dies spricht für eine Ernte nach Mittag [8]. Durch die dargestellten Veränderungen ist es nicht leicht, die optimale Schnittzeit zu bestimmen, jedoch kann genügende Trocknung des Schnittguts die positiven Veränderungen begünstigen.

Das Trocknen (Anwelken) des geschnittenen Grases ist bedeutsam für die Vorbereitung der Silierung. Die Silage kann entweder durch die direkte Silierung des frisch geschnittenen Materials oder durch die Einsilierung nach einer Anwelkphase gewonnen werden. Bei sehr feuchtem Pflanzenmaterial sind die Nährstoffverluste deutlich höher [9]. Das Schneiden von Gras führt zum Austrocknen der Halme, wodurch die Pflanze Wasser verliert. Dadurch sinkt die Aktivität der pflanzlichen Proteasen ab und das führt zu einer Verminderung des enzymatischen Proteinabbaus zu Aminosäuren. Im Vergleich zu direkt siliertem Pflanzenmaterial wurden bei der angewelkten Silage höhere Rohprotein- und prozentuale Reineiweißgehalte festgestellt [10]. Das schnelle Anwelken kann die Nährstoffverluste durch Proteolyse verhindern. Um den Protein- und Zuckerabbau zu limitieren, sollte in möglichst kurzer Zeit das Anwelken des geschnittenen Grases erfolgen [11-12]. Jedoch ist der Nachteil der angewelkten Silage die geringere Verdaulichkeit [13].

Für eine erfolgreiche Silierung ist die genügende Zerkleinerung ein weiterer wirksamer Faktor. Durch die Zerkleinerung werden organische Säuren und Substrate (wie Zucker) freigesetzt sowie der erforderliche pH-Wert-Abfall beschleunigt [14-15]. Daher sinkt der Sauerstoffgehalt der Pflanzen und infolgedessen der Nährstoffverlust [35].

Eine gute Silage mit geringem Feuchtigkeitsgehalt ( $< 650 \text{ g kg}^{-1} \text{ TS}$ ) kann folglich produziert werden [33]:

- durch Trocknung,
- mit ausreichend hohem Zuckergehalt,
- durch die genügende Zerkleinerung,

- mit O<sub>2</sub>-Ausschluss durch Verdichten,
- mit niedrigem pH-Wert (< 4,0),
- durch Zusätze von Silierhilfsmitteln (Säuren, Milchsäurebakterien usw.).

Somit können die Gehalte der wichtigen charakteristischen Parameter (Reineiweiß, Trockensubstanz usw.) zur Qualität der Silage aus Sicht der Wiederkäuerfütterung erhöht werden.

### **2.1.3 Proteinabbau während der Silierung**

Der Abbau von stickstoffhaltigen Bestandteilen während der Silierung ist bedeutsam für die Verwertung des Futters durch den Wiederkäuer [15]. Beispielsweise wird das Photosyntheseenzym Rubisco (Ribulosebisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase, 560 kDa) während der Silierung in den ersten 24 h sehr schnell abgebaut [33]. Somit ändert sich die Zusammensetzung des Gesamtstickstoffgehalts hin zu einem höheren Anteil an NPN-Verbindungen (freien Aminosäuren, Amide, Amine, Ammoniak, Nitrit, Nitrat usw.) [16]. Dementsprechend liegen in Silagen mehr als 25 % des Gesamtstickstoffgehalts als freie Aminosäuren vor [48].

Die Proteasen kommen im Cytoplasma sowie in Vakuolen der Pflanzen vor [49-50], sind sofort nach dem Schnitt der Pflanze aktiv [15] und für lange Zeit extrazellulär wirksam [51]. Wird die Pflanze beschädigt, treten erst die in den Vakuolen befindlichen Proteasen ins Cytosol aus und bauen pflanzliche Proteine [52] ab, bis der pH-Wert auf pH 5 abfällt [15].

Zur näheren Erläuterung wird der Proteinabbau während der Silierung als Anwelk- und Fermentationsphase in zwei Phasen eingeteilt.

#### ***Phase 1: Veränderungen während des Anwelkens***

Während des Anwelkens der geschnittenen Pflanze werden aufgrund des zunächst noch relativ hohen Wassergehalts Peptidbindungen durch die pflanzlichen Proteasen und Enzyme aus an den Pflanzen haftenden Mikroorganismen hydrolytisch gespalten; Peptide, freie Aminosäuren und Amide entstehen. Durch das Anwelken steigen die TS-Gehalte der Pflanzen durchschnittlich von 18,1 % auf 35,3 % an [53] und nach 24 h Anwelkzeit wurde der höchste TS-Gehalt (58,1 % für angewelkte Luzerne) festgestellt [54]. Außerdem erhöht sich der NPN-Anteil am Gesamtstickstoff während des Anwelkens durchschnittlich von 11,8 % auf 45,0 % des Gesamtstickstoffs [54]. Der während des Anwelkens zunehmende TS-Gehalt im

Siliergut bedingt schließlich eine Abnahme der proteolytischen Aktivität und begrenzt so das Ausmaß der Proteolyse während des Anwelkprozesses.

Eine erniedrigte bzw. nicht ausreichende Sonneneinstrahlung während des Anwelkens kann dazu führen, dass der Feuchtigkeitsgehalt im Siliergut nicht schnell genug abnimmt. In der Folge steigt die Proteolyse und der NPN-Anteil am Gesamtstickstoff nimmt weiter zu [33, 53-54].

### ***Phase 2: Veränderungen während der Fermentation im Silo***

Ist der Sauerstoff im abgedeckten Silo vollständig verbraucht, startet die nächste Fermentationsphase. In Abhängigkeit von den Silierbedingungen kann die Dauer dieser Fermentationsphase max. drei Tage nach Abschluss des Silohaufens sein. Während der Fermentation werden durch die Proteolyse die freien Aminosäuren gebildet [55].

Durch die Bildung von Milchsäure und anderen organischen Säuren sinkt der pH-Wert auf pH 5,0-3,8 ab, somit nimmt die Aktivität der mikrobiellen Enzyme nach etwa 5-7 Tagen durch den sinkenden pH-Wert ab [56].

Die Silagen weisen aufgrund von Trockenmasseverlusten in Verbindung mit der Fermentation einen höheren Gesamtstickstoffgehalt gegenüber dem nicht silierten angewelkten Pflanzenmaterial auf [57-58].

#### **2.1.4 Pansenmikroorganismen und Proteinmetabolismus im Pansen**

Der Pansen ist der erste (Vormagen) der insgesamt vier Mägen eines Rindes und dient als eine ideale Gärkammer für den anaeroben Abbau der aufgenommenen Nährstoffe [59]. Er enthält Bakterien, Archaeen, Pilze und Protozoen. Die Konzentration an Protozoen beträgt zwischen  $10^5$ - $10^8$  Zellen je mL Pansenflüssigkeit [60]. Die Anzahl der Pansenbakterien zählt bei einem erwachsenen Rind etwa  $10^{10}$ - $10^{11}$  Zellen je mL Pansensaft [60]. Einige typische Pansenbakterien sind *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Megasphaera elsdenii* und *Fibrobacter succinogenes* [61]. Mit Hilfe der im Pansenmilieu vorkommenden Mikroorganismen, deren Enzymen (u. a. proteolytische, peptidolytische, ureolytische Enzyme) einschließlich der Kohlenhydrat abbauenden Enzymen (z.B. Enzyme für den Celluloseabbau) erfolgt ein effizienter Aufschluss des Grünfutters [62]. Beispielsweise werden im Pansen die Kohlenhydratverbindungen (wie Cellulose, Stärke) erst zu Glucose abgebaut und dann in flüchtige Fettsäuren umgewandelt [63], die dem Wiederkäuer als Energieträger zur Verfügung stehen. Futterfette werden durch Hydrolyse in

Fettsäuren gespalten, ungesättigte Fettsäuren werden anschließend über Biohydrogenierung in gesättigte Fettsäuren überführt [64].

Von besonderer physiologischer Bedeutung für den Wiederkäuer ist der mikrobielle Stickstoffstoffwechsel im Pansen. Die Proteine und NPN-Verbindungen sind die wichtigsten Stickstoffquellen des Pansens. Um den ruminalen Proteinstoffwechsel zu erläutern, werden die Futterproteine entsprechend ihrer voneinander abhängigen Metabolisierungswege in lösliches und unlösliches Protein eingeteilt.

Die löslichen Proteine werden zunächst relativ schnell durch die Pansenbakterien extrazellulär zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut [65-67]. Nachfolgend entstehen aus den Aminosäuren durch die Abspaltung der Aminogruppe am ersten Kohlenstoffatom als Endprodukte kurzkettige iso-Fettsäuren (i-Butter-, i-Valeriansäure), Kohlenstoffdioxid und Ammoniak [65-69]. Ammoniak ist in diesem Stoffwechsel ein Hauptendprodukt sowie ein wichtiges Substrat für die mikrobielle Proteinneusynthese. Der Ammoniakgehalt des Pansens liegt unter normalen Fütterungsbedingungen zwischen 2,35-11,70 mmol/L [70-71]. Im Pansensaft können Ammoniak und freie Aminosäuren von Mikroorganismen wieder aufgenommen und zur mikrobiellen Proteinsynthese genutzt werden. Das Ausmaß der Ammoniakbildung aus N-haltigen Verbindungen ist von der Menge, Löslichkeit, Zusammensetzung und somit der Abbaufähigkeit des Rohproteins im Futter abhängig. NPN-Verbindungen und lösliche Proteine werden im Pansen schnell zu Ammoniak umgesetzt [69]. Bei den größeren Mengen der leichtlöslichen Proteine (wie Casein) entsteht Ammoniak im Pansen in hohen Konzentrationen. Durch die Pansenwand wird Ammoniak resorbiert und in der Leber in Harnstoff umgewandelt [72]. Nachfolgend wird Harnstoff über die Nieren mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden oder gelangt zu einem erheblichen Anteil wieder über den Speichel in den Pansen (ruminohepatischer Kreislauf).

Die unlöslichen Proteine werden wie die löslichen Proteine zunächst zu Peptiden abgebaut. Danach werden die Peptide intrazellulär von Pansenbakterien und Protozoen in Aminosäuren zerlegt. Die freigesetzten Aminosäuren werden wiederum zur Neusynthese der Proteine durch die Mikroorganismen genutzt und auch von den Rindern aufgenommen [73]. Dabei wird ein Teil der Aminosäuren zu Ammoniak und Kohlendioxid umgewandelt [73-75]. Zur Synthese der Protozoenproteine können neben den in den Protozoen freigesetzten Aminosäuren auch Aminosäuren aus dem umgebenden Medium genutzt werden [46]. Abbildung 2.1 zeigt einen Überblick über den ruminalen mikrobiellen Proteinmetabolismus [46, 72, 74-75].

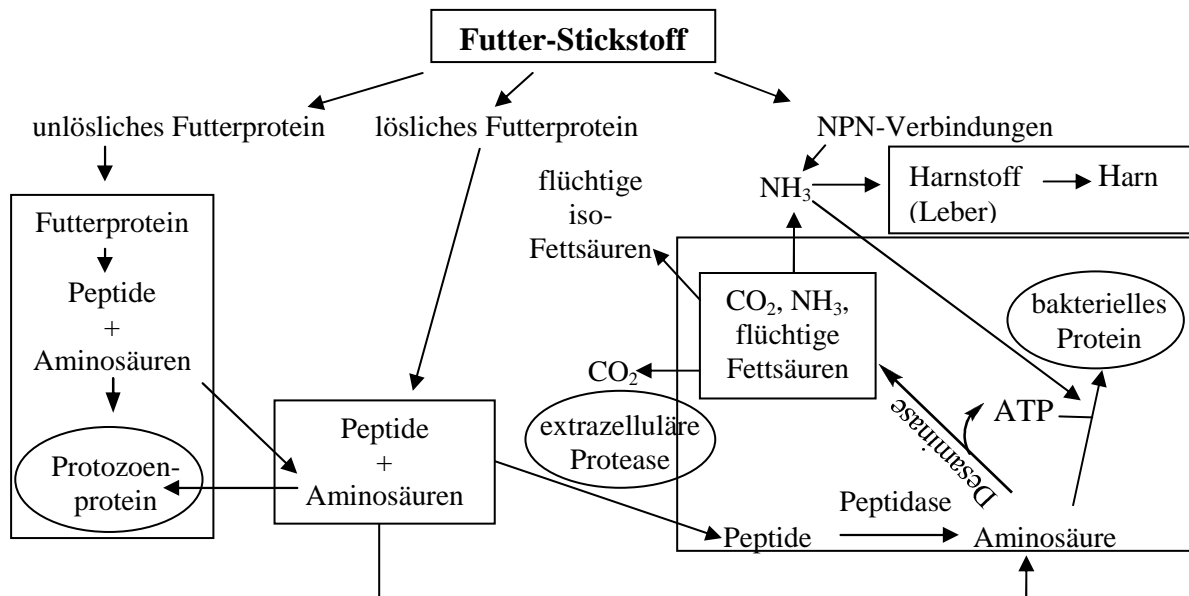


Abbildung 2.1 Der mikrobielle Stickstoffmetabolismus der Wiederkäuer [46, 72, 74-75].

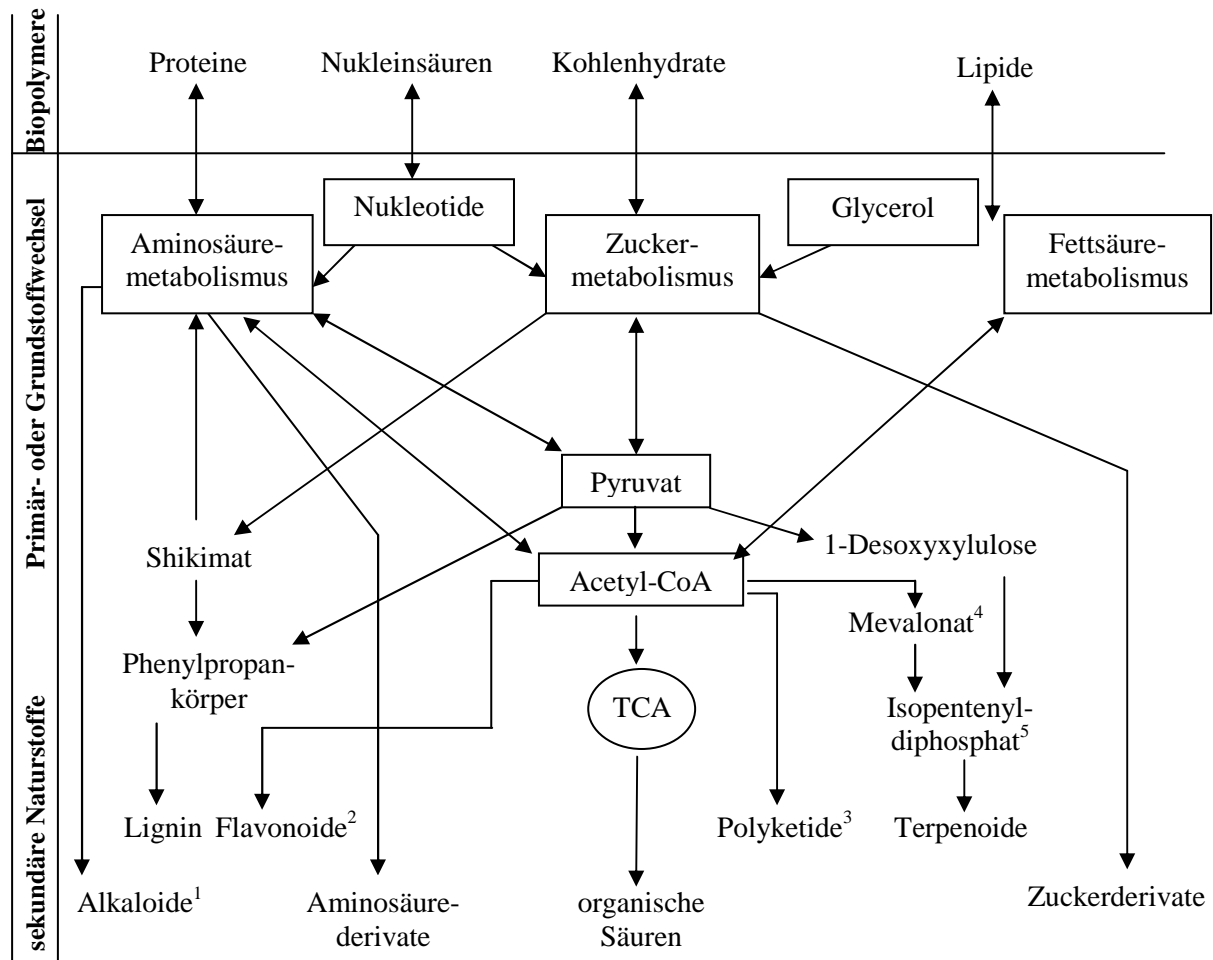
## 2.2 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

### 2.2.1 Primär- und Sekundärstoffwechsel in Pflanzen

Pflanzen bestehen zum größten Teil aus primären Inhaltsstoffen wie Wasser, Proteinen und Kohlenhydraten, die für das Wachstum und die Vermehrung von großer Bedeutung sind. Neben diesen Stoffen enthalten Pflanzen jedoch auch sekundäre Inhaltsstoffe. Diese sind ohne Bedeutung für den pflanzlichen Primärstoffwechsel, können aber für deren Fortbestand mitentscheidend sein, da sie u. a. Selektionsvorteile bieten [76]. So können sie beispielsweise als Lockstoff für bestäubende Insekten dienen oder als Giftstoff die Pflanze vor Fraß durch Herbivoren (Tiere) oder Insekten schützen [20].

Der Sekundärstoffwechsel wird durch charakteristische Besonderheiten vom Primärstoffwechsel unterschieden. Sekundäre Inhaltsstoffe werden im Gegensatz zu primären Inhaltsstoffen nicht kontinuierlich, sondern nur in bestimmten Entwicklungsphasen der Pflanze gebildet [20, 77]. Es sind auch weitere Einflussfaktoren wie Klima, Boden, Pflanzenspezies, Erntezeitpunkt und Pflanzenreife für die Konzentration der sekundären Inhaltsstoffe bedeutsam [76]. Bemerkenswert ist auch der unterschiedliche Einfluss der Evolution auf die Umsetzungen im Primär- und Sekundärmetabolismus. Während sich der Primärmetabolismus unter dem Einfluss der Evolution kaum verändert hat [20], wurden im Gegensatz dazu rasche Veränderungen auf der genetischen Ebene des Sekundärmetabolismus festgestellt [78]. Zudem ist der Primärstoffwechsel universell, uniform und konservativ, während der Sekundärstoffwechsel singulär, vielfältig und adaptiv ist [20]. Die Bildung der

sekundären Pflanzeninhaltsstoffe lässt sich aber trotz seiner Vielfalt auf gemeinsame Intermediärmetabolite mit dem Primärstoffwechsel zurückverfolgen [20]. So können viele Sekundärmetabolite von Primärmetaboliten wie z.B. den Aminosäuren und einfachen Kohlenhydraten abgeleitet werden [76]. In Abbildung 2.2 werden der biosynthetische Zusammenhang zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel und die Bildung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe dargestellt.



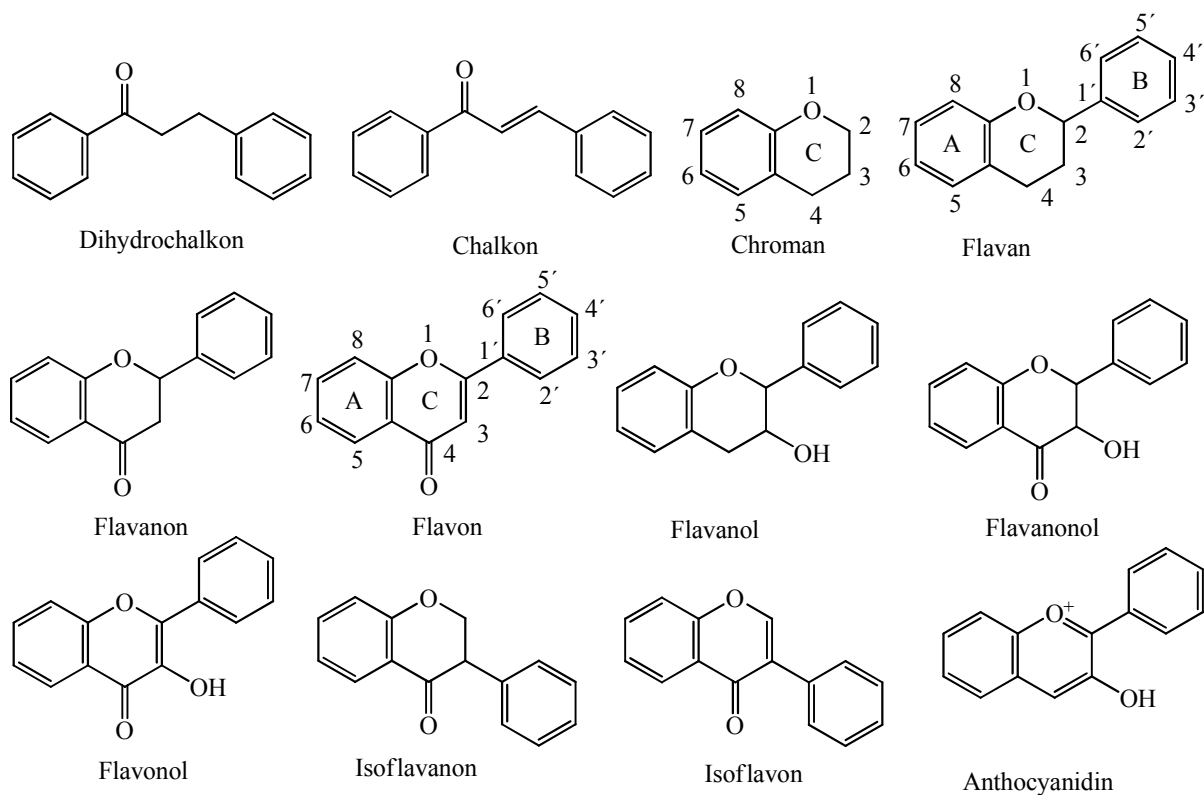
**Abbildung 2.2** Biosynthetischer Zusammenhang zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel und die Bildung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe (<sup>1</sup>: Aminosäureweg, <sup>2</sup>: Shikimisäureweg, <sup>3</sup>: Polyketidweg, <sup>4</sup>: Mevalonsäureweg, <sup>5</sup>: Methylerythritolphosphatweg, TCA: Tricarbonsäurezyklus) [20].

Zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen werden Alkaloide, phenolische Stoffe, Gerbstoffe, Saponine und Glykosinolate gezählt [76]. Alkaloide sind stickstoffhaltige heterocyclische organische Verbindungen und können als Endprodukte im Aminosäurestoffwechsel von Pflanzen, aber auch Tieren und Pilzen gebildet werden [20]. Alkaloide können starke toxische Wirkungen zeigen und haben in Pflanzen auch die Funktion vor Fressfeinden zu schützen [20, 78].

Die phenolischen Verbindungen zählen zu den bekanntesten sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Sie werden über den Shikimat-Weg aus Shikimisäure und zugehörigen Aminosäuren abgeleitet. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (Saponine, cyanogene Glykoside, Glucosinolate und Alkaloide) werden in den Vakuolen gespeichert [79]. Lignine und Tannine in den Zellwänden und Vakuolen werden auch als konstitutive antimikrobielle Verbindungen bezeichnet. Auch Flavonoide zählen zu den in der Natur häufig vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und zeichnen sich durch eine große Strukturvielfalt innerhalb der Gruppe der Polyphenole aus.

### 2.2.2 Flavonoide

Flavonoide bestehen aus einem *o*-heterozyklischen Ring (C) und zwei aromatischen Ringen (A und B) bzw. aus einem Flavangerüst (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Körper), welche unterschiedliche Substituenten aufweisen. Die Flavonoide können aufgrund des Oxidationszustandes im mittleren Pyran-Ring des C<sub>15</sub>-Gerüsts in Dihydrochalkone, Chalkone, Chromane, Flavane, Flavanone, Flavone, Flavanole, Flavanonole, Flavonole, Isoflavanone, Isoflavone und Anthocyanidine unterteilt werden (s. Abb. 2.3) [80].



**Abbildung 2.3** Strukturformeln der zwölf Flavonoidhauptgruppen [80].

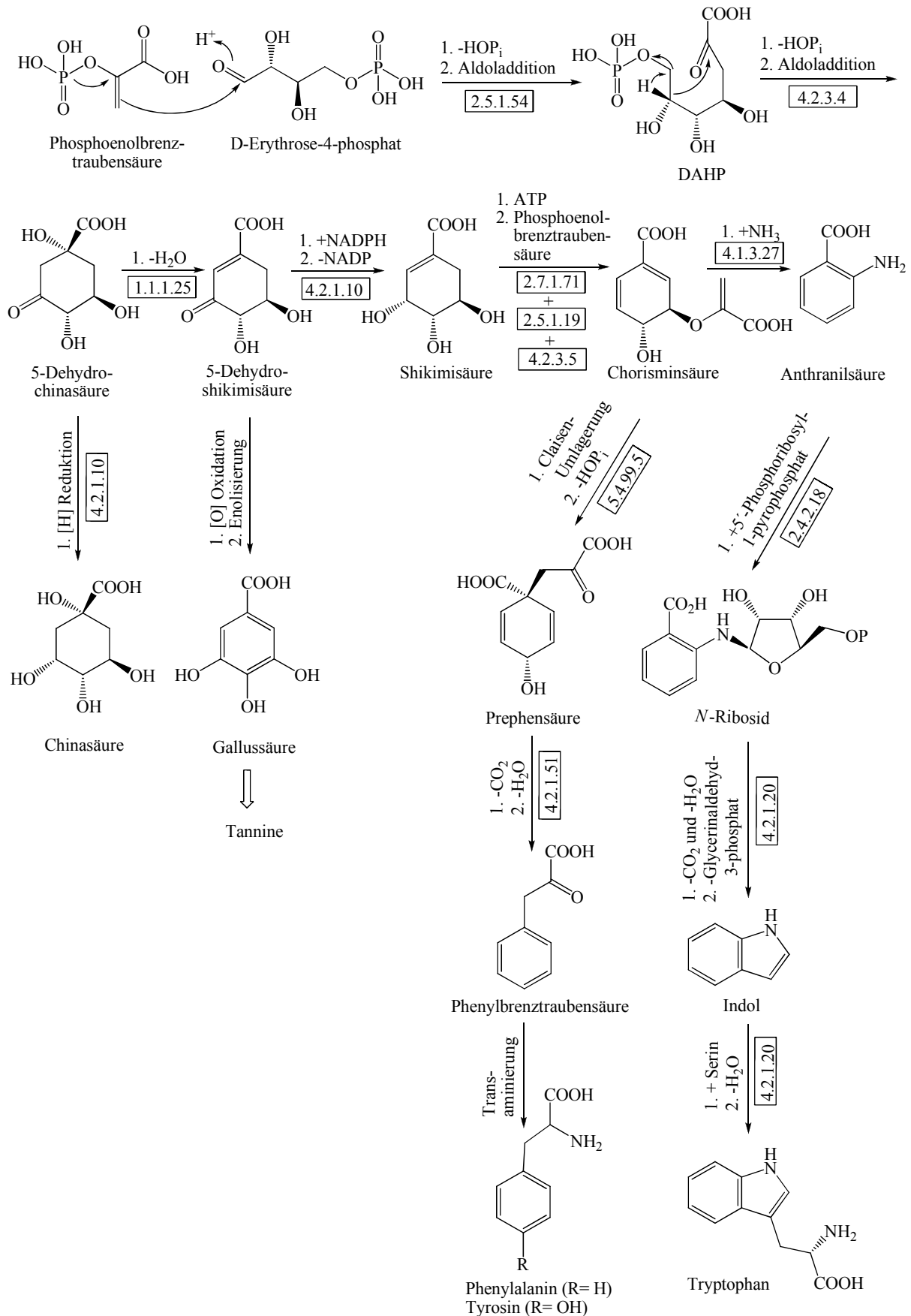
Die Flavonoide liegen oft als Glykoside der Glucose oder der Rhamnose in den Vakuolen (sog. *chymotrope* Farbstoffe) der höheren Pflanzen vor und werden den Pflanzennamen entsprechend bezeichnet [20]. In Bakterien, Algen, Pilzen und im gesamten Tierreich kommen sie nicht vor [20]. Die Zuckerreste können an die 6. und 7. Position des Flavans gebunden werden. Dabei handelt es sich um *O*-Glykoside oder *C*-Glykoside. Bei den *C*-Glykosiden ist der Zucker-Rest direkt an den aromatischen Ring gebunden. D-Glucose, D-Galaktose, L-Rhamnose, L-Arabinose und D-Xylose sind die am häufigsten gebundenen Zucker-Reste an der Bindungsstelle von Flavan. Beispielsweise kommen Flavon *O*-Glykoside in Pflanzen besonders als 7-*O*-Rutinoside oder 7-*O*-Neohesperidoside vor, obwohl ein 3-*O*-Rutinosid als Rutin benannt worden ist. Rutinose ist ein Disaccharid aus D-Glucose und L-Rhamnose. Das Isomer L-Rhamnosid-D-Glucose wurde im Neohesperidin, einem Glykosid aus unreifen, bitteren Orangen, nachgewiesen und „Neohesperidoside“ genannt [20]. Außerdem wird durch Glykosylierung der Flavonoide eine bessere Wasserlöslichkeit und eine geringere Anfälligkeit gegenüber freien Radikalen erreicht [81].

### 2.2.3 Biosynthese der Polyphenole

Die Biosynthese der Polyphenole setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Abschnitten zusammen: das Shikimisäure-, das Phenylpropanoid- und das Flavonoidsegment. Bei der Synthese der Polyphenole kommen insbesondere dem Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan eine bedeutsame Rolle zu. Diese Aminosäuren werden in Pflanzen im ersten Abschnitt über den Shikimisäureweg produziert. Dieser Syntheseweg ist nur in Pflanzen und Mikroorganismen, nicht aber in Tieren möglich [82]. Tiere und Menschen vermögen im Gegensatz zu Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen Phenylalanin durch Hydroxylierung in Tyrosin umzuwandeln. Während des Shikimatweges entscheidet sich bei Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen, ob Phenylalanin durch die Prephenatdehydratase oder Tyrosin durch die Prephenatdehydrogenase entsteht.

3-Deoxy-D-arabino-2-heptulonsäure (DAH) ist ein bedeutsames Intermediat zu Beginn des Stoffwechselweges der für den Menschen essentiellen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan [83]. Der Shikimisäureweg zur Synthese von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan ist in Abbildung 2.4 dargestellt.





**Abbildung 2.4** Shikimisäureweg zur Biosynthese von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Aromaten [84-93]. Abkürzungen der dargestellten Metabolite: DAHP: 3-Deoxy-D-arabinoheptulose-7-phosphat, Pi: anorganisches Phosphat, NADP: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, ATP: Adenosintri-phosphat. Abkürzungen der beteiligten Enzyme: EC 2.5.1.54: DAHP-Synthasen, EC 4.2.3.4: 5-Dehydroquinat-

Dehydratase, EC 1.1.1.25: Shikimat-Dehydrogenase, EC 4.2.1.10: 5-Dehydroquinat-Dehydratase, EC 2.7.1.71: Shikimatkinasen, EC 2.5.1.19: 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase, EC 4.2.3.5: Chorismat-Synthase, EC 4.1.3.27: Anthranilat-Synthase, EC 5.4.99.5: Chorismat-Mutase, EC 4.2.1.51: Prephenat-Dehydratase, EC 2.4.2.18: Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase, EC 4.2.1.20: Tryptophan-Synthase.

Im ersten Schritt findet eine enzymkatalysierte Aldoladdition von Phosphoenolpyruvat (PEP) mit Erythrose-4-phosphat (E4P) statt und es bildet sich als das erste Produkt der Synthese das bereits erwähnte 3-Deoxy-D-arabinoheptulose-7-phosphat (DAHP) [84-85]. Durch die Eliminierung von Phosphat und einer innermolekularen Aldoladdition cyclisiert die Verbindung DAHP zu 5-Dehydrochinasäure [84-85]. Diese kann nun zu Chinasäure reduziert werden oder durch Wasserabspaltung zu 5-Dehydroshikimisäure umgesetzt werden. Aus Letzterer entsteht durch weitere Reduktion Shikimisäure als Namensgeber des Shikimisäurebiosyntheseweges [84]. 5-Dehydroshikimisäure kann aber auch zu Bestandteilen der hydrolysierbaren Gerbstoffe der Gallussäure, einem Vorläufer der Tannine, umgesetzt werden. Die Shikimisäure selbst wird durch eine aktivierte ATPase in das maßgebende Zwischenprodukt dieser Reaktionskette, der Chorisminsäure, umgewandelt [86]. Schließlich werden aus dem Intermediat Chorisminsäure Phenylalanin und Tyrosin über Prephensäure und Tryptophan als weitere Produkte über Anthranilsäure synthetisiert [86]. Prephensäure entsteht in diesem Weg aus Chorisminsäure nach einer enzymkatalysierten Claisen-Umlagerung, die mit einer Decarboxylierung und Wasserabspaltung in Phenylbrenztraubensäure überführt [84-86]. Im nächsten Schritt wird durch Transaminierung dieser  $\alpha$ -Ketosäure (Phenylbrenztraubensäure) die Aminosäure Phenylalanin synthetisiert. Tyrosin kann auch aus der Prephensäure nach Dehydrierung und Transaminierung gebildet werden. Ferner entsteht durch Reaktion mit Ammoniak und Abspaltung des Pyruvat-Restes aus Chorisminsäure auch Anthranilsäure. Anthranilsäure reagiert unter Katalyse durch Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase in einer  $S_N2$ -Reaktion mit 5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat zum *N*-Ribosid [87]. Im nächsten Schritt wird aus dem *N*-Ribosid mit Hilfe der Phosphoribosyl-Anthranilat-Synthase im Rahmen einer Amadori-Umlagerung 1-[(2-Carboxyphenyl)amino]-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat gebildet [87-90]. Durch weitere Cyclisierung unter Verlust von  $CO_2$  und Wasser entsteht daraus 3'-Indolylglycerin-3-phosphat (IGP), das durch die Tryptophan-Synthase in Indol gespalten wird. Indol wird schließlich durch die Tryptophan-Synthase mit der Aminosäure Serin zum Tryptophan umgewandelt [91-93]. L-Phenylalanin und L-Tyrosin dienen als Edukte für die Synthese von Cumarinen, Ligninen und Flavonoiden. Der zweite (Phenolsäuren und Lignine) und dritte (Flavonoid-Bereich) Abschnitt der Polyphenolsynthese sind in Abbildung 2.5 mit den beteiligten Enzymen dargestellt.



CoA-Ligase (4CL), EC 1.14.14: Ferulasäure-5-hydroxylase (F5H), EC 2.1.1.104: Kaffeeoyl-*O*-methyltransferase (COMT), EC 2.3.1.74: Chalkon-Synthase (CHS), EC 2.3.1.170: Chalkon-Reduktase (CHR), EC 5.5.1.6: Chalkon-Isomerase (CHI), EC 2.3.1.95: Stilben-Synthase (SS), EC 1.14.13.86: Isoflavon-Synthase (IFS), EC 1.14.11.9: Flavanon 3-hydroxylase (F3OH), EC 1.14.13.52: Isoflavon 2'-hydroxylase (IFOH), EC 1.3.1.45: Isoflavon-Reduktase (IFR), EC 1.1.1.246: Vestitone-Reduktase (VR), EC 1.1.1.219: Dihydroflavonol-Reduktase (DHFR), EC 1.14.11.19: Anthocyanidin-Synthase (AS), EC 2.4.1.91: UDP-Glucose Flavonol 3-*O*-glucosyl-Transferase (UFGT).

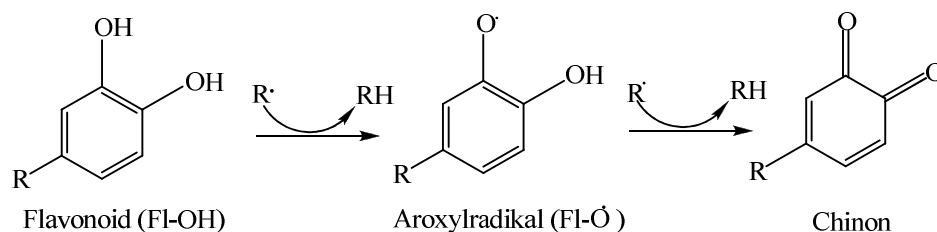
Das Enzym L-Phenylalaninammoniumlyase (PAL) katalysiert die Bildung von Zimtsäure aus Phenylalanin [94]. In Pflanzen können mit der Abspaltung eines C<sub>2</sub>-Fragments aus der *trans*-Zimtsäure die Benzoessäuren und ihre Derivate (z.B. Salicylsäure) entstehen. Durch eine enzymatische Hydroxylierung des Aromaten in *para*-Stellung zum Propensäurerest verläuft die Reaktion sehr schnell in Richtung *p*-Cumarsäure [20]. *p*-Cumarsäure kann aber auch direkt durch Tyrosinammoniumlyase (TAL)-katalysierte Desaminierung aus der Aminosäure L-Tyrosin gebildet werden [95]. Zudem kann die TAL-Reaktion wie z.B. in Mais durch PAL-Enzyme mit geringer Substratspezifität katalysiert werden [96]. Des Weiteren kann die aktivierte *p*-Cumarsäure durch eine Phenolase zur Kaffeesäure hydroxyliert werden [97]. Kaffeesäure ist eine Schlüsselsubstanz für den Bildungsweg der Cumarine, Chlorogensäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und Lignine. Die Pflanzen können aus Kaffeesäure mit der Reaktion von Chinasäure Chlorogensäure bilden und auch Ferulasäure durch Methylierung mithilfe des Enzyms Kaffeesäure-*O*-methyltransferase (COMT) synthetisieren [94]. Aus den Phenolcarbonsäuren (*p*-Cumar-, Sinapin-, Kaffee-, Ferula- und 5-Hydroxyferulasäure) werden im Phenylpropanstoffwechsel die Monolignole wie z.B. *p*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol gebildet. In den nächsten Schritten kann in Pflanzen aus den Monolignolen durch enzymatisch initiierte Dehydrogenierungs-Polymerisation ein polymeres Naturprodukt des Lignins entstehen [98-100]. Außerdem wird *p*-Cumarsäure durch die Enzyme *p*-Cumaroyl-CoA-Ligase (CL) in *p*-Cumaroyl-CoA umgewandelt [101], welches ebenfalls zu Ligninen polymerisieren kann [94]. Zudem werden aus *p*-Cumaroyl-CoA in Pflanzen Chalkone und Stilbene gebildet. Stilbene werden durch Reaktion von *p*-Cumaroyl-CoA über das Zwischenprodukt Malonyl-CoA mit dem Enzym Stilbensynthase (STS) dargestellt [94]. Sie sind strukturell aus einem C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Grundkörper aufgebaut.

Im letzten Schritt dient das Chalkon als Edukt für die Synthese der Flavonoide und Aurone. Dieser Abschnitt wird in der Polyphenolsynthese als Flavonoid-Bereich bezeichnet. Chalkon wird aus drei Molekülen Malonyl-CoA und einem Molekül *p*-Cumaroyl-CoA mit Hilfe des Enzyms Chalkon-Synthase (CHS) gebildet. Unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung entsteht ein dreiwertiges Phenol, das Naringenchalkon (4,2',4',6'-Tetrahydroxychalkon). Nach dem durch die Chalkon-Isomerase (CHI) katalysierten Ringschluss stellt das Naringenin das C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-

Grundgerüst dar, aus dem die Flavanone, Flavone, Flavonole, Isoflavone, Anthocyanine sowie Anthocyanidine durch verschiedene enzymatische Oxidationen, Dehydratationen, Hydroxylierungen und Reduktionen gebildet werden können [102-103]. Die große Zahl an Flavonoid-Verbindungen ergibt sich dementsprechend aus den vielfältigen Möglichkeiten der Derivatisierung der Grundstruktur, beispielsweise durch Glykosylierung, Hydroxylierung, Methylierung und Sulfatisierung. Somit wurden bisher über 5.000 verschiedene Flavonoide beschrieben [104].

### 2.2.4 Reaktionen und antioxidative Wirkungen der Polyphenole

Polyphenole sind aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung bzw. ihrer Eigenschaften als Radikalfänger wichtige Biomoleküle und die reaktivsten Inhaltsstoffe der Pflanzen [20, 105-106]. Proteine und Kohlenhydrate sind ihre bekanntesten Reaktionspartner und hydrolytische bzw. oxidative Reaktionen mit Polyphenolen treten insbesondere in Früchten und Gemüse auf [20]. Bei den hydrolytischen Prozessen werden freie Phenole aus den korrespondierenden Glykosiden freigesetzt. Zudem werden durch oxidative Prozesse aus den Phenolen die Chinone gebildet. Das Zwischenprodukt Aroxyradikal ist im Vergleich zu den freien Radikalen weniger reaktiv und kann durch Reaktion mit weiteren Radikalen in die stabile Chinon-Struktur übergehen (s. Abb. 2.6) [105-107].



**Abbildung 2.6** Deaktivierungsreaktion reaktiver Radikale durch Flavonoide [107].

Das *ortho*-Chinon ist das reaktivste Zwischenprodukt bei dem enzymatischen und nicht enzymatischen Prozess in Früchten und Gemüse [108]. Die Kondensation bzw. Polymerisation der reaktiven Chinoide kann zu gelben bis braunen Produkten beispielsweise in Äpfel führen [108]. Die wichtigsten Reaktionstypen der Polyphenole sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

**Tabelle 2.3** Die Reaktionstypen der Polyphenole [108].

Reaktionstyp	Substrat	Reaktion mit	Produkt
enzymatische Bräunung	Chinone oxidierte	anderen Phenolen (Enzyme: Laccase/Tyrosinase)	braune Kondensate
nicht-enzymatische Bräunung	Phenole	Phenolen	gelb-braune Pigmente
Polyphenol-Protein-Bindung	Phenole	Proteinen (vorzugsweise mit prolinhaltigen Gruppen)	Ausbildung von schwerlöslichen Verbindungen
Polyphenol-Polysaccharid-Bindung	Phenole	Polysacchariden	Ausbildung von schwerlöslichen Verbindungen

Die enzymatische oder nicht enzymatische Bildung des *o*-Chinons ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Polyphenol-Reaktionen [107-108]. In diesem Schritt werden *o*-Diphenole unter Katalyse von Polyphenoloxidasen (PPO) wie Laccase und Tyrosinase zu *o*-Chinonen oxidiert, was zur Bildung der braunen Pigmente führt. Neben dieser Oxidation katalysieren Polyphenoloxidasen in Früchten und Gemüsen die Hydroxylierung eines Monophenols zu einem *o*-Diphenol. Beispielsweise wird nach dieser enzymatischen Reaktion 3-Hydroxyphloridzin gebildet [109]. Das Enzym Polyphenoloxidase weist eine hohe Affinität zu Hydroxyzimtsäureverbindungen auf, während die Flavonoide weniger schnell umgewandelt werden [110-111]. Daneben kann das Chinon durch ein Reduktionsmittel wie L-Ascorbinsäure reduziert werden, obwohl es als starkes Oxidans wirkt [108-109]. Sind die Reduktionsprodukte *o*-Diphenole nur in geringen Mengen vorhanden, können sie mit einem anderen *o*- oder *p*-Diphenol („Gekoppelte Oxidation“) reagieren [109]. Somit können die Polyphenole ohne die Katalyse von Enzymen und ohne Sauerstoff oxidiert werden.

Außerdem kann Chinon Kondensationsprodukte durch die Reaktion mit anderen Polyphenolen, einzelnen Aminosäuren, Proteinen oder auch Polysacchariden bilden [108]. Durch die Kondensationen entstehen schwerlösliche größere Moleküle mit irreversiblen kovalenten Bindungen, welche für eine braune Färbung von Früchten und Gemüsen verantwortlich sind [106, 108].

Der strukturelle Aufbau der Polyphenole ist ein effektiver Einflussfaktor für die Intensität der antioxidativen Wirkung. Bei den Phenolcarbonsäuren nimmt die antioxidative Wirkung mit der Anzahl der Hydroxylgruppen zu [112]. Die Wirkung steigt für die Dihydroxycarbonsäuren in der Reihenfolge meta-, ortho- und para-Stellung [113-114]. Zudem verstärken Methoxygruppen bei den Phenolcarbonsäuren wie z.B. Ferula-, Sinapin- und

Syringasäure in benachbarter Position die Wirkung [114]. Bei den Hydroxyzimtsäuren wie Phenylessig- und Phenylpropionsäure ist die Carboxylgruppe vom aromatischen Ring getrennt. Deshalb weisen die entsprechenden Hydroxyzimtsäuren eine sehr viel stärkere antioxidative Aktivität als Hydroxybenzoesäuren auf [113]. Außerdem wirken Verbindungen mit ungesättigter Seitenkette wie z.B. Kaffeesäure weniger antioxidativ als Phenolcarbonsäuren mit gesättigten Seitenketten wie beispielsweise Dihydrokaffeesäure [113]. Die zweiten und dritten benachbarten phenolischen Hydroxylgruppen wie in Gallussäure verursachen eine ausgeprägte antioxidative Wirkung [113].

Zudem sind die Catechine, Flavonole und Flavone aufgrund ihrer Farblosigkeit als Antioxidationsmittel für den Zusatz zu Lebensmitteln und kosmetischen Mitteln weit verbreitet. Flavonole und Flavone können aus den phenolischen Hydroxylgruppen wirkungsvoll Hydroxyl- ( $\text{HO}^\cdot$ ), Superoxid- ( $\text{O}_2^\cdot$ ) und Peroxyl- ( $\text{ROO}^\cdot$ ) Radikale abfangen [115-116]. Bei den Flavonoiden steigt die antioxidative Wirkung wie bei den Phenolcarbonsäuren mit der Anzahl der Hydroxylgruppen. Wenn sich drei oder weniger Hydroxylgruppen im Molekül befinden, zeigen sie nur eine geringere oder sogar keine antioxidative Wirkung [117]. Demzufolge wird eine optimale Wirkung für Moleküle mit vier bis sechs Hydroxylgruppen beschrieben [117-118]. Durch Methylierung und Glykosylierung werden die Hydroxylgruppen am Molekül blockiert, wodurch sich die Fähigkeit Radikale abzufangen verringert [119]. Außerdem ermöglicht die Position der Hydroxylgruppen in 3'- und 4'-Stellung des B-Ringes eine relativ starke Fähigkeit zum Abfangen freier Radikale. Die 2,3-Doppelbindung im C-Ring bei Flavon und Flavonol führt durch Elektronenwanderung zu einer Mesomeriestabilisierung des Radikals [119].

### 2.2.5 Physiologische Bedeutung der Polyphenole

In diversen epidemiologischen Studien werden den Polyphenolen und insbesondere den Flavonoiden präventive Wirkungen in Hinsicht auf die Entstehung verschiedenster Krankheiten, wie z.B. Herz-Kreislaufkrankungen, Arteriosklerose, Diabetes sowie Krebserkrankungen zugeschrieben [20-25]. Beispielsweise können Quercetin, Rutin und Hesperidin aufgrund der antioxidativen Eigenschaften das Wachstum von Magen- und Hautkrebs bei Tieren hemmen [120]. Die bewiesenen positiven Wirkungen der Polyphenole sind durch ihre antioxidativen Eigenschaften, das Abfangen freier Radikale und aggressiver Sauerstoffformen, den Schutz der Blutgefäße, der Hemmung der LDL (low-density lipoprotein)-Oxidation, der antikanzerogenen und antimutagenen Wirkung, dem Schutz vor

UV- und ionisierender Strahlung, ihrer antientzündlichen, antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften sowie ihrer antiallergenen Wirkung bedingt. Einige wichtige Wirkungen werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

Wie bereits in Kapitel 2.2.4 erwähnt, entstehen bei sehr vielen biochemischen Prozessen im Organismus aus Sauerstoff aggressive Radikale, die die Zellen schädigen können [121-122]. Durch antioxidativ wirksame Enzyme (z.B. Peroxidasen, Katalase, Superoxiddismutase) und Substanzen (z.B. Phenolcarbonsäuren, Flavonoide,  $\beta$ -Carotin, Chlorophyllderivate) können auf zellulärer Ebene schädliche Radikale abgefangen und somit Radikal-Ketten-Reaktionen verhindert werden. Auf diese Weise beugen die Polyphenole verschiedenen Krankheiten vor, die durch Oxidation und Schädigung von Lipoproteinen (Transportform von Lipiden im Blutkreislauf) [123], Lipiden [124-125], Deoxyribonukleinsäuren (Träger der Erbinformation) [126] und Proteinen [127] durch aggressive Sauerstoffspezies bedingt sind. Arteriosklerose beispielsweise entsteht infolge einer Oxidation von LDL durch aggressive Sauerstoffradikale [128].

Die weiteren nachgewiesenen Wirkungen der Polyphenole auf die Gesundheit umfassen antibakterielle und antiallergene Wirkungen und antivirale Effekte gegenüber unterschiedlichen Virustypen [129-131]. Beispielsweise können Flavonoide durch die Bindung an virale Proteine die Nucleinsynthese indirekt unterbrechen [131]. So soll beispielsweise Quercetin die Replikation des HIV-Virus beeinflussen [131-134]. Weitere Wirkungen der Polyphenole (z.B. Tannine) gegen Krankheitserreger beruhen auf der Änderung der Permeabilität der Zellmembran und auf der Bindung sowie der Denaturierung von Enzymen in Viren, Pilzen und Bakterien [135]. Durch Hemmung der Histaminsynthese hemmen Polyphenole die Entstehung bzw. klinische Manifestation von Allergien [136].

Zusätzlich beeinflussen die Flavonoide und insbesondere die Untergruppe der Flavone durch kompetitive Bindung an den Benzodiazepinrezeptor das Zentralnervensystem positiv [137-139]. Benzodiazepinrezeptor (BZD-R)-Agonisten (z.B. Diazepam) zeigen muskelrelaxierende, antikonvulsive, anxiolytische (angstlösend), hypnotische und amnesische Wirkungen [137-139]. Beispielsweise wird das Flavon Hispidulin als hochwirksamer Benzodiazepinrezeptor-Ligand ( $IC_{50} = 1,3 \mu M$ ) beschrieben [139]. Hispidulin wirkt außerdem in einem Oozyten-Modell von Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) als partiell agonistischer Ligand an rekombinanten GABA<sub>A</sub> ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)-Rezeptoren [139]. Als weiteres Beispiel zeigt Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon) im Mausmodell bei niedrigen Dosen eine deutliche anxiolytische Wirkung jedoch ohne muskelrelaxierende Effekte [140]. Im



Gegensatz dazu weisen die restlichen Flavonoid-Klassen, wie die Flavanone und Flavonole, in-vitro keine oder nur sehr geringe Affinität zum BZD-R auf [141].

Außer den erwähnten gesundheitsfördernden und pharmakologischen Wirkungen haben Polyphenole in Pflanzen eine Reihe weiterer Funktionen. Als Pigmente beeinflussen sie die Farbe von Pflanzen und Pflanzenteilen und Phytoalexine dienen der pflanzlichen Erregerabwehr. Teilweise wirken Polyphenole als Attraktantien und auf der anderen Seite zum Schutz vor Insekten (z.B. Isoflavonoide) [142] und wieder andere schützen vor UV-Strahlung (z.B. Quercetin und Kaempferol) [143-144].

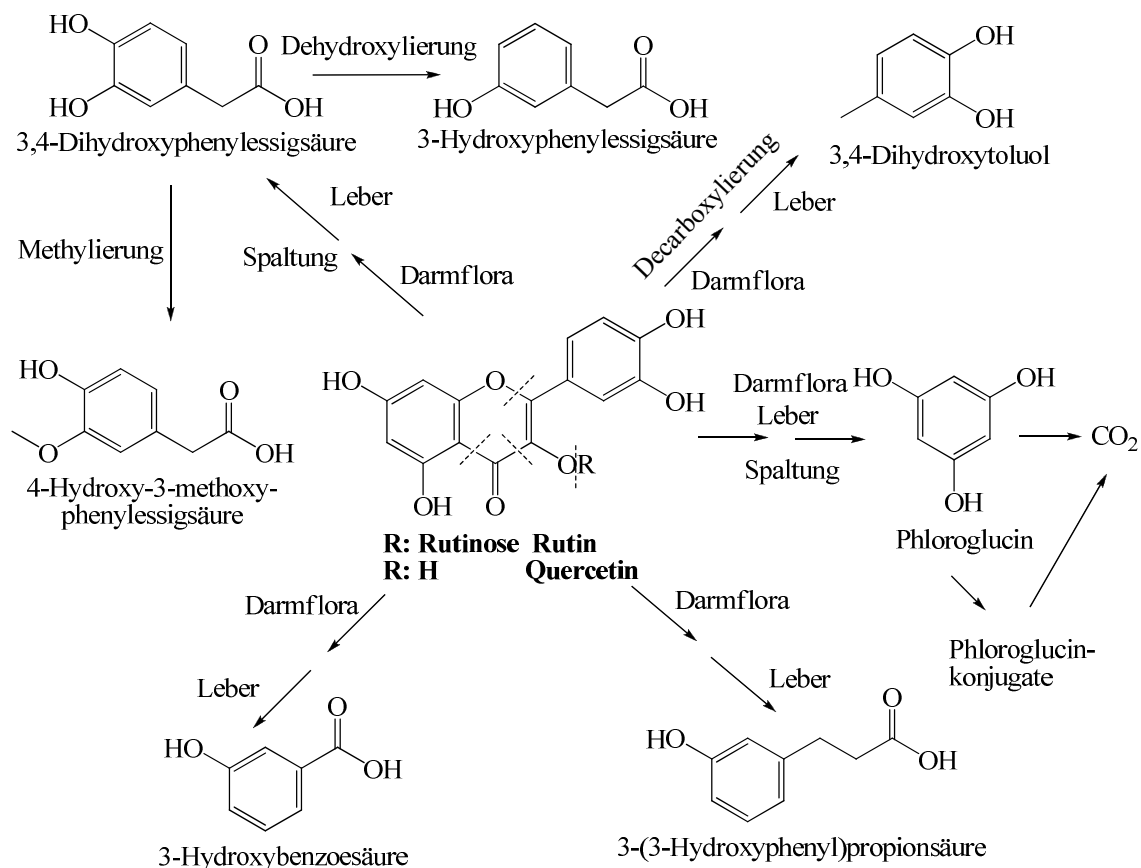
Polyphenole können nicht nur nützliche und physiologische, sondern auch negative und sogar toxische Wirkungen besitzen. Die Toxizität auf die menschliche und tierische Gesundheit ist bislang nur für sehr wenige Polyphenole durch in-vitro-Studien hinreichend geklärt worden. Beispiele für negative Einflüsse sind die Verringerung der Eisenverfügbarkeit [26-29], die Mutagenität von Flavonolen [30-31], die Hemmung von Verdauungsenzymen [32] und die östrogene Wirkung von Resveratrol [145]. Polyphenole reagieren mit Enzymen, die daher ihre biologischen Funktionen nicht mehr erfüllen können. Durch die Reaktion mit Verdauungsenzymen wird die Verdauung der Nährstoffe (z.B. Kohlenhydrate) verringert [32]. Dementsprechend wurde bei Ratten, die polyphenolhaltige Futtermittel erhielten, auch eine Abnahme des Glucose- und Triglyceridgehaltes im Blut nachgewiesen [146]. Die Mutagenität von Quercetin in großen Dosen wurde in in-vitro-Experimenten belegt [30-31, 147-148], in-vivo konnte dies jedoch nicht bestätigt werden [149-150]. Auch glykosidisch gebundenes Quercetin wirkt wie Rutin nicht mutagen [151].

### **2.2.6 Metabolismus**

Die biologische Aktivität von Polyphenolen nach ihrer Aufnahme in den Gastrointestinaltrakt hängt vor allem davon ab, wo, wie und in welchem Umfang sie resorbiert und metabolisiert werden. Mit Hilfe von Fütterungsversuchen bei verschiedenen Säugetieren [152] und in-vitro-Studien mit perfundierten Därmen [153] wurde die Biotransformation der Flavonole Quercetin und Rutin untersucht [154-160]. Flavonoide werden hauptsächlich in der Leber, im Dün- und im Dickdarm metabolisiert [161-162]. Mit Hilfe der in großen Mengen vorhandenen Enzyme wie z.B. Glykosidasen und Rhamnosidasen können die glykosylierten Flavonide zu ihren Aglykonen hydrolysiert werden [162]. In zahlreichen Veröffentlichungen wurde die Fähigkeit der Darmbakterien zur Deglykosilierung und Ringspaltung von Flavonoiden beschrieben [163] und Fütterungsversuche an Ratten zeigten, dass bei Verfütterung von Rutin an Tiere ohne Darmflora größere Mengen der unmetabolisierten

Verbindungen in den Faeces nachweisbar sind [164]. Oral verabreichtes Quercetin oder Rutin konnte bei Tieren und Menschen nicht im Blut oder im Urin nachgewiesen werden [165-166]. Messbar sind aber sowohl im Blut als auch im Urin 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, 3-Hydroxyphenylelessigsäure, 4-Hydroxy-3-methoxyphenylelessigsäure sowie 3,4-Dihydroxytoluol als Spaltprodukte [167-170]. Bei Ziegen und Rindern werden Quercetin und Rutin vor allem durch Pansenbakterien über Verbindungen wie 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 4-Hydroxyphenylelessigsäure als Zwischenstufen zu flüchtigen Fettsäuren abgebaut [171-172]. Als nachweislich aktive Bakterien im Flavonoidmetabolismus gelten verschiedene *Bacteriodes*-Arten (z.B. *B. distasonis*, *B. uniformis*), Spezies der Gattungen *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus* und *Streptococcus* [162-164, 171-174].

Die  $\beta$ -glykosidischen Bindungen am Flavonoidmolekül (d. h. die Glykoside) können im Dünndarm nicht durch Mikroorganismen hydrolysiert und die Flavonoidmoleküle nicht von diesen resorbiert werden [152-153, 175]. Oral applizierte Flavonoid-Aglykone werden im Dünndarm des Makroorganismus von diesem resorbiert und anschließend in der Leber zu Glucuroniden und Sulfaten konjugiert [175]. Die glykosylierten Flavonoide, die nicht schon im Dünndarm resorbiert wurden, werden erst in den unteren Darmabschnitten durch Mikroorganismen unter Hydroxylierung zu ihren Aglykonen umgesetzt [175]. Jedoch können dort die Aglykone nicht resorbiert werden und die Mikroorganismenflora baut diese sehr schnell ab [175-176]. Infolgedessen sind in Exkrementen Phenylelessigsäure- und Benzoessäurederivate als Abbauprodukte der Aglykone nachweisbar [175-176]. Abbildung 2.7 stellt die postulierten Abbaumechanismen von Rutin und Quercetin beispielhaft dar [154, 159].



**Abbildung 2.7** Postulierte Abbaumechanismen von Quercetin und Rutin [154, 159].

Zunächst können die Glykoside von Rutin durch Bakterien wie *Bacteriodes distasonis*, *Bacteriodes uniforms* und *Eubacterium ramulus* im Dickdarm hydrolysiert werden [164, 171, 174], wobei Quercetin gebildet wird. In den nachfolgenden Schritten wird das Ringgerüst von Quercetin unter anaeroben Bedingungen durch Bakterien wie *Eubacterium ramulus* und *Clostridium butyricum* zu Phenolsäurederivaten abgebaut [171, 174, 177]. Die Bildung von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure durch Rutin- und Quercetin-Metabolisierung wurde aus dem B-Ring postuliert [178]. Durch die folgende Dehydroxylierung oder Methylierung entstehen in der Leber 3-Hydroxyphenylessigsäure oder 4-Hydroxy-3-methoxyphenylessigsäure. Außerdem ist die Entstehung des C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Körpers wie bei der 3-(3-Hydroxyphenyl)propionsäure möglich [179]. Allerdings konnte bisher nur bei einigen Tieren in in-vitro-Kulturen von Darmbakterien die Entstehung der Phloroglucinderivate aus dem A-Ring festgestellt werden [180-182], weil Phloroglucinverbindungen im nächsten Schritt im Gastrointestinaltrakt nach einer Ringöffnung vollständig zu CO<sub>2</sub> und Acetyl-CoA abgebaut werden [175, 183]. Diese Verbindungen enthalten meta-ständige Hydroxygruppen, welche durch die Keto-Enol-Tautomerie die Elektronendichte im Ring reduzieren [183]. Daher wird ein leichter reaktiver Angriff ermöglicht und eine schnelle Ringöffnung von Phloroglucin mit Hilfe der

Hydrolasen von *Eubacterium oxidoreducens* und *Pelobacter acidigallici* ist möglich [183]. Des Weiteren kann CO<sub>2</sub> auch während einer oxidativen Spaltung des C-Ringes gebildet werden. Außerdem entstehen C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-Phenolcarbonsäuren [154].

Tabelle 2.4 fasst die bisher nach oraler Applikation im Urin (Mensch und Tier) nachgewiesenen Ringspaltungsprodukte von Flavonolen, Flavonen, Flavanonen, Isoflavone sowie Anthocyanidine zusammen [154-162, 184-191].

**Tabelle 2.4** Übersicht der bisher nach oraler Applikationen im Urin nachgewiesenen Ringspaltungsprodukte von verschiedenen Flavonoiden (M.: Mensch, T.: Tier) [154-162, 184-191]. Phloroglucin wird vollständig zu CO<sub>2</sub> und Acetat abgebaut und aus diesem Grund in dieser Tabelle nicht gezeigt.

Metaboliten	M.	T.	Komponenten	Referenzen
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-Körper</b>				
3-Hydroxybenzoesäure		+	Quercetin, Rutin	[154-160]
		+	Hesperidin	[184]
		+	Catechin	[155, 185]
4-Hydroxybenzoesäure		+	Quercetin, Rutin	[154-160]
		+	Apigenin, Apiin	[155, 158-159]
		+	Naringin	[186-187]
2,4-Dihydroxybenzoesäure	+		Cyanidin	[160]
3,4-Dihydroxybenzoesäure	+		Diosmin	[188]
	+		Cyanidin	[160]
2,4,6-Trihydroxybenzoesäure	+		Cyanidin	[160]
3,4-Dihydroxytoluol	+	+	Quercetin, Rutin	[155-162]
3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure	+		Diosmin	[188]
		+	Catechin	[155, 185]
4-Hydroxy-3-methoxyphenylbenzoesäure		+	Hesperidin	[184]
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-Körper</b>				
3-Hydroxyphenylelessigsäure	+	+	Quercetin, Rutin	[154-160]
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	+	+	Quercetin, Rutin	[154-160]
4-Hydroxy-3-methoxyphenylelessigsäure	+	+	Quercetin, Rutin	[154-160]
	+		Diosmin	[188]
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Körper</b>				
3-Hydroxycumarsäure		+	Diosmin	[184]
3-Hydroxyzimtsäure		+	Quercetin, Rutin	[154-160]
		+	Eriodictyol	[184]
		+	Homoeriodictyol	[184]
		+	Hesperidin	[184]
		+	Hesperetin	[184]
4-Hydroxyzimtsäure		+	Apigenin, Apiin	[155, 158-159]
		+	Naringin	[187]
3-(3-Hydroxyphenyl)propionsäure		+	Quercetin, Rutin	[154-160]
	+	+	Diosmin	[184, 188]
		+	Eriodictyol	[184, 189]
		+	Homoeriodictyol	[184, 189]
		+	Hesperidin	[184]
		+	Hesperetin	[184]
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure		+	Quercetin, Rutin	[154-160]
		+	Apigenin, Apiin	[155, 158-159]
		+	Naringin	[184, 187]
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure	+		Isoorientin	[190]

---

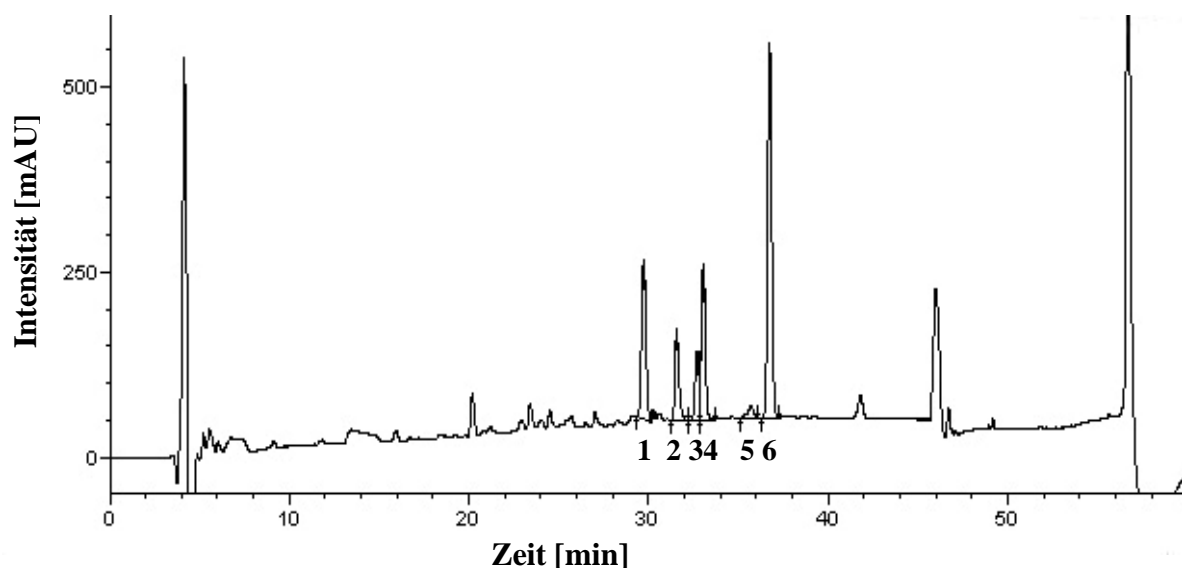
		+	Hesperidin	[184, 189]
		+	Hesperetin	[184, 189]
		+	Apigenin, Apiin	[155, 158-159]
3-Hydroxy-4-methoxyphenylpropionsäure		+	Hesperetin	[189]
4-Hydroxy-3-methoxyphenylpropionsäure		+	Hesperidin	[184]
4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure	+	+	Genistein	[154, 169, 191]
3-Hydroxyphenylhydracrylsäure	+		Quercetin, Rutin	[154-160]
3-Hydroxy-4-methoxyhydracrylsäure	+		Hesperidin	[184]

---

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Konzeptvorstellung

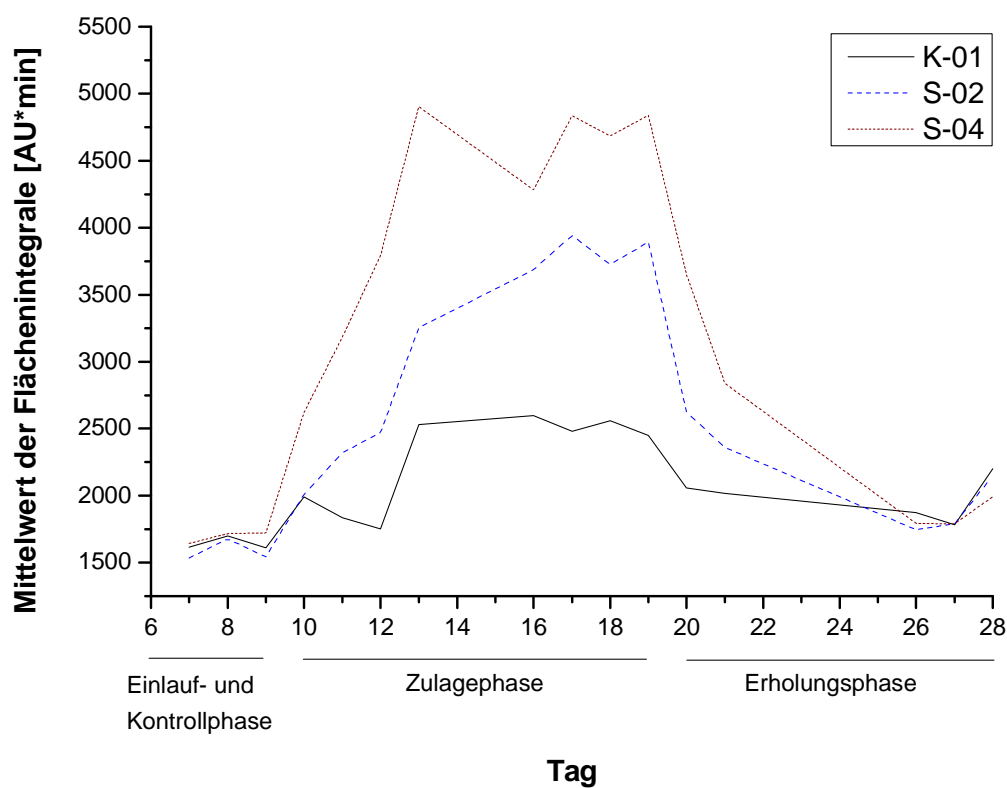
Zahlreiche Wissenschaftler bemühen sich seit Jahren, die Gesundheitsprobleme in Milchviehbetrieben bei der Verfütterung von Grassilagen mit auffälligen Reineiweißanteilen (RE) im Verhältnis zum Rohprotein (Rp) zu erforschen [1]. Um die Qualitätsprobleme bei den Grundfuttern zu lösen, wurden in den bisher durchgeführten Forschungen insbesondere die pharmakologischen Auswirkungen der Aminosäuren, Biogenen Amine, Peptide, Proteine und Vitamine bei verschiedenen Konzentrationen auf das Tier untersucht [1, 192-193]. In vorangegangenen Untersuchungen im Pansenlabor der Klinik für Rinder (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) wurden mit Hilfe des Langzeitinkubationssystems RUSITEC (RUmen SIMulation TEChnique) in-vitro durch die Fermentierung der Schadgrassilagen (Silagen, welche einen RE-Anteil vom Rp von  $< 50\%$  (w/w) aufweisen) im Vergleich zu Kontrollgrassilagen (Silagen, welche einen RE-Anteil vom Rp von  $> 50\%$  (w/w) aufweisen) die Auswirkung der Zugabe der Grassilagen auf die Gehalte von flüchtigen Fettsäuren [194], Aminosäuren [46, 66] und Biogenen Aminen [46, 66] im Pansensaft überprüft. Zudem wurden die Einflüsse der Grassilagen auf das Vorkommen und die Verteilung von Komponenten im Pansen an der RP-HPLC und LC-MS/MS untersucht [195]. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen waren die analytischen Methoden auf Peptid- und Phenolverbindungen gerichtet [195]. Demzufolge wurden die künstlichen Fermenter-Proben aus zuvor durchgeführten 18-Fermenterläufen an der RP-HPLC analysiert. Es konnten sechs Peaks getrennt werden (s. Abb. 3.1) [195].



**Abbildung 3.1** Beispiel-Chromatogramm für die Messung der Fermenter-Probe Fr-1 (K-01, K: Kontrollsilage) an der RP-HPLC. Säule: ReproSil Pur C18-AQ, 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße, 250 x 4,6 mm; Vorsäule: ReproSil Pur

C18-AQ, 5 µm Partikelgröße, 10 x 4,6 mm; Flussrate: 0,8 mL/min; Injektion: 30 µL; Temperatur: 40 °C; Eluenten: A= 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O/ACN mit 0,1 % TFA; Gradient: 0-60 min → 5-42 % B [195].

Von besonderem Interesse in dieser Forschungsaufgabe ist Peak 1. Dieser ist in den Chromatogrammen der Schadsilage-Messungen stets größer als in denen der Kontrollsilagen (um bis zu 54 %,  $p < 0,001$ ) [195]. Es wird vermutet, dass die „Faktorenkrankheit Milchviehherde“ durch diese Substanz (Peak 1) verursacht wird [195]. Eine signifikante Veränderung hinsichtlich der Flächenintegrale in Abhängigkeit von der Zulage konnte bei Peak 1 festgestellt werden (s. Abb. 3.2) [195].



**Abbildung 3.2** Flächenintegral von Peak 1 nach Zulage unterschiedlicher Silagen in den RP-HPLC-Analysen der Fermenter-Proben (K: Kontrollsilage, S: Schadsilage) [195].

Daneben stieg die Kurve und damit die Konzentration in den Fermentern mit Schadsilagen für Peak 2 (um bis zu 65 %,  $p < 0,001$ ), Peak 3 (um bis zu 25 %,  $p < 0,05$ ), Peak 5 (um bis zu 44 %,  $p < 0,05$ ) und Peak 6 (um bis zu 14 %,  $p < 0,05$ ) während der Zulagephase stärker als die der Kontrollsilagen an [195]. Dagegen wurde für Peak 4 ( $p > 0,05$ ) nur unwesentlich höhere Mittelwerte der Flächenintegrale der Schadsilagen im Vergleich zu Kontrollsilagen festgestellt [195].

Basierend auf diesen Ergebnissen war das Ziel der Arbeit, die Identifizierung der Peaks, insbesondere von Peak 1, im Chromatogramm der RP-HPLC-Messung sowie deren Entstehung in Pflanzen bzw. Vorkommen und Abbaumechanismus. Aus diesem Grunde wurden aufgearbeitete Pansensaft-Proben (n= 12; s. Tab. 5.15-5.17) aus RUMEN SIMulation TECHnique (RUSITEC)-Fermentationsläufen analytisch charakterisiert und die Substanzen in Grassilagen wurden mit den Substanzen im Pansensaft verglichen. Zu näherer Untersuchung der Einflüsse der geringeren RE-Anteile (RE-Anteile in % (w/w) vom Rp) von Grassilagen (n= 65; s. Tab. 5.18) wurden ebenfalls Gras- (n= 2; s. Tab. 5.18) und Heu-Proben (n= 3; s. Tab. 5.18) mit über 80 % igem RE-Anteilen (w/w) analysiert. Dadurch wurde Biosynthese der charakterisierten Komponenten in Grassilagen, Gras und Heu (Herkunft und Nährstoffanalyse der untersuchten Futtermitteln; s. Kap. 5.3.2.2) mit Hilfe der allgemeinen Synthesereaktionen in Pflanzen in drei Abschnitten definiert. Zudem wurden alle identifizierten Komponenten in den Futtermitteln quantifiziert und mögliche pharmakologische Wirkungen auf das Tier diskutiert. Daneben wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Erklärung der Abbaumechanismen der Komponenten in Grassilagen und Pansensaft auch Serumanalysen durchgeführt. Die Serum-Proben (n= 15; s. Tab. 3.7) stammten von Betrieben, welche klinische Verdachtsfälle für das Auftreten der „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ aufwiesen. Es sollte überprüft werden, ob die definierten sechs Peaks aus den fermentierten Grassilagen auch in Serum-Proben detektiert werden können.

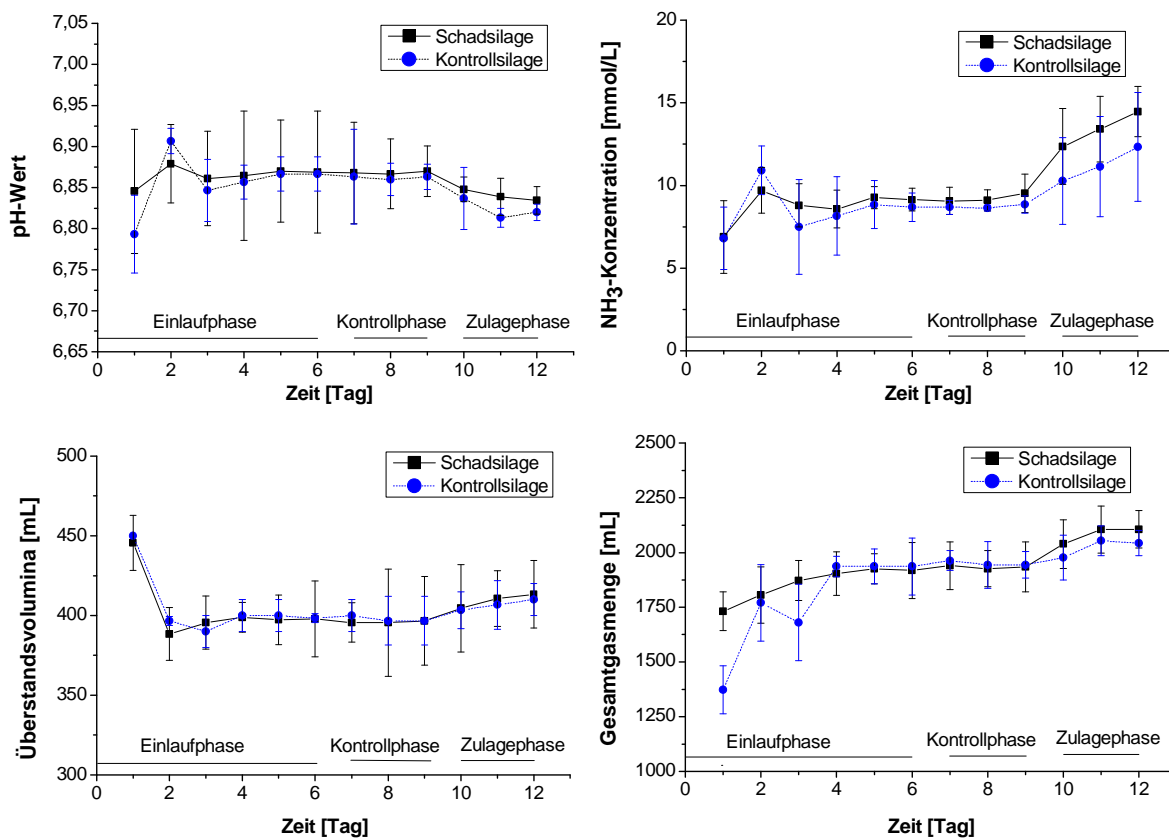
Zur quantitativen und qualitativen Analyse der Fermenter-, Grassilage-, Gras-, Heu-, Serum- und den fraktionierten Fermenter-Proben wurden RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS, UPLC-ESI-MS, <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR- und FT-IR-Spektroskopie, FMOC-Methode an der HPLC, Bradford- sowie Lowry-Test, SDS-PAGE und MALDI-TOF Methoden angewendet. Um genügend Material vom künstlichen Pansensaft für die genannten Analysemethoden zu erhalten, wurden zunächst RUSITEC-Fermentationen durchgeführt.

### **3.2 RUSITEC-Fermentationssystem mit Fermentationsparameter**

Um den Einfluss der Verfütterung unterschiedlicher Grassilagenqualitäten auf die Pansensaftzusammensetzungen zu untersuchen, wurden in 12 RUSITEC-Fermentationsläufen Schadsilagen bzw. Kontrollsilagen mit Pansensaft sowie festem Panseninhalt von einem gefistelten Rind (Spendertier; s. Kap. 5.3.1.3) fermentiert (RUSITEC-Fermentationssystem; s. Kap. 5.3.1). In den zuvor durchgeführten achtzehn RUSITEC-Läufen [33, 46, 66, 194-195]



wurden bei den Fermenter-Proben am zwölften Tag die höchsten Flächenintegrale für die untersuchten sechs Peaks an der RP-HPLC festgestellt [195]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein RUSITEC-Lauf über zwölf Tage durchgeführt. Um die Stabilität des RUSITEC-Systems und den Futtermittel-Einfluss auf den mikrobiellen Stoffwechsel zu untersuchen, wurden während der Versuchsdauer für jede Fermentereinheit der pH-Wert, die Ammoniakkonzentration, die Fermentationsgasmenge und das Überstandsvolumen bestimmt (s. Kap. 5.3.1.4). In Abbildung 3.3 sind die täglich gemessenen Fermentationsparameter der Kontroll- und Schadsilage-Fermentationen gemittelt dargestellt.



**Abbildung 3.3** Gemittelte pH-Werte, NH<sub>3</sub>-Konzentrationen, Überstandsvolumina und Fermentationsgasmenge des RUSITEC-Fermentationslaufs während 12-tägiger Inkubation (Kontrollsilage: K-01, K-14, K-15 (n= 3) und Schadsilage: S-02, S-04, S-07, S-08, S-09, S-10, S-11, S-12, S-13 (n= 9); Ergebnisse der Nährstoffanalyse der fermentierten Proben s. Tab. 5.16-5.17).

Durch den kontinuierlichen Pufferzusatz kann die Stabilität des Fermentationssystems wie im Pansen gewährleistet werden. Um die Stabilität des Systems zu überprüfen, wurden die Fermenter in der Einlauf- und Kontrollphase (9 Tage) identisch mit Heu und Kraftfutter gefüttert. Die Ergebnisse der täglich gemessenen Parameter zeigten, dass das System erst nach drei Tagen stabile Fermentationsbedingungen erreichte und die Stabilität während der restlichen Einlauf- und Kontrollphase erhalten werden konnte.

Am Tag 10 begann die Zulagephase, in der das System mit Kontroll- und Schadsilagen beladen wurde. Im Vergleich zur Einlauf- und Kontrollphase können sich die Parameterwerte aufgrund der unterschiedlichen Futterart verändern. Beispielsweise wurden pH-Werte bis zum 9. Tag der Fermentation zwischen pH 6,72-7,00 sowie als Mittelwert zwischen pH  $6,79 \pm 0,05$ - $6,91 \pm 0,02$  gemessen. Mit Beginn der Zulagephase sanken die pH-Werte leicht ab. Die pH-Werte im Pansensaft eines Rindes liegen in Abhängigkeit vom Futtermittel zwischen pH 4,80-7,50 [196-197]. Während dieser Zeit traten identische pH-Werte wie im Pansensaft (für Schadsilagen zwischen pH 6,80-6,87; für Kontrollsilagen zwischen pH 6,80-6,88) und keine signifikanten Abweichungen für die Stabilität des Pansenmilieus auf.

Der nächste untersuchte RUSITEC-Parameter Ammoniak ist Abbauprodukt der ruminalen Proteine und nötig für die mikrobielle Proteinsynthese [198]. Die Ammoniakkonzentrationen in den Fermentern lagen während der Einlauf- und Kontrollphase zwischen 4,43-12,60 mmol/L sowie als Mittelwert zwischen  $6,79 \pm 1,88$  mmol/L und  $10,91 \pm 1,47$  mmol/L. In der Zulagephase erhöhten sie sich deutlich mit der Zulage der Grassilagen und erreichten am Tag 12 ihr Maximum für die gesamte 12-tägige Versuchsdauer. Die optimale Ammoniakkonzentration des Pansensafts in-vivo liegt zwischen 1,00-16,40 mmol/L [198]. Für alle eingesetzten Grassilagen wurden Ammoniakkonzentrationen zwischen 8,75 mmol/L (Probe: Fr-11 (K-14) und Fr-12 (K-15) am Tag 10) und 16,51 mmol/L (Probe: Fr-3 (S-04) am Tag 12) und als Mittelwert zwischen  $10,27 \pm 2,63$ - $14,46 \pm 1,51$  mmol/L in den Fermenterflüssigkeiten festgestellt. Die Zulagen der Schadsilagen (von  $9,52 \pm 1,16$  mmol/L auf  $14,46 \pm 1,51$  mmol/L) führten zu einer Erhöhung der Ammoniakkonzentrationen gegenüber den Zulagen der Kontrollsilagen (von  $8,84 \pm 0,51$  mmol/L auf  $12,32 \pm 3,28$  mmol/L). Aus den Schadsilagen werden folglich höhere Konzentrationen an Aminosäuren und sehr leicht abbaubare NPN-Verbindungen gegenüber den Kontrollsilagen freigesetzt (detaillierte Ergebnisse der Aminosäuren- und Biogenen Amine-Identifikation in Fermenter-Proben durch FMOC-HPLC-Methode; s. Kap. 5.1.1.1). Gleiche Ergebnisse wurden auch in den zuvor im Pansenlabor der Klinik für Rinder (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) wiederholten 28-tägigen achtzehn RUSITEC-Läufen erhalten [46, 66]. Zur Überprüfung des Pufferzusatzes wurden außerdem täglich Überstandsvolumina der 12 Fermenter gemessen. In diesem Lauf wurde die maximale Schwankung für die Überstandsvolumina-Bestimmung in den ersten zwei Tagen mit 90 mL bei Fr-5 (S-08) festgestellt. Daher sind stabile Fermentationsbedingungen wie bei pH-Wert und  $\text{NH}_3$ -Konzentrationen erst ab dem dritten Tag zu erkennen. Durch die höhere Flüssigkeitsaufnahme des eingesetzten Heus und der Kraftfutter gegenüber den Silagen können die

Flüssigkeitsüberstandsvolumina in der Einlauf- und Kontrollphase abnehmen [33, 194]. Dieser Versuch wurde für 12 Tage durchgeführt, wobei nur in den letzten 3 Tagen Silage zugegeben wurde (Zulagephase). Die Volumenerhöhung in der Zulagephase war deshalb gering. Der maximale tägliche Volumenunterschied in der Zulagephase der vorherigen achtzehn Läufe lag bei ca. 65 mL [194]. Die höchste tägliche Schwankung für diesen Lauf wurde in der Zulagephase bei Fr-6 (S-09) nur mit 30 mL bestimmt. Das Ergebnis zeigt, dass dem System kontinuierlich und mit gleichbleibendem Volumen die Puffer zugeführt wurden. Auch anhand der täglich gemessenen Gesamtgasproduktion konnte die Stabilität des Systems gezeigt werden. Die Gesamtgasproduktion schwankt ab dem dritten Tag des Laufes sehr schwach und erhöht sich mit Beginn der Zulagephase bei allen Silagen auf ein ähnliches Niveau.

### 3.2.1 Fazit des Kapitels

Um genügend Material vom künstlichen Pansensaft für die Isolierung und Identifikation der sechs Zielkomponenten mittels differenzierter Analyse-Methoden zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst RUSITEC-Fermentationen durchgeführt. Außerdem wurde unter Verwendung der Inkubationsanlage und der Fütterung der Silagen mit unterschiedlichen RE-Anteilen geprüft, ob und in welchem Umfang in-vitro eine Pansenstimulation die ruminale Fermentation beeinflusst. In den ersten 9 Tagen wurde das System identisch mit Heu und Kraftfutter gefüttert und während der gesamten Versuchsdauer die Kraftfuttermenge nicht verändert. Die Fermentationsbedingungen waren nach drei Tagen stabilisiert und das RUSITEC-System konnte ohne signifikante Abweichungen in pH-Wert,  $\text{NH}_3$ -Konzentration, Überstandsvolumen und Gesamtgasmenge durchgeführt werden.

Mit Beginn der Silage-Zulage wurden eine pH-Werterniedrigung und Erhöhung der Ammoniak-Konzentration sowie der Gasproduktion gegenüber der Fütterung mit Heu festgestellt. Bei Schadsilagen wurden im Vergleich zu den Kontrollsilagen höhere pH-Werte, mehr freigesetzte Ammoniak- und Gasmenge beobachtet. Da vor Silage-Zulage alle Fermenter eine gleich gerichtete Fermentation zeigten, können die anschließend unter Silagegabe veränderten Stoffwechselbedingungen und die damit produzierten Moleküle nur auf den Silageeinfluss zurückgeführt werden. Gleiche Ergebnisse sind in ähnlichen Versuchen in der Literatur beschrieben [33, 46, 66, 194-195, 198].

Von jedem Einzelfermenter wurden ca. 500 mL Überstand (s. Kap. 5.3.1.1) als Ausgangsmaterial zur weiteren Charakterisierung entnommen und die aufgearbeiteten Fermenter-Proben in 2 mL Portionen bei  $-18\text{ °C}$  tiefgefroren (s. Kap. 5.3.2.1).

### 3.3 Isolierung und Charakterisierung der Fermenter-Proben

Zur Isolierung und Identifizierung der sechs Zielsubstanzen im Pansensaft (mittels RP-HPLC in allen fermentierten Schad- und Kontrollgrassilagen detektierten sechs Peaks; s. Abb. 3.1) wurden die Fermenter-Proben zunächst an der RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS und UPLC-MS analysiert. Im nächsten Schritt wurden zur weiteren Charakterisierung Methoden wie  $^1\text{H-NMR}$ -,  $^{13}\text{C-NMR}$ - und FT-IR-Spektroskopie hinzugezogen.

#### 3.3.1 RP-HPLC-Analysen

Die aufgearbeiteten (s. Kap. 5.3.2.1) Fermenter-Proben wurden erst mit einer analytischer Säule (Screeninguntersuchung mit geringeren Probenvolumina; s. Kap. 5.3.5 u. Tab. 5.22) bei verschiedenen Wellenlängen (von 195-490 nm) an der RP-HPLC analysiert (s. Abb. 3.1). Auf diese Weise wurden die Retentionszeiten und die charakteristischen maximalen Wellenlängen der zu identifizierenden Substanzen festgestellt (s. Tab. 3.1). Die Retentionszeiten der sechs Peaks von der RP-HPLC liegen zwischen 29-37 min und sind in den verschiedenen Versuchen und Versuchstagen stabil. Dagegen konnte Peak 5 nicht in jedem Chromatogramm der Fermenter-Proben detektiert werden.

**Tabelle 3.1** Analyseergebnisse der Fermenter-Proben durch die RP-HPLC-Methode.

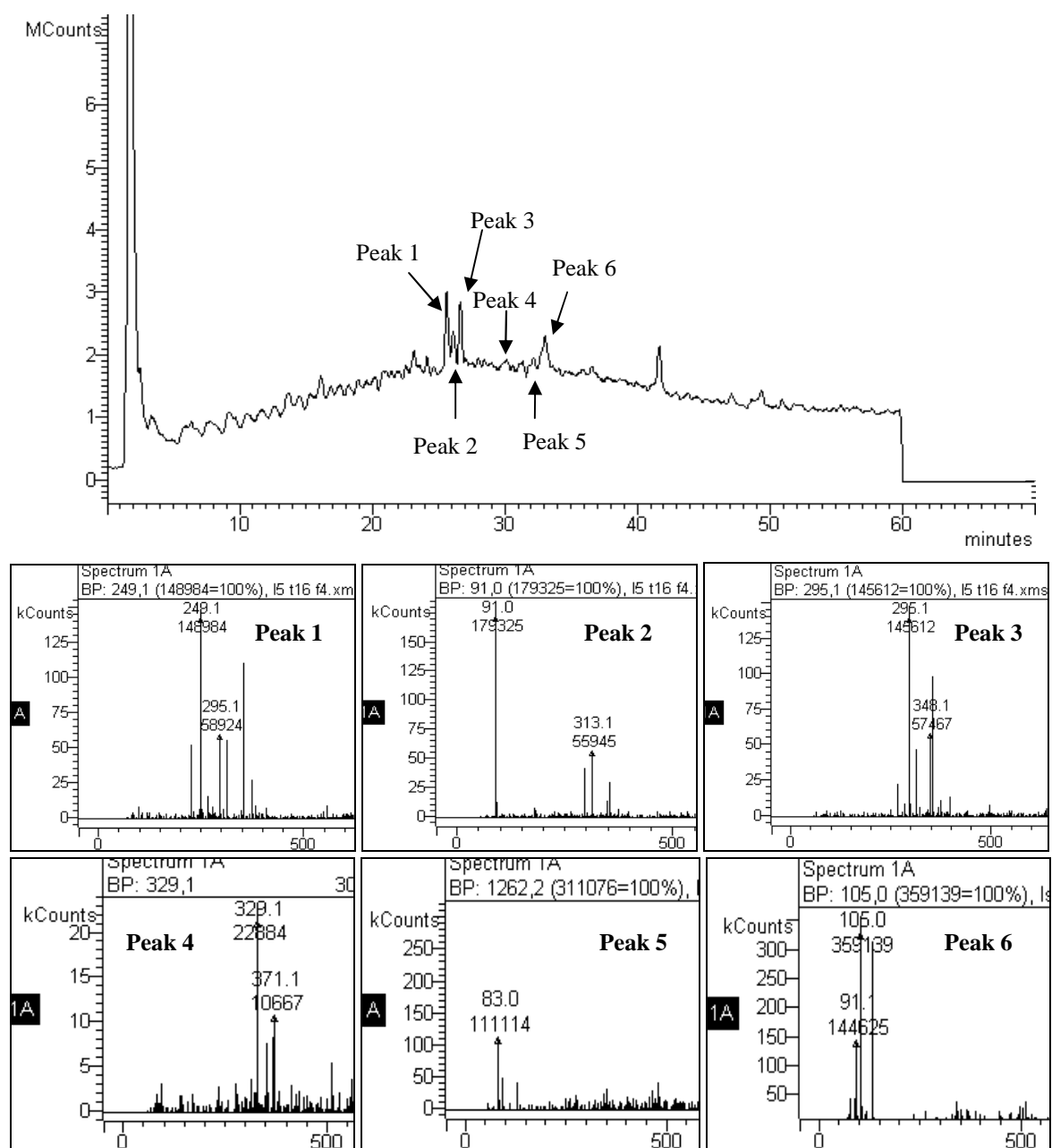
Peak Nr.	$R_t$ [min]	UV $\lambda_{\text{max}}$ [nm]
1	29,71	206, 275
2	31,54	202, 277
3	32,69	201, 277
4	33,03	200, 278
5	35,72	200
6	36,73	210, 258

Um genügend Material für weitere Analysen zu erhalten, wurden die Fermenter-Proben Fr-1 (K-01) 220-mal (220 Analysen) mit einer präparativer Säule an der RP-HPLC fraktioniert (s. Kap. 5.3.5) und im Gefriertrockner lyophilisiert. Die fraktionierten Proben wurden mittels LC-ESI-MS/MS, UPLC-MS, MALDI-TOF (Ergebnisse; s. Kap. 5.1.1.3) und NMR-Spektroskopie untersucht.

#### 3.3.2 LC-ESI-MS/MS- und UPLC-MS-Analysen

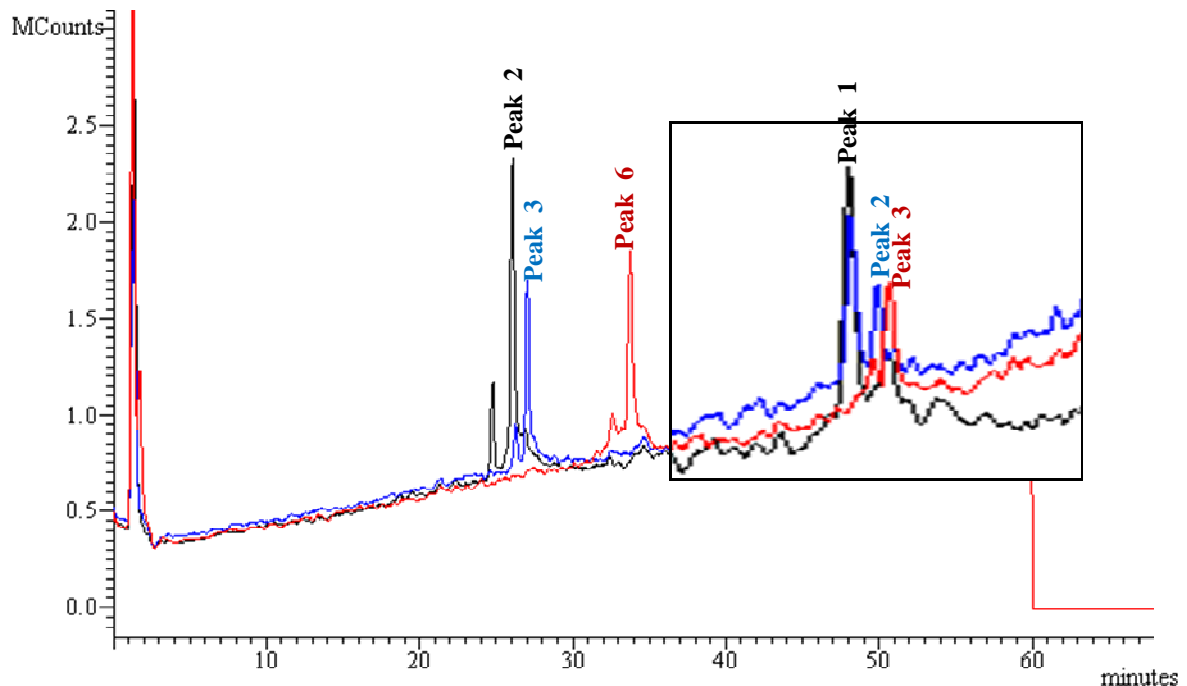
Zur Bestimmung der Fragmentierungsmuster der Zielkomponenten in Fermenter-Proben wurden im Massenbereich von  $m/z$  50-2.000 im positiven und negativen Modus LC-ESI-MS-

FullScan-, MS/MS- und MS<sup>n</sup>-Experimente (n= 1-3) durchgeführt. Die Proben wurden nach der Aufarbeitung an der LC-ESI-MS/MS zunächst durch eine FullScan-Methode analysiert und die dazugehörigen Massen sowie die Retentionszeiten bestimmt. Die Zielsubstanzen lassen sich mit hinreichenden Intensitäten positiv und negativ ionisieren. Die differenzierten Peaks sind in Abbildung 3.4 als Fullscan-Chromatogramm und ebenfalls als MS-Spektren dargestellt.



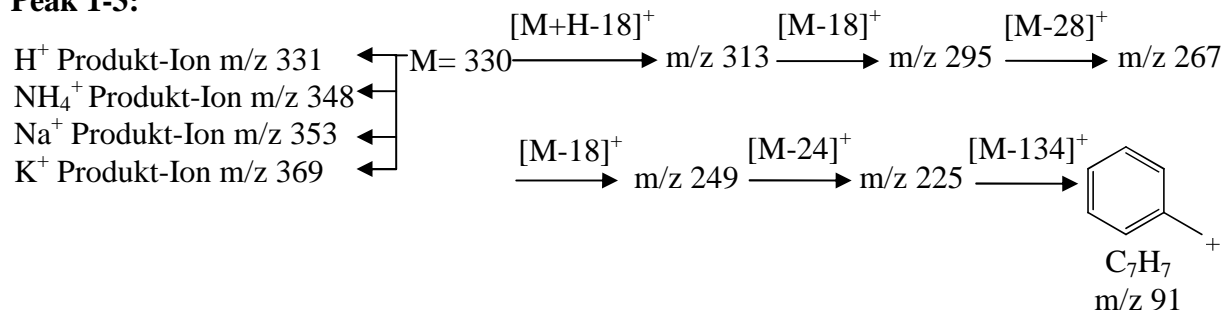
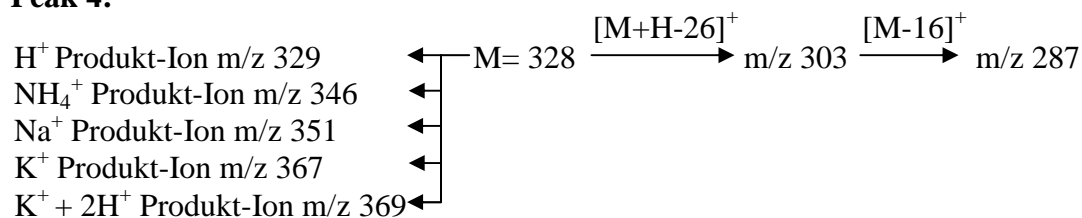
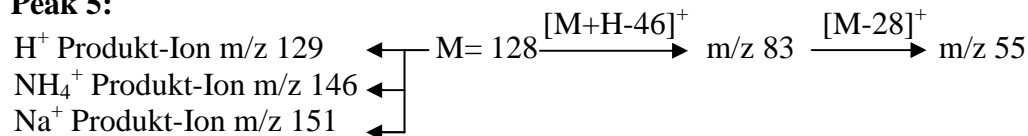
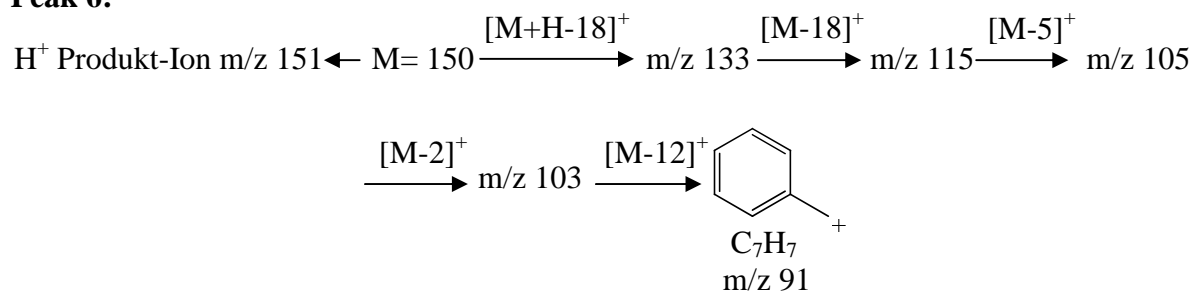
**Abbildung 3.4** MS-ESI-Fullscan der Fermenter-Probe Fr-1 (K-01, K: Kontrollsilage) (oben) und LC-ESI-MS-Spektren von Peak 1 (Mitte links), 2 (Mitte Mitte), 3 (Mitte rechts), 4 (unten links), 5 (unten Mitte) und 6 (unten rechts) der Fermenter-Probe Fr-1 (K-01). Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10 µL, Temperatur: 40 °C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min → 5-60 % B.

Die an der RP-HPLC erhaltenen Fraktionen (Peaks 1-6) wurden erneut an der LC-ESI-MS/MS untersucht. Nach der Fraktionierung waren Peak 4 und 5 an der LC-ESI-MS/MS im positiven und negativen Modus nicht nachweisbar bzw. isolierbar. Da diese jedoch in Fermenter-Proben nachgewiesen werden konnten, wird vermutet, dass die Peaks 4 und 5 während des Isolierungsprozesses zersetzt wurden. Dagegen sind die fraktionierten Peaks 1-3 und 6 an der LC-ESI-MS/MS nachweisbar. Peak 2 und 3 weisen gleiche Massen und ähnliche Retentionszeiten wie Peak 1 auf (s. Abb. 3.4 u. Tab. 3.3). Als Differenz enthält Peak 2 das Fragmentation  $m/z$  91 in höherer Intensität im Vergleich zu Peaks 1 und 3 (im Grundrauschen nicht identifizierbar, s. Abb. 3.4). Zudem betragen die Retentionszeit-Unterschiede der Peaks 1-3 nur ca. 30 s. Nach der Fraktionierung waren Peak 1 mit Peak 2 und Peak 2 mit Peak 3 im MS-Chromatogramm überlappt (s. Abb. 3.5). Aus diesem Grunde wird vermutet, dass es sich bei den Peaks 1-3 um dieselbe Substanz handelt, die möglicherweise mit unterschiedlichen Konfigurationen im Pansen gebildet wird. Abbildung 3.5 zeigt beispielhaft den MS-ESI-Fullscan für die isolierten Peaks 1-3 und 6 der Fermenter-Probe Fr-1 (K-01). Am Chromatogramm ist zu erkennen, dass Peaks 1-3 nach der Isolierung aus zwei Signalen mit unterschiedlichen Flächenintegralen bestehen.



**Abbildung 3.5** LC-MS-ESI-Fullscans der isolierten Substanz 2, 3 und 6 (Peaks 2, 3 und 6) von der Fermenter-Probe Fr-1 (K-01, K: Kontrollsilage). Rechts: Vergrößerte Darstellung der isolierten Substanzen 1-3 aus zweiten Messung der Fermenter-Probe Fr-1 (K-01). Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Zusätzlich wurden die Precursor-Ionen der Peaks 1-6 durch die MS<sup>3</sup>-Analyse untersucht. Im Folgenden sind die Molekülionen (mit dem Symbol „M“) und die Fragmentierungsmuster mit den dazugehörigen Abspaltungen angegeben.

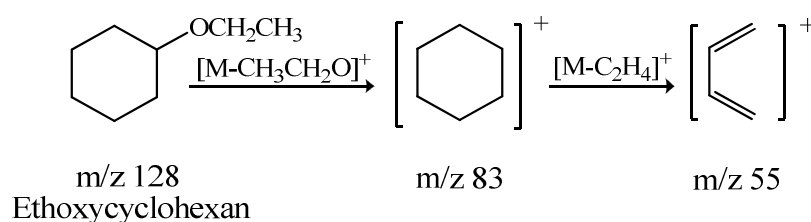
**Peak 1-3:****Peak 4:****Peak 5:****Peak 6:**

Die Abspaltungen der Zielkomponenten sind in Tabelle 3.2 mit charakteristischen Massendifferenzen, möglichen Formeln und Herkunft zusammengestellt.

**Tabelle 3.2** Zusammenstellung der charakteristischen Massendifferenzen von Zielkomponenten (Peaks 1-6) in Fermenter-Proben [199] (\*: Massendifferenz 24 wurde mit der vorherigen Abspaltung von 18 mitgerechnet;  $\Delta m_{18} + \Delta m_{24} = \Delta m_{42}$ ).

$\Delta m/z$	Strukturvorschlag	Herkunft/Kommentar
1	H	aus fragmentierungsgünstiger Stellung
2	H <sub>2</sub>	aus Aromaten
5	2H <sub>2</sub> + H	aus Aromaten
16	NH <sub>2</sub> /O	Amine, aromatische Carbonsäureamide, N-Oxide
18	H <sub>2</sub> O/NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Alkohole, Phenole, Aldehyde
24* / 42*	2C / C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	Phenol- und Enolacetate
26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	Aromaten
28	CO / C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / CH <sub>2</sub> N	Phenole, Chinone, Aromate, aromatische Amine
46	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sup>2+</sup> / NO <sub>2</sub> / CH <sub>2</sub> S	Verbindung mit Ethoxygruppe, Thiole, Thioether

Aus diesen Fragmentierungen konnten 5 Elemente (S, N, C, O und H) für die Zielsubstanzen abgeleitet werden. Zudem zeigen die Spektren und Fragmentierungsmuster keine signifikanten Peptidfragmentierungen (keine positiv geladenen Aminosäure-Fragmente). Für die Peaks 1-3 und 6 wurden als Endprodukt Phenylmethylgruppen ( $m/z$  91; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>-) ermittelt. Die Abspaltungen von H<sub>2</sub>, Wasser, Ammonium, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, CO, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> sind charakteristisch für Aromaten oder Phenole [199]. Peak 1-4 und 6 zeigen diese Fragmentierungsmuster auf. Diese können aromatische Pflanzenmoleküle sein, die aus der Silage-Fütterung stammen und mittels enzymatischer Prozesse durch Bakterien sowie Pilze im Pansen derivatisiert wurden. Im Peak 5 sind neben der Abspaltung von CH<sub>2</sub>S ( $\Delta m/z = 46$ ) die Abspaltung einer Ethoxygruppe und einer Massendifferenz von  $m/z$  83 zu erkennen. Das Fragmentation  $m/z$  83 könnte ein Cyclohexan-Ion sein, das mit einer Ethoxygruppe verbunden ist [199] und wie in Abbildung 3.6 fragmentiert.



**Abbildung 3.6** Eine mögliche Variante der Fragmentierungen von Peak 5.

Als eine Alternative bzw. Ergänzung wurden die Fermenter-Proben ebenfalls an der Q-ToF Premier UPLC-ESI-MS im positiven und negativen Modus analysiert. Diese Methode ermöglicht vor allem in komplexen Proben das molekulargewichtsbasierende Peaktracking [199]. Somit wurden die Summenformeln der Peaks 1-3 sowie 6 bestimmt, die UPLC-ESI-MS-Analyseergebnisse stimmen mit den LC-ESI-MS/MS-Analyseergebnissen überein. Die



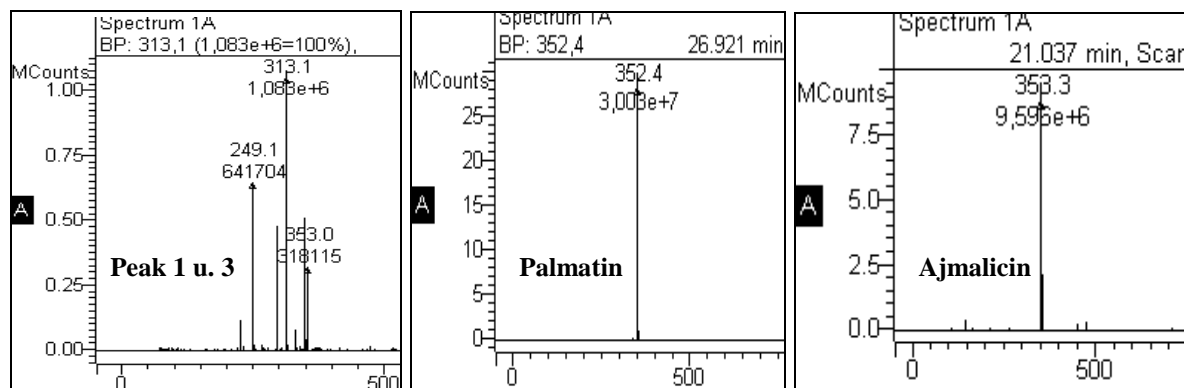
Ergebnisse der an LC-ESI-MS/MS und UPLC-ESI-MS untersuchten Fermenter-Proben (Peaks 1-6) sind in Tabelle 3.3 gegenübergestellt.

**Tabelle 3.3** Die Retentionszeiten, Massen und Fragmentionen der Fermenter-Proben (Peaks 1-6) an der LC-ESI-MS/MS und UPLC-ESI-MS/MS (n. d.: nicht detektierbar, n. i.: nicht identifiziert). Die Fragmentionen und Molmassen von Peak 5 wurden lediglich mittels LC-ESI-MS/MS-Analyse bestimmt.

Peak Nr.	R <sub>t</sub> [min] LC-MS	R <sub>t</sub> [min] UPLC-MS	m/z LC-MS und UPLC-MS	Summenformeln UPLC-MS	Molmassen [g/mol]	Bemerkungen
1	25,68	1,63	353/ 348/ 331/ 313/ 295/ 267/ 249/ 225/ 91	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	330,13	Isolierbar
2	26,19	1,71	353/ 348/ 331/ 313/ 295/ 267/ 249/ 225/ 91	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	330,13	Isolierbar
3	26,74	1,77	353/ 348/ 331/ 313/ 295/ 267/ 249/ 225/ 91	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	330,13	Isolierbar
4	29,83	2,29	369/ 367/ 351/ 346/ 329/ 303/ 287	n. i.	n. i.	Nicht isolierbar
5	32,27	n. d.	151/ 146/ 129/ 83/ 55	n. i.	128,21	Nicht isolierbar
6	32,97	2,80	151/ 133/ 115/ 105/ 103/ 91	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	150,17	Isolierbar

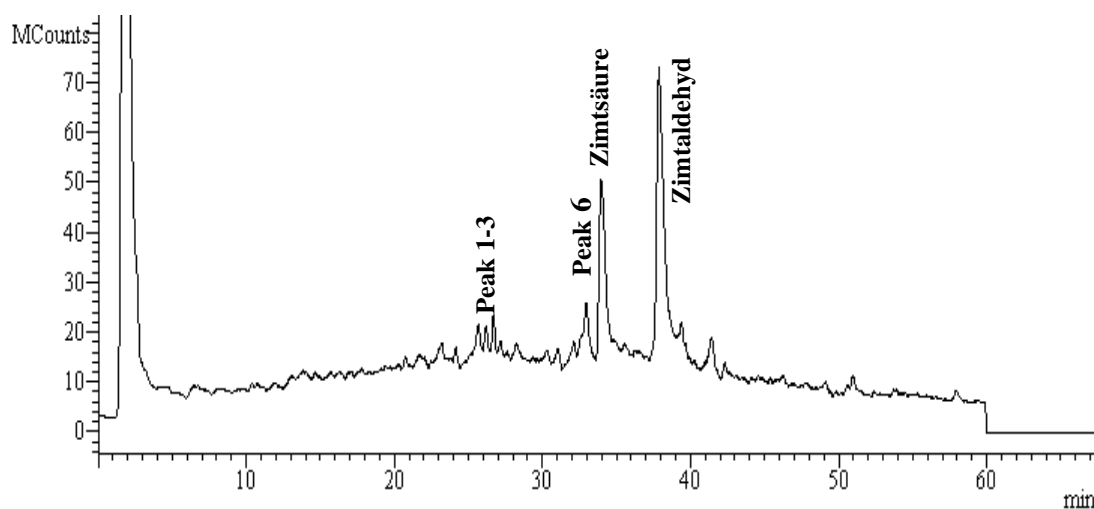
Zur Identifizierung der Substanzen wurde anschließend mit Hilfe der Internetseite „<http://chembiofinder.cambridgesoft.com>“ eine Chemikalien-Liste mit Stoffen zusammengestellt, die diese wichtigen Massen sowie Summenformeln aufweisen. Diese Liste der möglichen Komponenten wurde anhand der Internetseite „<http://www.massbank.jp>“ mittels bestimmter Fragmentionen und mit Hilfe der pflanzlichen Vorkommen reduziert. Darüber hinaus wurden für die Peaks 1-3 und 6, die kein Stickstoff enthalten (s. Tab. 3.3), Proteine, Peptide, Biogene Amine und Aminosäuren als mögliche Verbindungen ausgeschlossen (Peptiduntersuchung in Pansensaft; s. Kap. 5.1.1). Folglich wurden auch die N-haltigen heterocyclischen organischen Alkaloide eliminiert. Im Deutschen Weidelgras (*Acremonium lolii*) wurden für Herbivoren toxisch wirkende Ergot-Alkaloide nachgewiesen [200]. Diese sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und werden aus dem Aminosäure-Stoffwechsel (wie z.B. aus Tryptophan und Serin) als Endprodukt gebildet [20]. Die Alkaloid-Standard-Lösungen mit ähnlichen Molmassen wie Peak 1-3 wurden an der LC-ESI-MS/MS analysiert und zeigten ähnliche Retentionszeiten, aber unterschiedliche Fragmentierungsmuster im Vergleich zu Zielkomponenten in der Fermenterprobe. Die Alkaloide sind stabile Verbindungen. Es finden keine mehrfachen Abspaltungen der Hydroxy- ( $\Delta m/z = 18$ ) und Carbonylgruppen ( $\Delta m/z = 28$ ) statt wie bei Peak 1-3. Die Intensität

der Molekülonen der Alkaloide ist im Vergleich mit Peak 1-3 signifikant höher. Die Differenzen zwischen den Peaks 1-3 und der analysierten Alkaloide sind in Abbildung 3.7 mit LC-ESI-MS/MS-Spektren dargestellt.



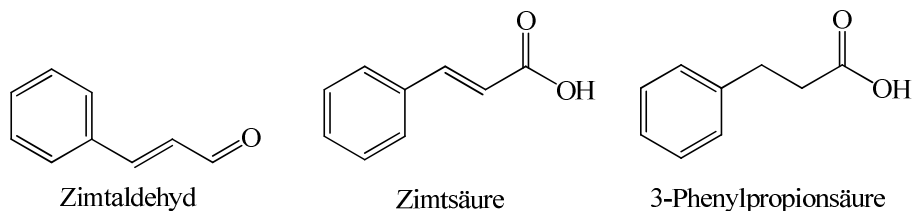
**Abbildung 3.7** LC-ESI-MS/MS-Spektren der Peaks 1 und 3 (links), Palmatin (Mitte) und Ajmalicin (rechts). Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Desweiteren wurden die Stoffe mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zur Identifikation mit ihren Standards an der RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS geprüft und infolgedessen wurde Peak 6 (Substanz 6) identifiziert (s. Tab. 5.4). Peak 6 zeigte in der Datenbank mit Phenylpropanoiden ähnliche Retentionszeiten und Fragmentierungsmuster. Beispielsweise wies er mit Zimtaldehyd die gleiche Fragmentierung und mit Zimtsäure eine sehr ähnliche Retentionszeit auf (s. Abb. 3.8). Außerdem zeigten die sogenannten Phenolsäuren nach der Fragmentierung als Endprodukt eine Phenylmethylgruppe ( $m/z$  91; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub><sup>-</sup>).



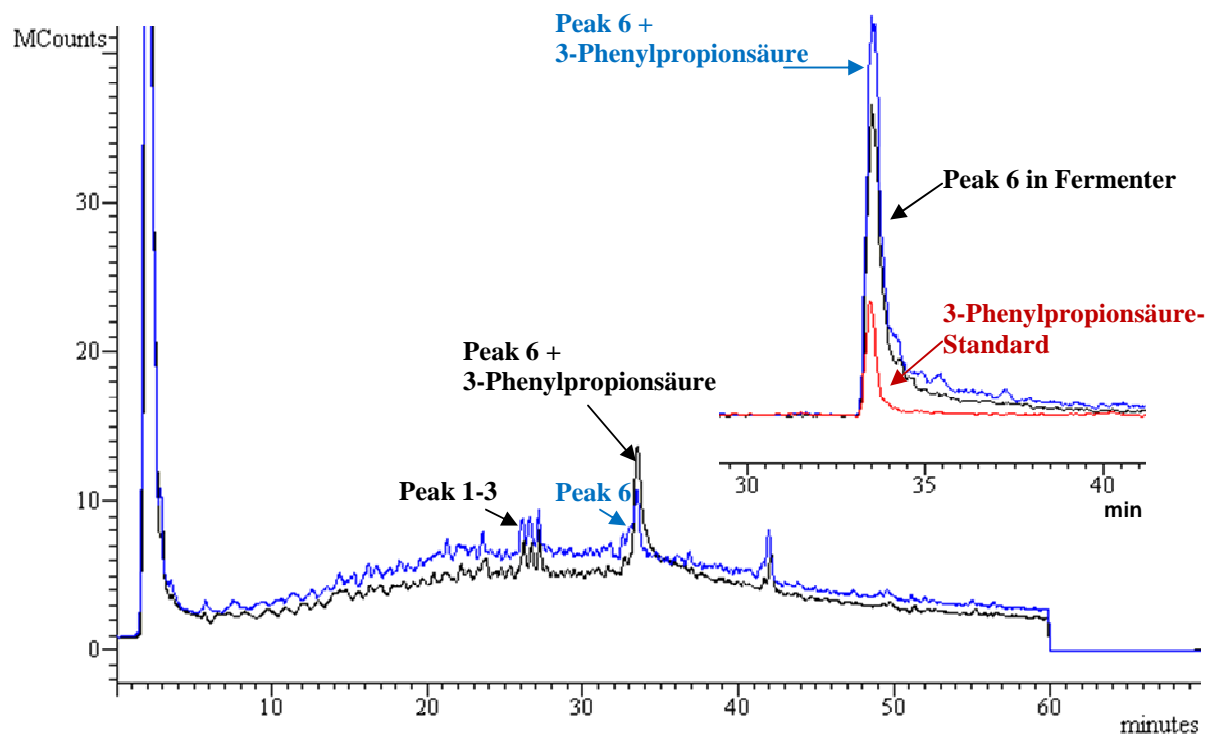
**Abbildung 3.8** LC-ESI-MS-Fullscan-Chromatogramm der Fermenter-Probe Fr-1 (K-01, K: Kontrollsilage) mit der Zugabe der Zimtaldehyd- und Zimtsäure-Standard-Lösungen. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Basierend darauf wurde ausgerechnet, dass die Polarität der gesuchten Phenylpropanoide größer als Zimtsäure sein müsste. 3-Phenylpropionsäure enthält keine Doppelbindung an der Kohlenstoffkette (s. Abb. 3.9), ist polarer als Zimtsäure und besitzt die gleiche Molmasse (150,17 g/mol) wie Peak 6.



**Abbildung 3.9** Die Strukturen von Zimtaldehyd, Zimtsäure und 3-Phenylpropionsäure für die Peak 6-Identifikation.

Demzufolge wurde Peak 6 mit 3-Phenylpropionsäure-Standard-Lösung an der LC-ESI-MS/MS durch Additionsverfahren mit MS<sup>n</sup>-Experimenten eindeutig identifiziert (s. Abb. 3.10). Beim 3-Phenylpropionsäure-Standard wurden die gleiche Retentionszeit und identische Fragmentationen (s. Tab. 3.3) wie bei Peak 6 in Fermenter-Proben bestimmt. Für weitergehende Charakterisierungen wurden der isolierte Peak 6 und 3-Phenylpropionsäure-Standard-Lösung bei verschiedenen Wellenlängen (von 195-490 nm) an der analytischen HPLC vermessen. Auch hier wurden für Peak 6 und 3-Phenylpropionsäure dieselben Retentionszeiten (36,73 min) und charakteristischen maximalen Wellenlängen ( $\lambda_{\max}$ = 210 nm und 258 nm) festgestellt.



**Abbildung 3.10** LC-ESI-MS-Nachweis-Chromatogramme der Fermenter-Probe Fr-1 (K-01, K: Kontrollsilage) für Peak 6 bei Zugabe des 3-Phenylpropionsäure-Standards. Oben rechts: LC-ESI-MS/MS-Überlappungs-chromatogramme für Masse 133 m/z  $[M-18]^+$  von 3-Phenylpropionsäure-Standard, Fermenter-Probe Fr-1 (K-01) und 3-Phenylpropionsäure-Standard mit der Fermenterprobe Fr-1 (K-01). Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40 °C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

In der Literatur wurde 3-Phenylpropionsäure im Pansensaft nachgewiesen [201] und der Einfluss auf die Aktivität der ruminalen Mikroorganismen beschrieben [201-204]. Die Peaks 1-3 wurden wie Peak 6 anhand der ermittelten Summenformeln und Molmassen in der Datenbank gesucht und es wurde ebenfalls eine Liste mit möglichen Substanzen zusammengestellt. Die Substanzen dieser Liste wurden auf Grund ihrer charakteristischen Massen, Fragmentierungsmuster, Retentionszeiten sowie ihres pflanzlichen Vorkommens eingegrenzt. Jedoch konnten hierdurch die Peaks 1-3 nicht identifiziert werden. Daher wurden weitere Analysemethoden wie NMR-, FT-IR-Spektroskopie hinzugezogen. Die Ergebnisse sind in den nächsten Kapiteln zusammengefasst.

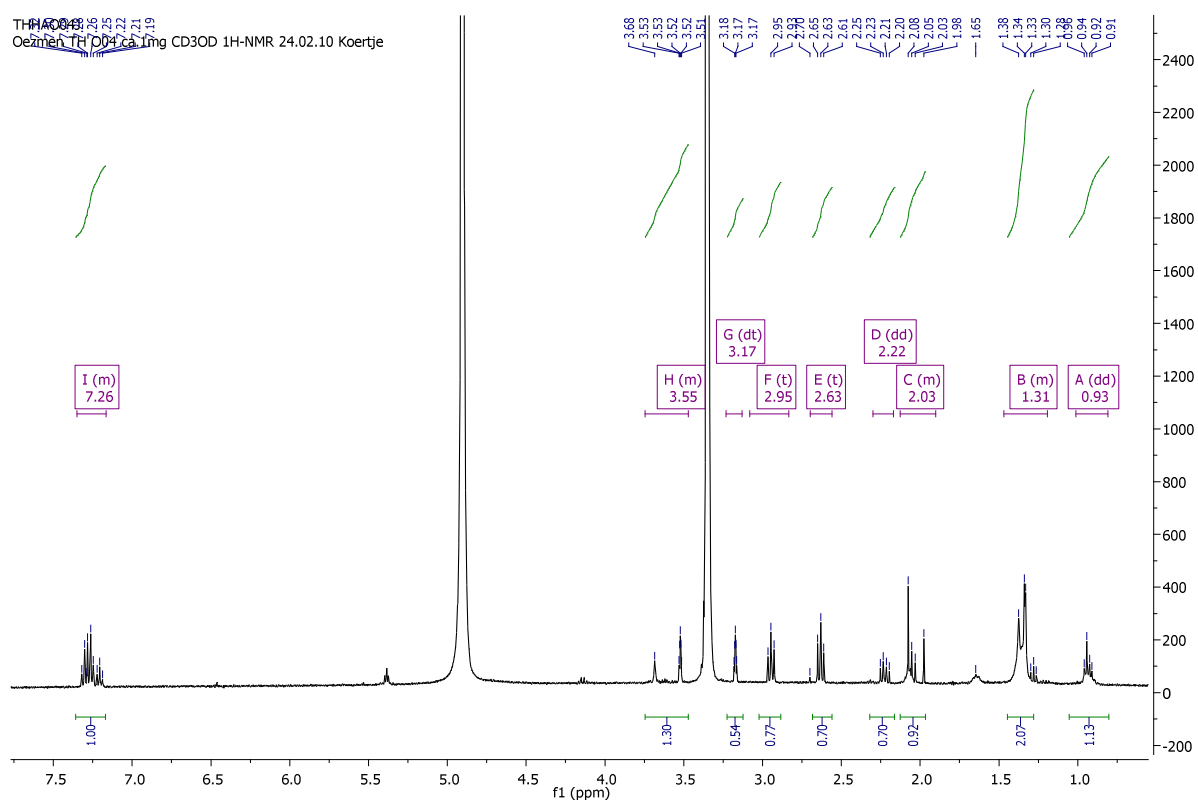
### 3.3.3 NMR-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Strukturaufklärung der definierten Zielsubstanzen in Fermenter-Proben <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie angewendet. Für die NMR-Spektroskopie sollte zunächst minimal je 1-2 mg Produkt durch Fraktionierung der Fermenter-Proben an der RP-HPLC dargestellt werden. Wegen der möglichen Instabilität der

fraktionierten Substanzen konnten nach 220 Analysen (220-mal fraktioniert) nur ca. 0,4 mg Produkt vom Peak 1 isoliert werden. Aus diesem Grund konnten für die fraktionierten Peaks 2-5 keine auswertbaren NMR-Spektren erhalten werden.

### <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum

<sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie ist nicht so empfindlich wie die anderen differenzierten NMR-Methoden. Aufgrund der geringeren Menge der fraktionierten Proben sollten zunächst <sup>1</sup>H-NMR-Messungen durchgeführt werden (s. Abb. 3.11). Durch mehrfache Vergrößerung der Ergebnisse sind einige Peaks mit sehr geringerer Intensität zu erkennen. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sind für den isolierten Peak 1 (Fr-1: K-01)  $\delta = 0,90; 1,10; 1,40; 1,70; 2,30; 7,30$  ppm vorhanden, die als Multipllett aufgespalten sind. Diese Signale könnten Protonen von Aromat- und/oder Aliphath-Verbindungen sein [199].



**Abbildung 3.11** Die vergrößerte Darstellung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von dem isolierten Peak 1 in Methanol-d<sub>4</sub> bei einer Frequenz von 400 MHz.

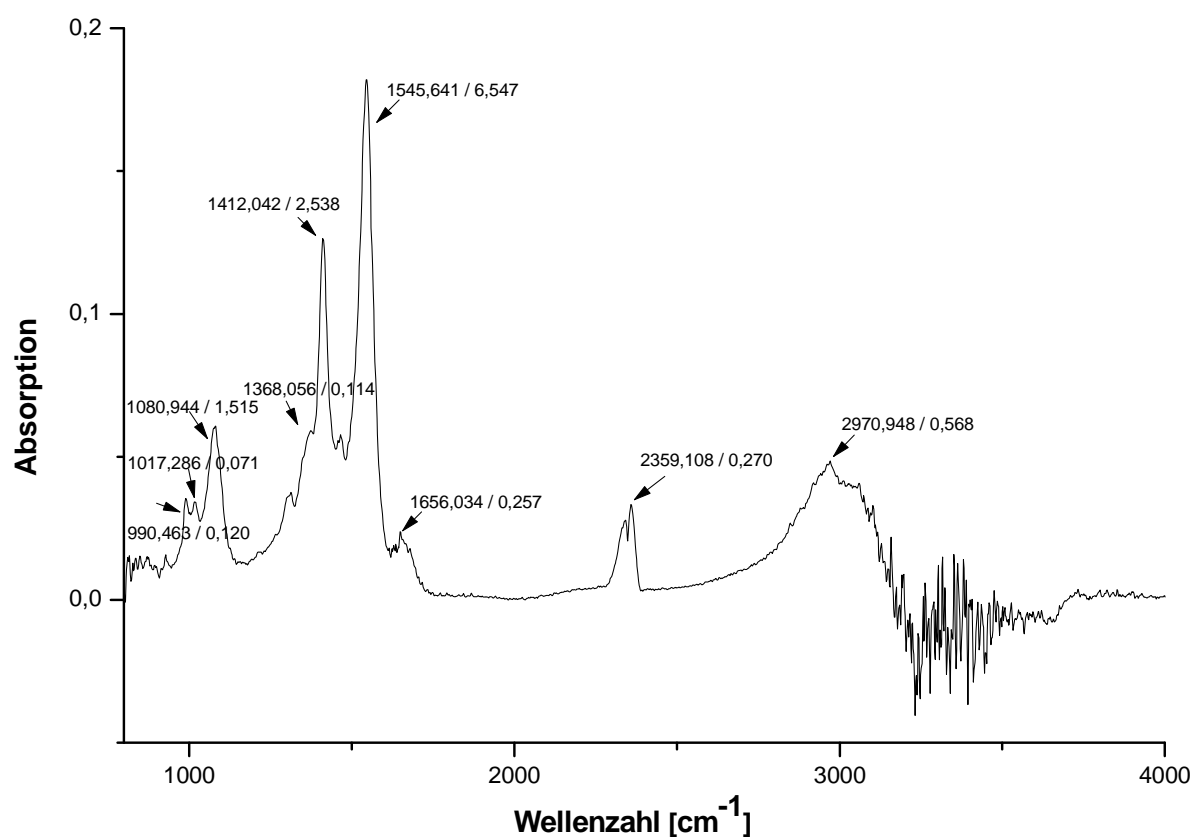
### <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum

Für nicht fraktionierte Fermenter-Proben und der fraktionierten Probe (Peak 1) wurde auch ein <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum gemessen. Aufgrund der geringen Menge der fraktionierten Probe

(Peak 1) konnte trotz sehr langer Messzeit (für 12 h) kein auswertbares Spektrum erhalten werden (in dieser Arbeit nicht präsentiert).

### 3.3.4 FT-IR-Spektroskopie

Zum Nachweis der funktionellen Gruppen in Fermenter-Proben wurde Fourier-Transform-(FT)-IR-Spektroskopie im Frequenzbereich von  $800\text{-}4.000\text{ cm}^{-1}$  eingesetzt. Um die Konzentrationen der vorhandenen Komponenten in Fermenter-Proben zu erhöhen, wurde die Messung nach der Aufkonzentrierung der Fermenter-Probe durchgeführt und verschiedene funktionelle Molekülgruppen festgestellt (s. Abb. 3.12).



Bereich der Wellenzahlen [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Molekülgruppe	Verbindung	Bemerkungen
1.017	C-C	Alkane	Alkylgruppen, $\text{CH}_3$ -Gruppen
1.080	C-O	Alkohole, Ether, Carbonsäuren, Ester	Von der Struktur der betreffenden Verbindung abhängig
1.350-1.450	C-H	Alkane	Charakteristisch für Alkylgruppen
1.450-1.600	C=C	Aromatische Ringe	Charakteristisch für Aromaten
1.656	C=O, C=C	Alkene, Carbonsäuren	Wenn symmetrisch substituiert Valenzschwingung,
2.359	O=C=O	$\text{CO}_2$	Carbonylverbindung
2.970	O-H	Carbonsäuren	Bande ebenso wie bei Alkoholen und Phenolen sehr breit

**Abbildung 3.12** FT-IR-Spektrum der Fermenter-Probe Fr-1 (K-01, K: Kontrollsilage) mit den Schwingungsdaten [198, 204].

Die aromatischen C=C-Gerüstschwingungsbanden bei  $1.610\text{ cm}^{-1}$  bis  $1.450\text{ cm}^{-1}$  (intensiv bei ca.  $1.545\text{ cm}^{-1}$ ) sind ein relativ sicherer Nachweis für aromatische Verbindungen im künstlichen Pansensaft [199, 205]. Zusätzlich erlauben die  $\text{sp}^2\text{-C-H}$ -Banden bei  $3.100\text{ cm}^{-1}$  bis  $2.950\text{ cm}^{-1}$  eine weitere Erkennung von Aromaten und auch Alkenen. Nebenbei sind Carbonsäure-Verbindungen (wie bei Alkoholen und Phenolen) mit ihren breiten O-H-Streckschwingungsbanden bei ca.  $3.000\text{-}2.500\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen [199]. Ein zusätzliches Erkennungsmerkmal für Carbonsäuren sind C=O-Schwingungsbande bei ca.  $1.656\text{ cm}^{-1}$  und Carbonylbande bei ca.  $2.359\text{ cm}^{-1}$ . Daneben ist C=C-Streckschwingungsbande bei ca.  $1.656\text{ cm}^{-1}$  charakteristisch für Alkene, da sie im selben Bereich mit Aromaten auftreten [205].

Desweiteren sind die „in plane“-Deformationsbanden bei ca.  $1.412\text{ cm}^{-1}$  und  $1.368\text{ cm}^{-1}$  besonders charakteristisch für Alkylgruppen, die den  $\text{CH}_3$ -Gruppen in der Fermenter-Probe zugeordnet werden können. Daneben liegen die ausgeprägten C-C-Streckschwingungsbanden für Alkylgruppen im typischen „finger-print-Bereich“ bei ca.  $1.017\text{ cm}^{-1}$  und  $990\text{ cm}^{-1}$  [205]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Banden in Fermenter-Proben sehr wahrscheinlich von Aromaten, Alkenen, Carbonsäuren möglicherweise mit Alkylresten stammen.

### 3.3.5 Fazit des Kapitels

Ziel dieser Untersuchung war die Isolierung und Charakterisierung von sechs Substanzen (Peak 1-6), welche in einer vorangegangenen Studie nach der Fermentation von Grassilagen mit unterschiedlichen RE-Anteilen in Fermenterproben detektiert werden konnten [195]. Dazu wurden zunächst aufgearbeitete Proben an der RP-HPLC fraktioniert. Trotz wiederholter Fraktionierung (220 Analysen) an der RP-HPLC wurden nur geringe Probenmengen vom Peak 1 (ca. 0,4 mg) nach der RP-HPLC-Isolierung erhalten. Die Fraktionen wurden im Vergleich zu nicht fraktionierten Fermenter-Proben zur Strukturklärung bzw. Summenformeln-Bestimmung erneut an der RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS, UPLC-ESI-MS analysiert. Peaks 4 und 5 waren nach der Fraktionierung an der RP-HPLC, LC-MS/MS sowie UPLC-MS im positiven und negativen Modus nicht nachweisbar bzw. isolierbar.

Zu Beginn der Studie wurde die Analytik zur Identifizierung der sechs Zielsubstanzen auf Peptidverbindungen fokussiert. Anhand der Fragmentierungen der isolierten Peaks in Fermenter-Proben wurde jedoch festgestellt, dass die Peaks 1-3 und 6 keinen Stickstoff, das Hauptelement einer Peptidbindung, enthalten. Mittels UPLC-ESI-MS-Analyse konnten die Summenformeln der Peaks 1-3 als  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$  und des Peak 6 als  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$  bestimmt werden.

Somit wurden für diese Peaks Proteine, Peptide, Biogene Amine, Aminosäuren und N-haltige heterocyclische organische Alkaloide als mögliche Verbindungen ausgeschlossen. Darüber hinaus wurde mittels RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS und UPLC-MS-Methode Peak 6 als 3-Phenylpropionsäure identifiziert. Zusätzlich wurden nach Fragmentierung der Peaks 1-3 sowie Peak 6 Phenylmethylgruppen ( $m/z$  91;  $C_6H_5CH_2-$ ) als Endprodukt ermittelt. Die Retentionszeit-Unterschiede betragen für Peaks 1-3 ca. 30 s. Basierend aus diesen Ergebnissen zählen Peaks 1-3 mit hoher Wahrscheinlichkeit zu derselben Substanzklasse.

Für die weitere Aufklärung der Struktur und Zusammensetzung der fraktionierten Peaks 1-3 erfolgte zudem eine  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR und FT-IR-Spektroskopie. Diese Ergebnisse sowie die  $^1H$ -NMR-Daten wiesen bei den ersten drei Peaks auf Aromaten hin. Dagegen konnte nach der  $^{13}C$ -NMR- und FT-IR-Analyse aufgrund der geringen Menge der fraktionierten Probe (Peak 1) kein auswertbares Spektrum erhalten werden. Deshalb wurden FT-IR-Analysen nach der Konzentrierung der nicht fraktionierten Fermenter-Proben durchgeführt, wobei Schwingungsbanden von Aromaten und Carbonsäuren mit Alkylresten festgestellt wurden.

Aufgrund der geringeren isolierten Probenmenge, konnten mit den angewandten Methoden die Zielkomponenten zum Teil differenziert bzw. identifiziert werden. Um diesen Hinweisen nachzugehen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit das Vorkommen der sechs Zielkomponenten im Fermenter untersucht. Somit konnte die Entstehung der Zielkomponenten bestimmt und mögliche Substanz-Klassen eingrenzt werden. Hierzu wurden Grassilage- und Serum-Analysen an der RP-HPLC und LC-ESI-MS/MS durchgeführt und mit den Substanzen in den Fermenter-Proben verglichen.

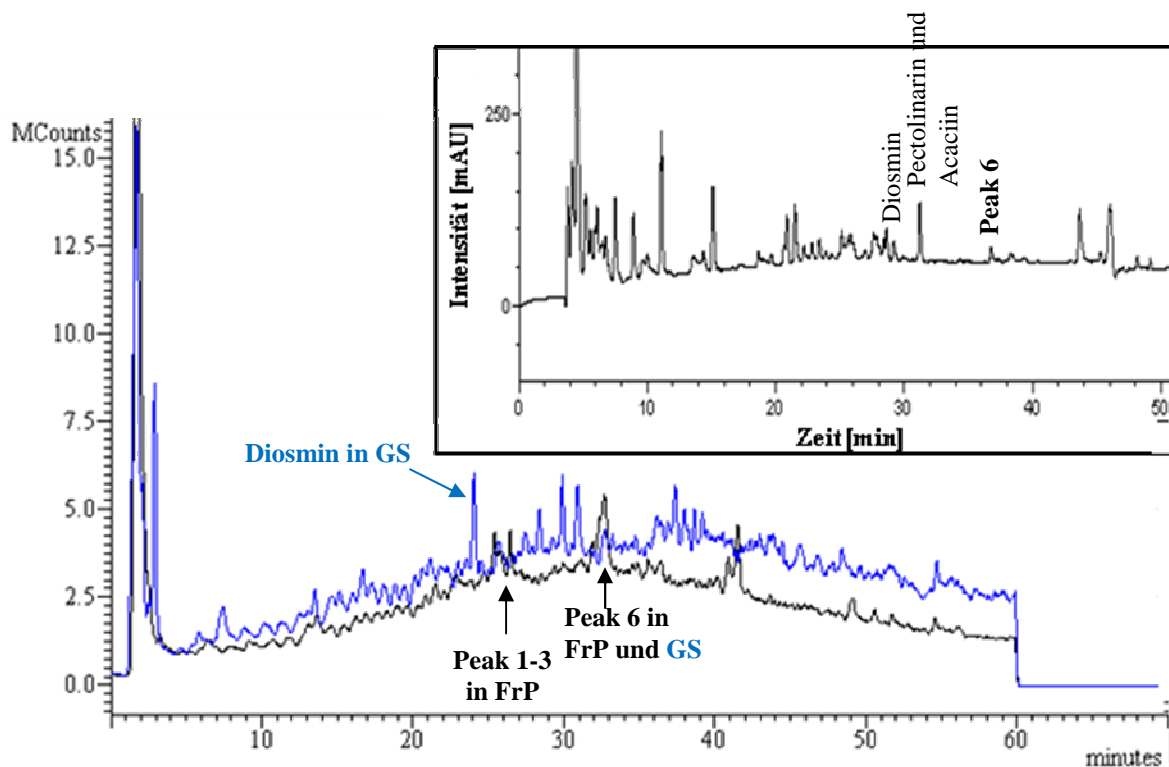
### 3.4 Vergleich der Grassilagen zu Fermenter

Um das Vorkommen und den Zusammenhang der sogenannten sechs Zielsubstanzen mit den Komponenten in Grassilagen zu bestimmen, wurden insgesamt 65 Grassilage-Proben (s. Tab. 5.18) mit unterschiedlichen RE-Anteilen (RE-Anteil: 25-70 % (w/w) vom Rp) wie die Fermenter-Proben (s. Tab. 5.15-5.17) an der analytischen RP-HPLC und LC-ESI-MS/MS im Massenbereich von  $m/z$  50-2.000 im positiven und negativen Modus durch LC-MS-FullScan-, MS/MS- und  $MS^n$ -Experimente (s. Abb. 3.13) analysiert.

Aufgrund der Heterogenität des Siliergutes in der Lagerungsdauer kann der RE-Anteil am Rp um das Dreifache des ursprünglichen Wertes abnehmen [1]. Um die Einflüsse der RE-Anteile näher zu bestimmen, wurden im Rahmen der Arbeit auch insgesamt zwei Gras- (RE-Anteil: 89-95 % (w/w) vom Rp, s. Tab. 5.18) und drei Heu- (RE-Anteil: 82-89 % (w/w) vom Rp,



s. Tab. 5.18) Extrakte untersucht und die Retentionszeiten, maximalen Wellenlängen, Massen sowie Fragmentationen definierter Peaks mit Grassilage- und Fermenter-Proben verglichen (s. Tab. 3.5). Nach Bestimmung der dazugehörigen Molmassen wurde mit Hilfe der Internetseite „<http://chembiofinder.cambridgesoft.com>“ eine Chemikalien-Liste mit Stoffen zusammengestellt, die diese wichtigen Massen aufweisen. Anhand der Internetseite „<http://www.massbank.jp>“ wurden mittels bestimmter Fragmentationen, pflanzlichen Vorkommens und durch Additionsverfahren zum Abgleich mit Standardchemikalien drei Aminosäuren (L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Tyrosin), ein Biogenes Amin (2-Phenylethylamin), fünf Phenolsäuren (*p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Chlorogensäure, 3-Phenylpropionsäure) und eine neue pflanzliche Substanzgruppe der Flavonoide (13 Flavone: Acacetin, Apigenin, Diosmetin, Luteolin, Acaciin, Diosmin, Isorhoifolin, Pectolinarin, Saponarin, Isoorientin, Orientin, Vitexin, Luteolin 7-*O*-rutinosid; drei Flavonole: Kaempferol, Quercetin, Rutin; drei Isoflavone: Genistein, Biochanin A, Formononetin) in Grassilage, Gras- und Heu-Proben identifiziert (s. Abb. 3.14). Die identifizierten Komponenten in Futtermittel-Extrakten sowie die sechs entsprechenden Zielsubstanzen im Pansensaft können mit hinreichenden Intensitäten positiv und negativ ionisieren. In Abbildung 3.13 wurde überprüft, ob die in Futtermittel identifizierten Komponenten auch in Fermenter-Proben und die sechs Zielsubstanzen aus den Fermenter-Proben auch in Grassilage-Proben erfasst werden können.



**Abbildung 3.13** LC-ESI-MS/MS-Überlappungschromatogramm der Grassilage-Probe S-09 (S: Schadsilage, GS: Grassilage) und Fermenter-Probe Fr-6 (S-09, FrP: Fermenter-Probe). Positive Mode, Kapillarspannung 80 V,

Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40 °C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B. Oben Rechts: RP-HPLC-Chromatogramm der Grassilage-Probe S-09. Säule: ReproSil Pur C18-AQ, 5  $\mu$ m Partikelgröße, 250 x 4,6 mm; Vorsäule: ReproSil Pur C18-AQ, 5  $\mu$ m Partikelgröße, 10 x 4,6 mm; Flussrate: 0,8 mL/min; Injektion: 30  $\mu$ L; Temperatur: 40 °C; Eluenten: A= 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O/ACN mit 0,1 % TFA; Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Vergleicht man die RP-HPLC und MS-Ergebnisse der Grassilage- (n= 65), Gras- (n= 2) und Heu-Proben (n= 3) mit den Fermenter-Proben (n= 12), so stellt man fest, dass in Fermenter-Proben und nur in einer Grassilage-Probe (S-09, Schadsilage) ein Peak mit gleicher Retentionszeit (RP-HPLC: 36,73 min bzw. LC-ESI-MS: 32,97 min), charakteristischen maximalen Wellenlängen (210 nm und 258 nm), Fragmentierungen (m/z 151/133/115/105/103/91) und Molmasse (150,17 g/mol) auftaucht, in beiden Proben als Peak 6 gekennzeichnet (s. Abb. 3.14 u. Tab. 3.5). 3-Phenylpropionsäure (Peak 6) kann aus Zimtsäure und/oder als Abbaustoff aus Flavonoiden gebildet werden (s. Abb. 3.27) [202]. Diese Verbindung wurde nicht in Gras- und Heu-Proben sondern nur in einer Schadsilage (S-09) mit 39 % igem RE-Anteil (w/w) vom Rp identifiziert. Dagegen wurde 3-Phenylpropionsäure in allen RUSITEC-Fermenter-Proben (fermentierten Grassilagen) nachgewiesen. Außerdem zeigen die anderen fünf Peaks aus den Fermenter-Proben zwar ähnliche Retentionszeiten mit Flavonoiden in Futtermitteln (Diosmin mit Peak 1, Pectolinarin mit Peak 3, Acaciin mit Peak 4 und Quercetin mit Peak 5), haben aber unterschiedliche m/z-Werte. In Tabelle 3.4 wurden die sechs Peaks in Fermenter-Proben mit den Komponenten in Grassilagen verglichen.

**Tabelle 3.4** Vergleich der sechs Zielsubstanzen (Peaks 1-6) in Fermenter-Proben mit den Substanzen in Grassilagen mit ähnlichen Retentionszeiten (n. d.: nicht detektiert, n. i.: nicht identifiziert). Die Peaknummerierungen beziehen sich auf die RP-HPLC-Messung.

	<b>Peaks</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Fermenter-Proben</b>	<b>R<sub>t</sub> [min]</b>	29,71	31,54	32,69	33,03	35,72	36,73
	<b>HPLC</b>						
	<b>R<sub>t</sub> [min]</b>	25,68	26,19	26,74	29,83	32,27	32,97
	<b>LC-MS/MS</b>						
	<b>UV <math>\lambda_{\max}</math> [nm]</b>	206/275	202/277	201/277	200/278	200	210/258
	<b>[M+H]<sup>+</sup> (m/z)</b>	331	331	331	329	129	151
	<b>Identifikation</b>	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	3-Phenylpropionsäure
<b>Grassilage-Proben</b>	<b>R<sub>t</sub> [min]</b>	28,31	n. d.	31,58	31,87	34,78	36,73
	<b>HPLC</b>						
	<b>R<sub>t</sub> [min]</b>	24,45	n. d.	27,68	30,81	31,97	32,97
	<b>LC-MS/MS</b>						
	<b>UV <math>\lambda_{\max}</math> [nm]</b>	252/346	n. d.	276/330	268/334	255/370	210/258
	<b>[M+H]<sup>+</sup> (m/z)</b>	609	n. d.	623	593	303	151
	<b>Identifikation</b>	Diosmin	n. d.	Pectolinarin	Acaciin	Quercetin	3-Phenylpropionsäure

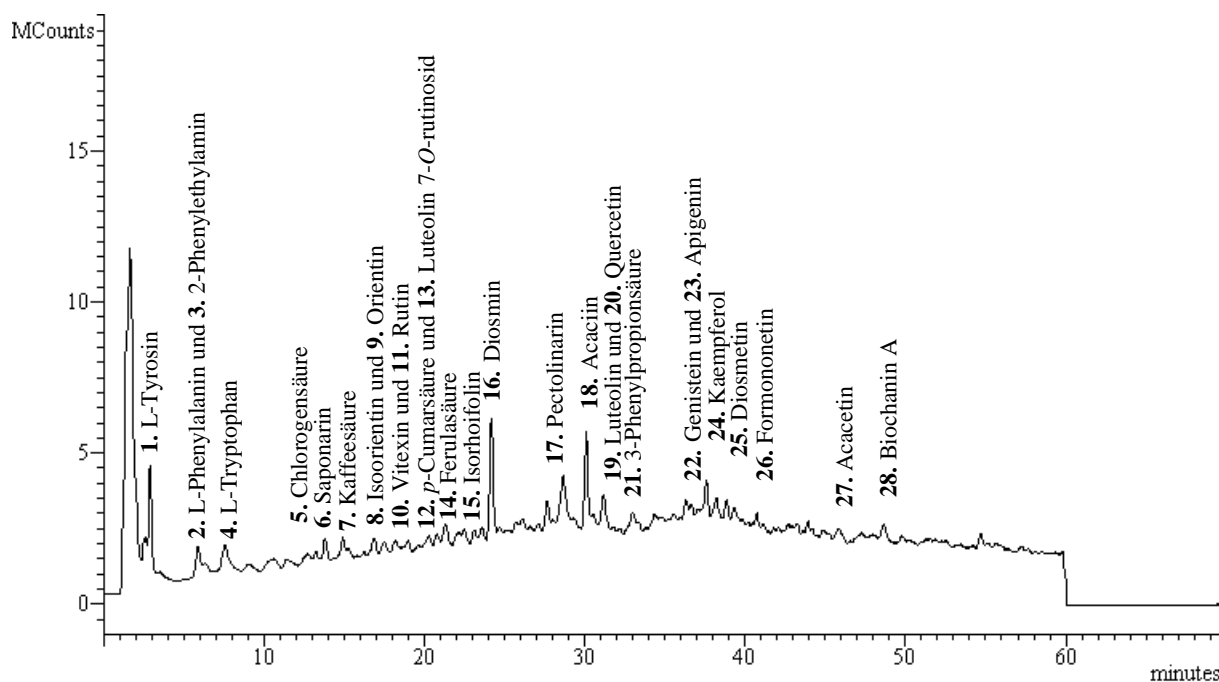
Anhand dieser Ergebnisse wird vermutet, dass nach der Silage-Fütterung die Flavonoide mittels Pansenbakterien durch enzymatische Reaktionen wie Peak 6 in diese fünf Substanzen (Peak 1-5) gespalten werden. Darüber hinaus können die Flavonoide im Säugetierorganismus nicht synthetisiert werden [82], jedoch können sie durch Pansenbakterien über Zwischenstufen abgebaut werden [171-172]. Die Identifikation und Abbaumechanismen der identifizierten Flavonoide im Pansen werden im Kapitel 3.5 näher beschrieben.

### 3.4.1 Grassilage-Identifikation

Um die Auswirkungen der Komponenten in Grassilagen auf das Tier zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die eingesetzten Grassilagen mit verschiedenen RE-Anteilen im Vergleich mit Gras und Heu an der RP-HPLC und LC-ESI-MS/MS charakterisiert. Dadurch wurden in den Grassilage-, Gras- und Heu-Proben die Sekundärstoffwechselprodukte Phenolsäuren und Flavonoide nachgewiesen.

Bei der Extraktion wurden wegen der großen Unterschiede in der Polarität der identifizierten Komponenten verschiedene organische und wässrige Puffer für die Grassilage-, Gras- sowie Heu-Proben geprüft (s. Tab. 5.19), wobei mit organischem Lösungsmittel, insbesondere ACN-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) + 0,1 % aq. FA, durch die Bestimmung der Flächenintegralwerte an der LC-ESI-MS die besten Ergebnisse erzielt wurden. Mit diesem Lösungsmittel konnten höchste Flavonoidgehalte in den Proben analysiert werden. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Flavonoide sind in DMSO vollständig löslich. Aus diesem Grund wurden die Flavonoid-Standards zur Proben-Quantifizierung erst in DMSO gelöst und anschließend um den Faktor 100 mit ACN-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) + 0,1 % aq. FA verdünnt (s. Kap. 5.3.2.4).

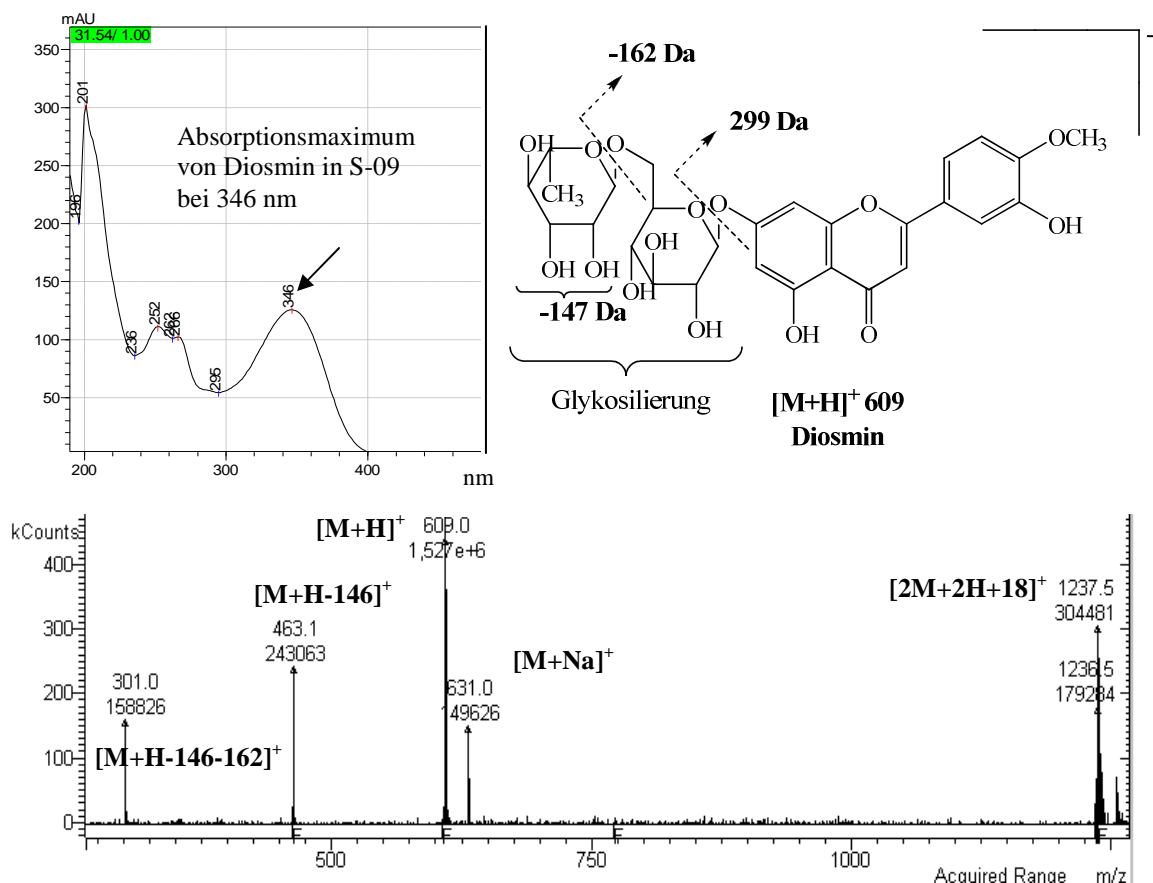
In diesem Kapitel werden die Chromatogramme der positiv geladenen Moleküle an der LC-ESI-MS/MS dargestellt und Abbildung 3.14 zeigt beispielhaft den MS-ESI-Fullscan für Grassilage-Probe S-09.



**Abbildung 3.14** MS-ESI-Fullscan der Grassilage-Probe von S-09 (S: Schadsilage). Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Für weitergehende Charakterisierungen wurden alle angewendeten Standardchemikalien und identifizierte Substanzen bei verschiedenen Wellenlängen (von 195-490 nm) an der analytischen HPLC vermessen. Auf diese Weise wurden die charakteristischen maximalen Wellenlängen der identifizierten Substanzen festgestellt und die Ergebnisse mit Standardchemikalien verglichen.

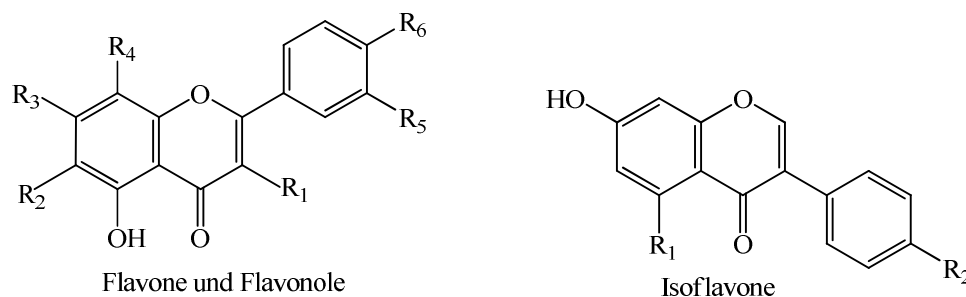
Als Hauptprodukt der Polyphenolsynthese in Grassilage-, Gras- und Heu-Proben wurde Diosmin festgestellt. Bei einer Retentionszeit von 24 min wurde ein Peak mit  $m/z$  609  $[M+H]^+$  (Molekulargewicht von Diosmetin 7-*O*-rutinosid + H) detektiert, der die gleiche Molmasse wie das Flavonoid Diosmin besitzt. Zur eindeutigen Identifizierung wurden Diosmin-Standard-Lösungen mittels LC-ESI-MS/MS detektiert. Für das Diosmin wurden die gleiche Retentionszeit und identische Fragmentationen  $m/z$  463  $[M+H-Rhamnose]^+$  (Molekulargewicht von Diosmetin 7-*O*-glucosid + H) und  $m/z$  301  $[M+H-Rhamnose-Glucose]^+$  (Molekulargewicht von Diosmetin + H) wie beim Peak im Grassilage-Extrakt bestimmt [206-208]. Nach der Abspaltung der Rhamnose und Glucose von Diosmin verbleibt die Aglykon-Form Diosmetin 301  $m/z$   $[M+H]^+$  [208]. In Abbildung 3.15 werden UV- und LC-ESI-MS/MS-Spektrum mit dem strukturellen Fragmentierungsmuster für Diosmin in Grassilage S-09 dargestellt.



**Abbildung 3.15** Oben links: UV-Spektrum von Diosmin mit charakteristischen Wellenlängen in S-09 (S: Schadsilage). Oben rechts: Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Diosmin (Diosmetin 7-*O*-rutinosid  $m/z$  609). Unten: Vergrößerte Darstellung bei geringer Intensität des LC-ESI-MS-Spektrums von Diosmin  $m/z$  609  $[M+H]^+$  in S-09. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40 °C, Eluenten: A= 0,1 % FA/ $H_2O$  (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Die große Zahl an Flavonoid-Verbindungen ergibt sich durch die vielfältige Möglichkeit der Derivatisierung der Grundstruktur, beispielsweise durch Glykosylierung, Hydroxylierung, Methylierung oder andere Modifizierungen. Die jeweiligen Grundstrukturen der in dieser Arbeit identifizierten Flavonoide in Grassilagen, Gras sowie Heu bestehen aus einer Doppelbindung zwischen der 2. und 3. Position im *o*-heterozyklischen Ring und werden als Flavone, Isoflavone und Flavonole bezeichnet. Die Synthese der identifizierten Flavonoide in Futtermitteln ist eine enzymatische Kettenreaktion und läuft im höheren Bereich in Richtung der Flavone (s. Abb. 3.18) ab. Als Zuckerkomponente in analysierten Futtermittelarten wurden D-Glucose und Rutinose an der Bindungsstelle des Flavone- und Flavonole-Gerüsts festgestellt. Aufgrund des vollständigen Verbrauchs der Zwischenprodukte Flavon 7-*O*-glucose, Flavonol 3-*O*-glucose zur Synthese der Flavon 7-*O*-rutinoside und Flavonol 3-*O*-rutinoside wurden diese in analysierten Extrakten nicht charakterisiert. Im Gegensatz dazu wurden die drei Isoflavone-Komponenten (Genistein, Biochanin A und Formononetin) ohne Zuckerrest in geringen Konzentrationen in einigen analysierten

Futtermitteln identifiziert. Die Grundstruktur der in dieser Arbeit charakterisierten Aglykone und Glykoside mit identifizierten Zuckerkomponenten sind in Abbildung 3.16 dargestellt.



Identifizierte Flavonoide	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	GS	G	H
<b>Flavon-Aglykone</b>									
Acacetin	H	H	OH	H	H	OMe	+	-	+
Apigenin	H	H	OH	H	H	OH	+	-	+
Diosmetin	H	H	OH	H	OH	OMe	+	+	+
Luteolin	H	H	OH	H	OH	OH	+	+	+
<b>Flavon-Glykoside und Glucoside</b>									
Acaciin (Acacetin 7- <i>O</i> -rutinosid, Linarin)	H	H	<i>O</i> -Ru	H	H	OMe	+	+	+
Diosmin (Diosmetin 7- <i>O</i> -rutinosid)	H	H	<i>O</i> -Ru	H	OH	OMe	+	+	+
Isoorientin (Luteolin 6- <i>C</i> -glucosid)	H	Glu	OH	H	OH	OH	+	+	+
Isorhoifolin (Apigenin 7- <i>O</i> -rutinosid)	H	H	<i>O</i> -Ru	H	H	OH	+	+	+
Luteolin 7- <i>O</i> -rutinosid	H	H	<i>O</i> -Ru	H	OH	OH	+	+	+
Orientin (Luteolin 8- <i>C</i> -glucosid)	H	H	OH	Glu	OH	OH	+	-	+
Pectolarin (6-Methoxy-acacetin-7- <i>O</i> -rutinosid, Neolarin, Pectolarosid)	H	OMe	<i>O</i> -Ru	H	H	OMe	+	+	+
Saponarin (Apigenin 6- <i>C</i> -glucoside-7- <i>O</i> -glucosid, Isovitexin 7- <i>O</i> -glucosid)	H	Glu	<i>O</i> -Glu	H	H	OH	+	+	+
Vitexin (Apigenin 8- <i>C</i> -glucosid)	H	H	OH	Glu	H	OH	+	-	-
<b>Flavonol-Aglykone</b>									
Kaempferol	OH	H	OH	H	H	OH	+	+	+
Quercetin	OH	H	OH	H	OH	OH	+	-	-
<b>Flavonol-Glykoside</b>									
Rutin (Quercetin 3- <i>O</i> -rutinosid)	<i>O</i> -Ru	H	OH	H	OH	OH	+ <sup>1</sup>	+	+
<b>Isoflavon-Aglykone</b>									
Genistein	OH	OH					+ <sup>2</sup>	-	-
Biochanin A	OH	OMe					+ <sup>2</sup>	-	-
Formononetin (Biochanin B)	H	OMe					+	-	-

**Abbildung 3.16** Grundlegende Strukturen der identifizierten Aglykone, Glucoside und Glykoside in Grassilage (GS), Gras (G) und Heu (H) (*O*-Ru: *O*-Rutinoside; Glu: *C*-Glykoside, *O*-Glu: *O*-Glucoside). <sup>1-2</sup>: Diese Komponenten wurden jeweils nur in einer Grassilage-Probe (<sup>1</sup>: K-20, <sup>2</sup>: K-03, K: Kontrollsilage, Nährstoffanalyse s. Tab. 5.18) identifiziert.

Um die Entstehung der Flavonoide in Futtermittel zu verfolgen, wurden alle teilnehmenden Substanzen der Polyphenolbiosynthese (s. Abb. 2.4-2.5) in Grassilagen-, Gras-, Heu- und Fermenter-Proben tandemmassenspektroskopisch untersucht. L-Phenylalanin und L-Tyrosin wurden über den Shikimisäureweg als Edukte der Polyphenole und ein Biogenes Amin, das 2-Phenylethylamin aus L-Phenylalanin, in Futtermittel-Extrakten sowie in Fermenter-Proben

---

nachgewiesen. Neben L-Phenylalanin und L-Tyrosin wurden L-Tryptophan in den analysierten Futtermitteln über den Shikimisäureweg als weiteres enzymatisches Stoffwechselprodukt synthetisiert. Infolgedessen wurden aus L-Phenylalanin und L-Tyrosin in Grassilagen, Gras und Heu *p*-Cumar-, Kaffee-, Ferula- und Chlorogensäure gebildet. *p*-Cumar-, Kaffee-, Ferula-, Chlorogensäure und L-Tryptophan wurden in Fermenter-Proben nicht detektiert. Die Biosynthesewege der identifizierten Komponenten in Futtermitteln werden im nächsten Kapitel näher beschrieben. In Tabelle 3.5 sind die identifizierten Komponenten in Futtermitteln und Fermenter-Proben mit den ermittelten charakteristischen Eigenschaften zusammengestellt.

**Tabelle 3.5** Identifizierte Komponenten in Heu-, Gras-, Grassilage- und Fermenter-Proben mittels RP-HPLC und LC-ESI-MS/MS-Methode. <sup>1-5</sup>: Diese Komponenten wurden in entsprechenden Gruppen jeweils in nur einer Probe (<sup>1</sup>: H-01, <sup>2</sup>: G-01, <sup>3</sup>: S-09, <sup>4</sup>: K-20, <sup>5</sup>: K-03; Nährstoffanalyse s. Tab. 5.18) identifiziert. Die Basisionen sind fett markiert. Abkürzungen: R<sub>t</sub>: Retentionszeit, H: Heu, G: Gras, GS: Grassilage, Fr: Fermenter, Std: Standards, K: Kontrollsilage, S: Schadsilage.

Identifizierte Komponenten	R <sub>t</sub> [min]	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Aglykone oder diagnostischen Fragmenten (m/z)	UV λ <sub>max</sub> HPLC (nm)	Identifikation	H	G	GS	Fr	Ident. mit Std.	Referenzen	
<b>Aminosäuren</b>	6,08	166	149/131/ <b>120</b> /103	203, 215, 257	L-Phenylalanin	+	+	+	+	+	[46, 66, 192, 209]	
	3,21	182	<b>165</b> /147/136/123/119	201, 224, 275	L-Tyrosin	+	+	+	+	+	[46, 66, 192, 209]	
	8,98	205	<b>188</b> /159/146/132/118/105	209, 273	L-Tryptophan	+	+	+	-	+	[46, 66]	
<b>Biogene Amine</b>	6,35	122	<b>105</b> /103/95/79	219, 258	2-Phenylethylamin	<sup>1</sup> +	-	+	+	+	[210-214]	
<b>Phenolsäuren</b>	15,54	181	<b>163</b> /145/135/117	228, 288	Kaffeensäure	<sup>1</sup> +	<sup>2</sup> +	+	-	+	[215]	
	13,12	355	<b>163</b> /145/135/117	219, 327	Chlorogensäure	+	+	+	-	+	[214-215]	
	20,01	165	<b>147</b> /119/91	218, 310	<i>p</i> -Cumarsäure	-	<sup>2</sup> +	+	-	+	[209, 214]	
	23,01	195	<b>177</b> /149/145/117	237, 308	Ferulasäure	-	<sup>2</sup> +	+	-	+	[209, 215]	
	32,97	151	149/ <b>133</b> /115/105/103/91	210, 258	3-Phenylpropionsäure	-	-	<sup>3</sup> +	+	+	[201-204]	
	<b>Flavon-Aglykone</b>	46,79	<b>285</b>	-/-	270, 330	Acacetin	+	-	+	-	+	
	36,84	<b>271</b>	-/-	268, 338	Apigenin	+	-	+	-	+	[213-214]	
37,97	<b>301</b>	286	251, 266	Diosmetin	+	+	+	-	+			
31,89	<b>287</b>	-/-	253, 348	Luteolin	+	+	+	-	+	[214]		
<b>Flavon-Glykoside und Glucoside</b>	30,81	<b>593</b>	447/285	268, 334	Acaciin	+	+	+	-	-		
	24,45	<b>609</b>	463/301/286	252, 346	Diosmin	+	+	+	-	+		
	17,13	<b>449</b>	431/413/395/383/353/329	222, 256, 344	Isoorientin	+	+	+	-	+	[213-214]	
	24,03	<b>579</b>	433/271	268, 332	Isorhoifolin	+	+	+	-	-	[214]	
	20,36	<b>595</b>	449/287	256, 266, 348	Luteolin 7- <i>O</i> -rutinosid	+	+	+	-	-	[213-214]	
	17,97	<b>449</b>	431/413/388/329	255, 348	Orientin	+	-	+	-	+		
	27,68	<b>623</b>	477/315	276, 330	Pectolarin	+	+	+	-	-		
	14,90	<b>595</b>	-/-	271, 336	Saponarin	+	+	+	-	-		
	19,25	<b>433</b>	415/313	215, 269, 338	Vitexin	-	-	+	-	+		
<b>Flavonol-Aglykone</b>	37,58	<b>287</b>	-/-	265, 366	Kaempferol	+	+	+	-	+	[214]	
	31,97	<b>303</b>	-/-	255, 370	Quercetin	-	-	+	-	+	[173, 214]	
	19,59	611	465/ <b>303</b>	255, 354	Rutin	+	+	<sup>4</sup> +	-	+	[171, 181, 216-217]	
<b>Isoflavon-Aglykone</b>	36,60	<b>271</b>	-/-	261	Genistein	-	-	<sup>5</sup> +	-	+	[218-219]	
	48,49	<b>285</b>	-/-	221, 260	Biochanin A	-	-	<sup>5</sup> +	-	+	[218]	
	40,53	<b>269</b>	-/-	248	Formononetin	-	-	+	-	+	[218]	



### 3.4.2 Biosynthese der identifizierten Komponenten in Grassilagen

Zahlreiche Wissenschaftler bemühen sich seit Jahren die Gesundheitsprobleme in der Landwirtschaft bei der Verfütterung von Grassilagen zu erforschen. In den bisher durchgeführten Forschungen wurden insbesondere die pharmakologischen Auswirkungen der Aminosäuren, Biogenen Amine und Phenole auf das Tier untersucht [192-193]. Bereits in vorangegangenen Untersuchungen wurden in Graszellwänden Ferulasäure und *p*-Cumarsäure identifiziert [209, 215] und die Synthese aus Phenolsäuren bis zum Lignin beschrieben [215]. Zudem enthalten Knaulgras-Heu, Raygras-Silage sowie Raygras-Heu die Chlorogensäure, *p*-Cumarsäure, Apigenin, Luteolin, Quercetin, Kaempferol, Isoorientin, Luteolin 7-*O*-rutosid [211-212, 214] und Rotklee-Silage in geringen Konzentrationen Formononetin, Biochanin A und Genistein [218-219]. Trotz all dieser Studien konnte die Ursache der chronischen Erkrankung durch die Fütterung der Grassilagen mit geringeren RE-Anteilen nicht aufgeklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die Entstehung der Flavonoide sowie die Stoffwechselreaktionen in Grassilage, Gras und Heu mit unterschiedlichen RE-Anteilen tandemmassenspektrometrisch untersucht. Die Biosynthese der charakterisierten Substanzen wurde mit allgemeinen Stoffwechselreaktionen in Pflanzen verglichen und in drei Abschnitten definiert: 1. Phenylalaninsynthese (s. Abb. 2.4) [84-85, 87-93], 2. Phenylpropanoidsynthese (s. Abb. 3.17) [94] und 3. Flavonoidsynthese (s. Abb. 3.18). In Extrakten wurden als Edukte der Polyphenolsynthese L-Phenylalanin und L-Tyrosin, als Zwischenkomponente vier verschiedene Zimtsäurederivate (*p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Chlorogensäure), als weiteres enzymatisches Stoffwechselprodukt L-Tryptophan, aus L-Phenylalanin ein Biogenes Amin (2-Phenylethylamin), als Hauptprodukt der Polyphenolsynthese 13 Flavone, drei Flavonole, drei Isoflavone und ein Abbauprodukt der Flavonoide (3-Phenylpropionsäure: Peak 6) identifiziert. Daneben wurden nicht nur die vorhandenen Substanzen sondern auch die in Grassilagen, Gras und Heu nicht gebildeten Substanzen festgestellt. Damit konnten die Endungen und Richtungen der Synthesereaktionen in Grassilagen, Gras und Heu bestimmt werden.

In ersten Abschnitt der Polyphenolsynthese werden die Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan in höheren Pflanzen sowie in Grassilagen, Gras und Heu über den Shikimisäureweg als Endprodukte gebildet (s. Abb. 2.4). Die Neben- sowie Zwischenprodukte der Phenolsäuren liegen in Pflanzen auf Grund des hohen Vorkommens nur selten in freier Form vor und sie werden als Hydroxymimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren zusammengefasst. Zudem wurden die Nebenprodukte Gallussäure, Chinasäure und das Zwischenprodukt Phenylbrenztraubensäure des Shikimisäureweges in

Grassilagen nicht identifiziert. Die Gallussäure kann in Grassilage zur möglichen Gallotanninsynthese vollständig verbraucht werden oder an einen Zucker, z.B. Glucose, gebunden sein. Die vorhandene Chinasäure reagiert in Grassilagen mit veresterter Kaffeesäure (s. Abb. 3.17) und daraus entsteht die Chlorogensäure (5-Kaffeeoylchinasäure). Somit ist die Chinasäure in Grassilagen an Kaffeesäure gebunden. Phenylbrenztraubensäure kann in dieser Reaktion vollständig zu Phenylalanin und Tyrosin umgewandelt werden. All die am Shikimisäureweg beteiligten Komponenten wurden auch in Fermenter-Proben untersucht. Die Ausgangskomponenten L-Phenylalanin und L-Tyrosin wurden im Pansensaft mittels LC-ESI-MS/MS- (detaillierte Ergebnisse; s. Kap. 3.4.3.3) und FMOC-HPLC-Methode (detaillierte Ergebnisse; s. Kap. 5.1.1.1) identifiziert. L-Phenylalanin und L-Tyrosin wurden zudem in vorangegangenen Untersuchungen mittels OPA- und FMOC-HPLC-Methode im Pansensaft nachgewiesen [46, 66]. Die in Futtermittel-Extrakten vorhandenen L-Tryptophan, Neben- und Zwischenprodukte wurden in Fermenter-Proben nicht detektiert.

Der zweite Schritt der Polyphenolsynthese in Grassilagen, Gras sowie Heu startet mit Phenylalanin durch die Katalyse mit dem Enzym L-Phenylalanin Ammoniaklyase (PAL) zur Zimtsäure-Bildung und/oder aus L-Tyrosin durch die Tyrosin-Ammoniaklyase (TAL) katalysierte Desaminierung zur *p*-Cumarsäure-Bildung [20, 94]. Zudem kann die TAL-Reaktion wie z.B. in Mais durch PAL-Enzyme mit geringer Substratspezifität katalysiert werden [220].

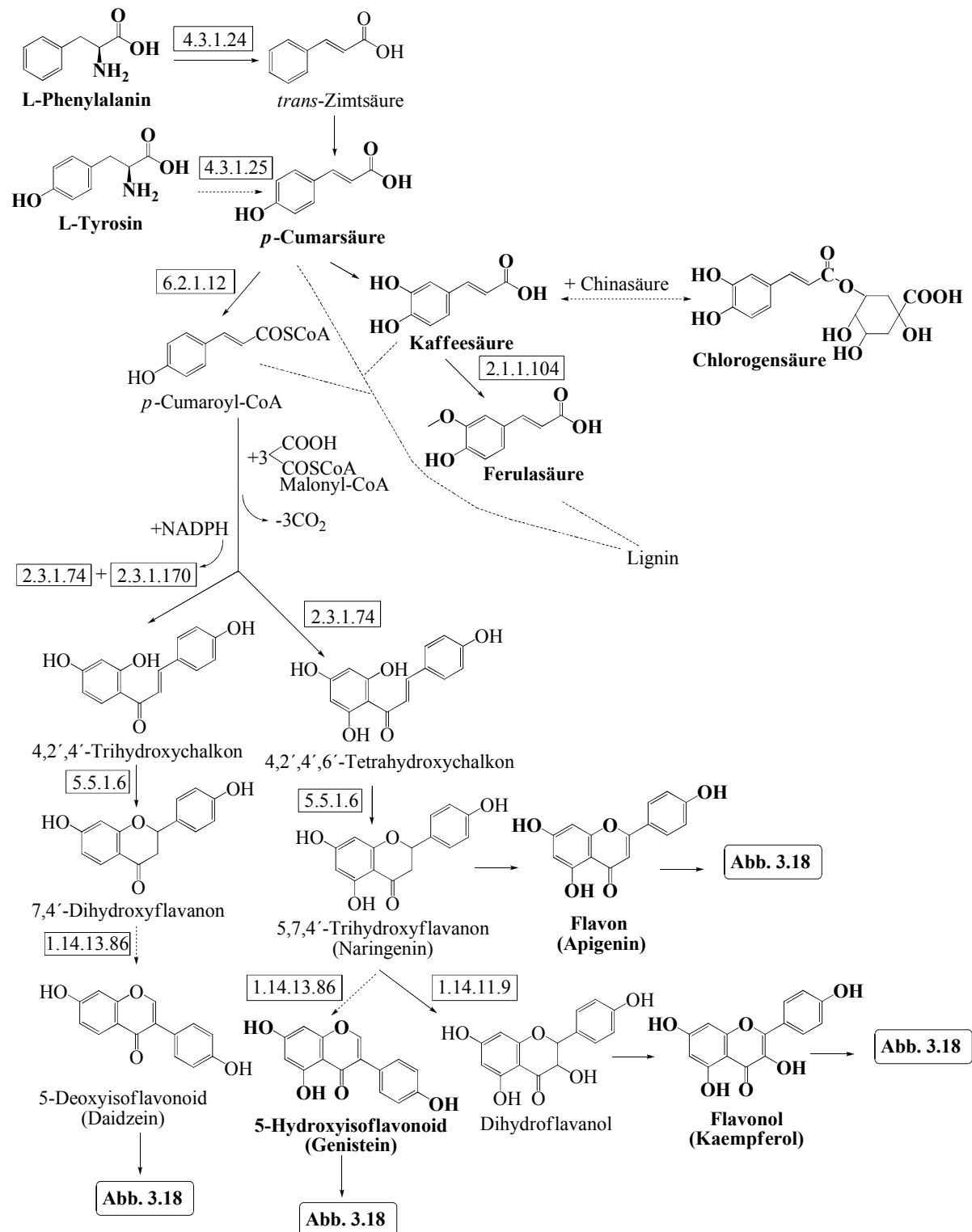
Im nächsten Schritt werden in höheren Pflanzen aus *trans*-Zimtsäure mit der Abspaltung eines C<sub>2</sub>-Fragments die Benzoensäuren sowie ihre Derivate (z.B. Salicylsäure, 3-Hydroxybenzoensäure, 3,4-Dihydroxybenzoensäure) gebildet [94]. Die Benzoensäure und ihre Derivate wurden in Grassilagen untersucht, konnten jedoch nicht identifiziert werden (s. Tab. 5.4). Die Komponenten werden möglicherweise in Grassilagen durch Veresterung an Phenolsäure gebunden. Außerdem kann Zimtsäure durch eine enzymatische Hydroxylierung des Aromaten in *para*-Stellung sehr schnell in *p*-Cumarsäure umgewandelt werden [20]. Aus diesem Grunde wurde Zimtsäure trotz hoher Umsätze von L-Phenylalanin in Grassilagen, Gras und Heu nicht detektiert.

Durch die weitere Hydroxylierung wird aus *p*-Cumarsäure Kaffeesäure als Schlüsselsubstanz für den Bildungsweg der Cumarine, Chlorogensäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und Lignine gebildet [97]. Die Synthese der Chlorogensäure mit Chinasäure und der Ferulasäure durch Methylierung mit dem Enzym Kaffeesäure-*O*-methyltransferase (COMT) erfolgt in Grassilagen sowie in höheren Pflanzen [94]. Im Gegensatz zu Pflanzen werden in Grassilagen, Gras und Heu die Cumarine, 5-Hydroxyferulasäure und Sinapinsäure nicht

gebildet. In der Literatur wird das Vorkommen der Ferulasäure-Dimere und Lignine in der Grasszellwand beschrieben [215]. Demzufolge kann die Ferulasäure als Zwischenprodukt in Grassilagen, Gras und Heu zur Ligninsynthese verbraucht werden.

Im letzten Schritt ist das Chalkon ein Edukt für die Synthese der Flavonoide, Stilbene und Aurone [94, 221]. Es kann aus drei Molekülen Malonyl-CoA und einem Molekül *p*-Cumaroyl-CoA mit Hilfe des Enzyms Chalkon-Synthase gebildet werden [94, 221]. Unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung entsteht ein dreiwertiges Phenol, das Naringeninchalkon [20, 94, 222]. Durch die Chalkon-Isomerase nach Ringschluss wird das Naringenin dargestellt, aus dem sich die Flavanone, Flavone, Flavonole, Isoflavone, Anthocyanine und Anthocyanidine bilden [94]. Die enzymatischen Reaktionen zur Synthese der Stilbene, Aurone, Flavanone, Anthocyanine und Anthocyanidine finden in Grassilagen nicht statt.

Das Naringenin (Flavanon) dehydratisiert in Grassilagen, Gras und Heu zu Apigenin (Flavon), Kaempferol (Flavonol) und Genistein (Isoflavone) (s. Abb. 3.17). Auf Grund der vollständigen Dehydratation des C-Ringes ( $\gamma$ -Pyron) [20] wurden in den analysierten Extrakten das Zwischenprodukt Naringenin und ihre Flavanon-Derivate nicht identifiziert. Dennoch werden in Grassilagen, Gras und Heu die Flavone, Flavonole und Isoflavone gebildet.



**Abbildung 3.17** Schematische Darstellung der Biosynthesewege der Polyphenole in Grassilagen, Gras und Heu [94]. Die identifizierten Substanzen in Grassilagen, Gras und Heu sind fett gekennzeichnet. Die Reaktionen werden durch folgende Enzyme katalysiert. Abkürzungen der beteiligten Enzyme: CoA: Coenzym A, EC 4.3.1.24: Phenylalaninammoniumlyase (PAL), EC 4.3.1.25: Tyrosinammoniumlyase (TAL), EC 6.2.1.12: *p*-Cumaroyl-CoA-Ligase (4CL), EC 1.14.14: Ferulasäure-5-hydroxylase (F5H), EC 2.1.1.104: Kaffeeoyl-*O*-methyltransferase (COMT), EC 2.3.1.74: Chalkon-Synthase (CHS), EC 2.3.1.170: Chalkon-Reduktase (CHR), EC 5.5.1.6: Chalkon-Isomerase (CHI), EC 2.3.1.95: Stilben-Synthase (SS), EC 1.14.13.86: Isoflavon-Synthase (IFS), EC 1.14.11.9: Flavanon 3-hydroxylase (F3OH), EC 1.14.13.52: Isoflavon 2'-hydroxylase (IFOH), EC 1.3.1.45: Isoflavon-Reduktase (IFR), EC 1.1.1.246: Vestitone-Reduktase (VR), EC 1.1.1.219: Dihydroflavonol-Reduktase (DHFR), EC 1.14.11.19: Anthocyanidin-Synthase (AS), EC 2.4.1.91: UDP-Glucose Flavonol 3-*O*-glucosyltransferase (UFGT).

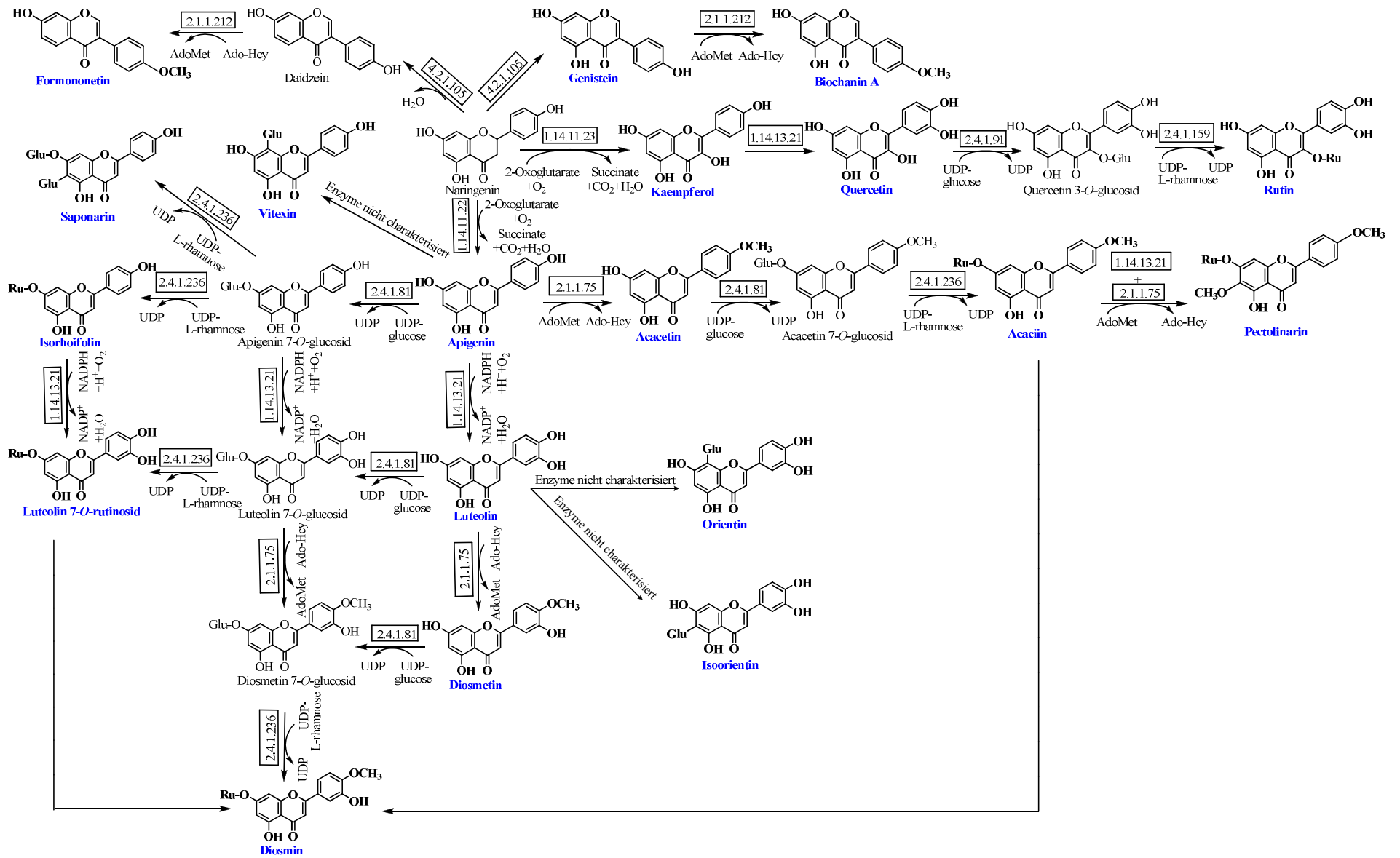
Neben dem ersten (Shikimisäureweg oder Phenylalaninsynthese) (s. Abb. 2.4) und zweiten Schritt (Phenylpropanoidsynthese) der Polyphenolsynthese (s. Abb. 3.17) wurde in dieser Arbeit erstmalig der dritte Abschnitt der Flavonoidsynthese in Grassilagen, Gras und Heu erforscht (s. Abb. 3.18). Dafür wurden alle erhältlichen Massen und Fragmentationen an der LC-ESI-MS/MS in allen Extrakten bestimmt und mit der Datenbank verglichen. Anschließend wurde für die analysierten Grassilagen, Gras und Heu eine charakteristische Synthesereaktion aus Naringenin zu Flavonen, Flavonolen und Isoflavonolen aufgestellt (s. Abb. 3.18).

Bei der Qualifizierung (s. Kap. 3.4.1) und Quantifizierung (s. Kap. 3.4.3) wurden die Flavon-Glykoside Diosmin (Diosmetin 7-*O*-rutinosid) und Acaciin (Acacetin 7-*O*-rutinosid) in allen analysierten Extrakten als Hauptprodukte ermittelt. Die in dieser Arbeit identifizierten Flavone zeigen relativ ähnliche Strukturen mit Diosmin. Die große Zahl an Flavonoid-Verbindungen ergibt sich durch die vielfältige Möglichkeit der Derivatisierung der Grundstruktur, beispielsweise durch Glykosylierung, Hydroxylierung, Methylierung oder andere Modifizierungen [20, 94]. Beispielsweise werden zur Flavonsynthese aus Apigenin durch die Glykosylierung Apigenin 7-*O*-rutinosid sowie Vitexin, durch die Hydroxylierung Luteolin und durch die Methoxylierung Acacetin produziert [222-223]. Die Zuckermoleküle können *C-O*-glykosidisch oder *C-C*-glykosidisch durch Enzyme (Transferase) an dem vorhandenen Aglykon gebunden werden [223]. Die Glykosylierung erfolgt besonders in Grassilagen, Gras und Heu häufig an Hydroxylgruppen wie beim Apigenin 7-*O*-rutinosid und Acacetin 7-*O*-rutinosid. Die Zwischenprodukte Flavon 7-*O*-glucoside können in Pflanzen sehr schnell durch die Enzyme L-Rhamnosyltransferase zu Flavon 7-*O*-rutinoside umgewandelt werden [20]. Aus diesem Grunde wurden in allen analysierten Extrakten Apigenin 7-*O*-glucosid aus Apigenin, Luteolin 7-*O*-glucosid aus Luteolin und Diosmetin 7-*O*-glucosid aus Diosmetin nicht identifiziert. Zudem wurden aus Apigenin 7-*O*-glucosid außer Apigenin 7-*O*-rutinosid auch ein weiteres *C*-Glykosilierung-Produkt, das Saponarin (Apigenin 6-*C*-glucoside-7-*O*-glucosid), in allen analysierten Extrakten synthetisiert. Daneben werden aus Luteolin *C*-glucoside die Isomere Orientin und Isoorientin gebildet. Orientin ist wie Vitexin (aus Apigenin) ein Flavon 8-*C*-glucoside. Die direkte Derivatisierung der Kohlenstoffatome des Grundgerüsts an dem entsprechenden *C*-Glykoside ist sehr selten [224]. Aus diesem Grunde wurden die beiden 8-*C*-Glucoside Orientin und Vitexin nicht in allen analysierten Grassilagen identifiziert. Zudem wurde Orientin in Gras und Vitexin in Gras sowie in Heu nicht detektiert.

Außer den Flavonen wurden die Isoflavone (Genistein, Biochanin A, Formononetin) und Flavonole (Kaempferol, Quercetin, Rutin) durch Dehydratation aus Naringenin als Nebenprodukte gebildet. Die Reaktion läuft jedoch insbesondere bei Grassilagen in Richtung der Flavone. Somit konnten die Isoflavone und Flavonole nur in wenigen Proben nachgewiesen werden.

Die identifizierten Isoflavone enthalten keine Zuckerkomponente im Molekül (s. Abb. 3.16 u. 3.18). Biochanin A (aus Genistein) und Formononetin (aus Daidzein) werden durch Methoxylierung in geringeren Konzentrationen nur in Grassilagen gebildet (s. Abb. 3.16 u. 3.18). Das Daidzein kann zur Formononetinsynthese vollständig verbraucht werden und wird somit nicht in allen Proben detektiert. Formononetin wurden in 11 der 65 analysierten Grassilage-Proben nachgewiesen. Zudem wurden Genistein und Biochanin A nur in einer Grassilage-Probe (K-03) mit 50,93 % igem RE-Anteil (w/w) vom Rp identifiziert.

Die Flavonole sind im Allgemeinen in Pflanzen die verbreitetsten Flavonoide, wurden jedoch in den analysierten Proben in sehr geringen Konzentrationen bestimmt. Rutin wurde nur in einer Grassilage mit 67,12 % igem RE-Anteil (w/w) vom Rp (K-20), in zwei Heu-Proben (H-02 mit 85,85 % igem RE-Anteil, H-03 mit 88,59 % igem RE-Anteil (w/w) vom Rp) und in einem Gras (G-01 mit 89,28 % igem RE-Anteil (w/w) vom Rp) identifiziert. Mit diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass ein Zusammenhang zwischen der Flavonoid-Bildung und den unterschiedlichen RE-Anteilen besteht. Zum Nachweis wurden die identifizierten Substanzen ebenfalls quantifiziert und mögliche pharmakologische Wirkungen diskutiert.



**Abbildung 3.18** Enzymatische Synthese der identifizierten Flavonoide in Grassilage, Gras und Heu. Die in dieser Arbeit identifizierten Flavonoide sind fett und blau gekennzeichnet. Die beteiligten Enzymen sind EC 1.14.13.21: Flavonoid 3'-monoxygenase [94], EC 2.4.1.91: Flavonol 3-O-glucosyltransferase [94], EC 2.4.1.159: Flavonol 3-O-glucoside L-rhamnosyltransferase [94], EC 1.14.11.22: Flavon-Synthase [223], EC 2.4.1.81: Flavon 7-O- $\beta$ -glucosyltransferase [223], EC 2.4.1.236: Flavanon 7-O-glucoside 2''-O- $\beta$ -L-rhamnosyltransferase [222-223, 225], EC 2.1.1.75: Apigenin 4'-O-methyltransferase [226], EC 2.4.1.170: Isoflavon 7-O-glucosyltransferase [94], EC 4.2.1.105: 2-Hydroxyisoflavanon dehydratase [94], EC 2.1.1.212: Isoflavon-Methyltransferase [94] (Abkürzungen: Ru: Rutinose, Glu: Glucose, UDP: Uridindiphosphat, AdoMet: S-Adenosylmethionin, Ado-Hcy: S-Adenosylhomocystein).

### 3.4.3 Quantifizierung der identifizierten Komponenten in Grassilagen, Gras, Heu und Fermenter

Im ersten Schritt wurden einzelne Komponenten aus Grassilage-, Gras-, Heu- und Fermenter-Proben identifiziert (s. Kap. 3.4.1). Aus den gewonnenen Informationen zu den einzelnen gefundenen, wie auch nicht nachgewiesenen Stoffen konnte der Biosyntheseweg in Gras, Heu und Grassilagen aufgezeigt werden (s. Kap. 3.4.2). Im nächsten Schritt war es von besonderem Interesse die gefundenen Komponenten zu quantifizieren.

Da die zu untersuchenden Materialien zu unterschiedlichsten Zeitpunkten in das Labor eingeliefert wurden, mussten zuerst Lagerungseinflüsse auf das Material selbst, wie auch zeitliche Einflüsse auf die zu untersuchenden Komponenten nach der Aufbereitung (Extraktion) untersucht werden.

#### 3.4.3.1 Auswirkungen der Lagerungszeit und Lagerungstemperatur auf die Messkomponenten

Die Konzentrationen der primären und sekundären Inhaltsstoffe in den gewonnenen Extrakten können beispielsweise durch Sauerstoffeinwirkung während der Lagerung verändert werden. In dieser Studie wurden die Veränderungen durch den Einfluss der Lagerzeit und der Lagertemperatur für alle Edukte (Aminosäuren), Zwischenprodukte (Phenolsäuren, Flavonoid-Aglykone), Nebenprodukte (Isoflavone, Flavonole) und Hauptprodukte (Flavonoid-Glykoside) der Flavonoidsynthese untersucht.

Neben Phenolsäuren und Flavonoiden wird durch enzymatische Decarboxylierung aus Phenylalanin das Biogene Amin 2-Phenylethylamin synthetisiert. Diese Verbindung wurde in 32 von insgesamt 65 untersuchten Grassilage-Proben detektiert und somit auch in diesem Versuch vermessen.

Das untersuchte Ursprungsmaterial (Grassilage, Gras und Heu) wird als natives Material bezeichnet. Über die genaue Lagerung bis zur Ankunft im Labor ist oftmals nichts bekannt. Die zu analysierenden Grassilagen und Gräser wurden möglichst umgehend nach Eingang



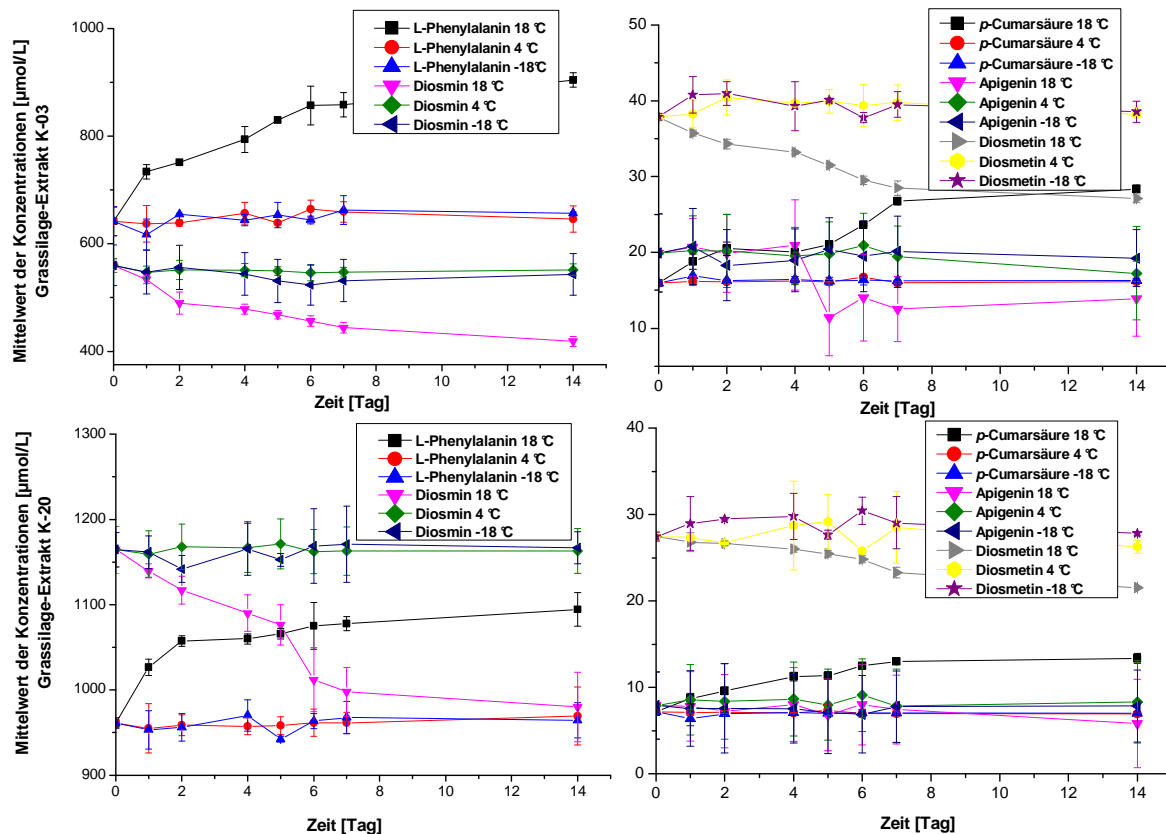
gefriergetrocknet (für 48 h). Danach wurde das Material für die eigenen qualitative (s. Kap. 3.4.1) und quantitative Untersuchungen (s. Kap. 3.4.3.2 u. 5.1.4) bei 18 °C sowie 4 °C zwischengelagert (s. Abb. 5.5).

Zur Bestimmung des Einflusses der Lagerungszeit und verschiedener Lagerungstemperaturen auf die Konzentrationen der identifizierten Komponenten wurden zwei gefriergetrocknete Grassilage-Proben (K-03 und K-20) zuerst einer Extraktion (s. Kap. 5.3.2.2) unterzogen und anschließend bei Temperaturen von 18 °C, 4 °C und -18 °C über einen Zeitraum von 14 Tagen vor Analyse gelagert.

Die beiden Grassilagen wurden ausgewählt, da alle identifizierten Komponenten der Polyphenolsynthese wie Neben- (z.B. Flavonole, Isoflavone) und Zwischenprodukte (z.B. Phenolsäuren, Flavonoid-Aglykone) in ihnen detektiert werden konnten (s. Kap. 3.4.2). Durch den Einsatz des ACN/H<sub>2</sub>O-Gemisches konnte die größte Flavonoidmenge extrahiert werden (s. Kap. 3.4.1 u. Tab. 5.19).

Nur in der Grassilage K-03 konnte 2-Phenylethylamin nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden in Abbildung 3.20 die Veränderungen der mittleren Konzentrationen während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen für das 2-Phenylethylamin nur in dem Silage-Extrakt K-03 dargestellt.

Die Abhängigkeit der Konzentration der identifizierten Komponenten von der Lagerung des extrahierten Materials bei verschiedenen Temperaturen ist als mittlere Konzentrationen nach zweifacher Vermessung mit Angabe der Standardabweichungen in Abbildung 3.19 dargestellt. Zudem wurden in Abbildung 3.19 die Konzentrationsänderung von bedeutsamen beteiligten Substanzen der Polyphenolsynthese, die in analysierten Grassilage-Proben detektiert wurden, beispielhaft (L-Phenylalanin als Edukt, *p*-Cumarsäure, Apigenin, Diosmetin als Zwischenprodukte und Diosmin als Hauptprodukt der Polyphenolsynthese) aufgetragen.



**Abbildung 3.19** Stabilität der identifizierten Komponenten L-Phenylalanin, *p*-Cumarsäure, Apigenin, Diosmetin und Diosmin in den Grassilage-Extrakten (K-03 und K-20, K: Kontrollsilage, Nährstoffanalyse s. Tab. 5.18) über einen Lagerzeitraum von 14 Tagen bei 18 °C, 4 °C und -18 °C.

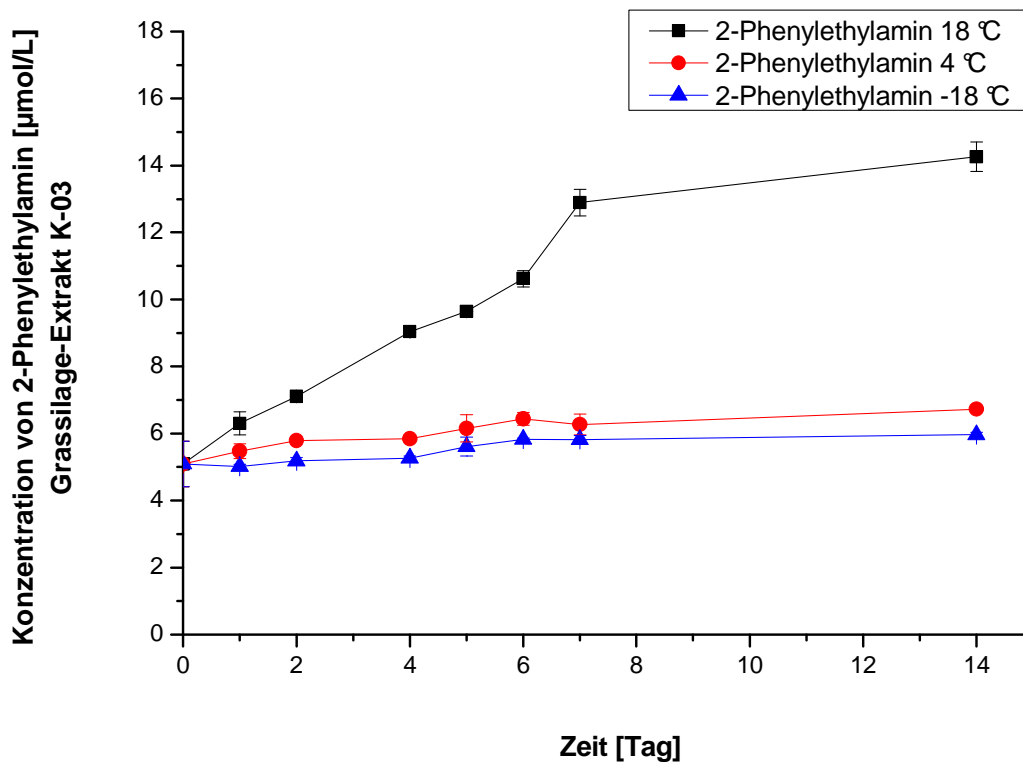
Wie in Abbildung 3.19 zu erkennen ist, wird eine deutliche Zunahme der in Grassilagen identifizierten Aminosäure- und Phenolsäurekonzentrationen mit zunehmender Lagerungsdauer unter 18 °C Temperatur beobachtet. Durch die Lagerung der Extrakte bei 18 °C sind die mittleren Konzentrationen für L-Phenylalanin ca. 21 % (K-03: von  $641,59 \pm 26,82 \mu\text{mol/L}$  auf  $903,92 \pm 13,41 \mu\text{mol/L}$ ; K-20: von  $961,28 \pm 5,89 \mu\text{mol/L}$  auf  $1094,34 \pm 19,74 \mu\text{mol/L}$ ), für L-Tyrosin ca. 44 % (K-03: von  $20,44 \pm 0,15 \mu\text{mol/L}$  auf  $40,61 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$ ; K-20: von  $36,05 \pm 1,41 \mu\text{mol/L}$  auf  $58,40 \pm 1,10 \mu\text{mol/L}$ ) und für L-Tryptophan ca. 53 % (K-03: von  $16,68 \pm 0,63 \mu\text{mol/L}$  auf  $40,63 \pm 0,08 \mu\text{mol/L}$ ; K-20: von  $29,94 \pm 3,73 \mu\text{mol/L}$  auf  $56,76 \pm 1,16 \mu\text{mol/L}$ ) gestiegen. Im Laufe der Lagerzeit können beispielsweise aufgrund der Sauerstoff-Einwirkung die in Grassilagen vorhandenen Peptide und Proteine zu Aminosäuren und Biogene Amine abgebaut werden. Die Temperaturerhöhung (18 °C) beschleunigt diese Abbaureaktionen.

Wie bei den Edukten ist auch der Mittelwert der Konzentrationen von den Zwischenprodukten (Konzentrationszunahme: *p*-Cumarsäure 45 %, Kaffeesäure 28 %, Ferulasäure 49 %, Chlorogensäure 30 %) bei Lagerungstemperaturen von 18 °C deutlich erhöht. Im Gegensatz hierzu zeigten die Flavon-Aglykone (Konzentrationsabfall:

Apigenin 39 %, Luteolin 40 %, Diosmetin 34 %, Acacetin 53 %) und Flavon-Glykoside (Konzentrationsabfall: Diosmin 26 %, Isoorientin 21 %, Vitexin 27 %) bei einer Lagerungstemperatur von 18 °C einen deutlichen Konzentrationsabfall. Dies bedeutet, dass die Flavonoide in den Extrakten im Laufe der Lagerzeit bei hohen Temperaturen ( $\geq 18$  °C) durch die Abspaltungen der Zuckerkomponente oder Hydroxy- und Methoxy-Gruppe beispielsweise zu Phenolsäuren abgebaut werden. Gleiche Konzentrationsabnahmen der Flavonoide wurden für Gerste-Extrakte im Laufe der Lagerung bei 18 °C beschrieben [227]. Außerdem können die entsprechenden Zunahmen der Phenolsäuregehalte mit Abbaureaktionen von den vorhandenen Ligninen in Grassilagen erklärt werden [209].

Im Vergleich zu einer Lagerungstemperatur von 18 °C, blieben die Konzentrationen der Messkomponenten in den Futtermittel-Extrakten bei Temperaturen von 4 °C und -18 °C bis zum Versuchsende nahezu konstant (s. Abb. 3.19). Dies weist auf eine ausreichende Stabilität dieser Substanzen (Aminosäuren, Phenolsäuren, Flavone, Flavonole und Isoflavone) in den Grassilage-Extrakten bei niedrigen Lagerungstemperaturen ( $\leq 4$  °C) hin. Da die Materialien nach Extraktion bei 4 °C gelagert wurden und innerhalb von 14 Tagen der Analyse an der LC-MS/MS zugeführt wurden, ist ein Einfluss der Lagerungsdauer und Temperatur ausgeschlossen.

Als weitere Untersuchungsergebnisse sind in Abbildung 3.20 die Veränderungen der mittleren Konzentrationen von 2-Phenylethylamin während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen in dem Silage-Extrakt K-03 dargestellt.



**Abbildung 3.20** Stabilität von 2-Phenylethylamin in dem Grassilage-Extrakt K-03 (K: Kontrollsilage) über einen Lagerungszeitraum von 14 Tage bei 18 °C, 4 °C und -18 °C.

In Abbildung 3.20 ist deutlich zu erkennen, dass die Konzentrationen von 2-Phenylethylamin im Gegensatz zu denen der Flavonoide (s. Abb. 3.19) durch die Lagerungszeit und Lagertemperatur (Konzentrationszunahme: bei 18 °C 64 %, bei 4 °C 24 %, bei -18 °C 15 %) erheblich zugenommen hat. Werden die Lagertemperaturen miteinander verglichen, ist im Laufe der Lagerzeit bei 18 °C die höchste Veränderung bei den 2-Phenylethylamin-Gehalten beobachten. Ferner wurde bei -18 °C die geringste Konzentrationsanstieg im Vergleich zu den bei höheren ( $\geq 4$  °C) Temperaturen ermittelt. Der Variationskoeffizient der Präzision in der Serie von 2-Phenylethylamin bei -18 °C ist 3,27 %. Somit resultieren die Ergebnisse bei -18 °C aus geringfügig veränderten Konzentrationen (Zunahme: 15 %) während der Lagerung und nicht aus Messungenauigkeiten. Die Konzentrationszunahme von 2-Phenylethylamin lässt sich mit der Instabilität und Zerlegung der vorhandenen Peptide und Proteine in Aminosäuren und Biogene Amine erklären [46, 66].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erarbeiteten Untersuchungsergebnisse entweder auf eine unzureichende Stabilität der Aminosäuren, Biogenen Aminen, Phenolsäuren und Flavonoide in den extrahierten Futtermittel-Proben bei den hohen Lagerungstemperaturen ( $\geq 18$  °C) hinweisen und/oder es finden weitere Abbaureaktionen der Flavonoide, Proteine und Peptide in den Extrakten während der Lagerung statt, die die Menge der Aminosäuren,

Biogenen Aminen und Phenolsäuren vergrößern und im Gegensatz dazu die Gehalte der Flavonoide durch Spaltungsreaktionen reduzieren. Die Konzentrationen der identifizierten Komponenten (Phenolsäuren, Flavone, Flavonole und Isoflavone) aus Aminosäuren sind in den Extrakten während der Lagerung bei niedrigeren Temperaturen ( $\leq 4\text{ °C}$ ) stabil, das Syntheseprodukt Phenylethylamin steigt jedoch bei jeder Lagerungstemperatur an. Somit hat die Lagerungszeit bei niedrigen Temperaturen ( $\leq 4\text{ °C}$ ) keinen Einfluss auf die Konzentration der identifizierten Aminosäuren, Phenolsäuren und Flavonoide in den Futtermitteln.

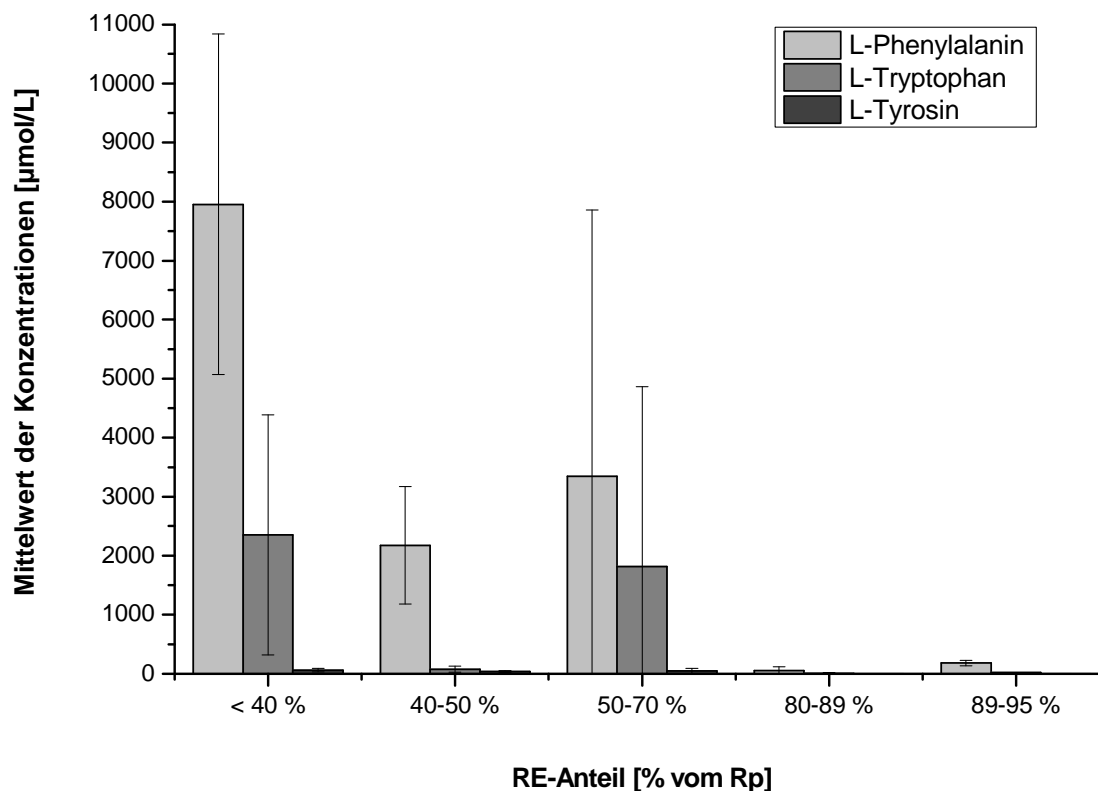
#### **3.4.3.2 Einfluss des prozentualen Reineiweißanteils (RE/Rp) auf die Konzentration der identifizierten Komponenten in Grassilagen, Gras und Heu**

Da die untersuchten Futtermittel als eine Ursache für das Krankheitsbild "Faktorenerkrankung Milchviehherde" diskutiert werden, wurden die in dieser Studie eingesetzten Grassilagen ( $n= 14$ ), Heu ( $n= 3$ ) und Gras ( $n= 2$ ) nach ihren prozentualen RE-Anteilen am Rohprotein (RE/Rp, w/w) in fünf Gruppen  $< 40\%$ ,  $40\text{-}50\%$ ,  $50\text{-}70\%$ ,  $80\text{-}89\%$  und  $89\text{-}95\%$  eingeteilt (s. Tab. 5.18). Bei dem Krankheitsbild wurden sinkende prozentuale RE-Gehalte ( $< 50\%$  RE/Rp, w/w) als eine Ursache erkannt und diskutiert [1].

Der RE-Anteil liegt in dem eingesetzten Heu bei  $80\text{-}89\%$  und Gras bei  $89\text{-}95\%$  (w/w) vom Rp. Dagegen liegt der prozentuale RE-Anteil in Grassilagen auf Grund von Ernte und Silierung nur zwischen  $25\text{-}70\%$  (w/w) vom Rp (Gruppe  $< 40\%$ :  $n= 5$ ; Gruppe  $40\text{-}50\%$ :  $n= 6$ ; Gruppe  $50\text{-}70\%$ :  $n= 3$ ) [1-2, 33, 45-46].

Die eingesetzten Grassilagen (sVnE-GS) wurden gleich nach der Ankunft im Labor extrahiert. Nach der Extraktion wurden die Komponenten in den zu untersuchenden Futtermittel-Proben (Grassilage, Gras u. Heu) sofort an der LC-ESI-MS/MS quantifiziert.

In Abbildung 3.21 sind die Mittelwerte der Edukte-Konzentrationen von L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan in Abhängigkeit vom RE-Anteil dargestellt.



**Abbildung 3.21** Auswirkungen der unterschiedlichen prozentualen RE-Anteile (w/w) vom Rp auf den Mittelwert der Konzentrationen der Edukte (L-Phenylalanin, L-Tyrosin) der Polyphenolsynthese und L-Tryptophan für die Fragmentationen in den LC-ESI-MS-Analysen der Grassilage-, Gras- und Heu-Proben (Anzahl der analysierten Proben für die Grassilage: < 40 % n= 5, 40-50 % n= 6, 50-70 % n= 3; Heu: 80-89 % n= 3; Gras: 89-95 % n= 2).

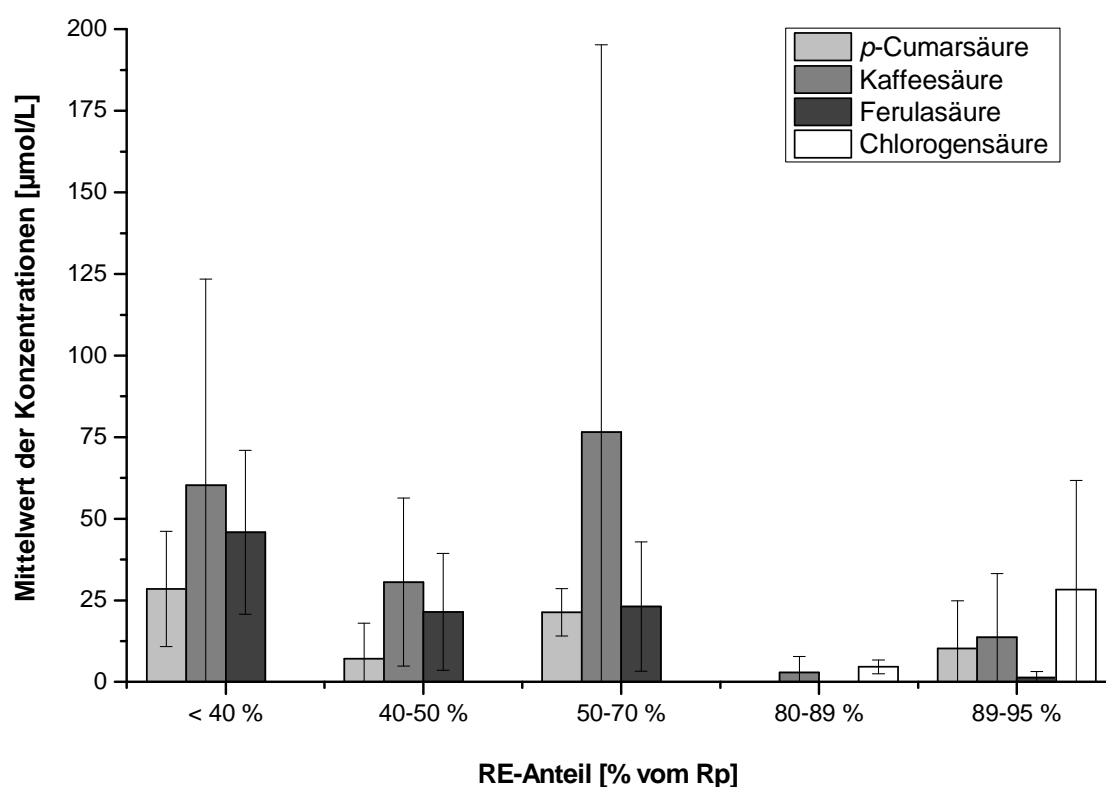
Wie an den hohen Standardabweichungen in Abbildung 3.21 zu erkennen ist, sind die Konzentrationen der identifizierten Substanzen in den analysierten Futtermittel-Proben sehr unterschiedlich. Die Zuverlässigkeit dieser Messergebnisse wurde zum einen durch die zweimalige Analyse jeder einzelnen Futtermittel-Probe kontrolliert (s. Kap. 5.3.6). Die zweifache Vermessung jeder einzelnen Probe lieferte sehr ähnliche Flächenintegrale für die in dieser Arbeit identifizierten Komponenten (beispielhaft s. Abb. 3.19-3.20). Zum anderen wurde die Präzision der LC-ESI-MS-Messung durch dreimalige Vermessung mit einem externen Standard (s. Kap. 5.3.5 u. 5.3.6) täglich überprüft und eine ausreichende Messgenauigkeit erzielt (Standard-Proben:  $\emptyset$  3,73 % VK in der Serie; s. Tab. 5.29). Ein ähnliches Ergebnis (LC-ESI-MS/MS:  $\emptyset$  2,37 % VK in der Serie) ist für die Präzisionsmessung der angewendeten Methode in der Literatur beschrieben [195]. Somit resultieren die hohen Standardabweichungen der Quantifizierungsergebnisse nicht aus Messungenauigkeiten, sondern basieren vielmehr auf den unterschiedlichen Konzentrationen bzw. Eigenschaften der analysierten Proben.

Die Bildung der identifizierten Substanzen in diesen Proben wird vor allem durch die Heterogenität des Silierungsprozesses beeinflusst. Auch die Unterschiede in pH-Wert (s. Tab. 5.18), Schnittzeitpunkt, Schnittfrequenz sowie in Nährstoffwerten (s. Tab. 5.18) wirken sich auf die Konzentrationen der identifizierten Komponenten in Grassilagen, Gras sowie Heu und erhöhen die Standardabweichungen. Außerdem wurden die identifizierten Komponenten der Polyphenolsynthese wie Neben- und Zwischenprodukte nicht in allen Proben einer Futtermittel-Gruppe detektiert. Diese Nullwerte der Konzentrationen wurden bei der Berechnung der mittleren Konzentrationen mitberücksichtigt. Dies führte zu sehr hohen Abweichungswerten in den entsprechenden Gruppen. Aufgrund dieser hohen Standardabweichungen sowie unterschiedlicher Besetzung der Gruppen wurde in dieser Arbeit mittels t-Test (Programm SPSS-Output) die statistische Relevanz überprüft, indem die Mittelwerte der Konzentrationen bzw. Flächenintegrale der Stichproben auf signifikante Unterschiede untersucht wurden. Durch das Logarithmieren der Mittelwerte erreichte die Verteilung der Parameter der Stichproben eine annähernde Normalverteilung. Die detaillierten Informationen der statistischen Auswertung für die unabhängigen Stichproben wurden im Kapitel 5.1.4 zusammengestellt. Im Vergleich dazu wurden in diesem Kapitel zur Interpretation der Quantifizierungsergebnisse die normalen arithmetischen mittleren Konzentrationen genutzt.

Wie in Abbildung 3.21 zu erkennen ist, sind die mittleren Konzentrationen für die identifizierten Aminosäuren in Gras und Heu im Vergleich zu Grassilagen relativ gering (s. Tab. 3.6). Der Silierungsprozess ist ein wichtiger Faktor für den freien Aminosäure-Gehalt [1, 46, 66, 192]. Während der Silierung findet in der Grünpflanze eine Proteolyse des Reineiweißes statt und führt zu einem höheren Anteil an freien Aminosäuren in Silagen als bei Gras und Heu [33, 45-46].

Die identifizierten L-Phenylalanin und L-Tyrosin in den analysierten Futtermitteln sind die Edukte der Synthese der Phenolsäuren und Flavonoide (s. Kap. 3.4.2). Die dritte abgebildete Aminosäure L-Tryptophan reagiert nicht in der Flavonoidsynthese (s. Abb. 3.17) [20]. Dagegen kann es in den Futtermitteln für die Peptid- und Proteinsynthese genutzt werden [20]. Im Allgemeinen können die entsprechenden Aminosäuren in Pflanzen als Edukte zur Synthese der primären und sekundären Naturstoffe wie z.B. der Biogenen Amine, Peptide, Proteine, Alkaloide, Lignine und Flavonoide dienen [20, 46, 66, 94, 192]. Werden die mittleren Konzentrationen der analysierten Silagen miteinander verglichen (s. Abb. 3.21), sind bei den Silagen mit < 40 % RE-Anteil höhere Aminosäuregehalte als bei denen über 40 % RE-Anteil zu beobachten. Die niedrigsten Aminosäure-Konzentrationen wurden in den

Silagen mit 40-50 % RE-Anteil ermittelt. Aufgrund des Verbrauchs der Aminosäuren zur Flavonoidsynthese liegt die Vermutung nahe, dass die Flavonoide in den Grassilagen mit > 40 % RE-Anteil in höheren Konzentrationen vorliegen als in Silagen < 40 % RE-Anteil. Dieses Verhältnis sollte ebenfalls bei den weiteren Zwischenprodukten der Flavonoidsynthese zu beobachten sein. Hierfür wurden wie bei den identifizierten Edukten (Aminosäuren) auch für alle teilnehmenden Zwischenprodukte der Polyphenolsynthese die Konzentrationen berechnet und in Abbildung 3.22 dargestellt.



**Abbildung 3.22** Auswirkungen der unterschiedlichen prozentualen RE-Anteile (w/w) vom Rp auf den Mittelwert der Konzentrationen der Zwischensubstanzen *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure der Polyphenolsynthese und das Produkt Chlorogensäure aus Kaffeesäure für die Fragmentionen in den LC-ESI-MS-Analysen der Grassilage-, Gras- und Heu-Proben (Anzahl der analysierten Proben für die Grassilage: < 40 % n= 5, 40-50 % n= 6, 50-70 % n= 3; Heu: 80-89 % n= 3; Gras: 89-95 % n= 2).

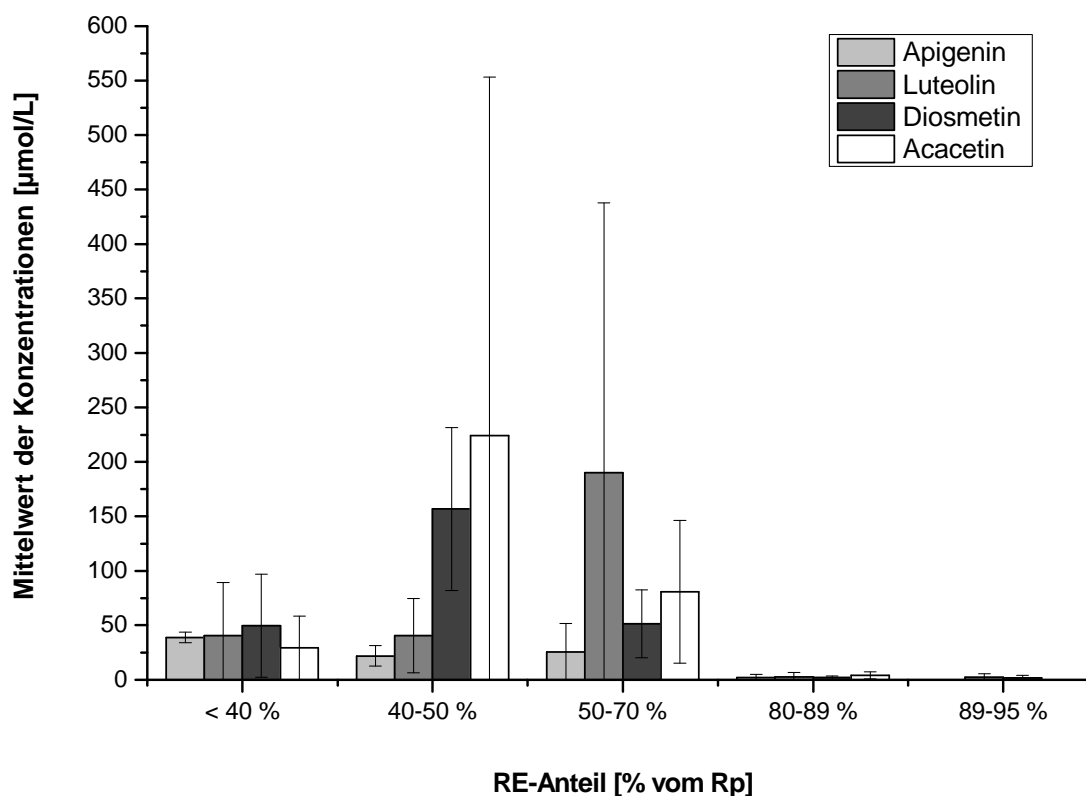
Wie in Abbildung 3.22 zu erkennen ist, weisen die Zwischenprodukte (Phenolsäuren) ein ähnliches Mengenverhältnis wie die Edukte auf. Für das Zwischenprodukt *p*-Cumarsäure zur Synthese der Flavonoide und Lignine (s. Abb. 3.17) wurden niedrigere Konzentrationen als für die weiteren Produkte Kaffeesäure und Ferulasäure festgestellt. In den Silagen mit < 40 % RE-Anteil wurde die höchste mittlere Konzentration von *p*-Cumarsäure im Vergleich zu den Silagen mit höheren RE-Anteilen ermittelt. Diese Untersuchungen bestätigten, dass die Edukte und Zwischenverbindungen der Polyphenole in Silagen mit höheren RE-Anteilen (> 40 % (w/w) vom Rp) für die Biosynthese der Flavonoide in größeren Mengen verbraucht



werden. Außerdem wurde in Grassilagen eine geringere Ferulasäuremenge als ihre Ausgangskomponente Kaffeesäure ermittelt. Die Reaktion in diesen Grassilagen läuft vermutlich nicht weiter zur Ligninsynthese.

Als weiteres Resultat wurde das Produkt Chlorogensäure aus Kaffeesäure (s. Abb. 3.17) in allen untersuchten Gras- (28,28  $\mu\text{mol/L}$ ) und Heu-Proben (4,63  $\mu\text{mol/L}$ ) identifiziert. Jedoch wurde diese Verbindung nur in 2 von insgesamt 65 analysierten Grassilage-Proben nachgewiesen (K-23: 54,06 % RE-Anteil (w/w) vom Rp, 3,30  $\mu\text{mol/L}$  Chlorogensäure; K-20: 67,12 % RE-Anteil (w/w) vom Rp, 9,51  $\mu\text{mol/L}$  Chlorogensäure). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die hinreichenden RE-Anteile die Synthese der Chlorogensäure aus Kaffeesäure und Chinasäure in Gras und Heu ermöglicht wird. Außerdem wurde die Ferulasäure in sehr geringeren Konzentrationen in Gras und Heu gegenüber den Grassilagen identifiziert. Auf dieser Basis laufen die Reaktionen mit über 80 % RE-Anteil insbesondere in Richtung der Lignine bzw. Chlorogensäure (s. Abb. 3.17).

Außer den Kaffee-, Ferula- und Chlorogensäure werden in den untersuchten Futtermitteln aus *p*-Cumarsäure die weiteren Zwischenprodukte Flavon-Aglykone der Flavon-Glykoside synthetisiert (s. Abb. 3.18). Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der unterschiedlichen RE-Anteile auf die Konzentrationen der Flavon-Aglykone im Detail diskutiert (s. Abb. 3.23).



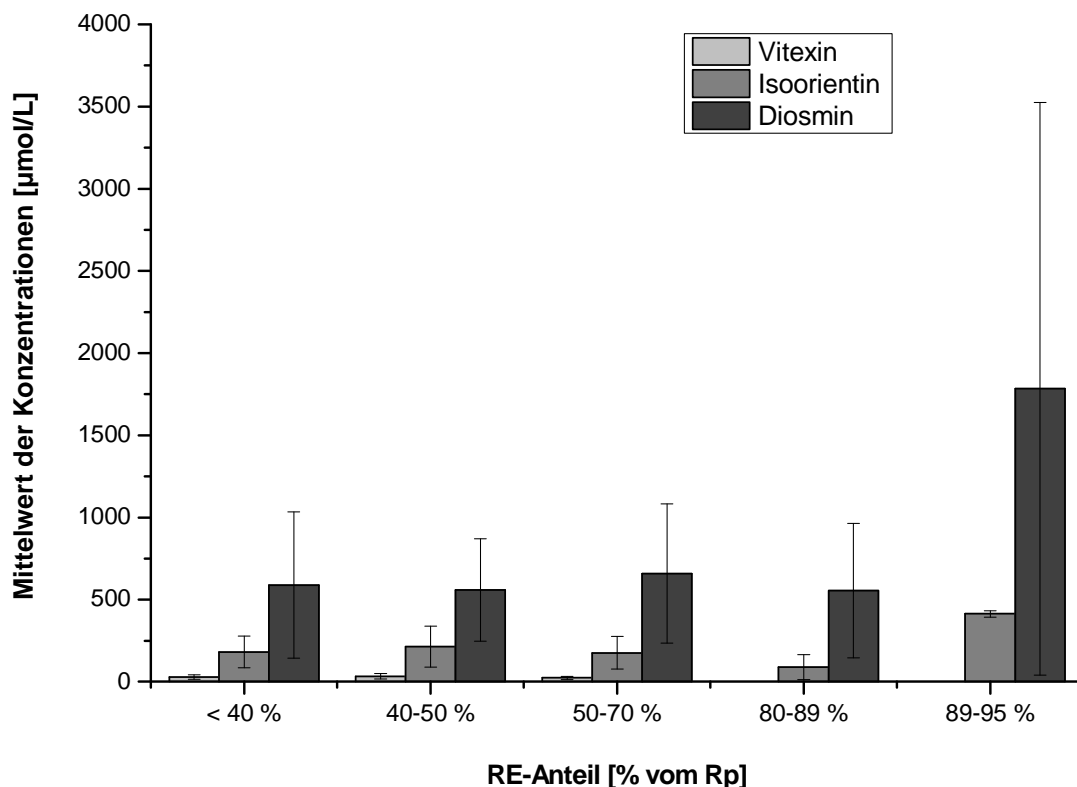
**Abbildung 3.23** Auswirkungen der unterschiedlichen prozentualen RE-Anteile (w/w) vom Rp auf den Mittelwert der Konzentrationen der Flavon-Aglykone (Apigenin, Luteolin, Diosmetin, Acacetin) für die

Fragmentationen in den LC-ESI-MS-Analysen der Grassilage-, Gras- und Heu-Proben (Anzahl der analysierten Proben für die Grassilage: < 40 % n= 5, 40-50 % n= 6, 50-70 % n= 3; Heu: 80-89 % n= 3; Gras: 89-95 % n= 2).

Wie in Abbildung 3.23 zu erkennen ist, wurden die Zwischenprodukte Flavon-Aglykone der Flavonsynthese nicht in allen Proben detektiert und dieser Unterschied führte zu höheren Abweichungswerten gegenüber den Hauptprodukten (s. Abb. 3.24).

Luteolin, Diosmetin und Acacetin werden in den analysierten Silagen aus Apigenin synthetisiert (s. Abb. 3.18), deshalb wurden für Apigenin die geringsten Konzentrationen ermittelt. In den Grassilagen mit 40-50 % RE-Anteil (w/w) vom Rp wurden für Diosmetin (Synthese aus Apigenin über Luteolin) und Acacetin (Synthese aus Apigenin) die höchsten Mittelwerte gegenüber den Silagen mit < 40 % und > 50 % RE-Anteil (w/w) vom Rp ermittelt. Dagegen wurde für Luteolin (Synthese aus Apigenin) die niedrigste Menge berechnet, weil aus Luteolin mehr Produkte (Diosmetin, Luteolin 7-*O*-rutinosid über Luteolin 7-*O*-glucosid, Orientin und Isoorientin) synthetisiert werden als aus Diosmetin (Diosmin über Diosmetin 7-*O*-glucosid) und Acacetin (Pectolinarin und Acaciin über Acacetin 7-*O*-glucosid, Diosmin über Acaciin) (s. Abb. 3.18). Im Vergleich dazu wurden bei Silagen mit 50-70 % RE-Anteil (w/w) vom Rp für Luteolin die höchsten Mittelwerte gegenüber den Silagen mit < 40 % und > 50 % RE-Anteil (w/w) vom Rp festgestellt.

In Gras und Heu mit > 80 % RE-Anteil wurden die niedrigsten Aglykongehalte ermittelt. Zudem wurde Acacetin in Gras nicht detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Reaktion bei 40-50 % RE-Anteil im höheren Bereich bis zum Flavon-Aglykon (Diosmetin über Luteolin) läuft. In Abbildung 3.24 werden die Konzentrationen des strukturell unterschiedlichen Flavon-Glykosids Diosmin (Flavon 7-*O*-rutinoside) und Flavon-Glucosids Isoorientin (Flavon 6-*C*-glucoside) sowie Vitexin (Flavon 8-*C*-glucoside) verglichen.



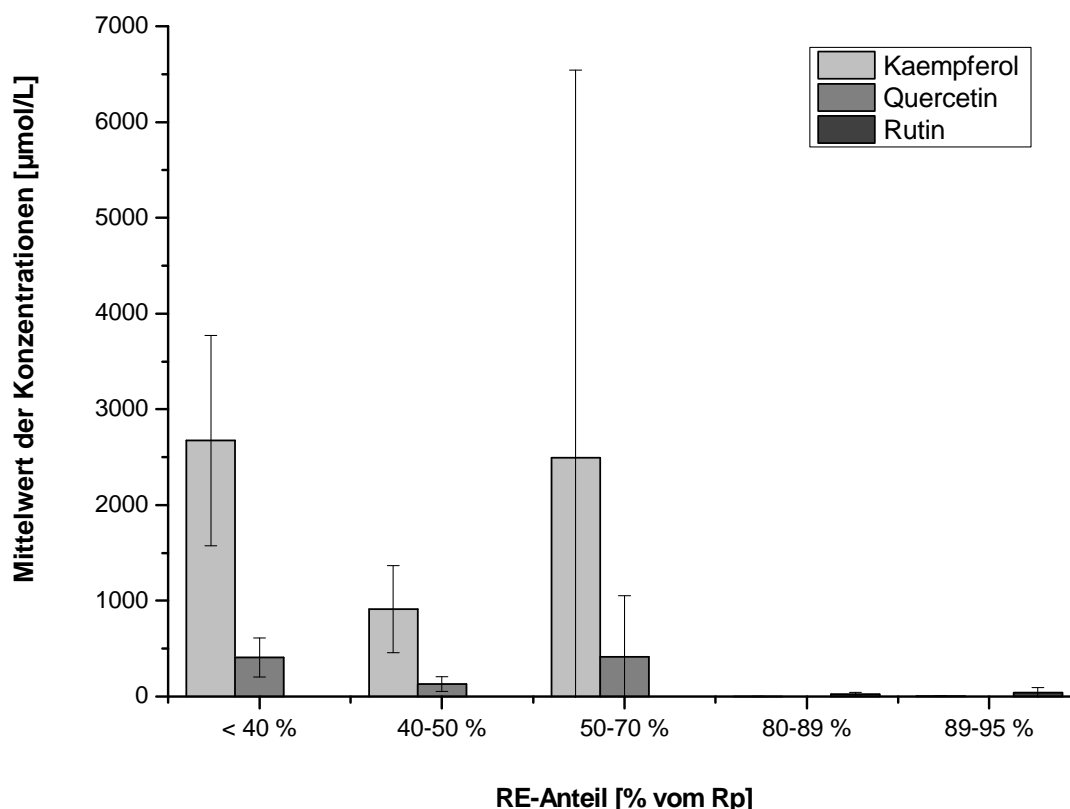
**Abbildung 3.24** Auswirkungen der unterschiedlichen prozentualen RE-Anteile (w/w) vom Rp auf den Mittelwert der Konzentrationen des Hauptprodukts Diosmin (Flavon 7-*O*-glykoside), der Nebenprodukte Isoorientin (Flavon 6-*C*-glucoside) und Vitexin (Flavon 8-*C*-glucoside) für die Fragmentationen in den LC-ESI-MS-Analysen der Grassilage-, Gras- und Heu-Proben (Anzahl der analysierten Proben für die Grassilage: < 40 % n= 5, 40-50 % n= 6, 50-70 % n= 3; Heu: 80-89 % n= 3; Gras: 89-95 % n= 2).

In allen Proben wurde das Flavon-Glykosid Diosmin in größeren Konzentrationen (s. Abb. 3.24) im Vergleich zu Flavon-Aglykonen (s. Abb. 3.23) nachgewiesen. Bei Vergleich der Ergebnisse mit Edukten und Zwischenkomponenten der Flavonsynthese (s. Abb. 3.21-3.23) zeigten das Hauptprodukt Diosmin eine umgekehrte grafische Darstellung (s. Abb. 3.24). Zudem zeigen die Konzentrationen von Diosmin in den Silagen trotz unterschiedlicher RE-Anteile keine starken Abweichungen, sie sind bei Proben 50-70 % RE-Anteil leicht erhöht. Dagegen wurde in Gras deutlich höhere Diosmin-Konzentration als in Heu und Silagen ermittelt. Die Silierung und der Trocknungsprozess könnten in der Silage und im Heu die Synthese von Diosmin beeinflussen. Diese Ergebnisse erklären ebenfalls die geringeren Konzentrationen der Aminosäuren in Gras-Proben (s. Abb. 3.21).

Da die direkte Derivatisierung an Kohlenstoffatomen des Grundgerüsts zu den entsprechenden *C*-Glykosiden recht selten ist [224], wurden die Flavon *C*-glucoside (Saponarin, Vitexin, Orientin und Isoorientin) als Nebenprodukte in geringeren Konzentrationen nachgewiesen (s. Tab. 3.6). Zudem wurde Orientin nicht in allen untersuchten Proben detektiert. Isoorientin und Orientin sind Isomere und es wurde in allen

Proben mehr Isoorientin als Orientin gebildet (s. Tab. 3.6). Für Isoorientin, Orientin und Vitexin wurden in den Grassilagen die höchsten Konzentrationen bei Silagen mit 40-50 % RE-Anteil berechnet (s. Tab. 3.6 u. Abb. 3.24). Zudem wurde Vitexin in den über 80 % RE-Anteil enthaltenen Heu- und Gras-Proben nicht detektiert.

Die Isoflavone und Flavonole sind aktiver als Flavone und werden als weitere Produkte aus Naringenin gebildet (s. Abb. 3.18). Die mittleren Konzentrationen der in Futtermittel identifizierten Flavonole wurden in Abbildung 3.25 dargestellt.



**Abbildung 3.25** Auswirkungen der unterschiedlichen prozentualen RE-Anteile (w/w) vom Rp auf den Mittelwert der Konzentrationen der identifizierten Flavonole (Kaempferol, Quercetin, Rutin) der Polyphenolsynthese für die Fragmentionen in den LC-ESI-MS-Analysen der Grassilage-, Gras- und Heu-Proben (Anzahl der analysierten Proben für die Grassilage: < 40 % n= 5, 40-50 % n= 6, 50-70 % n= 3; Heu: 80-89 % n= 3; Gras: 89-95 % n= 2).

Im Vergleich zu den anderen Zwischenprodukten (Flavon-Aglykone; s. Abb. 3.23) wurden für Kaempferol in den Silagen höhere Konzentrationen als für Quercetin (aus Kaempferol) und Rutin (aus Quercetin) bestimmt. In den eingesetzten Silagen läuft die Reaktion aus Kaempferol in Richtung der Flavonol-Glucoside (Quercetin) ziemlich begrenzt (s. Abb. 3.18). Zudem ist das Flavonol-Glykosid Rutin allgemein in Pflanzen den verbreitetsten Flavonoid in der Familie von Flavonoid-Klassen [20], wurden aber diese Verbindung in dieser Studie nur in einer Silage (K-20: 23,36 µmol/L Rutin; 67,12 % RE-Anteil (w/w) vom Rp) von insgesamt 65 analysierten Grassilage-Proben (s. Tab. 5.18) nachgewiesen. Während die Konzentrationen

für Kaempferol und Quercetin in Silagen mit < 40 % RE-Anteil und 50-70 % RE-Anteil ähnlich hoch sind, wiesen die Silagen mit 40-50 % RE-Anteil deutlich niedrigere Konzentrationen bei diesen Verbindungen auf. Demzufolge zeigten die mittleren Konzentrationen von Kaempferol und Quercetin in der Silage keine Abhängigkeit vom RE-Anteil.

Daneben wurden in den Silagen mit 50-70 % RE-Anteil die höchsten Standardabweichungen festgestellt. Die Grassilage K-13 mit 67,34 % RE-Anteil zeigte für Kaempferol (7.165,34  $\mu\text{mol/L}$ ) und Quercetin (1.149,57  $\mu\text{mol/L}$ ) deutlich höhere Konzentrationen als die in dieser Grassilage-Gruppe vorhandenen anderen Proben (für Silage K-05 mit 53,01 % RE-Anteil: Kaempferol: 298,05  $\mu\text{mol/L}$ , Quercetin: 93,74  $\mu\text{mol/L}$ ; für Silage K-09 mit 56,37 % RE-Anteil: Kaempferol: 14,27  $\mu\text{mol/L}$ , Quercetin nicht detektiert). Dieser große Konzentrationsunterschied innerhalb der Gruppen führt zu höheren Standardabweichungen für die Mittelwerte der Konzentrationen.

Im Vergleich zu den Grassilagen wurden die Flavonole in Gras- und Heu-Proben gar nicht oder in ganz geringen Konzentrationen bestimmt. So wurde Rutin in zwei Heu-Proben (H-03: 88,59 % RE-Anteil (w/w) vom Rp, 30,66  $\mu\text{mol/L}$ ; H-02: 85,85 % RE-Anteil (w/w) vom Rp, 38,88  $\mu\text{mol/L}$ ) und in einer Gras-Probe (G-01: 89,28 % RE-Anteil (w/w) vom Rp, 77,42  $\mu\text{mol/L}$ ) identifiziert. Daneben wurde Quercetin in Gras und Heu nicht charakterisiert. Kaempferol wurde in nur einer Gras-Probe (G-01: 6,58  $\mu\text{mol/L}$  mit 89,28 % RE-Anteil (w/w) vom Rp) und einer Heu-Probe (H-02: 4,93  $\mu\text{mol/L}$  mit 85,85 % RE-Anteil (w/w) vom Rp) festgestellt. Kaempferol und Quercetin können in Gras- und Heu-Proben zur Synthese von Rutin verbraucht werden.

Als weiteres Nebenprodukt wurde in 4 von insgesamt 19 Futtermittel-Proben, die in diesem Kapitel 3.4.3.2 analysiert wurden, das Isoflavon Formononetin ohne Zuckerkomponente identifiziert. Formononetin wird aus Daidzein gebildet (s. Abb. 3.18) und aufgrund des vollständigen Verbrauchs in den analysierten Futtermitteln wird Daidzein nicht detektiert. Zudem wurde Formononetin in 3 Silagen (S-01, S-03, S-14: mittlere Konzentration  $9,54 \pm 4,59 \mu\text{mol/L}$ ) von insgesamt 5 Silagen mit < 40 % RE-Anteil und in einer Silage (K-05: 11,84  $\mu\text{mol/L}$ ; 53,01 % RE-Anteil (w/w) vom Rp) von insgesamt 3 Silagen mit 50-70 % RE-Anteil nachgewiesen. Diese Verbindung wurde in den Grassilagen mit 40-50 % RE-Anteil (n= 6) und in den über 80 % RE-Anteil enthaltenen Heu- (n= 3) sowie Gras-Proben (n= 2) nicht identifiziert.

Zusätzlich wurden die weitere nachgewiesene Isoflavone Genistein und Biochanin A nur in einer Grassilage (K-03: 50,93 % RE-Anteil (w/w) vom Rp) detektiert (s. Tab. 5.18). In dieser

Grassilage beträgt die Konzentration von Genistein 14,34  $\mu\text{mol/L}$ , von Biochanin A 211,53  $\mu\text{mol/L}$  und von Formononetin 126,07  $\mu\text{mol/L}$ . Wegen der Verwendung von Genistein in der Biochanin A Synthese wurde Genistein in einer sehr geringen Konzentration nachgewiesen. Aus diesen Daten geht hervor, dass die Menge der identifizierten Isoflavone (Formononetin, Genistein, Biochanin A) in Silagen unabhängig vom RE-Anteil ist.

Die Unterschiede zwischen Grassilagen, Gras und Heu nach RE-Gehalten im Zusammenhang mit den einzelnen nachgewiesenen phenolischen Komponenten sind tabellarisch zusammengefasst (s. Tab. 3.6). Durch die Quantifizierung konnten die Umwandlungswege für die identifizierten Komponenten in den verschiedenen Futtermittel-Proben postuliert werden (s. Abb. 3.17-3.18).

**Tabelle 3.6** LC-ESI-MS/MS-Quantifikation der identifizierten Komponenten in Grassilage, Gras und Heu (Symbole:  $\sum n$ : Die Gesamtanzahl der analysierten Proben; n: Gesamtzahl der Proben, in denen die identifizierten Substanzen detektiert wurden; n. q.: nicht quantifiziert; n. d.: nicht detektiert).

Identifizierte Komponenten	Arithmetische Mittelwerte der Konzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ]				
	Grassilagen			Heu	Gras
	< 40 % $\sum n=5$	40-50 % $\sum n=6$	50-70 % $\sum n=3$	80-89 % $\sum n=3$	89-95 % $\sum n=2$
<b>Aminosäuren</b>					
L-Phenylalanin	7.954,57 n= 5; 100 %	2.177,63 n= 6; 100 %	3.346,89 n= 3; 100 %	56,27 n= 3; 100 %	181,36 n= 2; 100 %
L-Tyrosin	58,97 n= 5; 100 %	35,30 n= 6; 100 %	49,76 n= 3; 100 %	1,83 n= 3; 100 %	2,79 n= 2; 100 %
L-Tryptophan	2.354,73 n= 5; 100 %	79,28 n= 6; 100 %	1.813,65 n= 3; 100 %	7,78 n= 3; 100 %	17,60 n= 2; 100 %
<b>Biogene Amin</b>					
2-Phenylethylamin	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	1,55 n= 1 <sup>1</sup> ; 33 %	0 n= 0; n. d.
<b>Phenolsäuren</b>					
Kaffeensäure	60,24 n= 5; 100 %	30,57 n= 4; 67 %	76,59 n= 3; 100 %	2,87 n= 1 <sup>1</sup> ; 33 %	13,76 n= 1 <sup>2</sup> ; 50 %
Chlorogensäure	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	4,63 n= 3; 100 %	28,28 n= 2; 100 %
<i>p</i> -Cumarsäure	28,51 n= 4; 80 %	7,08 n= 3; 50 %	21,35 n= 3; 100 %	0 n= 0; n. d.	10,32 n= 1 <sup>2</sup> ; 50 %
Ferulasäure	45,86 n= 5; 100 %	21,45 n= 5; 83 %	23,09 n= 3; 100 %	0 n= 0; n. d.	1,32 n= 1 <sup>2</sup> ; 50 %
<b>Flavon-Aglykone</b>					
Acacetin	29,19 n= 5; 100 %	224,06 n= 6; 100 %	80,64 n= 3; 100 %	4,17 n= 3; 100 %	0 n= 0; n. d.
Apigenin	38,78 n= 5; 100 %	21,97 n= 6; 100 %	25,41 n= 3; 100 %	1,81 n= 1 <sup>1</sup> ; 33 %	0 n= 0; n. d.
Diosmetin	49,56 n= 5; 100 %	156,76 n= 6; 100 %	51,43 n= 3; 100 %	1,82 n= 2; 67 %	1,68 n= 1 <sup>2</sup> ; 50 %
Luteolin	40,37 n= 5; 100 %	40,48 n= 6; 100 %	190,15 n= 3; 100 %	2,49 n= 1 <sup>3</sup> ; 33 %	2,23 n= 1 <sup>2</sup> ; 50 %

<b>Flavon-Glykoside und Glucoside</b>					
Acaciin	n. q. n= 5; 100 %	n. q. n= 6; 100 %	n. q. n= 3; 100 %	n. q. n= 3; 100 %	n. q. n= 2; 100 %
Diosmin	588,28 n= 5; 100 %	599,01 n= 6; 100 %	657,84 n= 3; 100 %	553,52 n= 3; 100 %	1.782,81 n= 2; 100 %
Isoorientin	180,75 n= 5; 100 %	213,20 n= 6; 100 %	175,42 n= 3; 100 %	88,97 n= 3; 100 %	412,68 n= 2; 100 %
Isorhoifolin	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	n. q. n= 2; 67 %	n. q. n= 2; 100 %
Luteolin 7- <i>O</i> - rutinosid	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	n. q. n= 3; 100 %	n. q. n= 2; 100 %
Orientin	n. q. n= 4; 80 %	n. q. n= 6; 100 %	n. q. n= 2; 67 %	n. q. n= 2; 67 %	0 n= 0; n. d.
Pectolarin	n. q. n= 1 <sup>4</sup> ; 20 %	n. q. n= 5; 83 %	n. q. n= 2; 67 %	n. q. n= 2; 67 %	n. q. n= 2; 100 %
Saponarin	n. q. n= 5; 100%	n. q. n= 6; 100 %	n. q. n= 3; 100 %	n. q. n= 3; 100 %	n. q. n= 2; 100 %
Vitexin	28,65 n= 5; 100 %	32,69 n= 6; 100 %	22,61 n= 3; 100 %	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.
<b>Flavonol-Aglykone</b>					
Kaempferol	2.674,60 n= 5; 100 %	912,36 n= 6; 100 %	2.492,55 n= 3; 100 %	1,64 n= 1 <sup>3</sup> ; 33 %	3,29 n= 1 <sup>2</sup> ; 50 %
Quercetin	407,74 n= 5; 100 %	131,54 n= 6; 100 %	414,45 n= 2; 67 %	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.
<b>Flavonol-Glykoside</b>					
Rutin	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	23,18 n= 2; 67 %	38,71 n= 1 <sup>2</sup> ; 50 %
<b>Isoflavon-Aglykone</b>					
Genistein	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.
Biochanin A	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.
Formononetin	5,72 n= 3; 60 %	0 n= 0; n. d.	3,95 n= 1 <sup>5</sup> ; 33 %	0 n= 0; n. d.	0 n= 0; n. d.

<sup>1-5</sup>: Die Gesamtzahl der Proben mit RE-Anteil vom Rp, in denen die identifizierten Substanzen detektiert wurden.

<sup>1</sup>Heu-Probe (H-01): 82,01 % RE-Anteil (w/w) vom Rp

<sup>2</sup>Gras-Probe (G-01): 89,28 % RE-Anteil (w/w) vom Rp

<sup>3</sup>Heu-Probe (H-02): 85,85 % RE-Anteil (w/w) vom Rp

<sup>4</sup>Grassilage-Probe (S-20): 38,36 % RE-Anteil (w/w) vom Rp

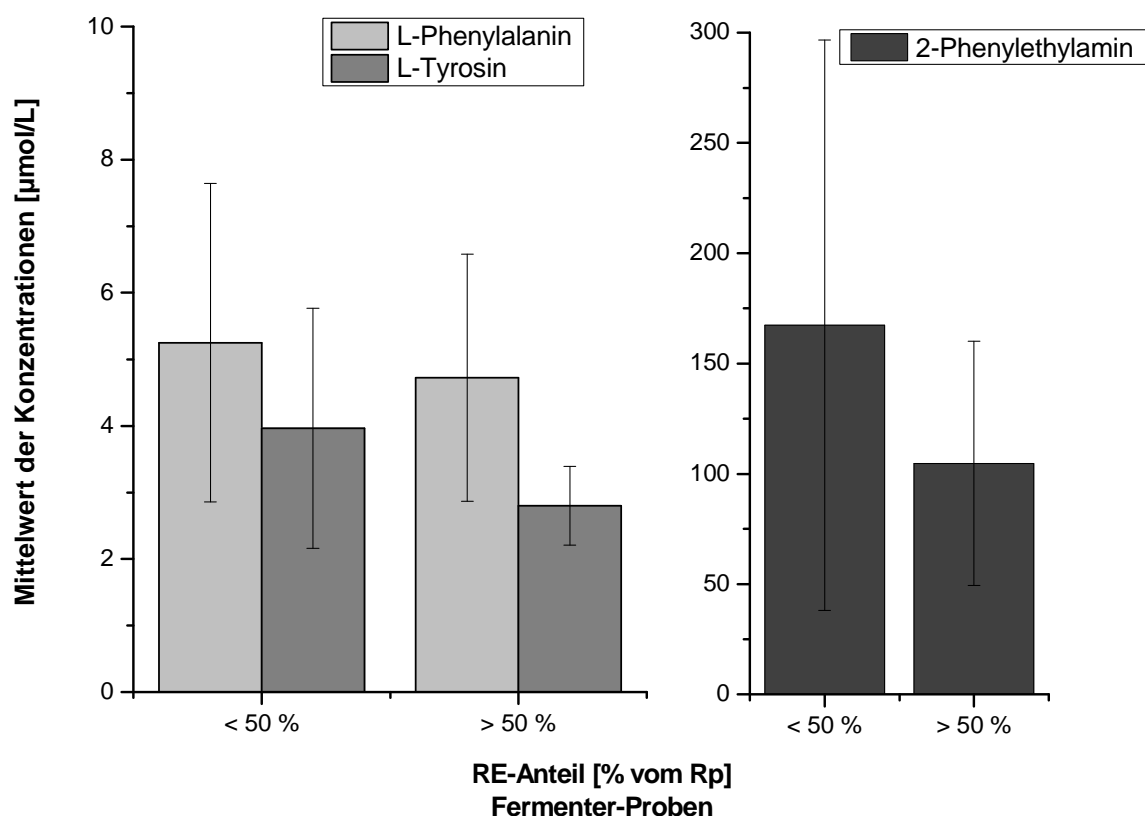
<sup>5</sup>Grassilage-Probe (K-05): 53,01 % RE-Anteil (w/w) vom Rp

### 3.4.3.3 Auswirkungen der RUSITEC-Fermentation auf die Grassilagekomponenten

Um die Veränderungen der Konzentrationen der in Futtermitteln identifizierten Komponenten durch den ruminalen Stoffwechsel im Pansen zu ergründen, wurden 12 verschiedene Grassilage-Proben mit unterschiedlichen RE-Anteilen (s. Tab. 5.15-5.17) im RUSITEC-System fermentiert (Fermenter-Proben). Die fermentierten Silage-Proben (s. Kap. 5.3.1) wurden am 12. Tag des RUSITEC-Versuches sofort nach der Aufarbeitung (s. Kap. 5.3.2.1) an der LC-ESI-MS/MS analysiert bzw. quantifiziert. Die analysierten Fermenter-Proben

wurden nach ihrem RE-Anteil in zwei Gruppen eingeteilt: < 50 % (Schadsilagen: n= 9) und > 50 % (Kontrollsilagen: n= 3) (w/w) RE-Anteil vom Rp (s. Tab. 5.16-5.17).

Von den in den Futtermitteln identifizierten Komponenten wurden in Fermenter-Proben nur L-Phenylalanin, L-Tyrosin, 2-Phenylethylamin (aus Phenylalanin) und das Flavonoid-Abbauprodukt 3-Phenylpropionsäure (Peak 6, Quantifizierung; s. Kap. 3.5 u. Abb. 3.28) nachgewiesen. Die mittleren Konzentrationen von L-Phenylalanin, L-Tyrosin und 2-Phenylethylamin sind in Abbildung 3.26 dargestellt.



**Abbildung 3.26** Mittelwert der Konzentrationen der Edukte (L-Phenylalanin, L-Tyrosin) der Polyphenolsynthese und 2-Phenylethylamin aus Phenylalanin für die Fragmentationen in den LC-ESI-MS-Analysen der Fermenter-Proben (Anzahl der analysierten Fermenter-Proben: RE/Rp (w/w) < 50 % n= 9, RE/Rp (w/w) > 50 % n= 3).

Zur Bestätigung der LC-ESI-MS/MS-Ergebnisse wurden L-Phenylalanin (Gruppe > 50 %:  $4,72 \pm 1,86 \mu\text{mol/L}$ ; Gruppe < 50 %:  $5,25 \pm 2,39 \mu\text{mol/L}$ ) und L-Tyrosin (Gruppe > 50 %:  $2,80 \pm 0,59 \mu\text{mol/L}$ ; Gruppe < 50 %:  $3,96 \pm 1,81 \mu\text{mol/L}$ ) auch an der FMOC-HPLC (L-Phenylalanin: Gruppe > 50 %:  $4,20 \pm 0,60 \mu\text{mol/L}$ , Gruppe < 50 %:  $5,27 \pm 1,74 \mu\text{mol/L}$ ; L-Tyrosin: Gruppe > 50 %:  $0,87 \pm 0,43 \mu\text{mol/L}$ , Gruppe < 50 %:  $1,08 \pm 0,44 \mu\text{mol/L}$ ) quantifiziert (s. Kap. 5.1.1.1) und sehr ähnliche Konzentrationswerte ermittelt. Die mittleren Konzentrationen für die identifizierten Edukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin waren in Schadsilagen (< 50 %) ca. 1,5-fach höher als in Kontrollsilagen (> 50 %). Die Ergebnisse der



Fermenter-Proben stimmen mit den zuvor durchgeführten 18-RUSITEC-Läufen überein [46, 66] und zeigen einen Zusammenhang zwischen dem RE-Anteil und dem freien Aminosäureanteil; mit sinkendem RE-Anteil steigt der Anteil an Aminosäuren [66]. Weiterhin wurden im Fermenter höhere Konzentrationen von 2-Phenylethylamin im Vergleich zur Ausgangskomponente L-Phenylalanin ermittelt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass 2-Phenylethylamin während der Fermentation durch Enzyme und Bakterien aus L-Phenylalanin im Pansen gebildet wird. Anscheinend wird die Synthese der Biogenen Amine im Pansen durch die Pansenbakterien und Enzyme beschleunigt [46, 66]. Zudem waren die Konzentrationen von 2-Phenylethylamin wie L-Phenylalanin und L-Tyrosin in Schadsilagen deutlich höher gegenüber den Kontrollsilagen. Daneben kann 2-Phenylethylamin in hohen Dosen negative Effekte wie z.B. Erhöhung des Blutdrucks, Toxizität bei Wechselwirkung mit anderen Substanzen (Arzneistoffe, Antikörper, Viren) auf das Tier zeigen [211].

Die in Futtermitteln identifizierten Flavonoide wurden im Fermenter nicht detektiert. Jedoch wurden die Edukte und Abbauprodukte (3-Phenylpropionsäure, Flüchtige Fettsäuren [194]) der Flavonoide in den analysierten Fermenter-Proben nachgewiesen. In Kapitel 3.5 wird der Abbaumechanismus der in dieser Studie identifizierten Flavonoide im Fermenter mittels Quantifikation des Abbauproduktes 3-Phenylpropionsäure detailliert erläutert.

#### **3.4.4 Fazit des Kapitels**

Um das Vorkommen der sechs Zielsubstanzen in Fermenter-Proben (s. Abb. 3.1) zu bestimmen, wurden als Ausgangsmaterialien Gras (n= 2), Heu (n= 3) und Grassilagen (n= 65) mit unterschiedlichen RE-Anteilen vom Rohprotein an der LC-MS/MS im positiven sowie negativen Modus sowie an der analytischen RP-HPLC bei verschiedenen Wellenlängen (von 195-490 nm) analysiert (s. Abb. 3.16 u. Tab. 3.5). Das weitere Ziel der Grassilage-Untersuchung war es, den Einfluss der auffällig niedrigen RE-Anteile auf das Vorkommen und die Stoffwechselreaktionen der Komponenten im Fermenter und Futtermittel (Grassilage, Gras und Heu) zu ergründen. Nach diesen Untersuchungen wurden erstmalig für die eingesetzten Grassilagen mit verringerten RE-Anteilen sowie für Gras und Heu eigene Synthesereaktionen definiert und die Synthesewege mit den allgemeinen Synthesereaktionen in Pflanzen verglichen (s. Kap. 3.4.2).

Mittels LC-MS/MS und RP-HPLC-Analyse wurden in den Ausgangsmaterialien (Grassilagen, Gras und Heu) der Fermenter-Proben die pflanzlichen Sekundärstoffwechselprodukte

Flavonoide (13 Flavone: Acacetin, Apigenin, Diosmetin, Luteolin, Acaciin, Diosmin, Isorhoifolin, Pectolarin, Saponarin, Isoorientin, Orientin, Vitexin, Luteolin 7-*O*-rutinosid; drei Flavonole: Kaempferol, Quercetin, Rutin; drei Isoflavone: Genistein, Biochanin A, Formononetin) und Phenolsäuren (*p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Chlorogensäure, 3-Phenylpropionsäure) als neue Substanzklasse identifiziert. L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan wurden in Grassilagen, Gras und Heu über den Shikimisäureweg produziert. Zusätzlich wurde 2-Phenylethylamin aus Phenylalanin in Futtermitteln detektiert. Dagegen wurden in den analysierten Futtermitteln die Cumarine, Stilbene, Aurone, Flavane, Anthocyanin und Anthocyanidin, die in Pflanzen über Phenylpropanoidsynthese aus Phenylalanin sowie Tyrosin gebildet wurden [94], nicht nachgewiesen. Mittels dieser Ergebnisse wurde für die identifizierten Flavonoide in den analysierten Futtermitteln ein Biosyntheseweg in drei Abschnitten beschrieben: 1. Phenylalaninsynthese (s. Abb. 2.4), 2. Phenylpropanoidsynthese (s. Abb. 3.17) und 3. Flavonoidsynthese (s. Abb. 3.18). Desweiteren wurden die identifizierten Komponenten an der LC-ESI-MS/MS mit einem externen Standard quantifiziert und die Abhängigkeit der Konzentrationen von der Lagerzeit, der Lagertemperaturen (s. Kap. 3.4.3.1) und vom RE-Anteil am Rp untersucht (s. Kap. 3.4.3.2). Als Resultat zeigten die Messkomponenten mit Ausnahme von 2-Phenylethylamin eine ausreichende Stabilität in den Grassilage-Extrakten bei niedrigen Lagerungstemperaturen ( $\leq 4$  °C) bis zu einem Zeitraum von 14 Tagen.

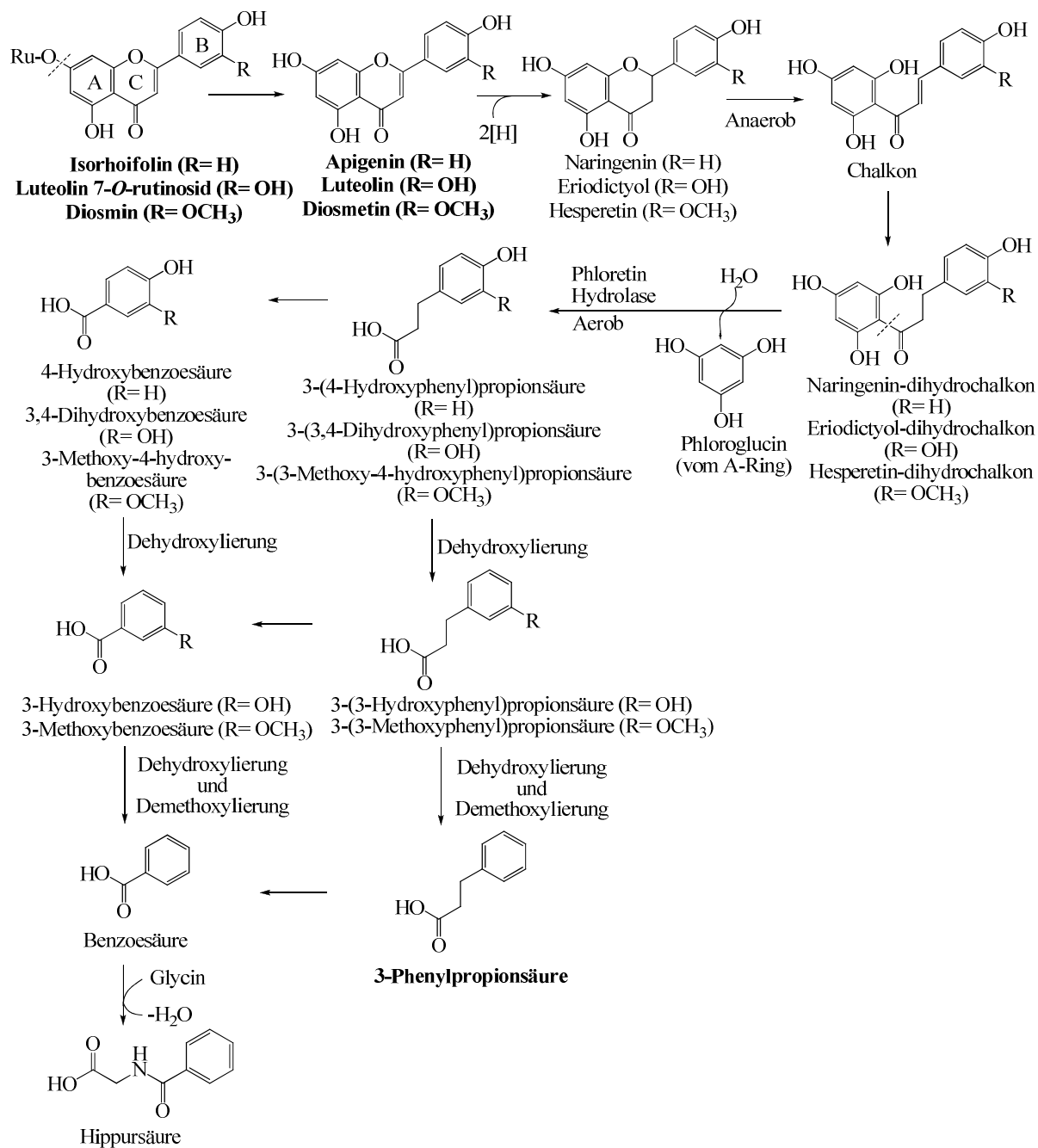
Das Flavon-Glykosid Diosmin wurde in den analysierten Futtermitteln als Hauptprodukt nachgewiesen. Die mittleren Konzentrationen von Diosmin sind in Grassilagen 50-70 % RE-Anteil gegenüber den Silagen < 50 % RE-Anteil leicht erhöht. Die Konzentrationen von Diosmin weisen in Grassilagen trotz unterschiedlicher RE-Anteile keine starken Abweichungen auf. Für die Synthese von Diosmin aus Apigenin wurden in den Silagen fünf verschiedene enzymatische Synthesewege beschrieben (s. Abb. 3.18) und der Weg aus Apigenin über Luteolin, Diosmetin und Diosmetin 7-*O*-glucosid als Hauptweg für die Diosminsynthese festgestellt (s. Abb. 3.18). Im Vergleich dazu wurde für die identifizierten Isoflavone und Flavonole aus Naringenin nur ein Syntheseweg ermittelt (s. Abb. 3.18). Diese Verbindungen wurden in geringeren Konzentrationen in nur einigen Futtermittel-Proben detektiert (s. Tab. 3.6).

Die in Grassilagen charakterisierten L-Tryptophan, Ferula-, Kaffee-, Chlorogen-, *p*-Cumarsäure sowie sämtliche identifizierte Flavonoide wurden in den fermentierten Grassilagen nicht gefunden. Folgende Substanzen konnten in Fermenter-Proben detektiert werden: L-Phenylalanin, L-Tyrosin und 2-Phenylethylamin. Das Flavonoid-Abbauprodukt

3-Phenylpropionsäure (Peak 6) wurde nur in einer Schadgrassilage mit niedrigem RE-Anteil (S-09: 39,01 % RE-Anteil (w/w) vom Rp) bestimmt. Die Peaks 1-5 konnten in den untersuchten Futtermitteln (n= 70) nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass die sechs untersuchten Zielsubstanzen (Peak 1-6) in Fermenter-Proben durch Stoffwechselreaktionen der Pansenbakterien aus Flavonoiden gebildet werden. Abbaumechanismen der Flavonoide sind in der Literatur für den Pansen beschrieben [158, 171-173, 216]. Zur Bestätigung dieser Hypothese, wurden mögliche Abbauprodukte der identifizierten Flavonoide im Literaturstudium herausgearbeitet (s. Tab. 2.4 u. 5.4) und das Vorkommen dieser Abbauprodukte anschließend mit Hilfe der LC-ESI-MS/MS-Methode untersucht (s. Kap. 3.5).

### **3.5 Abbaumechanismus der Flavonoide im Pansen**

Zahlreiche Studien berichten, dass die Blatt-Flavonoide Rutin und Quercetin bei Ziegen und Rindern durch Pansenmikroorganismen über Zwischenstufen wie die 3,4-Dihydroxyphenyl-essigsäure und die 4-Hydroxyphenylessigsäure zu flüchtigen Fettsäuren abgebaut werden [171-172]. In den vorangegangenen Untersuchungen wurden im Pansenlabor der Klinik für Rinder (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) mit Hilfe einer Zweikanal-gaschromatographie die Flavonoid-Ringspaltungsendprodukte, die flüchtigen Fettsäuren (wie Essigsäure, Propionsäure, i-Buttersäure, n-Buttersäure, i-Valeriansäure, n-Valeriansäure, Hexansäure), im Pansensaft identifiziert [194, 198]. Zur näheren Untersuchung wurden nach einem breiten Literaturscreening die bisher nach oraler Applikation im menschlichen und tierischen Urin nachgewiesenen Ringspaltungsprodukte der identifizierten Flavonoide in Tabelle 2.4 [154-162, 184-191] aufgelistet. Die Substanzen, die ihrer Masse und Fragmentierung nach mit hoher Wahrscheinlichkeit im Pansen vorhanden sind (n= 27; s. Tab. 5.4), wurden durch Additionsverfahren an der LC-ESI-MS/MS und RP-HPLC analysiert. Anhand des Literaturscreenings und der durchgeführten LC-ESI-MS/MS-Analysen wurde als Flavonoid-Stoffwechselreaktion im Rinder-Pansen die Bildung von 3-Phenylpropionsäure (Peak 6) nachgewiesen (s. Abb. 3.27).



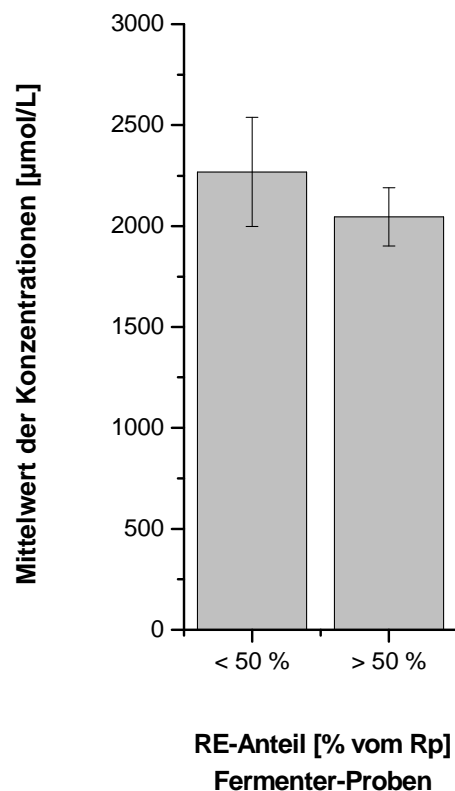
**Abbildung 3.27** Abbaumechanismus der in Grassilagen identifizierte Flavon 7-O-rutinoside Diosmin, Isorhoifolin und Luteolin 7-O-rutinosid durch Pansenbakterien zu 3-Phenylpropionsäure (Peak 6) (Ru: Rutinoside) [154-155, 158-159, 177].

Die Flavone wurden in Grassilagen in höheren Konzentrationen als Hauptprodukte identifiziert. Sie zeigen sehr ähnliche Strukturen, die zu einer schnellen Bildung verschiedener Konjugate führen [228]. Wie in Abbildung 3.27 zu erkennen ist, wird zunächst der gebundene Zucker aus den Flavonen durch Pansenbakterien und Enzyme gespalten. Die entstehenden Flavon-Aglykone werden zu Flavan-Aglykonen reduziert. Aufgrund der Instabilität zersetzen sich die C-Ringe der entstehenden Flavan-Aglykone irreversibel unter anaeroben Bedingungen zu Chalkon-Verbindungen [229]. Im nächsten Schritt reduziert das Chalkon

zum Dihydrochalkon. Durch A-Ring-Spaltung entstehen aus dem Dihydrochalkon Phloroglucin, 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure und ihre Derivate [154]. Phloroglucin wird im Gastrointestinaltrakt weiter vollständig zu CO<sub>2</sub> abgebaut [175]. Aus diesem Grund wurde diese Verbindung in den bisherigen Untersuchungen nur bei einigen Tieren nachgewiesen [180-182]. Im Fermenter wurde als Endspaltungsprodukt die nach Dehydroxylierung und Demethoxylierung entstehende 3-Phenylpropionsäure (Peak 6) identifiziert.

In der Literatur wird die Bildung der Benzoesäure-Derivate aus 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure und 3-Phenylpropionsäure durch weitere Demethoxylierung und Dehydroxylierung beschrieben [154-155, 177]. Aus Benzoesäure kann dann in Reaktion mit der Aminosäure Glycin durch Beteiligung des Coenzym A Hippursäure entstehen. In den Referenz-Untersuchungen wurde Hippursäure im Pansensaft und im Urin von herbivoren Säugetieren (z.B. Rind, Ziege, Pferd) nachgewiesen [201]. In dieser Arbeit wurden Hippursäure und alle möglichen Flavonoid-Abbauprodukte (Standards: n= 27; s. Tab. 5.4) in Fermenter-Proben untersucht, jedoch außer 3-Phenylpropionsäure keine Hippursäure oder andere Benzoesäure-Derivate identifiziert (s. Tab. 5.4). Glycin kann im Pansen durch Mikroorganismen und bakterielle Desaminasen sowohl abgebaut werden, als auch zu Serin oder Alanin umstrukturiert vorliegen [66, 198]. In den vorangegangenen Untersuchungen im Pansenlabor der Klinik für Rinder (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) wurden in den Fermenter-Proben der vorherigen RUSITEC-Läufe Essigsäure, CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> als Hauptabbauprodukte von Glycin identifiziert [65, 193]. In dieser Arbeit wurden mittels FMOC-HPLC-Methode in Fermenter-Proben freies Serin (mittlere Konzentration: in Kontrollsilagen 5,80±3,90 µmol/L, in Schadsilagen 7,19±4,61 µmol/L), Alanin (mittlere Konzentration: in Kontrollsilagen 0,91±0,04 µmol/L, in Schadsilagen 1,16±0,41 µmol/L) und Glycin (mittlere Konzentration: in Kontrollsilagen 1,87±0,15 µmol/L, in Schadsilagen 1,93±1,03 µmol/L) detektiert (detaillierte Analyse-Ergebnisse; s. Kap. 5.1.1.1). Die Konzentration des freien Glycins ist offensichtlich für die Bildung der Hippursäure im Pansen nicht ausreichend. Hippursäure könnte jedoch beim Rind in den folgenden Verdauungsorganen wie im Labmagen, Dünndarm oder Dickdarm gebildet werden. Außerdem können die Benzoesäure-Derivate durch die Veresterung im Pansen mit einer Aminosäure oder mit einem anderen Flavonoid-Abbauprodukt wie Phenolsäuren gekoppelt werden.

Neben der Identifizierung und Bestimmung des Synthesewegs wurde auch das Flavonoid-Abbauprodukt 3-Phenylpropionsäure an der LC-ESI-MS/MS quantifiziert (s. Abb. 3.28).



**Abbildung 3.28** Mittelwert der Konzentrationen von 3-Phenylpropionsäure für das Fragmentation m/z 133 in den LC-ESI-MS-Analysen der Fermenter-Proben (Anzahl der analysierten Fermenter-Proben: RE/Rp (w/w) < 50 % n= 9, RE/Rp (w/w) > 50 % n= 3).

3-Phenylpropionsäure wurde in Gras und Heu nicht detektiert. Die Verbindung wurde nur in einer Schadsilage S-09 mit 39 % RE-Anteil und in allen im RUSITEC fermentierten Schad- und Kontrollsilagen (in Fermenter-Proben) nachgewiesen. Während in der Silage S-09 eine Konzentration von 540,28 µmol/L festgestellt wurde, ist die Konzentration von 3-Phenylpropionsäure in der fermentierten Silage S-09 (Fr-6: 2.565,77 µmol/L) ca. 5-fach vergrößert. Neben dem enzymatischen Flavonoidabbau durch Pansenbakterien kann die Konzentration von 3-Phenylpropionsäure im Fermenter aber auch aufgrund der zugefügten Grassilagemenge, die höher als die bei der Silageextraktion eingesetzte Menge lag (10,5 g TS/800 mL oder 9-36 g/800 mL eines Fermenters, s. Tab. 5.15-5.17 vs. 0,1 g/10 mL, s. Kap. 5.3.2.2), gesteigert worden sein.

Desweiteren ist die mittlere Konzentration der Schadsilagefermenter (< 50 %: 2.267,94±270,70 µmol/L) höher als der Kontrollen (> 50 %: 2.046,12±144,83 µmol/L). Diese Ergebnisse bestätigen die im Pansensaft postulierte Synthese von 3-Phenylpropionsäure (s. Abb. 3.27). Darauf basierend lässt sich sagen, dass es sich bei den Zielsubstanzen (Peak 1-3) in Fermenter-Proben auch um Flavonoid-Ringspaltungsprodukte handelt, weil die Peaks 1-3 in Grassilagen, Gras und Heu nicht identifiziert wurden. Die Peaks können aber

auch durch Kopplung zwischen zwei verschiedenen Abbauprodukten z.B. mit einem Benzoessäure- und Phenylpropionsäure-Derivat entstehen. Als nächstes wurde überprüft, ob die sechs Zielsubstanzen in der Fermenter-Probe auch im Serum nachgewiesen werden können.

### 3.5.1 Fazit des Kapitels

Basierend auf den bisher ermittelten Ergebnissen wurde in diesem Kapitel der Flavonoid-Abbaumechanismus untersucht. Hiermit wurde überprüft, ob die definierten sechs Zielsubstanzen ein Flavonoid-Abbauprodukt sind. Dafür wurde zunächst ein breites Literaturscreening durchgeführt und die bisher nach oraler Applikation im menschlichen und tierischen Urin nachgewiesenen Ringspaltungsprodukte der identifizierten Flavonoide in Tabelle 2.4 aufgelistet [154-162, 184-191]. Im nächsten Schritt wurden die Substanzen, die ihrer Masse und Fragmentierung nach mit hoher Wahrscheinlichkeit im Pansen vorhanden sind, durch Additionsverfahren an der LC-ESI-MS/MS und RP-HPLC analysiert.

Demzufolge wurde entgegen der Literatur [154-159] in den Fermenter-Proben nur ein Flavonoid-Abbauprodukt, die 3-Phenylpropionsäure (Peak 6) identifiziert. Durch Pansenbakterien spaltet erst die Zucker-Komponente von den Flavonoid-Glykosiden ab, die entstehenden Aglykone zersetzen sich zu Chalkonen [229] und durch A-Ring-Spaltung der Chalkone entstehen Phloroglucin und verschiedene Phenolsäure-Derivate [154]. Durch weitere Demethoxylierung und/oder Dehydroxylierung bilden sich 3-Phenylpropionsäure (Peak 6) und die entsprechenden Phenolsäure-Derivate. 3-Phenylpropionsäure wurde in allen Fermenter-Proben identifiziert. Dagegen wurde diese Verbindung nur in einer Schadgrassilage (S-09) identifiziert, jedoch in geringerer Konzentration als in der fermentierten Probe (Fr-6). Außerdem wurden für 3-Phenylpropionsäure höhere Konzentrationen in den Schadsilagefermentern ( $< 50\%$ :  $2.267,94 \pm 270,70 \mu\text{mol/L}$ ) festgestellt als in den Kontrollen ( $> 50\%$ :  $2.046,12 \pm 144,83 \mu\text{mol/L}$ ).

Um die sechs Zielsubstanzen aus den Fermenter-Analysen zu identifizieren, sollte folglich auch die Resorption der sechs Zielsubstanzen durch die Serum-Analyse untersucht werden.

### 3.6 Resorption und Zusammenhang der Fermenter-Proben mit Serum-Proben

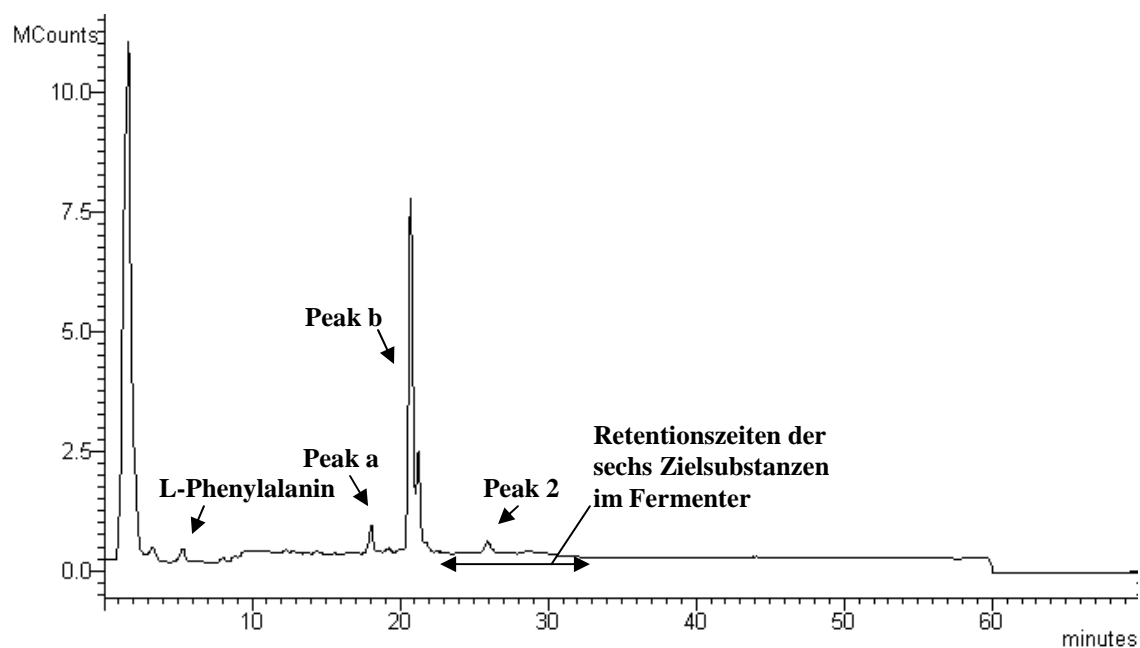
Um die Abhängigkeit der Krankheitsursache mit den untersuchten Peaks zu erforschen, wurden 15 verschiedene Serum-Proben mit der gleichen Methode an der RP-HPLC und LC-ESI-MS/MS analysiert (s. Abb. 3.29). Somit wurden die sechs Zielsubstanzen aus den Fermenter-Proben (Peaks 1-6) sowie die in den Futtermitteln identifizierte Komponenten im Serum untersucht und die m/z-Werte mit Fermenter- und Grassilage-Proben verglichen. Die Proben wurden von Rindern aus 2 Problembetrieben mit dem klinischen Bild der „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ entnommen, die zwar nicht mit den in dieser Untersuchung eingesetzten Grassilagen verfüttert wurden, die jedoch die klinischen Symptome der „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ aufzeigten (s. Tab. 3.7).

**Tabelle 3.7** Angaben zu den untersuchten Serum-Proben aus zwei Problembetrieben mit dem klinischen Krankheitsbild „Faktorenerkrankung Milchviehherde“.

Probe-Kode	Proben-anzahl	Symptome	Fütterung
2768/10	10	Faktorenerkrankung Milchviehherde: Reproduktionsstörung, Labmagenverlagerung, Zellzahlerhöhung, Festliegen und plötzliche Todesfälle	Total-Misch-Ration (TMR) Grundfutter: Mais: Gras: 48 %: 52 % max. Kraftfutteranteil: 35 %
2627/10	5	Klauenprobleme, Labmagenverlagerung, plötzliches Festliegen	Grundfutter: Mais:Gras: 50 %: 50 % max. Kraftfutteranteil: 35 %

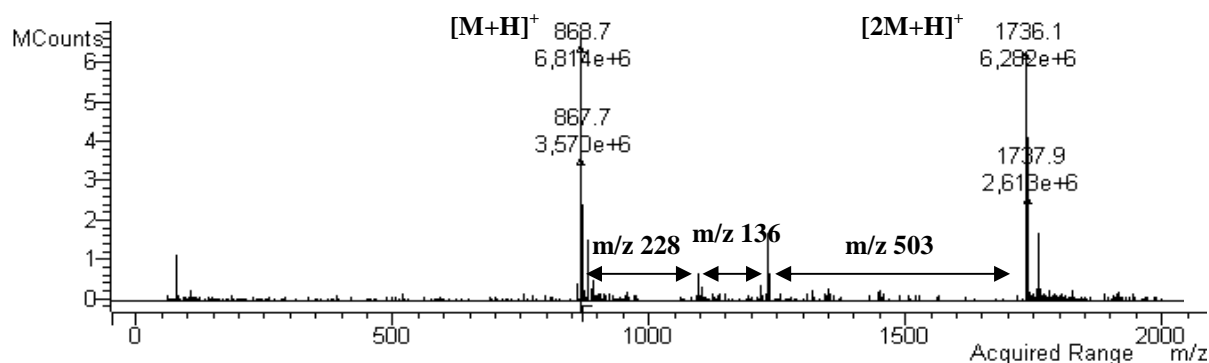
Nach der LC-ESI-MS-Analyse wurden in allen untersuchten Proben drei Peaks detektiert, die wie Isoorientin (hier Peak a), Luteolin 7-O-rutinosid sowie Peak 1 der Fermenter-Probe (hier Peak b) und Peak 2 der Fermenter-Probe (hier Peak 2 gekennzeichnet) ähnliche Retentionszeiten, aber unterschiedliche m/z-Werte zeigten. Daneben wurde L-Phenylalanin auch in diesen 15 Serum-Proben identifiziert (s. Abb. 3.29).





**Abbildung 3.29** MS-ESI-Fullscan der Serum-Probe 2768/10-09. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40 °C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Aufgrund der hohen Peak-Intensität wurde das als Peak b gekennzeichnete Signal an der RP-HPLC fraktioniert und die Massen sowie Fragmentationen an der LC-ESI-MS/MS bestimmt (s. Abb. 3.30).



**Abbildung 3.30** LC-ESI-MS-Spektrum der Serum-Probe 2768/10-09 vom isolierten Peak b. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40 °C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Wie in Abbildung 3.30 zu erkennen ist, wurden im Serum größere Spaltungsprodukte ( $\Delta m/z = 136, 228$  und  $503$ ) bestimmt als für die sechs Zielkomponenten aus den Fermenter-Proben ( $\Delta m/z = 18, 28$  und  $46$ ; s. Tab. 3.2). Dem Literaturscreening nach könnte Peak b aus den Serum-Proben aufgrund sehr ähnlicher Molekülmassen, Fragmentierungsmuster und des Vorkommens ein Flavonoid- oder Procyanidin-Dimer sein [229-232]. Bei den Flavonoiden

könnten zunächst die Zucker-Komponenten abgebaut werden und anschließend durch Enzyme im Stoffwechsel zu Procyanidin oder mit einem Flavonoid-Aglykone zum Flavonoid-Dimer umgewandelt werden. Das Molekölion  $m/z$  868,7 ( $[M+H]^+$ ) und sein Dimer  $m/z$  1736 ( $[2M+H]^+$ ) bekräftigen diese Hypothese.

Da hier nur Serum-Proben von kranken Tieren untersucht wurden, lässt sich nicht ohne weiteres schlussfolgern, ob Peak b nur bei Rindern mit dem klinischen Bild „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ auftritt oder ob diese Substanz auch im Serum gesunder Tiere zu beobachten ist. Zudem wurden die Tiere nicht mit den in dieser Arbeit untersuchten Silagen gefüttert, so dass der Einfluss der Fütterung auf die Komponenten der Serum-Probe nicht diskutiert werden konnte. Für die absolute Feststellung müssen das Auftreten von Peak b im Serum aus Problembetrieben sowie auch aus Kontrollbetrieben (ohne Krankheitssymptome) in Abhängigkeit von der Art der Silagefütterung (Kontroll- und Schadsilage mit unterschiedlichen RE-Anteilen vom Rp) untersucht werden. Anhand der erhaltenen Ergebnisse kann dann die Identifizierung und Untersuchung der medizinischen Auswirkung von Peak b auf das Tier durchgeführt werden.

### 3.6.1 Fazit des Kapitels

In diesem Kapitel wurde überprüft, ob die sechs Zielsubstanzen aus den Fermenter-Proben durch Resorption in Serum-Proben detektiert werden können. Dafür wurden Serum-Proben an der RP-HPLC fraktioniert und die Fraktionen erneut an der LC-ESI-MS/MS analysiert. Mit den angewendeten Analyse-Methoden wurden in Serum-Proben die typischen  $m/z$  Werte der Peaks 1-6 in Fermenter-Proben und der in Grassilagen identifizierten Flavonoide und Hydroxyzimtsäure-Derivate nicht detektiert. Die Zielkomponenten (Peaks 1-6) könnten gastrointestinal resorbiert, durch die Mikroorganismen sowie Enzyme abgebaut oder mit anderen Stoffwechselprodukten durch eine funktionelle Gruppe substituiert worden sein. In der Literatur sind die ähnliche Ergebnisse über die Resorption der RUSITEC-Fermenter-Proben beschrieben [195].

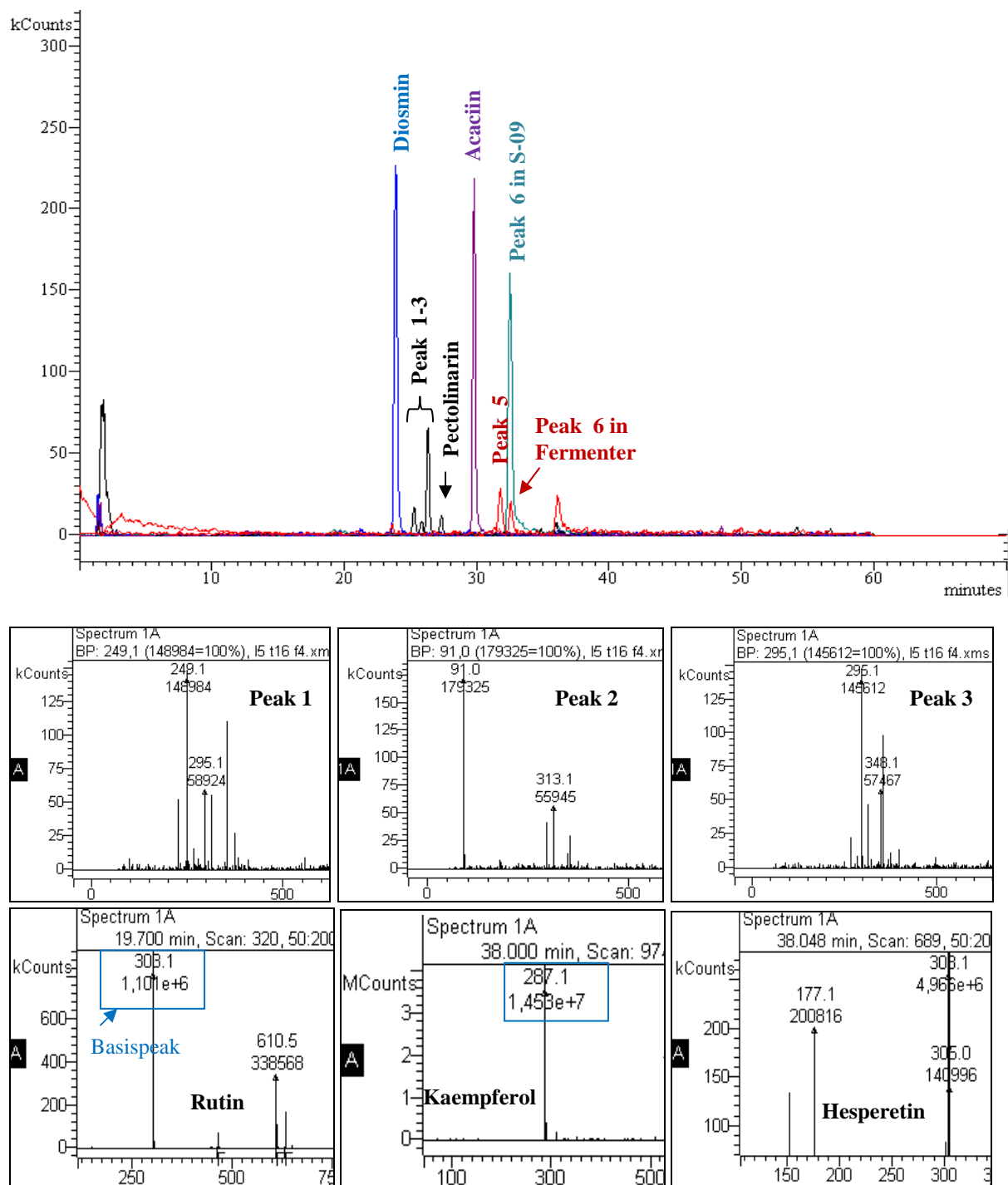
Um diese Hinweise zu überprüfen, wurden im nächsten Schritt der Arbeit die Zusammenhänge der Zielsubstanzen 1-3 mit den möglichen pflanzlichen sekundären Substanzklassen durchleuchtet.

### **3.7 Zusammenhang der Peaks 1-3 mit diversen sekundären pflanzlichen Substanzklassen**

#### **3.7.1 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Flavonoiden**

Die Summenformeln der ersten 3 Peaks in Pansensaft-Proben wurden durch die UPLC-ESI-MS-Methode als  $C_{18}H_{18}O_6$  bestimmt (s. Tab. 3.3). Mit Hilfe der Internetseite „<http://chembiofinder.cambridgesoft.com>“ wurde eine Liste mit möglichen Substanzen zusammengestellt, wobei sich die Liste in größerer Zahl aus Substanzen der Untergruppe der Flavonoide, der Flavanone, Neoflavane und Chalkone zusammensetzte. Zugleich wurden in den vorangegangenen Untersuchungen im Pansensaft Isoflavone (Biochanin A, Genistein, Formononetin) [216, 219], Flavonole (Rutin) [171, 181] und Flavanone (Naringin) [217] identifiziert.

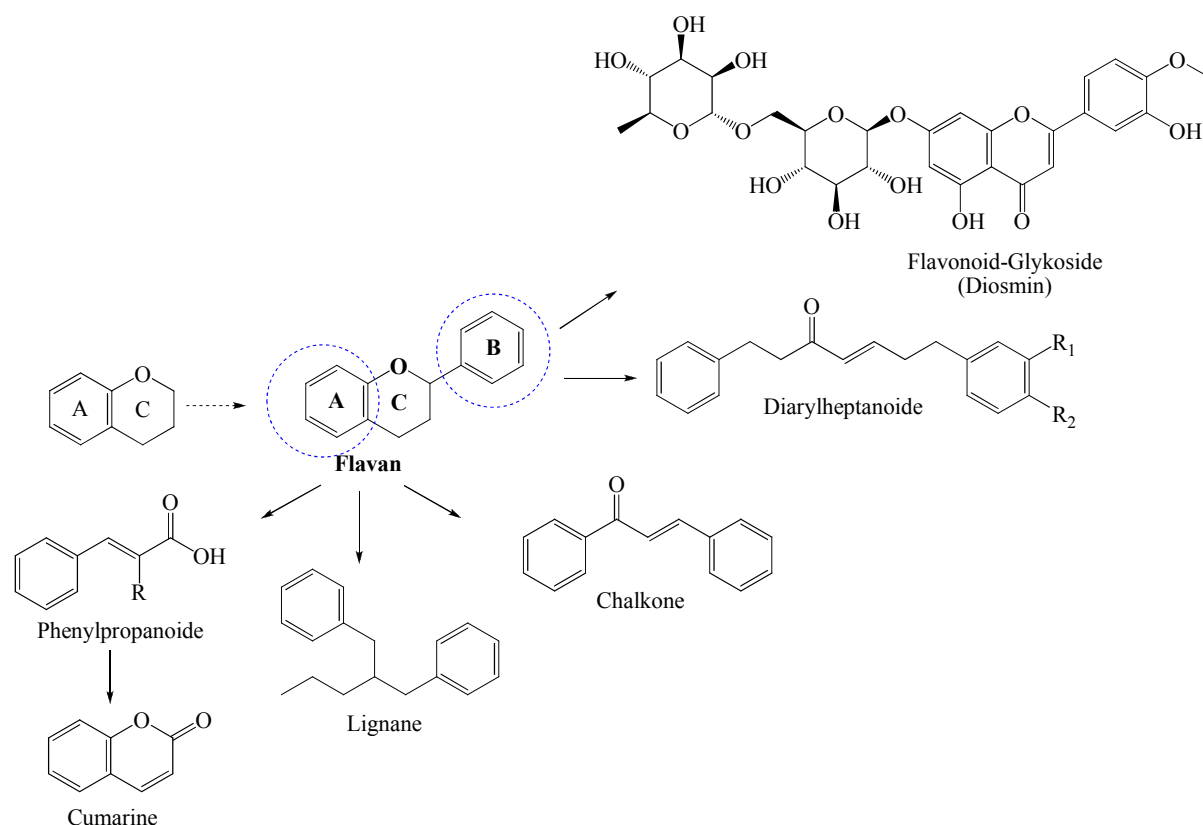
Die in dieser Liste stehenden Flavanone-Isomere enthalten am Flavan-Gerüst drei Methoxy- und einen Hydroxy-Rest in verschiedenen Positionen des A und B-Rings (wie 4'-Hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanon, 7-Hydroxy-5,8,2'-trimethoxyflavanon, 5-Hydroxy-7,2',3'-trimethoxyflavanon, 8-Hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanon). Die in Grassilagen, Gras sowie Heu identifizierten Flavone, Flavonole und Isoflavone enthalten am C-Ring zwischen dem 2. und 3. Kohlenstoffatom eine Doppelbindung (s. Abb. 3.18). Die identifizierten Flavonoide bauen generell durch Mikroorganismen zunächst ihre Zucker-Komponente ab [154-155], dann können sie im Pansen zu entsprechenden Flavanonen reduziert werden. Die in Grassilagen identifizierten Flavonoide wurden in Fermenter-Proben nicht detektiert, jedoch wurden die Edukte der Flavonoide, das Phenylalanin und das Tyrosin, nachgewiesen. Aus diesen Gründen wurden die Fragmentierungsmuster und Spaltungsprodukte der verschiedenen Flavone, Isoflavone, Flavanone, Flavonole mit den Peaks 1-3 verglichen (s. Abb. 3.31 u. detaillierte Liste mit m/z Werten aus 24 verschiedenen Flavonoiden; s. Tab. 5.4).



**Abbildung 3.31** Oben: Überlappendes LC-ESI-MS/MS-Chromatogramm der Grassilage S-09 (S: Schadsilage) und der Fermenter-Probe Fr-6 (durch Fermentierung der Silage S-09) für Diosmin ( $m/z$  609), Peak 1-3 ( $m/z$  295), Pectolinarin ( $m/z$  623), Acaciin ( $m/z$  593), Peak 5 ( $m/z$  83), Peak 6 (3-Phenylpropionsäure;  $m/z$  133). Mitte: LC-ESI-MS-Spektren der Peaks 1-3 im Fermenter. Unten: LC-ESI-MS-Spektren von Rutin (Flavonol-Glykoside) (links), Kaempferol (Flavonol-Aglykone) (Mitte) und Hesperetin (Flavanon-Aglykone) (rechts). Basispeaks von Rutin und Kaempferol sind in Spektren mit Rechteck gekennzeichnet. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A = 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B = 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Wie in Abbildung 3.31 zu erkennen ist, zeigen die Peaks 1-6 mit Flavonoiden ähnliche Retentionszeiten, aber unterschiedliche Fragmentierungen. Bei den Flavonoid-Glykosiden sind die Spaltungsprodukte die Zucker-Komponenten mit größeren  $m/z$  Werten ( $m/z$  146:

Glucose,  $m/z$  162: Rhamnose). Nach der Abspaltung der Zucker-Komponenten entstehen die Aglykone und es sind keine weiteren Abspaltungen erkennbar. Bei den Flavonoid-Glykosiden wurde keine Abspaltung von Wasser oder Carbonylgruppe wie bei den Peaks 1-6 festgestellt. Folglich sind die Peaks 1-3 keine Flavonoide. Die Flavonoide können durch die Mikroorganismen im Pansen zu Chalkonen abgebaut werden. Sie können auch durch enzymatische Stoffwechsel-Reaktionen zu Phenylpropanoiden, Lignanen, Diarylheptanoiden und Cumarinen umgewandelt werden. Die möglichen Darstellungen der Substanzklassen aus Flavonoiden wurden in Abbildung 3.32 dargestellt.

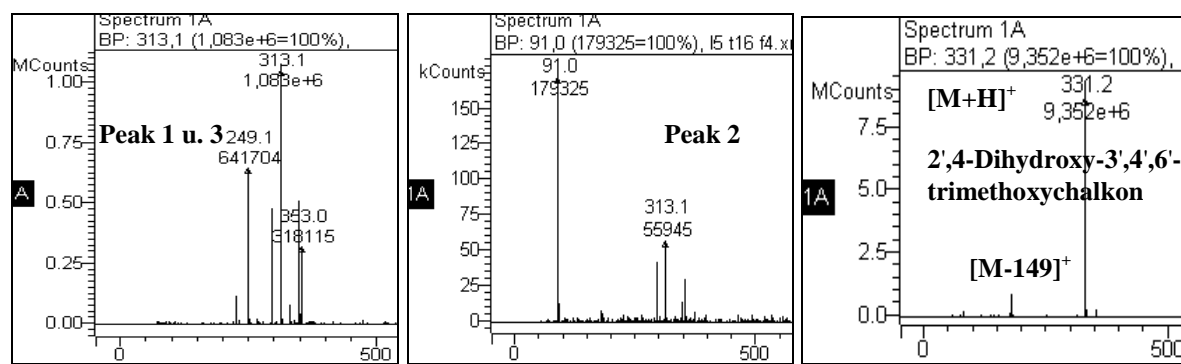


**Abbildung 3.32** Biosynthetischer Einbau der Phenylpropanoide, Cumarine, Lignane, Chalkone, Diarylheptanoide und Flavonoid-Glykoside aus Flavan [20].

### 3.7.2 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Chalkonen

Wie in Abbildung 3.27 zu erkennen ist, werden die Flavonoid-Aglykone unter anaeroben Bedingungen zu Chalkonen und Dihydrochalkonen abgebaut. Zusätzlich besitzen die Chalkone die gleiche Summenformel ( $C_{18}H_{18}O_6$ ) wie die Peaks 1-3. Die in der Liste stehenden Chalkone sind die Isomere (wie 2',4-Dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalkon, 3',6'-Dihydroxy-2',4',5'-trimethoxychalkon, 4,2'-Dihydroxy-3,4',6'-trimethoxychalkon) und weisen an der LC-ESI-MS/MS identische Spaltungsprodukte auf. Beispielhaft wurde

2',4-Dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalkon-Standardlösung an der LC-ESI-MS/MS analysiert. Aufgrund der Unpolarität kommen die Chalkone an der Säule ca. 30 min ( $R_t$  der Chalkone: 56,95 min) später als die Peaks 1-3 ( $R_t$  der Peaks 1-3: 25,68-26,74 min). Während 2',4-Dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalkon für das Pseudomolekülion mit  $m/z$  331 ( $[M+H]^+$ ) die höchste Intensität aufwies (s. Abb. 3.33), wurde das Precursor-Ion mit  $m/z$  331 ( $[M+H]^+$ ) für Peaks 1-3 in sehr geringen Intensitäten detektiert. Das Fragmentierungsmuster der Chalkone ergab keine Methoxy- ( $\Delta m/z$  32) oder Hydroxyl- ( $\Delta m/z$  18) Spaltungen sondern ein größeres Spaltungsprodukt mit  $\Delta m/z$  149. Auf diese Weise können die Peaks 1-3 auch keine Chalkone sein. Jedoch werden die Chalkone im Pansen weiter zu Phenylpropanoiden abgebaut.

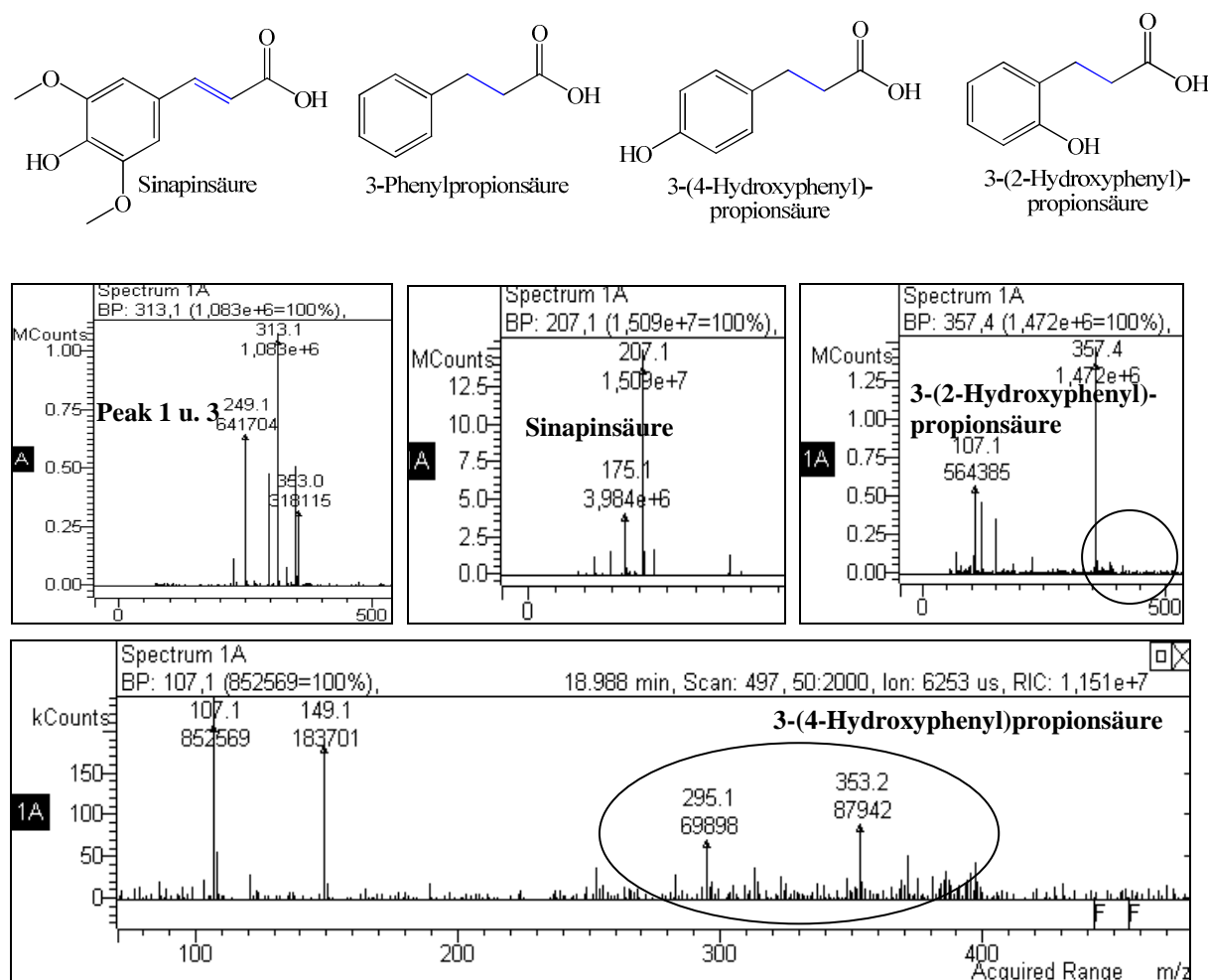


**Abbildung 3.33** LC-ESI-MS-Spektren von Peaks 1 und 3 (links), Peak 2 (Mitte), 2',4-Dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalkon (rechts). Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40 °C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

### 3.7.3 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Phenylpropanoiden

Die Flavonoide werden im Pansen über ihre Aglykone und Chalkone zu Phenylpropanoiden wie Phenylpropionsäure-, Phenyllessigsäure- oder Phenylbenzoesäure-Derivaten abgebaut. Die Phenolsäuren aus dem Flavonoidabbau enthalten wegen der Hydrierung der Chalkone zu Dihydrochalkonen wie 3-Phenylpropionsäure (Peak 6) keine Doppelbindung an der Kohlenstoffkette (s. Abb. 3.27) [154-159]. In zahlreichen in-vitro-Studien wurden im bovinen Pansen verschiedene Phenylpropanoide wie 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure als Flavonoid-Abbauprodukte nachgewiesen [201-204]. Deshalb wurden in dieser Arbeit 38 verschiedene Phenylpropanoide an der RP-HPLC und LC-ESI-MS/MS analysiert, die laut Literatur im Pansen nachgewiesen wurden und mit Peaks 1-3 ähnliche Massen und/oder Fragmentierungen aufwiesen (detaillierte Analyse-Ergebnisse; s. Tab. 5.4). Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass die Peaks 1-3 ähnliche Fragmentierungsmuster oder Fragmentionen wie Sinapinsäure, 3-(2-Hydroxyphenyl)- sowie 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure enthalten

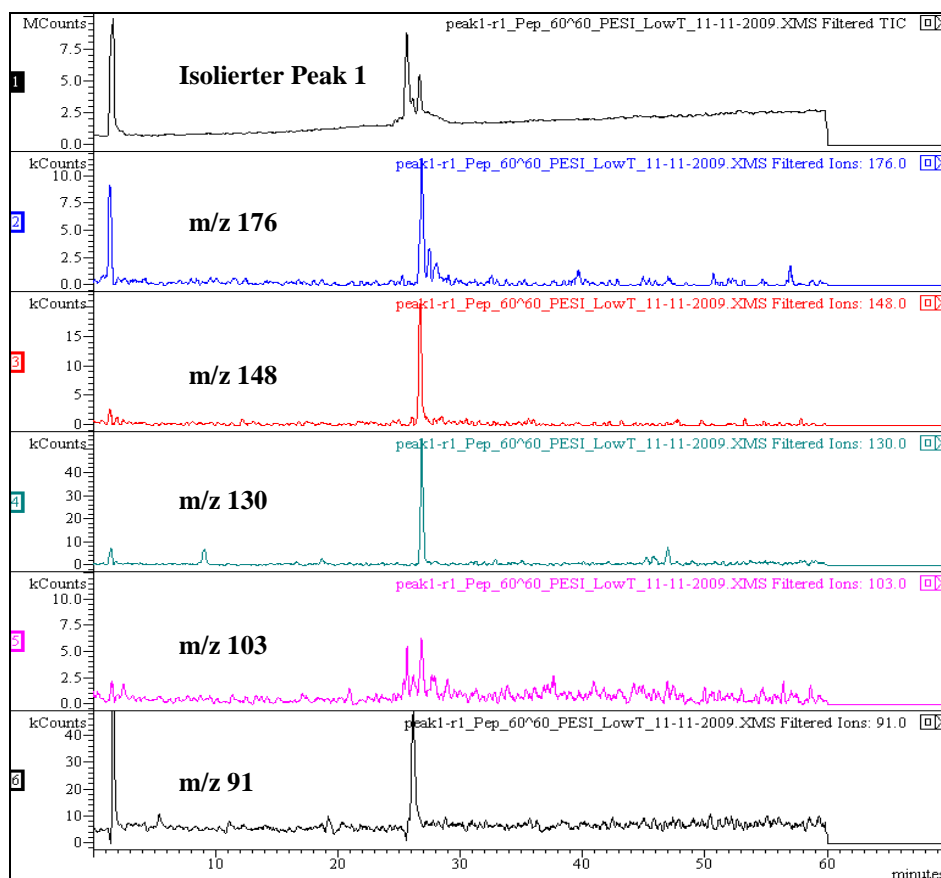
(s. Abb. 3.34). Insbesondere besitzen 3-(2-Hydroxyphenyl)- und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure wie Peaks 1-3 keine Doppelbindung an der Kohlenstoffkette und keine Methoxygruppe am Phenyl-Ring (s. Abb. 3.34). Außerdem sind die entsprechenden Säuren die hydroxylierte Form von Peak 6 (3-Phenylpropionsäure) und erreichen somit die Polarität von Peaks 1-3.



**Abbildung 3.34** Oben: Die Strukturen von Sinapinsäure, 3-Phenylpropionsäure, 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure und 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure. Mitte: LC-ESI-MS-Spektren von Peaks 1-3 (links), Sinapinsäure (Mitte) und 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure (rechts). Unten: Vergrößerte Darstellung des LC-ESI-MS-Spektrums von 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure. Dimer-Signale von 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure und 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure sind in Spektren mit dem Kreis gekennzeichnet. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Für die Sinapinsäure wurden kleine Spaltungsprodukte wie Hydroxy- und Methoxygruppe-Spaltungen detektiert. Im Vergleich dazu wurden für Peaks 1-3 keine Methoxy-Spaltungen ( $\Delta m/z$  32) jedoch mehrere Hydroxy-Spaltungen ( $\Delta m/z$  18) festgestellt (s. Tab. 3.2). Zusätzlich waren in der Sinapinsäure-Probe durch mehrfache Vergrößerung des MS-Spektrums die Fragmentionen  $m/z$  176/148/130/103 der Peaks 1-3 in geringer Signal-Intensität (10-15 kCounts) auffindbar (s. Abb. 3.35). Diese Fragmentierung deutet auf aromatische

Verbindungen wie Phenolsäure-Derivate hin. Diese Hypothese wurde durch die Identifizierung der 3-Phenylpropionsäure als Peak 6 bekräftigt.

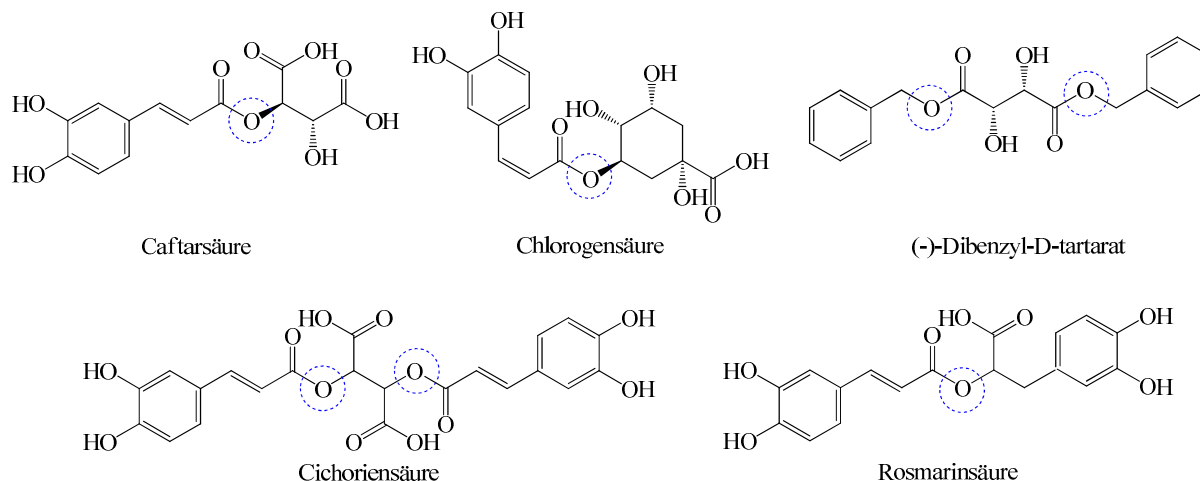


**Abbildung 3.35** LC-ESI-MS/MS-Fragmenten-Chromatogramm ( $m/z$  176/148/130/103/91) vom isolierten Peak 1 der Fermenter-Probe Fr-1 (K-01, K: Kontrollsilage). Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/ $H_2O$  (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure ( $R_t$ : 18,31 min) und 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure ( $R_t$ : 23,28 min) zeigten an der LC-ESI-MS/MS in unterschiedlichen Retentionszeiten Dimer-Signale ( $m/z$  295 und 353) auf (s. Abb. 3.34). Die Peaks 1-3 aus Fermenter-Proben ( $R_t$ : 25,68-26,74 min) besitzen identische Fragmentationen wie das 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure-Dimer. Die 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure enthält neun Kohlenstoffatome und drei Sauerstoffatome, das Dimer ergibt folglich die gleiche Summenformel wie die Peaks 1-3 ( $C_{18}H_{18}O_6$ ). Darüber hinaus kann es sich bei den Peaks 1-3 um Diphenyl-Verbindungen handeln. Diverse Diphenyl-Verbindungen wie (-)-Dibenzyl-D-tartarat (Analyse-Ergebnisse; s. Abb. 3.37), Di-P-Tolyl-tartarsäure (Tartarsäure: Weinsäure) und 2,3-Dihydroxybutan-1,4-diyl-dibenzoessäure besitzen identische Summenformel mit den Peaks 1-3. Um die Verbindungen 1-3 strukturell zu ergründen, wurden zunächst die Phenolsäuren analysiert, die durch ein Sauerstoffatom mit einer organischen Säure oder einer Phenolsäure verknüpft sind

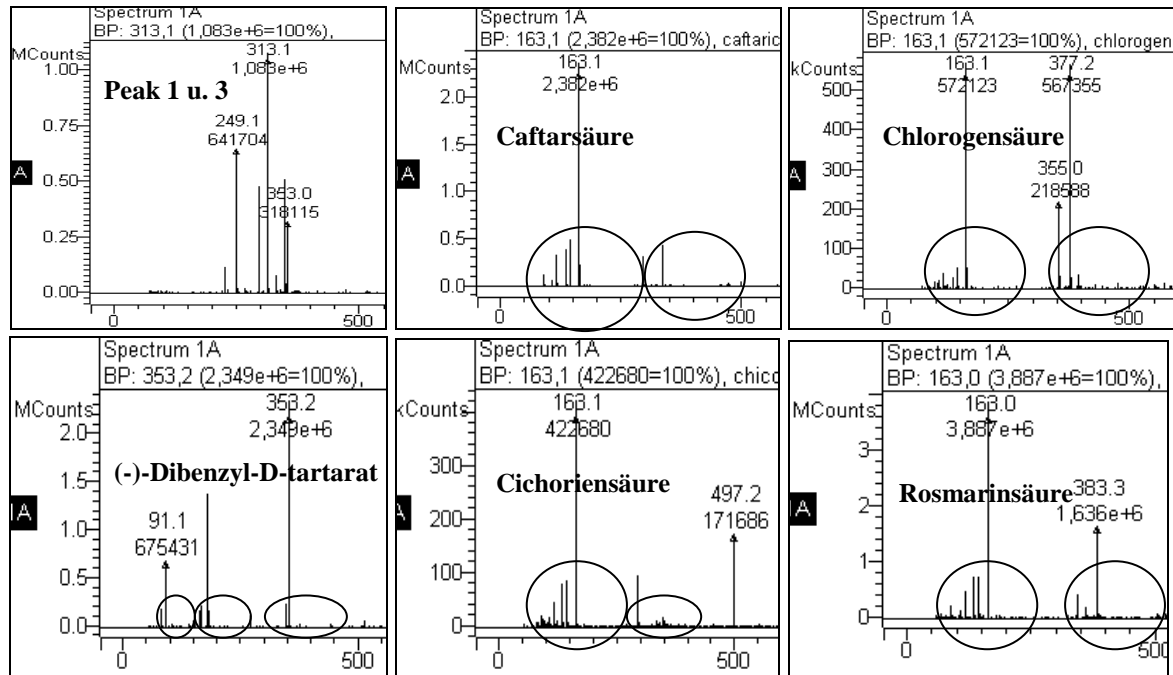


(s. Abb. 3.36), wie Caftarsäure (Kaffeensäure + Weinsäure), Chlorogensäure (Kaffeensäure + Chinasäure), Cichoriensäure (2 x Kaffeensäure + Weinsäure), Rosmarinsäure (Kaffeensäure + 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)milchsäure) und (-)-Dibenzyl-D-tartarat. In den bisherigen Untersuchungen wurden in Gräsern die organischen Säuren Malonsäure, Aconitsäure, Äpfelsäure, Oxalsäure, Chinasäure in Spuren gefunden [233].



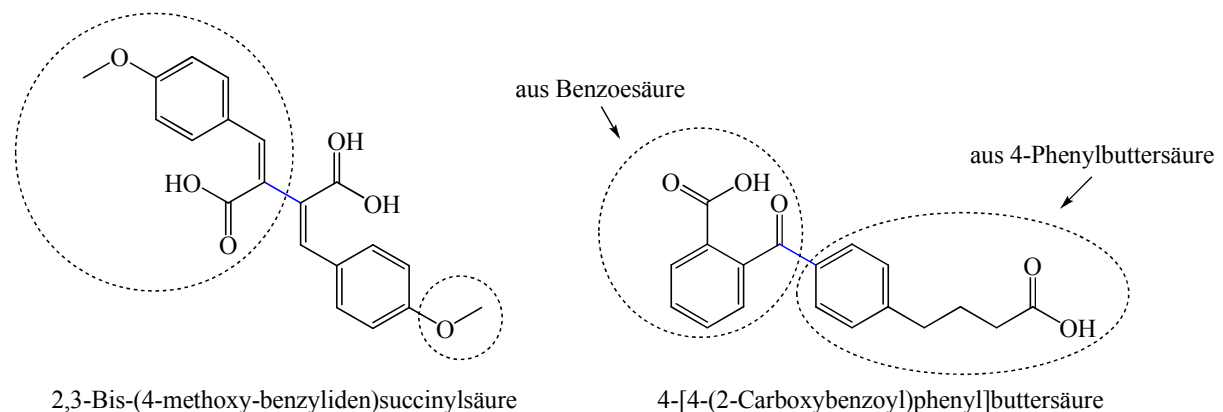
**Abbildung 3.36** Die Strukturen von Caftarsäure, Chlorogensäure, (-)-Dibenzyl-D-tartarat, Cichoriensäure und Rosmarinsäure.

Die massenspektroskopische Analyse zeigte, dass die Fragmentierungen der Verbindungen mit Sauerstoff-Verknüpfung wie Caftarsäure aus zwei Teilen entstehen (s. Abb. 3.37). Caftarsäure (2-O-Kaffeeoylweinsäure) spaltet bei der Ionisierung in Weinsäure und Kaffeensäure. Für Rosmarinsäure (2-O-Kaffeeoyl-2-hydroxy-2,3-dihydrokaffeensäure: Kaffeensäureester mit 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure) und Cichoriensäure (2,3-Dikaffeeoylweinsäure) sind die Spaltungen von Milchsäure/Weinsäure und nachfolgend von Kaffeensäure deutlich zu erkennen. Zudem wies (-)-Dibenzyl-D-tartarat mit Peaks 1-3 die gleiche Summenformel ( $C_{18}H_{18}O_6$ ) auf und zeigte im Spektrum identische  $m/z$ -Werte bei der positiven Produktionen-Detektion (z.B.  $m/z$  353  $[M+Na]^+$ ) und gleiches End-Fragmention (Phenylmethylgruppe  $m/z$  91). Jedoch enthält (-)-Dibenzyl-D-tartarat zwei Sauerstoff-Verknüpfungen an der Kohlenstoffkette und folglich tritt ein aus drei Teilen entstehendes Spektrum sowie unterschiedliches Fragmentierungsverhältnis als bei den Peaks 1-3 auf. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die entsprechenden Phenolsäuren bei der Ionisierung wegen der Sauerstoff-Verknüpfung die ladungstragende organische Säuregruppe leicht abspalten. Im Gegensatz dazu treten bei den Peaks 1-3 keine Sequenz von Phenolsäuren und/oder organischen Säuren auf. Darauf basierend können die Peaks 1-3 aus zwei Phenylgruppen strukturiert werden. Jedoch sind die Phenylgruppen nicht mit einem Sauerstoffatom verknüpft.

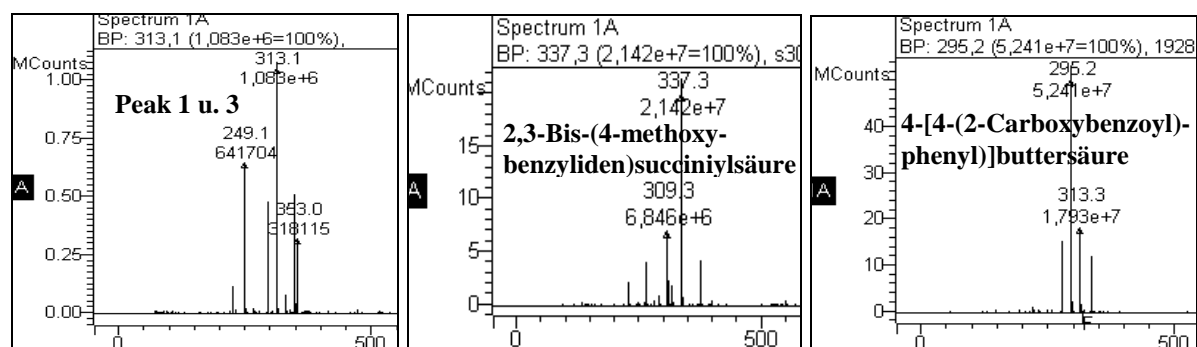


**Abbildung 3.37** Oben: LC-ESI-MS-Spektren der Peaks 1-3 (links), Caftarsäure (Mitte) und Chlorogensäure (rechts). Unten: LC-ESI-MS-Spektren von (-)-Dibenzyl-D-tartarat (links), Cichoriensäure (Mitte) und Rosmarinsäure (rechts). Die aus zwei sowie drei Teilen bestehenden Fragmentierungen der analysierten Komponenten sind in Spektren mit Kreisen gekennzeichnet. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im nächsten Schritt beispielhaft durch eine Kohlenstoffkette miteinander verbundene und ähnliche Summenformel aufweisende 2,3-Bis-(4-methoxy-benzyliden)succinylsäure und 4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure an der LC-ESI-MS/MS analysiert (s. Abb. 3.38-3.39).

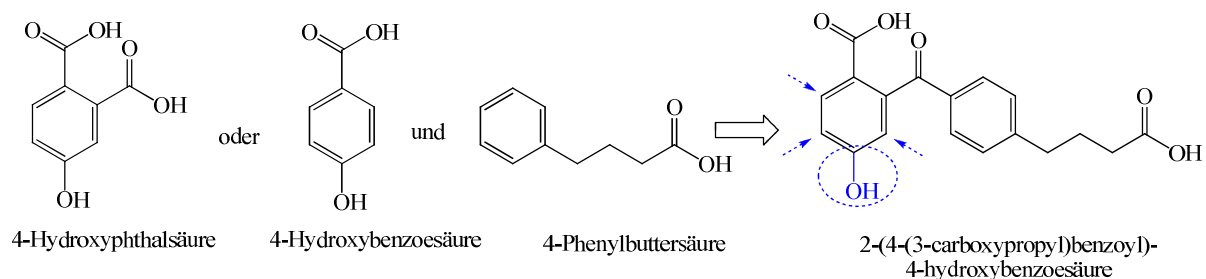


**Abbildung 3.38** Die Strukturen von 2,3-Bis-(4-methoxy-benzyliden)succinylsäure und 4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure.



**Abbildung 3.39** LC-ESI-MS-Spektren der Peaks 1-3 (links), 2,3-Bis-(4-methoxy-benzyliden)succiniylsäure (Mitte) und 4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure (rechts). Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Wie in Abbildung 3.39 zu erkennen ist, zeigen 2,3-Bis-(4-methoxy-benzyliden)succiniylsäure und 4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure gleiche Fragmentierungsmuster mit Peak 1-3. Die entsprechenden Säuren enthalten keine Methoxygruppe am Benzyl-Ring und spalten wie die Peaks 1-3 bei der Ionisierung mehrere Carbonyl- ( $\Delta m/z$  28) und Hydroxygruppen ( $\Delta m/z$  18) (s. Tab. 3.2). Die Summenformel der 4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure ist C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub> und enthält eine OH-Gruppe weniger als die Peaks 1-3. Aus diesem Grund kommt die 4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure ca. 10 min später als Peak 1. Durch die Positionsänderung der OH-Gruppe und/oder mit einer eingefügten OH-Gruppe am Benzoessäure-Ring wird diese Säure polarer und kann früher von der Säule eluiert werden. Die 4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure (m/z 313/295/277/249) zeigt ähnliche Fragmentierungen wie Peaks 1-3 (m/z 331/313/295/267/249/225/91). Diese Säure entsteht durch die Verbindung aus Benzoessäure oder Phthalsäure mit 4-Phenylbuttersäure. Benzoessäure und 4-Phenylbuttersäure wurden als Flavonoid-Abbauprodukte im bovinen Rumen identifiziert [201, 204]. In den zuvor durchgeführten Untersuchungen im Pansenlabor der Klinik für Rinder (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) wurde Buttersäure im künstlichen Pansensaft nachgewiesen [194, 198]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die Peaks 1-3 im Pansen durch Mikroorganismen aus der 4-Phenylbuttersäure und aus Benzoessäure-/Phthalsäure-Derivaten entstehen. Somit erreicht 4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure die Summenformel der Peaks 1-3 (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>). Aufgrund der verschiedenen möglichen Positionen der OH-Gruppe am Benzyl-Ring wurden an der LC-ESI-MS/MS wie bei den Peaks 1-3 unterschiedliche Retentionszeiten für die drei Isomere detektiert. Ein möglicher struktureller Aufbau der Peaks 1-3 ist in Abbildung 3.40 dargestellt.



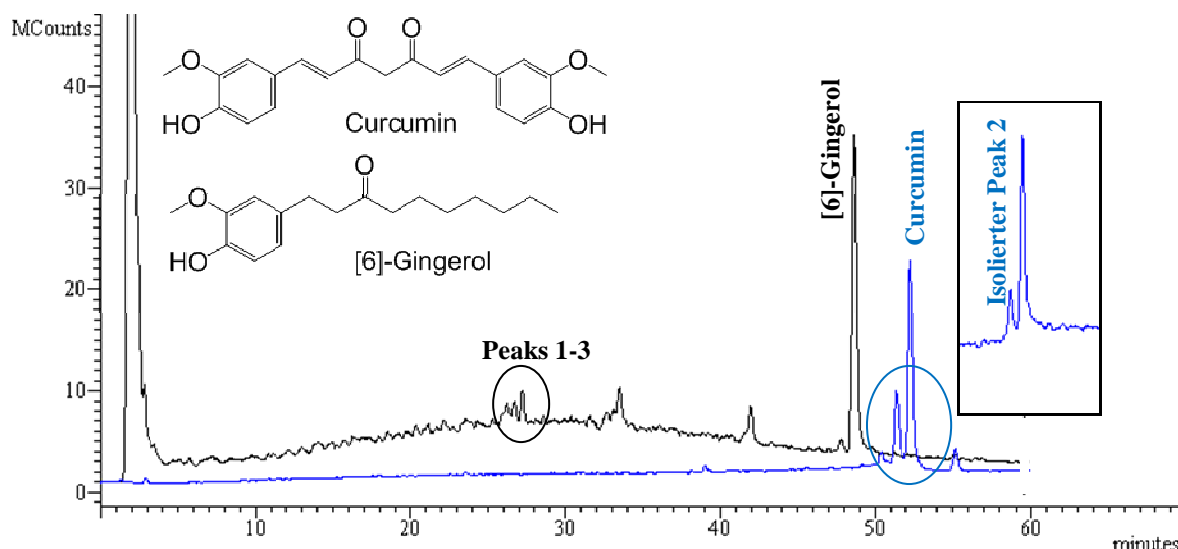
**Abbildung 3.40** Der mögliche strukturelle Aufbau der Peaks 1-3.

Im nächsten Schritt wurden zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse die im Pansen nachgewiesenen Diarylheptanoide [234-235] als weitere pflanzliche Phenylpropanoid-Derivate untersucht.

### 3.7.4 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Diarylheptanoiden

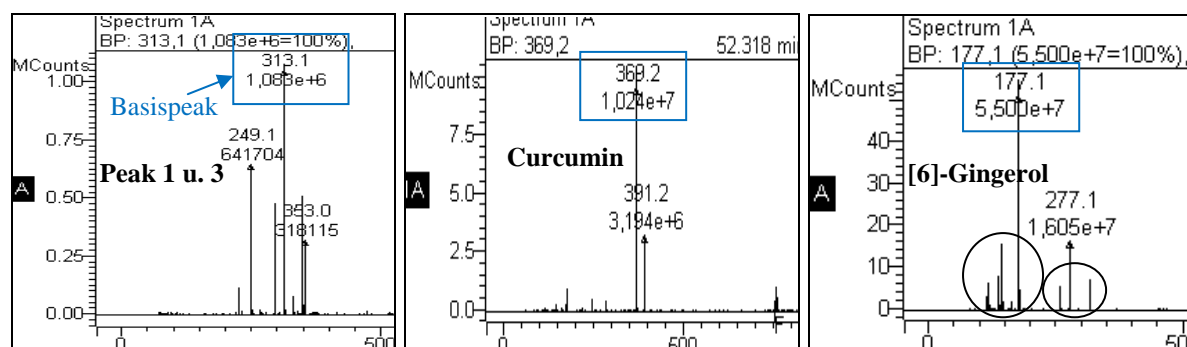
Die offenkettigen und linearen Diarylheptanoide sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Die Grundstruktur der Diarylheptanoide wird als Arylring- $C_7$ -Arylring definiert. Sie werden von Mikroorganismen metabolisiert, denen Platyphyllone, Centrololol und Platyphyllane gegeben werden [234-235]. Somit wurden Platyphyllone im Pansensaft sowie im Urin von Rind, Schaf, Ziegen und Kaninchen identifiziert [234-235]. Auf diese Weise wurden in dieser Arbeit die Massen, Summenformeln, Fragmentierungen der im Pansensaft nachgewiesenen Diarylheptanoide (wie 3-Platyphyllone, Centrololol) und ihre Derivate mit Hilfe der Massen-Datenbank gescannt. Damit wurden 20 verschiedene Diarylheptanoid-Verbindungen mit Peaks 1-3 verglichen (s. Tab. 5.4-5.5) und es wurde keine identische Summenformel mit Peaks 1-3 gefunden [234-238]. Zur detaillierteren Untersuchung wurden beispielhaft das bekannteste Diarylheptanoide Curcumin und [6]-Gingerol als weitere Phenylpropanoid-Derivate an der LC-ESI-MS/MS analysiert (s. Abb. 3.41). Der unterschiedliche strukturelle Aufbau der entsprechenden Verbindungen war ein weiterer Grund für die Auswahl der Standardanalyse.

Curcumin entsteht aus zwei Phenylpropanoid-Einheiten und einer Malonsäure-Einheit [239]. Durch weitere Hydroxylierung bzw. Methylierungen können ihre Derivate gebildet werden. Daneben können aus Curcumin Gingerole als weiteres Phenylpropanoid-Derivate synthetisiert werden [239]. [6]-Gingerol ist Hauptvertreter der Gingerole, die sich aus Ferulasäure und Malonsäure sowie einer Fettsäure herleiten [239].



**Abbildung 3.41** Überlappendes LC-ESI-MS/MS-Chromatogramm von Curcumin-Standard und Fermenterprobe Fr-1 (K-01, K: Kontrollsilage) mit Zugabe von [6]-Gingerol-Standard. Strukturen von Curcumin, [6]-Gingerol und LC-ESI-MS/MS-Chromatogramm vom isolierten Peak 2. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Curcumin wurde an der LC-ESI-MS/MS aufgrund des Diaryl-Rings und der asymmetrischen Anordnung mit drei intensitätsunterschiedlichen Signalen aufgelöst. Bei den Peaks 1-3 treten auch drei überlappende Signale auf. Dagegen spaltet Curcumin zunächst Malonsäure ( $m/z$  369/309/271/245/225/177/147/123) und nicht wie die Peaks 1-3 ( $m/z$  331/313/295/267/249/225/91) Hydroxy- ( $\Delta m/z$  18) bzw. Carbonylgruppen ( $\Delta m/z$  28) ab (s. Abb. 3.42). Zudem ist die Intensität des Molekülions  $m/z$  369 (hier auch Basispeak) von Curcumin signifikant größer als Molekülion  $m/z$  331 von Peaks 1-3 auf. Dagegen ist für [6]-Gingerol die Spaltung von Hydroxy- sowie Carbonylgruppe zu erkennen. Jedoch besteht ihre Fragmentierung aus zwei Teilen ( $m/z$  277/259/177/162/145/137/117). Für die beiden Verbindungen wurden als Endfragmentation im Gegensatz zu den Peaks 1-3 keine Phenylmethylgruppe ( $m/z$  91; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>-) ermittelt. Demzufolge eluieren Curcumin ( $R_t$ : 52,22 min) und [6]-Gingerol ( $R_t$ : 48,04 min) von der Säule mit relativ späteren Retentionszeiten als die Peaks 1-3 ( $R_t$ : 25,68-26,74 min).



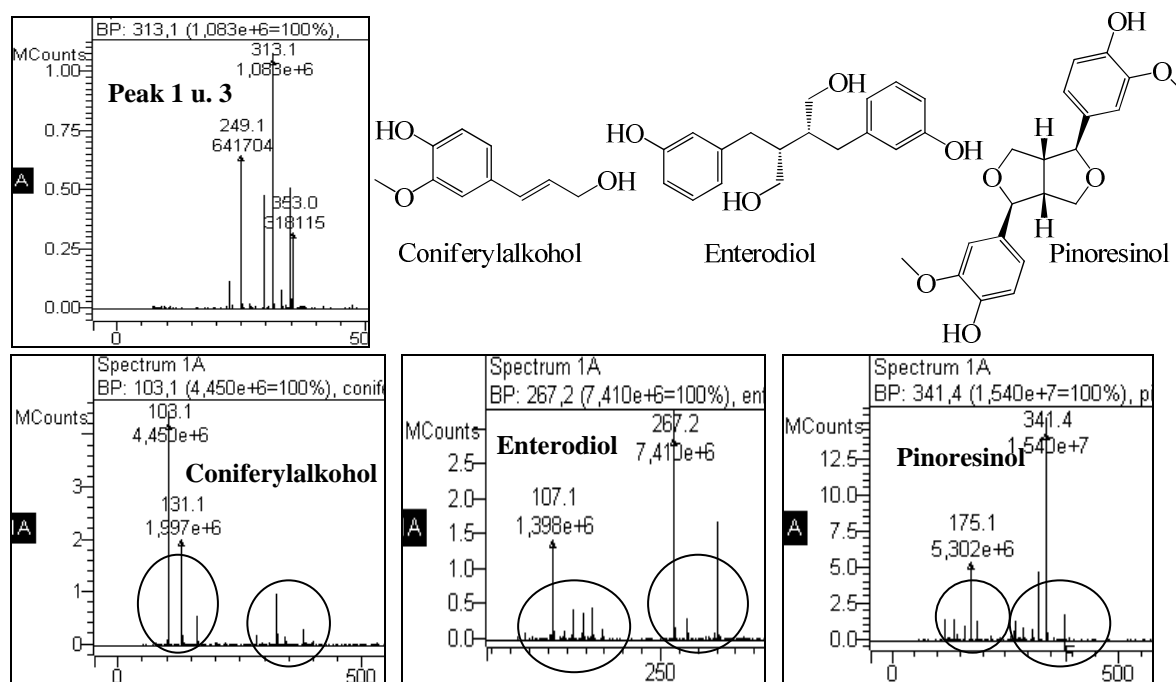
**Abbildung 3.42** LC-ESI-MS-Spektren der Peaks 1-3 (links), Curcumin (Mitte) und [6]-Gingerol (rechts). Basispeaks der analysierten Komponenten sind in Spektren mit Rechteck gekennzeichnet. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Aufgrund der unterschiedlichen m/z-Verhältnisse können die Peaks 1-3 keine enolisierbaren Carbonylverbindungen bzw. Diarylheptanoide sein. Zudem wurden in den bisherigen Untersuchungen keine negativen pharmakologischen Wirkungen von Diarylheptanoiden beschrieben [240]. Beispielsweise ist Curcumin ein potenter Inhibitor der Mutagenese und chemisch induzierten Karzinogenese [240-241]. Folglich wurden im nächsten Schritt neben den positiven pharmakologischen Wirkungen auch negativ wirkende und nicht enolisierbare Phenolsäure-Dimere, die Lignane, untersucht.

### 3.7.5 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Lignanen

Die Struktur der Lignane besteht aus zwei C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>-Phenylpropanoid-Körpern verknüpft über das mittlere Kohlenstoffatom der C<sub>3</sub>-Seitenketten (s. Abb. 3.43) [20]. Die Lignane-Bausteine der Hydroxyzimtsäure-Derivate, meist Coniferylalkohol, entstehen aus Phenylalanin über den allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel [94]. Beispielsweise oxidieren zwei Moleküle primär Coniferylalkohol durch die Pinoresinol-Synthase stereospezifisch zu (+)-Pinoresinol (Furofuran-Lignan) [20]. Zudem besitzt (-)-3,3'-Bisdimethylpinoresinol die gleiche Summenformel (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>) wie die Peaks 1-3. Im Gegensatz zu Pinoresinol enthält diese Substanz an beiden Phenyl-Ringen keine Methoxy- sondern Hydroxygruppen, damit weist sie insgesamt vier Hydroxygruppen auf. Weiterhin wurden die Enterolignane z.B. Enterodiol und Enterolacton in Gras und Grassilage identifiziert [242-243]. Das Enterodiol zeigte nach der Silage-Fütterung schwache östrogene bzw. antiöstrogene Wirkung in Rinder-Milch [242-243]. Zudem wurden Pinoresinol im Pansen [244], Pinoresinol und Enterodiol im menschlichen sowie tierischen Urin (Ratten, Kaninchen) [244-247] nachgewiesen. Die unterschiedlichen pflanzlichen Lignane bzw. deren Glykoside werden durch Metabolisierung

mittels Darmflorabakterien in die aktiven Enterolignane umgesetzt [248-249]. Darauf basierend wird vermutet, dass die pflanzlichen Lignane durch die Fütterung der Silage in den Körper gelangen und durch Pansenbakterien zu Enterodiol (Enterolignane) und/oder Pinoresinol (Furofuran-Lignane) umgewandelt werden [244]. Aus diesen Gründen wurden an der LC-ESI-MS/MS beispielhaft zur Identifikation der Peaks 1-3 die Lignane-Bausteine Coniferylalkohol, Enterolignane Enterodiol und Furofuran-Lignane Pinoresinol analysiert (s. Abb. 3.43).



**Abbildung 3.43** Oben links: LC-ESI-MS/MS-Spektrum der Peaks 1-3. Oben rechts: Die Strukturen von Coniferylalkohol, Enterodiol und Pinoresinol. Unten: LC-ESI-MS/MS-Spektren von Coniferylalkohol (links), Enterodiol (Mitte), Pinoresinol (rechts). Die aus zwei Teilen bestehenden Fragmentierungen der analysierten Komponenten sind in Spektren mit Kreisen gekennzeichnet. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

Entgegen den Literaturquellen [242-244], wurden nach der LC-ESI-MS/MS-Analyse in den untersuchten Grassilagen, Gras, Heu sowie Fermenter-Proben kein Coniferylalkohol, Enterodiol oder Pinoresinol identifiziert. Zur Strukturaufklärung der Peaks 1-3 wurden die Fragmentierungsmuster der analysierten Lignane mittels Fullscan und MS<sup>n</sup>-Experimente mit den Peaks 1-3 verglichen. Die Lignane-Bausteine Coniferylalkohol (primär Hydroxyzimtsäure), Lignane Enterodiol (nicht cyclische Hydroxyzimtsäure-Dimer) und Pinoresinol (cyclische Hydroxyzimtsäure-Dimer) haben einen unterschiedlichen strukturellen Aufbau. Coniferylalkohol (m/z 381/343/325/283-163/131/103) weist wie Enterodiol (m/z 325/285/267-173/159/147/133/107) und Pinoresinol (m/z 381/357/341/323/311/291/271-205/187/175/

160/137/115) aus zwei Teilen entstehenden Fragmentierungen auf (s. Abb. 3.43). Im Gegensatz zu Enterodiol und Pinoresinol zeigt Coniferylalkohol bei der Ionisierung der Dimer-Signale (zweiter Teil der Fragmentierung) geringere Signal-Intensität als der Monomere. Im Vergleich dazu wurden für Peaks 1-3 keine aus zwei Teilen bestehenden Phenolsäure-Sequenzen festgestellt. Dagegen weisen Lignane wie Peaks 1-3 Hydroxy- sowie Carbonyl-Gruppe-Spaltungen aber mit unterschiedlichen  $m/z$  Werten auf. Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass die Peaks 1-3 Maximum aus zwei Phenolsäuren entstehen können. Jedoch können diese Phenolsäuren nicht cyclisch miteinander gekoppelt werden. Damit wird die Verknüpfung der beiden Phenolsäuren stabilisiert. Demzufolge können bei der Ionisierung der zu identifizierenden Substanzen keine aus zwei Teilen entstandenen Fragmentierungsmuster auftreten.

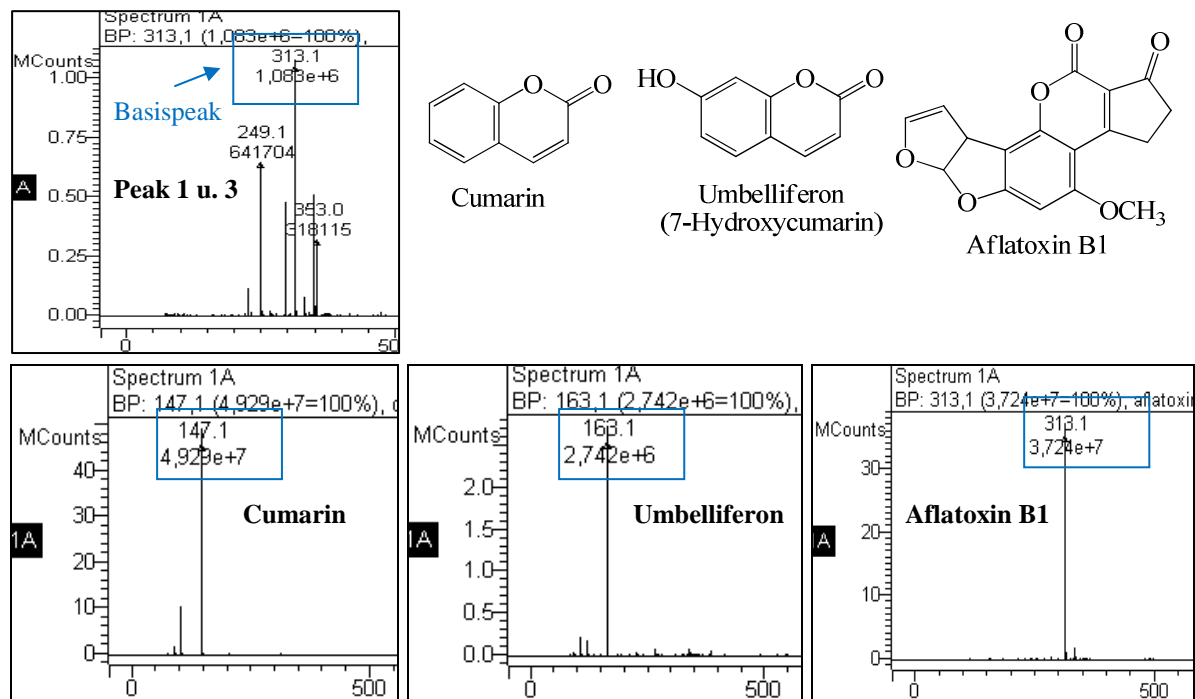
Neben den LC-ESI-MS-Untersuchungen wurden in unterschiedlichen Massen-Datenbanken die Massen, Summenformel und Fragmentierungen der verschiedenen Lignanarten nachgeprüft, aber keine mit den Peaks 1-3 identische Fragmentierungsmuster gefunden. Als weitere sekundäre Metaboliten der Phenolsäuren und Isoflavonen wurden in der Literatur Cumarin-Derivate mit toxischen Wirkungen auf das Tier beschrieben [242-243].

### 3.7.6 Vergleich der Peaks 1-3 mit den Cumarinen und Mykotoxinen

Cumarin (1,2-Benzopyrone) ist ein Lacton aus einer *o*-Hydroxycarbonsäure [20]. Es kommt in vielen Pflanzenarten wie Gras- und Kleearten in glykosidischer Form vor [250] und entsteht im Gras aus Phenolsäuren (s. Abb. 3.17) [94]. Diese Verbindungen können beim Anwelken des Grases ihre Zucker-Komponente enzymatisch abgespalten. Folglich wird das aufgenommene Cumarin bei Tieren zu Hydroxycumarin metabolisiert [251].

Eine weitere Substanzklasse aus Cumarin sind die Mykotoxine. Die hepatotoxischen und karzinogenen Aflatoxine sind die bekanntesten Mykotoxine [20]. Wie in der Literatur beschrieben, werden die Cumarine durch die Verfütterung des Grases im Pansen aufgenommen und durch Pansenbakterien zu Hydroxycumarinen umgewandelt. Aufgrund des Vorkommens dieser Verbindungen wurden als Beispiel-Standard Cumarin, Umbelliferon (7-Hydroxycumarin) und Aflatoxin B1 an der LC-ESI-MS/MS analysiert, somit wurden der strukturelle Aufbau der Cumarine mit den Zielkomponenten, Peaks 1-3, verglichen (s. Abb. 3.44).





**Abbildung 3.44** Oben: LC-ESI-MS-Spektrum von Peaks 1-3 und Strukturen von Cumarin, Umbelliferon sowie Aflatoxin B1. Unten: LC-ESI-MS-Spektren von Cumarin (links), Umbelliferon (Mitte) und Aflatoxin B1 (rechts). Die Basispeaks der analysierten Komponenten sind in Spektren mit Rechteck gekennzeichnet. Positive Mode, Kapillarspannung 80 V, Säule: Jupiter Proteo C12, Flussrate: 0,3 mL/min, Injektion: 10  $\mu$ L, Temperatur: 40  $^{\circ}$ C, Eluenten: A= 0,1 % FA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 0,1 % FA/ACN (v/v), Gradient: 0-60 min  $\rightarrow$  5-60 % B.

In Massenspektren von Cumarin ( $m/z$  147/103/91) und Umbelliferon ( $m/z$  163/119/107/91) konnte wie bei den Peaks 1-3 ( $m/z$  331/313/295/267/249/225/91) als Endfragmentation Phenylmethylgruppe  $m/z$  91 beobachtet werden. Daneben wurden das gleiche Basision ( $m/z$  313), aber unterschiedliche Fragmentierungsmuster zwischen Aflatoxin B1 ( $m/z$  335/313) und den Peaks 1-3 festgestellt. Im Gegensatz dazu war Aflatoxin B1 unpolarer und eluierte unter den eingestellten Laufbedingungen ca. 10 min ( $R_t$ : 34,57 min) später als die Peaks 1-3 ( $R_t$ : 25,68-26,74 min) von der LC-Säule. Zudem wurden in dieser Arbeit Cumarine, Umbelliferon und Aflatoxin B1 in Gras-, Heu-, Grassilage- und Fermenter-Proben nicht detektiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der dargestellten unterschiedlichen Fragmentierungsmuster und verfügbaren intensiven toxikologischen Wirkungen die Peaks 1-3 keine Cumarine oder Mykotoxine sein können.

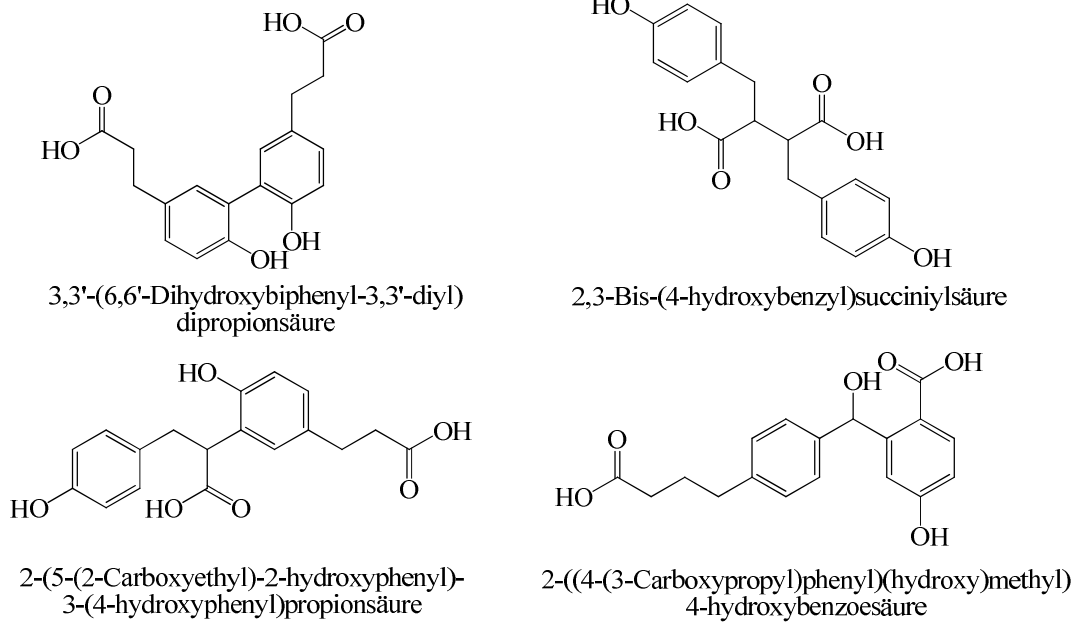
### 3.7.7 Fazit des Kapitels

Zur Identifizierung der Zielkomponenten Peaks 1-3 in Fermenter-Proben wurden nach der Bestimmung der Summenformel (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>) eine Liste der möglichen Substanzen mit Hilfe der Internetseite „<http://chembiofinder.cambridgesoft.com>“ zusammengestellt. Die Liste bestand größtenteils aus Flavonoiden, Chalkonen, Phenolsäuren mit organischen Säuren,

Cumarinen und Lignanen. Diese sind sekundäre pflanzliche Komponenten und wurden in dieser Studie bezüglich ihrer charakteristischen Massen, Fragmentierungsmuster, Retentionszeiten sowie ihres pflanzlichen Vorkommens eingegrenzt. Aufgrund der unterschiedlichen Fragmentierungsmuster oder pharmakologischen Wirkungen wurde festgestellt, dass die Peaks 1-3 keine Flavonoide, Chalkone, Lignane, Cumarine und Mykotoxine sind. Die Peaks 1-3 können wegen der ähnlichen Fragmentierungen, Retentionszeiten und charakteristischen maximalen Wellenlängen Phenolsäuren oder Phenolsäure-Dimere sein. Jedoch spalten die über das Sauerstoffatom verknüpften Phenolsäure-Dimere wie Rosmarinsäure oder Cichoriensäure bei der Ionisierung die ladungstragende organische Säuregruppe leicht ab und zeigen aus zwei Teilen entstandene unterschiedliche Fragmentierungsmuster auf. Dieses Verhalten wurde bei den Peaks 1-3 nicht beobachtet. Somit wurden die mit Sauerstoff gekoppelten Lignine von der Identifikationsliste der Peaks 1-3 eliminiert.

Nach diesen Untersuchungen wurde die entsprechende Liste zur Identifizierung der Peaks 1-3 in künstlichen Pansensaft-Proben auf vier Substanzen reduziert (s. Abb. 3.45). Sie haben die gleichen Summenformeln wie die Peaks 1-3 und ihre Derivate zeigen sehr ähnliche Fragmentierungen sowie Fragmentierungsverhältnisse mit Zielkomponenten (z.B. Intensität des Basisions und Molekülions, Spaltungen; s. Abb. 3.39). Sie können im Pansen durch radikalische Kopplung aus zwei Flavonoid-Abbauprodukten (Phenylpropanoiden) gebildet werden [215, 252].

3,3'-(6,6'-Dihydroxybiphenyl-3,3'-diyl)dipropionsäure, 2-(5-(2-Carboxyethyl)-2-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)propionsäure und 2,3-Bis-(4-hydroxybenzyl)succiniylsäure (s. Abb. 3.45) sind die Derivate und Phenolsäure-Dimere der 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure. Die nächste mögliche Substanz 2-((4-(3-Carboxypropyl)phenyl)-(hydroxy)methyl)-4-hydroxybenzoesäure (s. Abb. 3.45) entsteht aus 4-Phenylbuttersäure und einem Benzoessäure-Derivat z.B. Salicylsäure. Sie enthält wie Peaks 1-3 Phenyl-, COOH- sowie OH-Gruppe aber keine Methoxygruppe und keine Doppelbindungen an der Kohlenstoff-Kette (s. Kap. 3.3.2 u. Abb. 3.45). Zudem wurden die Edukte der entsprechenden vier Komponenten 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure, 3-Phenylpropionsäure (Nachweis in dieser Studie; s. Abb. 3.10), Benzoessäure, 4-Phenylbuttersäure im Pansen nachgewiesen [154-162, 201-202].



**Abbildung 3.45** Der strukturelle Aufbau der möglichen Substanzen nach der LC-ESI-MS/MS- und RP-HPLC-Analyse zur Identifikation der Peaks 1-3.

Für weitere Analysen sind die entsprechenden Standards dieser Substanzen nicht im Handel erhältlich. Daher sollten diese Substanzen zur Charakterisierung der künstlichen Pansensaft-Proben im Labor synthetisiert werden.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Verfütterung der Grassilagen mit auffällig niedrigen Reineiweißanteilen (RE) wird als Ursache für Erkrankungen in Milchviehherden („Faktorenerkrankung Milchviehherde“) diskutiert [1]. Um die Einflüsse der Grassilagen mit unterschiedlichen RE-Anteilen auf die Komponenten im Pansensaft zu untersuchen, wurden die Schadgrassilagen mit einem RE-Anteil < 50 % (w/w) am Rohprotein (Rp) im Vergleich zu Kontrollgrassilagen mit RE-Anteil > 50 % (w/w) am Rp mit Hilfe des Langzeitinkubationssystems RUSITEC (RUmen SIMulation TEChnique) in-vitro fermentiert. Die künstlichen Pansensaft-Proben wurden an der RP-HPLC analysiert, es konnten sechs Peaks getrennt werden (s. Abb. 3.1). Die Flächenintegrale dieser sechs Peaks insbesondere von Peak 1 sind in den Chromatogrammen der Schadsilage-Messungen stets größer als in denen der Kontrollsilagen [195]. Es wird vermutet, dass die „Faktorenkrankheit Milchviehherde“ durch die Substanz 1 (Peak 1) verursacht wird [195]. Darauf basierend waren die Ziele der vorliegenden Arbeit, die Identifizierung und Biosynthese der Zielkomponenten (Peaks 1-6) im Fermenter sowie die Untersuchung der Grassilagen, Gras, Heu im Vergleich. Zudem wurden die Bedeutungen der identifizierten Komponenten in Futtermitteln und im Pansensaft auf das Tier diskutiert.

Die maximalen Wellenlängen, Massen und Fragmentierungen der Zielkomponenten konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich mittels RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS und UPLC-MS bestimmt werden. Nach der Fraktionierung waren Peak 4 und 5 aufgrund geringer Konzentrationen an der RP-HPLC und LC-ESI-MS/MS im positiven sowie negativen Modus nicht nachweisbar bzw. isolierbar. Aus diesem Grund wurden lediglich die Summenformeln der Peaks 1-3 und 6 an der UPLC-MS bestimmt. Peaks 1-3 weisen gleiche Massen (Summenformel  $C_{18}H_{18}O_6$ ) und ähnliche Retentionszeiten (Retentionszeit-Unterschiede der Peaks nur ca. 30 s) auf. Nach der Fraktionierung waren Peak 1 mit Peak 2 und Peak 2 mit Peak 3 im MS-Chromatogramm überlappt. Daraus wurde gefolgert, dass es sich bei den Peaks 1-3 um dieselbe Substanz mit unterschiedlichen Konfigurationen handelt. Die Spektren und Fragmentierungsmuster der sechs Zielkomponenten zeigten keine Peptidfragmentierungen (keine positiv geladenen Aminosäure-Fragmente). Zudem besitzen die Peaks 1-3 und 6 kein N-Atom und als Endprodukt der Fragmentierung wurden Phenylmethylgruppen ( $m/z$  91;  $C_6H_5CH_2-$ ) ermittelt. Somit konnten die Peaks 1-3 und 6 keine N-haltigen Komponenten wie Proteine, Peptide, Aminosäuren, Biogene Amine, Amide, Alkaloide sein. Die Abspaltungen von  $H_2$ , Wasser,  $C_2H_2O$ , CO,  $C_2H_4$  sind charakteristisch für Aromaten oder Phenole [199]. Aus diesen Ergebnissen wurde Peak 6 als

3-Phenylpropionsäure identifiziert. Diese Verbindung gehört zu der pflanzlichen sekundären Substanzklasse der Phenylpropanoide.

Für den isolierten Peak 1 wurden an der  $^1\text{H-NMR}$  Multipllett aufgespaltene Signale von möglichen Protonen aus Aromat- und/oder Aliphath-Verbindungen ( $\delta = 0,90; 1,10; 1,40; 1,70; 2,30; 7,30$  ppm) festgestellt. Um diese Hinweise zu überprüfen, wurden die Fermenter-Proben mittels FT-IR-Spektroskopie analysiert. Die aromatischen C=C-Gerüstschwingungsbanden bei  $1.610\text{ cm}^{-1}$  bis  $1.450\text{ cm}^{-1}$ , die  $\text{sp}^2\text{-C-H}$ -Banden bei  $3.100\text{ cm}^{-1}$  bis  $2.950\text{ cm}^{-1}$  und C=C-Streckschwingungsbande bei ca.  $1.656\text{ cm}^{-1}$  sind der charakteristische Nachweis des aromatischen Systems im künstlichen Pansensaft [199, 205]. Darüber hinaus wurden Carbonsäure-Verbindungen mit ihren breiten O-H-Streckschwingungsbanden bei ca.  $3.000\text{-}2.500\text{ cm}^{-1}$ , ihrer C=O-Schwingungsbande bei ca.  $1.656\text{ cm}^{-1}$  und Carbonylbande bei ca.  $2.359\text{ cm}^{-1}$  festgestellt [199]. Die „in plane“-Deformationsbanden bei ca.  $1.412\text{ cm}^{-1}$  und  $1.368\text{ cm}^{-1}$  werden den Alkylgruppen in Fermenter-Proben zugeordnet. Zudem waren die ausgeprägten C-C-Streckschwingungsbanden für Alkylgruppen im typischen „finger-print-Bereich“ bei ca.  $1.017\text{ cm}^{-1}$  und  $990\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen [205]. Die ermittelten Banden konnten folglich aus Aromaten, Alkenen, Carbonsäuren mit möglichen Alkylresten stammen.

Um das Vorkommen und die Resorption der sechs Zielsubstanzen in Grassilage und Serum zu bestimmen, wurden auch Grassilage-, Gras-, Heu- und Serum-Untersuchungen durchgeführt. Die Peaks 1-6 wurden nach der HPLC- und LC-ESI-MS/MS-Analyse in den Serum-Proben nicht wiedergefunden. Auch in Grassilage, Gras und Heu wurden die Peaks nicht identifiziert. Lediglich in einer Schadgrassilage-Extrakte (S-09; RE-Anteil 39,01 % (w/w) vom Rp) wurde Peak 6 (3-Phenylpropionsäure) detektiert. Diese Verbindung ist ein sekundärer Metabolit aus Flavonoiden und ihre Konzentration in Fermenter-Proben ist gegenüber der Grassilage ca. 5-fach höher.

Darauf basierend wurden die sekundären pflanzlichen Komponenten in Grassilage-, Gras- und Heu-Proben untersucht. In den 70 analysierten Grassilage-, Gras- sowie Heu-Extrakten wurden ein Biogenes Amin (2-Phenylethylamin), fünf Phenolsäuren (*p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Chlorogensäure, 3-Phenylpropionsäure) und 19 Flavonoide (Flavone: Acacetin, Apigenin, Diosmetin, Luteolin, Acaciin, Diosmin, Isorhoifolin, Pectolarin, Saponarin, Isoorientin, Orientin, Vitexin, Luteolin 7-*O*-rutinosid; Flavonole: Kaempferol, Quercetin, Rutin; Isoflavone: Genistein, Biochanin A, Formononetin) charakterisiert. Da in den analysierten Futtermitteln und Fermenter-Proben keine Cumarine, Stilbene, Aurone, Flavane (Flavanole, Flavanone, Flavanonole), Anthocyanine und Anthocyanidine nachgewiesen wurden, wurde für die eingesetzten Grassilage-, Gras- und

Heu-Extrakte ein eigener enzymatischer Polyphenolsyntheseweg definiert, welcher in drei Abschnitten beschrieben wird: 1. Phenylalaninsynthese, 2. Phenylpropanoidsynthese und 3. Flavonoidsynthese. Dieser in eingesetzten Grassilagen erforschte Biosyntheseweg wurde mit allgemein definierten Shikimisäure- und Phenylpropanoid-Biosynthesewegen [94] in Pflanzen verglichen. Somit wurden L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan als Edukte der Synthese von sekundären pflanzlichen Inhaltsstoffen aus Shikimisäureweg identifiziert. Aufgrund der schnellen Abbaubarkeit der Proteine und Peptide im Pansen wurden L-Phenylalanin und L-Tyrosin in den fermentierten Silage-Proben mit signifikant höheren Konzentrationen nachgewiesen als in Futtermittel-Proben [66]. Dagegen wurde L-Tryptophan in den Fermenter-Proben nicht identifiziert.

Bezüglich ihres Vorkommens, ihrer Summenformel ( $C_{18}H_{18}O_6$ ) und Fragmentierungen wurden die Peaks 1-3 mit den Flavonoiden, Chalkonen, Phenolsäuren, Diaryheptanoiden, Lignanen, Cumarinen und Mykotoxinen verglichen. Wegen unterschiedlicher Fragmentierungsmuster sowie pharmakologischen Wirkungen wurden die Flavonoide, Chalkone, Lignane, Cumarine und Mykotoxine als Peaks 1-3 ausgeschlossen. Aufgrund der ähnlichen Fragmentierungen, Retentionszeiten und charakteristischen maximalen Wellenlängen wurden Phenolsäuren oder Phenolsäure-Dimere als mögliche Substanzen für die Peaks 1-3 untersucht. Jedoch spalten die mit einem Sauerstoffatom verknüpften Phenolsäure-Dimere wie Rosmarinsäure oder Cichoriensäure bei der Ionisierung die ladungstragende organische Säuregruppe leicht ab und zeigen damit aus zwei Teilen entstandene unterschiedliche Fragmentierungsmuster. Zudem wies die enolisierbare Kopplung aus zwei Phenolsäuren z.B. Diarylheptanoide unterschiedliche Fragmentierung als die Peaks 1-3 auf. Dadurch können die möglichen bifunktionalen Phenylgruppen in den Peaks 1-3 nicht mit einem Sauerstoffatom miteinander verbunden und somit enolisierbar sein. Daher wurden die über das Sauerstoffatom gekoppelten Lignine und enolisierbare Diarylheptanoide für die Peaks 1-3-Identifikation ebenfalls eliminiert.

Nach diesen Untersuchungen wurden vier Substanzen (3,3'-(6,6'-Dihydroxybiphenyl-3,3'-diyl)dipropionsäure, 2-(5-(2-Carboxyethyl)-2-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)propionsäure, 2,3-Bis-(4-hydroxybenzyl)succinylsäure und 2-((4-(3-Carboxypropyl)phenyl)-(hydroxy)methyl)-4-hydroxybenzoesäure), die mit den Peaks 1-3 gleiche Summenformel und sehr ähnliche Fragmentierungen aufweisen, als potenzielle Zielsubstanzen diskutiert (s. Abb. 3.45). Diese sind Phenolsäure-Dimere und können im Pansen durch radikalische Kopplung aus zwei Flavonoid-Abbauprodukten der Grassilagen gebildet werden [215, 252]. Sie enthalten wie die Peaks 1-3 Phenyl-, COOH-, OH-Gruppen und auch keine

Methoxygruppe am Phenylring sowie keine Doppelbindungen an der Kohlenstoff-Kette. Zudem wurden ihre entsprechenden Edukte, 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure, 3-Phenylpropionsäure, Benzoesäure, 4-Phenylbuttersäure, im Pansen nachgewiesen [154-162, 201-202].

Für die weitere Analyse sind die entsprechenden Standards dieser Substanzen nicht im Handel erhältlich. Daher müssten diese Substanzen zur Charakterisierung der künstlichen Pansensaft-Proben im Labor synthetisiert werden, was den Rahmen dieser Arbeit übersteigt.

Die Flavonoide sind aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung bzw. ihrer Eigenschaften als Radikalfänger für das Tier bedeutsame Biomoleküle [120]. Die Anzahl der Hydroxylgruppen und größere Reste wie die Zuckerkomponenten im Molekül sind für die antioxidative Wirkung von großer Bedeutung [117-119]. Drei oder weniger Hydroxylgruppen zeigen eine geringere oder keine antioxidative Wirkung [117-118]. Durch die Methylierung und Glykosylierung werden die vorhandenen Hydroxylgruppen blockiert und damit vermindert sich die Fähigkeit, die Radikale abzufangen [119]. In Grassilagen, Gras und Heu wurden die Flavon-Glykoside Diosmin und Acaciin in größeren Konzentrationen auf Grund des Verbrauchs ihrer Aglykone Diosmetin und Acacetin nachgewiesen. Diosmin und Acaciin enthalten ein Disaccharid (Rutinosid), eine Methoxygruppe und weniger als drei Hydroxylgruppen im Molekül. Aufgrund dieser Struktur können die beiden Substanzen eine geringere oder keine antioxidative Wirkung zeigen. Daneben sind Nebenwirkungen wie Migräne, Unwohlsein, Verdauungsbeschwerden oder Schwindel von Diosmin bekannt [253]. Die Auswirkungen von Diosmin auf das Tier sollten durch RUMen SIMulation TEChnique (RUSITEC)-System in-vitro untersucht werden. Mittels dieses Inkubationssystems kann ohne Belastung des Wirtstiers künstlicher Pansensaft produziert werden. Durch die Zugabe von Diosmin in verschiedenen Konzentrationen sollten die entsprechenden Silagen erneut fermentiert werden. Durch Überprüfung der Fermentationsparameter (wie pH, Ammoniak-, flüchtige Fettsäure-, Phenolsäurekonzentration) und durch analytische Qualifizierung der Stoffwechselprodukte in Fermenter-Proben können die Auswirkungen von Diosmin verifiziert werden.

Im Gegensatz zu Diosmin enthalten Quercetin, Rutin, Isoorientin und Orientin ausreichende Hydroxylgruppen im Molekül. Außerdem sind die Flavonole und Isoflavone im Körper aktiver als Flavone und können durch antioxidative Wirkung zur Prävention chronischer Erkrankungen beitragen [146, 253]. Aufgrund der Beeinflussung der Membranpermeabilität wird Rutin (Quercetin 3-*O*-rutinosid) ebenfalls als Vitamin P bezeichnet. Im Vergleich zu Flavonen wurden die antioxidativen Flavonole (Kaempferol, Quercetin, Rutin) und Isoflavone

---

(Genistein, Biochanin A, Formononetin) in sehr geringeren Konzentrationen als Nebenprodukte nachgewiesen. Diese Komponenten wurden nur in wenigen Proben insbesondere in Grassilagen > 50 % RE-Anteil und in Gras- und Heu-Proben > 70 % RE-Anteil identifiziert. Dagegen wurden die keine antioxidative Wirkung zeigenden Flavon-Glykoside in den Grassilagen < 50 % RE-Anteil in größeren Mengen festgestellt als in Silagen > 50 % RE-Anteil. Die Tiere könnten durch Verfütterung dieser Silagen mit geringeren Flavonole- und Isoflavonemengen anfälliger gegenüber Krankheiten wie der „Faktorenerkrankung der Milchviehherde“ sein. Die gesundheitsbeeinflussenden Wirkungen der Flavonoide auf den tierischen Organismus sollten mit pharmakologischen Methoden erforscht werden.



## 5 Anhang

Im Folgenden sind die Ergebnisse der statistischen Berechnungen und die in dieser Arbeit qualifizierten und quantifizierten primären Substanzen angegeben. Daneben werden in diesem Kapitel die Materialien sowie Methoden für die durchgeführten experimentellen Arbeiten dargestellt.

### 5.1 Ergänzungen der Analyseergebnisse

#### 5.1.1 Identifizierung der Aminosäuren, Biogenen Amine, Peptide und Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach der künstlichen Pansensaft-Produktion die potentiellen Aminosäuren, Biogene Amine, Peptide und Proteine durch differenzierte Methoden untersucht.

##### 5.1.1.1 Identifizierung der Aminosäuren und Biogenen Amine durch FMOC-Methode

Die in den zwölf Fermenter-Proben enthaltenen Aminosäuren und Biogenen Amine wurden mittels FMOC-Methode an der HPLC charakterisiert. Die identifizierten Aminosäuren und Biogene Amine sind mit den zugehörigen Abkürzungen im Folgenden aufgelistet.

##### Identifizierte Substanzen durch FMOC-Methode

1. IAA: Indol-3-essigsäure	8. Cys: Cystein	15. Arg: Arginin
2. Ser: Serin	9. Cit: Citrullin	16. Asp: Asparaginsäure
3. Glu: Glutamat	10. Thr: Threonin	17. His: Histamin
4. Gly: Glycin	11. Agm: Agmatin	18. Ala: Alanin
5. Tyr: Tyrosin	12. Pro: Prolin	19. GABA: $\gamma$ -Aminobuttersäure
6. Val: Valin	13. Phe: Phenylalanin	20. Ile: Isoleucin
7. Leu: Leucin	14. Sert : Serotonin	21. Lys: Lysin

Die Messungen wurden zweimal wiederholt. Die ermittelten mittleren Konzentrationen der identifizierten Aminosäuren in Fermenter-Proben am Tag 12 des RUSITEC-Versuches sind in Tabelle 5.1 zusammengestellt. Indol-3-essigsäure, Leucin und Isoleucin wurden in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen. Diese Aminosäuren können in FMOC-Reagenzien instabil sein und durch die nicht geeignete Messtemperatur und -zeit zerfallen.

Die höchsten Konzentrationen und Abweichungen wurden für das Biogene Amin Serotonin, insbesondere in Fr-9 (S-12) mit 345,19  $\mu\text{mol/L}$  und Fr-12 (K-15) mit 230,71  $\mu\text{mol/L}$

---

festgestellt. Lysin wurde als zweite Aminosäure mit deutlich höheren Konzentrationswerten in den Fermenter-Proben nachgewiesen. Mit diesen Methoden wurden wie bei der LC-ESI-MS/MS-Methode höhere Konzentrationen für L-Phenylalanin und L-Tyrosin in Schadsilagen ermittelt als in Kontrollsilagen. Außerdem waren die mittleren Konzentrationen von Indol-3-essigsäure, Arginin, Serin, Citrullin, Threonin, Glycin, Alanin, Valin, Leucin und Lysin höher in Schadsilagen gegenüber denen in Kontrollen (s. Tab. 5.1).

**Tabelle 5.1** Die Retentionszeiten und Konzentrationen der identifizierten Aminosäuren sowie Biogene Amine in Fermenter-Proben durch FMOC-Methode an der HPLC (As: Aminosäuren, BA: Biogene Amine, S: Schadsilage, K: Kontrollsilage, Fr: Fermenter,  $\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert, s: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient).

As und BA	$R_t$ [min]	Konzentration [ $\mu\text{mol/L}$ ]																	
		Fermenter-Proben												Fermentierte Kontrollgrassilagen					
		Fermentierte Schadsilagen												Fermentierte Kontrollgrassilagen					
S-02 Fr-2	S-04 Fr-3	S-07 Fr-4	S-08 Fr-5	S-09 Fr-6	S-10 Fr-7	S-11 Fr-8	S-12 Fr-9	S-13 Fr-10	$\bar{x}$	s	VK %	K-01 Fr-1	K-14 Fr-11	K-15 Fr-12	$\bar{x}$	s	VK %		
IAA	10,32	4,67	0,11	0,65	0,11	0,60	0,15	0,43	4,93	0,20	1,32	1,99	151	0,31	1,06	0	0,46	0,55	120
Cys	14,17	0,22	0,55	0,25	0,19	1,82	0,50	0,21	0,64	0,18	0,51	0,52	103	0,73	1,78	0,35	0,95	0,74	77
Arg	15,61	6,02	0,48	5,34	6,47	5,04	0,39	5,55	0,51	5,49	3,92	2,63	67	4,70	0,98	0,89	2,19	2,17	99
Ser	16,55	2,73	7,82	2,67	8,87	12,99	3,45	2,48	14,40	9,33	7,19	4,61	64	2,68	10,16	4,56	5,80	3,90	67
Cit	17,84	1,44	2,00	1,22	1,56	1,70	3,30	1,61	2,36	1,53	1,86	0,63	34	1,10	2,16	1,80	1,69	0,54	32
Asp	18,39	0,09	0,52	0,29	4,47	0,65	1,90	0,17	0,58	0,09	0,97	1,42	146	0,02	0,62	0,83	0,49	0,42	86
Glu	18,92	0,71	0,56	0,59	0,33	0,70	0,88	0,18	1,12	0,24	0,59	0,31	52	0,18	0,48	2,08	0,91	1,02	11
Thr	20,02	7,05	1,26	0,47	11,26	1,60	2,20	0,84	5,05	0,51	3,36	3,72	111	5,71	0,52	0,77	2,33	2,93	125
His	21,22	1,67	1,71	1,72	1,75	2,56	3,60	1,69	1,81	1,69	2,02	0,66	32	3,50	1,60	1,61	2,23	1,09	49
Gly	22,62	1,13	1,77	1,03	1,49	1,80	4,29	1,75	2,84	1,29	1,93	1,03	53	1,96	1,70	1,94	1,87	0,15	8
Agm	24,72	3,33	3,13	3,57	3,51	3,55	3,54	4,37	2,49	3,54	3,45	0,49	14	3,64	3,40	3,53	3,52	0,12	3
Ala	26,01	0,86	1,11	0,92	0,97	1,29	2,19	1,02	1,03	0,98	1,15	0,41	35	0,88	0,88	0,95	0,90	0,04	5
Tyr	27,25	0,55	0,53	1,36	1,37	1,64	1,24	1,50	0,55	1,01	1,08	0,44	40	1,36	0,72	0,53	0,87	0,43	50
Pro	28,81	5,37	9,85	8,97	5,83	2,73	12,81	6,46	9,68	4,91	7,40	3,13	42	4,83	10,28	23,18	12,76	9,43	74
GABA	31,78	0,03	0,10	0,10	0,05	0,23	0,14	0,05	0,21	0,01	0,10	0,08	76	0,07	0,17	0,39	0,21	0,17	79
Val	34,79	1,40	5,01	2,32	2,83	33,45	4,80	2,64	6,15	3,58	6,91	10,06	146	0,48	1,83	4,67	2,33	2,14	92
Phe	38,17	3,62	8,52	2,68	6,02	5,24	4,81	4,63	6,98	4,96	5,27	1,74	33	3,51	4,61	4,47	4,20	0,60	14
Ile	39,59	0,24	0,16	0,38	0,42	0,35	0,37	0,31	0,19	0,40	0,31	0,09	30	0,27	0,40	0,89	0,52	0,33	63
Leu	40,32	0,28	0,18	0,26	0,35	0,35	0,43	0,30	0,36	0,27	0,31	0,07	24	0,33	0,11	0,01	0,15	0,16	110
Sert	41,37	46,44	62,23	47,40	68,39	46,29	57,71	53,48	345,19	89,12	90,70	96,41	106	31,12	39,99	230,71	100,60	112,76	112
Lys	46,85	33,49	42,28	15,36	35,68	20,74	23,91	31,38	19,53	24,93	27,48	8,75	32	11,38	16,40	12,05	13,28	2,73	21

### 5.1.1.2 Bestimmung der Protein- und Peptid-Konzentration

Die Gesamtproteinmengen der Fermenter-Proben wurden nach Bradford- und Lowry-Test bestimmt (s. Tab. 5.2). Die höchste Proteinkonzentration in der Fermenterflüssigkeit für Tag 12 wurde für die Fermenter-Probe Fr-11 (K-14) nach Bradford-Test (682,44  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und nach Lowry-Test (701,70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ermittelt. Nach beiden Methoden wurden in Kontrollsilagen (Lowry: 596,20 $\pm$ 98,64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Bradford: 568,75 $\pm$ 98,47  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) gegenüber den Schadsilagen höhere mittleren Gesamtproteinmengen (Lowry: 462,26 $\pm$ 81,84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Bradford: 398,06 $\pm$ 77,04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) festgestellt.

**Tabelle 5.2** Gesamtproteinmenge in [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] der 12 RUSITEC Fermenter-Proben am 12. Tag des Versuches nach Bradford- und Lowry-Test (K: Kontrollsilage, S: Schadsilage, Fr: Fermenter,  $\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert, s: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient).

	Fermenter-Proben	Gesamtproteinmenge [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	
		Bradford	Lowry
Schadsilage	S-02 (Fr-2)	489,95	562,18
	S-04 (Fr-3)	368,81	465,66
	S-07 (Fr-4)	433,67	486,54
	S-08 (Fr-5)	324,52	352,09
	S-09 (Fr-6)	448,59	545,93
	S-10 (Fr-7)	358,92	435,93
	S-11 (Fr-8)	279,93	342,09
	S-12 (Fr-9)	367,95	422,93
	S-13 (Fr-10)	510,15	546,96
	$\bar{x}$	398,06	462,26
	s	77,04	81,84
	VK %	19,36	17,70
Kontrollsilage	K-01 (Fr-1)	442,27	464,42
	K-14 (Fr-11)	682,44	701,70
	K-15 (Fr-12)	581,54	622,48
	$\bar{x}$	568,75	596,20
	s	98,47	98,64
	VK %	17,31	16,54

### 5.1.1.3 MALDI-TOF-MS

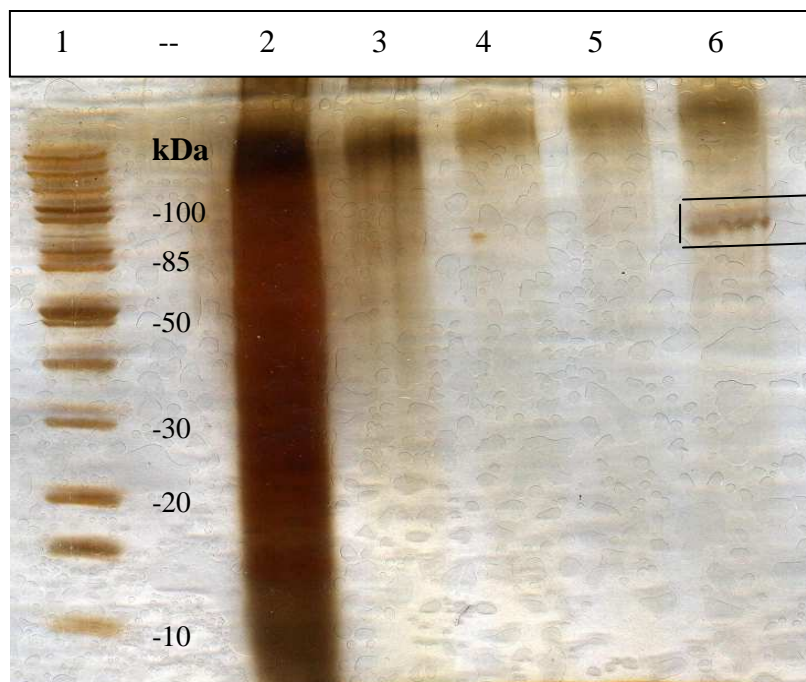
Die fraktionierten sowie unfraktionierten Fermenter-Proben wurden mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die Messung wurde im maximalen Messbereich von 500-7.000 Da durchgeführt und die ermittelten Massen sind in Tabelle 5.3 dargestellt. Mittels MALDI-Messung konnten bei den untersuchten Proben keine Signale über 1.000 Da (keine Protein-Masse) identifiziert werden.

**Tabelle 5.3** Die analysierten Proben an der MALDI-TOF-MS (Fr: Fermenter). Basisionen sind fett markiert.

Probe Name	Massen
Fr 1	1044, 711
Fr 3	884, 714, 713, 692, 676, 661, 575, 512
Fr 6	884, 714, 692, <b>676</b> , 661, 575, 512
Fr 9	886, 713, 696, 694, <b>678</b> , 662, 527, 512
Peak 1	881, 714, <b>681</b> , 663, 647, 512
Peak 2	879, 714, 680, 681, 677, <b>662</b> , 645, 576, 512
Peak 6	879, 863, 775, 731, 714, 680, 677, 671, 661, 655, 645, 602, <b>576</b> , 562, 533, 512

#### 5.1.1.4 SDS-PAGE

Es wurde versucht, die eventuell vorhandenen Proteine im Pansensaft oder in Fermenter-Proben mittels SDS-PAGE entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität zu isolieren. Aufgrund geringerer Konzentrationen und Instabilität der möglichen Proteine wurden beim ersten Versuch keine Protein-Banden detektiert. Deshalb wurde beim zweiten Versuch frischer Pansensaft von einem Rind entnommen und direkt mit 50 % Glycerin stabilisiert. Abbildung 5.1 zeigt die Pansensaft-Proben ohne Aufarbeitung bzw. nach Aufarbeitungsprozess sowie mit und ohne Glycerin. Um die Stabilität der Proteine zu untersuchen, wurden die Proben 4 und 5 über Nacht bei -25 °C gelagert. Die anderen Proben mit unterschiedlichem Aufarbeitungsprozess wurden direkt in die Taschen des Gels pipettiert.



**Abbildung 5.1** SDS-PAGE-Gele (12 %-ig, Silberfärbung) zur Untersuchung der enthaltenen Proteinbanden in Pansensaft-Proben.

Legende Fraktionen:

1. Marker
2. Frischer Pansensaft (nicht zentrifugiert und nicht aufgearbeitet)
3. Frischer Pansensaft (zentrifugiert, aufgearbeitet)
4. Pansensaft (zentrifugiert und über Nacht bei -25 °C gelagert)
5. Pansensaft mit Glycerin (zentrifugiert und über Nacht bei -25 °C gelagert)
6. Frischer Pansensaft mit Glycerin (zentrifugiert und direkt in die Taschen des Gels pipettiert)

In Abbildung 5.1 ist nur eine Proteinbande bei ca. 90 kDa für Probe 6 (frischer Pansensaft mit Glycerin, zentrifugiert und direkt in die Taschen des Gels pipettiert) zu erkennen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Proteine im Pansensaft schnell abgebaut und damit nicht detektiert werden können. Um die Stabilität der Proteine im Pansensaft zu untersuchen, wurde die optische Dichte der Proben bei den Lagertemperaturen mit und ohne Glycerin täglich gemessen. Als Resultat konnte eine ca. 10 % ige tägliche Erhöhung der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) beobachtet werden. Diese Zunahme weist darauf hin, dass die Proteine in der Probe während der Lagerung ausfallen und somit die optische Dichte erhöhen. Die Proteinbestimmung wurde deshalb mit frischen Pansensaft-Proben vom Spendentier mittels Ammoniumsulfat-, Trichloressigsäure- (TCA) und Aceton-Fällungsmethoden (jeweils mit verschiedenen Konzentrationen) wiederholt. Die Beobachtungen werden im Folgenden beschrieben:

**Ammoniumsulfat-Fällung (40 %, 60 % und 80 %-ige Fällung):**

Nach 2 h-iger Inkubation ist keine Fällung entstanden.

**10 %-ige TCA-Fällung:**

Nach 2 h-iger Inkubation ist keine Fällung entstanden.

**40 %-ige Aceton-Fällung:**

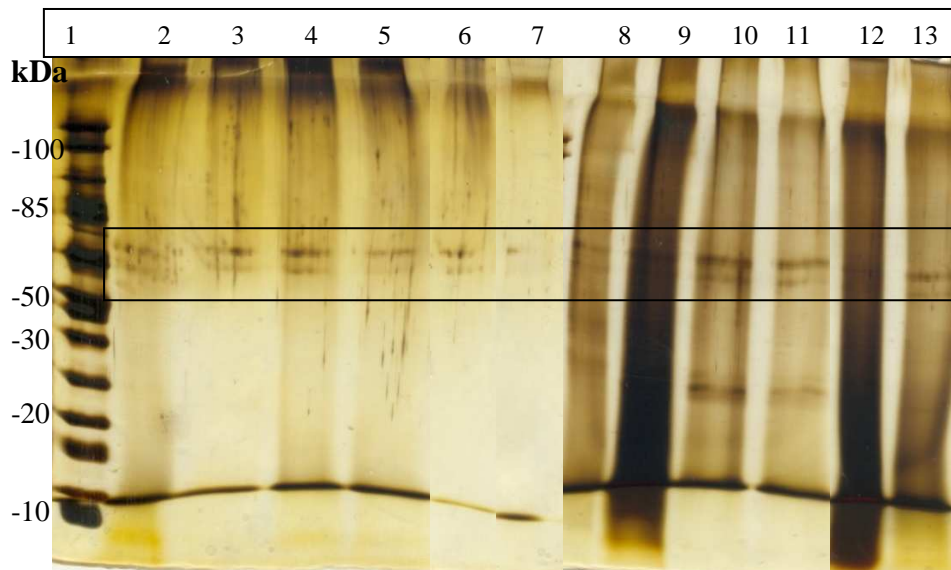
Nach 1 h-iger Inkubation ist keine Fällung entstanden.

Nach 2 h-iger Inkubation ist eine braune Fällung entstanden.

**Nur Fermenter-Probe:**

Nach 2 h-iger Inkubation ist keine Fällung entstanden.

Die Proben nach zweistündiger Inkubation wurden für die SDS-PAGE aufgearbeitet und in die Taschen des Gels pipettiert (s. Abb. 5.2). Demzufolge konnte für jede Probe eine schwache Proteinbande bei ca. 70 kDa beobachtet werden.



**Abbildung 5.2** SDS-PAGE-Gele (12 %-ige Gele, Silberfärbung) zur Untersuchung der Proteine nach der Fällung in Fermenter-Probe Fr-6 (S-09).

Legende Fraktionen:

1. Marker
2. Überstand, ohne Protein-Fällung
3. Überstand, 40 % ige Ammoniumsulfat-Fällung
4. Überstand, 60 % ige Ammoniumsulfat-Fällung
5. Überstand, 80 % ige Ammoniumsulfat-Fällung
6. Überstand, 10 % ige TCA-Fällung
7. Überstand, 40 % ige Aceton-Fällung
8. Pellet, ohne Protein-Fällung
9. Pellet, 40 % ige Ammoniumsulfat-Fällung
10. Pellet, 60 % ige Ammoniumsulfat-Fällung
11. Pellet, 80 % ige Ammoniumsulfat-Fällung
12. Pellet, 10 % ige TCA-Fällung
13. Pellet, 40 % ige Aceton-Fällung

Aus diesen Ergebnissen ist zu erkennen, dass die Proteine im Pansensaft auf Grund der schnellen Abbaubarkeit nicht stabil sind [46]. Zusätzlich können die im Pansensaft vorhandenen flüchtigen Fettsäuren und Phenolsäuren wegen der pH-Wert-abhängigen Wirkung die Isolierung der Proteine mittels SDS-PAGE Methode erschweren.

### 5.1.2 Untersuchte Komponenten zur Identifikation der Peaks 1-6

Die in dieser Arbeit analysierten Standards zur Identifikation der Peaks 1-6 wurden nach ihren Substanzklassen, Massen, Fragmentionen, Retentionszeiten und maximalen Wellenlängen in Tabelle 5.4 aufgelistet.

**Tabelle 5.4** Liste der analysierten Substanzen in Grassilagen (GS), Gras (G), Heu (H) und Fermenter (Fr). (R<sub>t</sub>: Retentionszeiten an der LC-ESI-MS/MS, λ<sub>max</sub>: maximale Wellenlängen an der RP-HPLC, MA: Molekulargewicht, n. d.: Aufgrund der Unpolarität wurden diese Standards mit der angewendeten RP-HPLC-Methode nicht detektiert). Die Basisionen sind fett markiert.

Substanz Klassen	Standards	MA [g/mol]	Fragmentionen m/z	GS	G	H	Fr	R <sub>t</sub> [min]	λ <sub>max</sub> [nm]
<b>Alkaloid</b>	Ajmalicin	352,43	<b>353</b> /144	-	-	-	-	20,86	221
	5-Methoxyindol-3-carboxaldehyd	175,18	176/148/133/117/105	-	-	-	-	25,69	241
	Palmatin chloridhydrat	387,86	353/ <b>352</b>	-	-	-	-	27,15	266, 343
<b>Amino- säuren und Derivate</b>	3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin	197,19	198/181/152/135/107	-	-	-	-	3,30	209
	Glutaminsäure	147,13	148/130/102/ <b>84</b>	-	-	-	-	1,81	203
	5-Hydroxy-L-Tryptophan	220,22	221/ <b>204</b> /162/134	-	-	-	-	4,09	206
	L-Phenylalanin	165,19	166/149/131/ <b>120</b> /103	+	+	+	+	6,08	203, 215
	L-Prolin	115,13	231/138/ <b>116</b>	+	+	+	-	2,19	207
	L-Tryptophan	204,23	205/ <b>188</b> /159/146/132/118/105	+	+	+	-	8,98	209, 273
	L-Tyrosin	181,19	182/ <b>165</b> /147/136/123/119	+	+	+	+	3,21	201, 224
	(S)-4-Phenylbutyrylglutamin	292,33	315/ <b>293</b> /276/164/147/130	-	-	-	-	24,86	203
2-Phenylethylamin	121,18	122/ <b>105</b> /103/95/79	+	-	+	+	6,19	219, 258	
<b>Chalkon</b>	2',4-Dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalkon	330,33	685/353/331/ <b>181</b> /177/145/117	-	-	-	-	56,95	n. d.
<b>Cumarin</b>	Acenocumarol	353,33	<b>354</b> /296/163	-	-	-	-	50,30	n. d.
	Cumarin	146,14	<b>147</b> /103/91	-	-	-	-	30,07	259, 223
	Umbelliferon	162,14	385/337/265/225/185/ <b>163</b> /119/107/91	-	-	-	-	21,29	205, 323
<b>Diaryl- heptanoid</b>	Curcumin	368,38	391/ <b>369</b> /309/271/245/225/177/147/123	-	-	-	-	52,22	n. d.
	[6]-Gingerol	294,39	317/277/259/ <b>177</b> /162/145/137/117	-	-	-	-	48,04	282
	Methoxyfenozid	368,47	391/369/351/313/295/163/149/133/123/105	-	-	-	-	51,93	n. d.
<b>Flavonoid</b>	Acaciin	592,54	<b>593</b> /447/285	+	+	+	-	30,81	268, 334
	Acacetin	284,26	<b>285</b>	+	-	+	-	46,79	270, 330
	Apigenin	270,24	293/ <b>271</b>	+	-	+	-	36,84	268, 338
	Apigenin 6-C-glucoside-7-O-glucosid (Saponarin)	594,51	597/596/ <b>595</b>	+	+	+	-	14,90	271, 336
	Apigenin 7-O-glucosid	432,38	455/ <b>433</b> /271	-	-	-	-	24,95	266, 337
	Apigenin 7-O-rutinosid (Isorhoifolin)	578,52	<b>579</b> /433/271	+	+	+	-	24,03	266, 337
	Biochanin A	284,26	307/ <b>285</b>	+	-	-	-	48,49	221, 260
	Diosmetin	300,26	323/ <b>301</b> /286	+	+	+	-	37,97	251, 346
	Diosmin	608,54	<b>609</b> /463/301/286	+	+	+	-	24,45	252, 346
	Epicatechin	290,27	313/ <b>291</b> /273/249/165/147/139/123	-	-	-	-	15,22	210, 278



	Formononetin	268,26	291/ <b>269</b>		+	-	-	-	40,53	200, 248
	Genistein	270,24	565/293/ <b>271</b>		+	-	-	-	36,60	202, 259
	Hesperetin	302,28	<b>303</b> /177/153		-	-	-	-	38,15	214, 286
	Hesperidin	610,56	633/610/593/575/557/541/489/465/449/431/ 413/395/369/345/ <b>303</b> /281/263/245/219/195/ 177/153		-	-	-	-	23,84	203, 283
	Isoorientin	448,38	471/ <b>449</b> /431/413/395/383/353/329/299		+	+	+	-	17,13	256, 344
	Kaempferol	286,24	597/309/ <b>287</b>		+	+	+	-	37,58	265, 366
	Luteolin	286,24	597/309/ <b>287</b>		+	+	+	-	31,89	253, 348
	Luteolin 7- <i>O</i> -glucosid	448,38	471/ <b>449</b> /287		-	-	-	-	21,27	254, 348
	Orientin	448,38	471/ <b>449</b> /431/413/388/329		+	-	+	-	17,97	255, 348
	Pectolarin	622,57	645/ <b>623</b> /477/315		+	+	+	-	27,68	276, 330
	Quercetin	302,24	325/ <b>303</b>		+	-	-	-	31,97	255, 370
	Rutintrihydrat	664,56	633/611/465/ <b>303</b>		+	+	+	-	19,59	255, 354
	Tanschinon IIA	294,34	<b>295</b> /277/267/249		-	-	-	-	55,26	n. d.
	Vitexin	432,38	<b>433</b> /415/313		+	-	-	-	19,25	269, 338
<b>Lignane</b>	Enterodiol	302,36	325/285/ <b>267</b> /173/159/147/133/107		-	-	-	-	29,32	203, 274
	Pinoresinol	358,39	381/357/ <b>341</b> /323/311/291/271/205/187/175/ 160/137/115		-	-	-	-	32,68	231, 280
<b>Mykotoxin</b>	Aflatoxin B1	312,27	335/ <b>313</b>		-	-	-	-	34,57	210
<b>Phenol- säuren</b>	<i>p</i> -Aminohippursäure	194,19	217/195/149/120/92		-	-	-	-	4,72	221, 270
	Benzoessäure	122,12	391/310/123/105/95/ <b>79</b> /60		-	-	-	-	25,68	224, 273
	2,3-Bis-(4-methoxy-benzylidien)- succinylsäure	354,36	377/ <b>337</b> /309/265/229		-	-	-	-	41,91	300
	Caftarsäure	312,23	335/295/ <b>163</b> /145/135/117/107/89		-	-	-	-	10,35	236, 285
	4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure	312,32	335/313/295/277		-	-	-	-	36,48	229, 253
	Chlorogensäure	354,31	377/355/ <b>163</b> /145/135/117		+	+	+	-	13,12	219, 327
	Cichoriensäure	474,37	497/295/ <b>163</b> /145/135/117/107/89		-	-	-	-	24,10	245, 328
	Coniferylalkohol	180,20	381/343/325/283/163/131/ <b>103</b>		-	-	-	-	19,13	231, 256
	<i>p</i> -Cumarsäure	164,16	165/ <b>147</b> /119/91		+	+	-	-	20,01	218, 292
	(-)-Dibenzyl-D-tartarat	330,33	685/353/271/ <b>181</b> /166/91		-	-	-	-	49,08	n. d.
	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure	182,17	165/123/105/79		-	-	-	-	14,10	232, 274
	3,4-Dihydroxyphenylessigsäure	168,15	149/ <b>123</b> /105/79		-	-	-	-	9,46	222, 278
	3,4-Dihydroxybenzoessäure	154,12	487/469/155/137/111/93/69		-	-	-	-	8,33	238
	3,4-Dimethoxyzimtsäure	208,21	209/ <b>191</b> /163		-	-	-	-	29,39	232, 283

Ferulasäure	194,18	195/ <b>177</b> /149/145/117	+	+	-	-	23,01	237, 308
Gallussäure	170,12	171/ <b>153</b> /127/109	-	-	-	-	4,56	278
Hippursäure	179,17	383/202/180/162/ <b>105</b> /95/77	-	-	-	-	14,67	234
3-Hydroxybenzoesäure	138,12	439/421/342/139/121/111/ <b>95</b>	-	-	-	-	15,59	223, 295
4-Hydroxybenzoesäure	138,12	439/421/139/121/111/ <b>95</b>	-	-	-	-	12,30	243
3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)propionsäure	196,20	613/446/413/373/241/219/179/ <b>137</b> /122	-	-	-	-	21,17	217, 275
4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure	180,16	385/341/316/297/181/163/135/107/95/79/69	-	-	-	-	16,81	213, 267
2-Hydroxyphenylelessigsäure	152,15	329/153/135/ <b>107</b> /95/79	-	-	-	-	18,08	208, 272
4-Hydroxyphenylelessigsäure	152,15	<b>107</b> /105/95/79	-	-	-	-	14,18	214, 275
3-Hydroxy-2-phenylpropionsäure	166,17	149/121/ <b>103</b> /91	-	-	-	-	18,33	208, 268
3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure	166,17	<b>357</b> /313/295/227/149/121/107/69	-	-	-	-	23,28	210, 267
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	166,17	353/313/295/149/121/ <b>107</b>	-	-	-	-	18,31	217, 270
3-Hydroxyzimtsäure	164,16	165/147/119/91	-	-	-	-	22,31	232, 265
Kaffeensäure	180,16	181/ <b>163</b> /145/135/117	+	+	+	-	15,54	228, 288
DL-Mandelsäure	152,15	269/223/195/179/135/106/79	-	-	-	-	20,60	210, 258
L-(-)-3-Phenylmilchsäure	166,17	523/375/329/227/199/121/ <b>103</b> /93/79	-	-	-	-	20,26	220
4-Phenylbuttersäure	164,20	147/129/91	-	-	-	-	38,69	211, 280
Phenylelessigsäure	136,15	91	-	-	-	-	25,92	206, 259
3-Phenylpropionsäure	150,17	149/ <b>133</b> /115/105/103/91	+	-	-	+	32,97	210, 258
Phenylbrenztraubensäure	164,16	353/237/147/119/91	-	-	-	-	35,94	210, 256
Phloroglucin	126,11	149/ <b>127</b> /109/99/81	-	-	-	-	3,80	220, 267
Rosmarinsäure	360,31	383/361/343/ <b>163</b> /145/135/117/89/69	-	-	-	-	24,88	208, 327
Sinapinsäure	224,21	225/ <b>207</b> /192/175/147/119/105/91	-	-	-	-	24,50	226, 314
Zimtaldehyd	132,16	149/133/115/105/103/91	-	-	-	-	37,92	230, 260
Zimtsäure	148,16	149/ <b>131</b> /103	-	-	-	-	33,89	225, 251
2,6-Dimethylbenzo(1,2-b,4,5-b')difuran-3,7-dicarboxylsäurediethylester	330,34	331/272/ <b>271</b>	-	-	-	-	44,38	208
RCL	330,34	331/299/271/243/211/183/177	-	-	-	-	29,38	204

### 5.1.3 Mittels Literaturscreening in Fermenter-Proben untersuchte Diarylheptanoide

Entgegen den Literaturquellen wurden im künstlichen Pansensaft und in Futtermitteln die Massen der folgenden Diarylheptanoid-Verbindungen nicht detektiert (s. Tab. 5.5).

**Tabelle 5.5** Mittels der angegebenen Literaturquellen in Fermenter und Futtermittel untersuchte Diarylheptanoid-Verbindungen ohne Standard-Messung an der LC-ESI-MS/MS (MA: Molekulargewicht).

Diarylheptanoid-Verbindungen	MA [g/mol]	Summenformel	Fragmentationen m/z	Referenzen
Platyphyllosid	476,52	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	478/314	[235-238]
(S)-5-Hydroxy-3-platyphyllon	314,38	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	316/315	[235-236]
3-Platyphyllon	298,38	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	299	[235-239]
Centrobol	300,39	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	301	[235-236]
Platyphyllan	284,39	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	285	[235, 238]
Platyphyllanon	296,36	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	297	[237]
Hirsutanon	328,36	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	329	[237]
Hirsutanonol	346,37	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	347	[237]
Oregonin	478,49	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	479/346	[237]
Oregonoyl A	624,63	C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> O <sub>12</sub>	625/647	[237]
Orgonoyl B	654,66	C <sub>34</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub>	677/655	[237]
Alnusid A	462,49	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	463/330	[237]
Alnusid B	462,49	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	463/330	[237]
Platyphyllon-5-xylopyranosid	446,49	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	447/314	[237]
Yakuchinon A	312,40	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	313	[237]
Rhododendrin	328,36	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	329	[238]
Rhododendrol	166,22	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	167	[238]

### 5.1.4 Statistische Auswertung der identifizierten Komponenten in Futtermitteln

Die Quantifizierungsergebnisse der identifizierten Komponenten in Grassilagen, Gras und Heu wurden mit dem Statistikprogramm SPSS (Abkürzung aus dem Engl.: **S**tatistical **P**ackage for the **S**ocial **S**ciences; Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durch den t-Test mit den logarithmierten Werten ausgewertet. Dafür wurden die logarithmierten Mittelwerte, Standardabweichungen (s) und Differenzsignifikanzen (p) berechnet. Signifikanzniveaus (p) können wie folgt angeordnet werden:

p < 0,05= schwach signifikant (\*)

p < 0,01= signifikant (\*\*)

p < 0,001= hoch signifikant (\*\*\*)

Außerdem wurden für die unabhängigen Stichproben nach dem Levene-Test der Varianzgleichheit empirische Verteilungsfunktion (F) und nach t-Test für die Mittelwertgleichheit die Testgröße (T), Freiheitsgrad (df, Abkürzung aus dem Engl.: degree of freedom), zweiseitige Signifikanz, mittlere Differenz (mitt. Diff.), Standardfehler der Differenz (sf) und 95 % Konfidenzintervall der Differenz bestimmt. Für die in nur einer Probe

identifizierten Komponenten konnten empirische Verteilungsfunktion, Testgröße, Freiheitsgrad, Signifikanz und Standardfehler der Differenz nicht berechnet werden, da mindestens eine der Gruppen leer ist. Zudem wurden mittels statistischen Auswertungen der Einfluss von zwei bedeutsamen Faktoren auf die Konzentrationen der identifizierten Komponenten zwischen den Futtermittel-Gruppen verglichen:

Faktor 1: Lagerungszeiteffekte der Grassilage-Extrakte

Faktor 2: Prozentualer RE-Anteil vom Rp (w/w)

#### **5.1.4.1 Lagerungszeiteffekte der Grassilage-Extrakte (Faktor 1)**

In dieser Arbeit wurden insgesamt 65 gefriergetrocknete Grassilage-, 2 gefriergetrocknete Gras- und 3 gemahlene Heu-Proben an der LC-ESI-MS/MS analysiert. 14 der 65 Grassilagen, 2 Gras- und 3 Heu-Proben wurden sofort nach der Extraktion an der LC-ESI-MS/MS quantifiziert. Die restlichen 51 Grassilagen wurden nach der Extraktion nach 1-2 Wochen Lagerung bei 4 °C mit der gleichen Methode an der LC-ESI-MS/MS analysiert. Deshalb wurden die quantifizierten Grassilage-Extrakte in zwei Gruppen unterteilt:

1. Nicht gelagerte Extrakte (sVnE-GS: sofortige Vermessung nach der Extraktion der Grassilage-Proben, n= 14)
2. Bei 4 °C für 1-2 Wochen gelagerte Grassilage-Extrakte (LnE-GS: Lagerung nach der Extraktion der Grassilage-Proben, n= 51)

In den vorliegenden Untersuchungen wurden der Einfluss der Lagerzeit und verschiedener Lagerungstemperaturen (18 °C, 4 °C, -18 °C) auf die Konzentrationen der identifizierten Komponenten in den Grassilage-Extrakten bestimmt (s. Kap. 3.4.3.1). Damit wurde kein Einfluss der Lagerungszeit auf die Konzentrationen der identifizierten Aminosäuren, Phenolsäuren und Flavonoide in den Futtermittel-Extrakten bei niedrigen Temperaturen ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ) festgestellt. Demzufolge wurde mittels t-Test im Laufe der Lagerzeit zwischen den entsprechenden gelagerten und nicht gelagerten Grassilage-Extrakten (sVnE-GS, n= 14/LnE-GS, n= 51) nur für einige Komponenten eine signifikante Veränderung ermittelt (s. Tab. 5.6).

**Tabelle 5.6** Mittels t-Test ausgewertete signifikante Veränderungen der Flächenintegralwerte der in den Futtermitteln identifizierten Komponenten durch die Gruppierung der Lagerzeiteffekte (sVE-GS: sofortige Vermessung der gefriergetrockneten Grassilagen nach der Extraktion (n= 14), LnE-GS: Lagerung der gefriergetrockneten Grassilagen nach der Extraktion bei 4 °C für 1-2 Wochen (n= 51), \*: schwach signifikant (p < 0,05), \*\*: signifikant (p < 0,01), \*\*\*: hoch signifikant (p < 0,001))

Identifizierte Komponenten	p-Wert (sVE-GS/LnE-GS)			Gesamt (unabhängig vom RE/Rp-Faktor)
	< 40 % RE/Rp (w/w)	40-50 % RE/Rp (w/w)	50-70 % RE/Rp (w/w)	
L-Phenylalanin		0,024*		
L-Tryptophan				0,004**
L-Tyrosin			0,001***	
Kaffeensäure			0,006**	
Apigenin	0,045*			
Orientin		0,003**		
Saponarin	0,040*		0,040*	
Formononetin	0,005**			

Werden die beide Gruppen miteinander verglichen, sind die Konzentrationen der Aminosäuren und Zwischenprodukte (Phenolsäure, Flavon-Aglykone) in den nicht gelagerten Grassilage-Extrakten höher als in den gelagerten Grassilage-Extrakten. Jedoch nur für L-Tryptophan wurde unabhängig vom Faktor der unterschiedlichen RE-Anteil in den nicht gelagerten Grassilage-Extrakten (sVnE-GS, n= 14) eine signifikant höhere Konzentration (p= 0,004) im Vergleich zu den gelagerten Grassilage-Extrakten (LnE-GS, n= 51) ermittelt. Zudem wurden in den nicht gelagerten Grassilage-Extrakten bei Silagen mit 40-50 % igem RE-Anteil für L-Phenylalanin (p= 0,024) und bei Silagen mit 50-70 % igem RE-Anteil für L-Tyrosin (p= 0,001) sowie Kaffeensäure (p= 0,006) signifikant höhere Mittelwerte gegenüber den gelagerten Silage-Extrakten festgestellt. Dagegen ist die Menge der Flavone (Hauptprodukte) in den gelagerten Grassilage-Extrakten gegenüber den nicht gelagerten Extrakten höher. Aber eine signifikante Veränderung im Laufe der Lagerzeit ist nur bei Saponarin und Orientin zu beobachten (s. Tab. 5.6).

Die Lagerungszeiten des gefriergetrockneten Materials bis zur Ankunft im Labor (für die Gruppen: sVnE-GS, sVnE-G, sVnE-H u. LnE-GS) sowie bis zur Extraktion (für die Gruppen: LnE-GS, sVnE-G u. sVnE-H) waren unterschiedlich. Die gefriergetrockneten Silagen in der Gruppe sVnE-GS wurden gleich nach der Ankunft im Labor extrahiert. Die gefriergetrockneten Silagen in der Gruppe LnE-GS wurden nach der Ankunft im Labor mindestens 1 Jahr bei 18 °C bis zur Extraktion gelagert. Zusätzlich werden die Flavone über die genannten Edukte und Zwischenprodukte mit der Zeit in gesteigerten Konzentrationen (nicht signifikant, s. Tab. 5.8) gebildet. Dies liegt die Vermutung nahe, dass durch die Lagerung in den gefriergetrockneten Grassilagen geringfügig weitere Synthese- sowie

Stoffwechselreaktionen stattfinden, die die Menge der Edukte sowie der Zwischensubstanzen reduzieren können.

Zudem entstehen die gelagerten und nicht gelagerten Grassilage-Extrakte-Gruppen aus verschiedenen Grassilagen. Daneben zeigt die Heterogenität des Silierungsprozesses (z.B. unterschiedliche Lagerzeit während der Silierung, Siliermittel, Temperatur, Klima, pH-Wert, Schnittfrequenz) einen weiteren differenziellen Einfluss auf die pflanzlichen Stoffwechselreaktionen in Silagen [1, 33]. Aufgrund dieser Faktoren, insbesondere aufgrund der ungleich eingesetzten Silagen könnten diese unerheblichen Konzentrationsunterschiede zwischen den entsprechenden Extrakte-Gruppen entstanden sein. Die statistischen Auswertungen der beiden Gruppen sind in Tabellen 5.8-5.10 dargestellt.

#### 5.1.4.2 Prozentualer RE-Anteil vom Rohprotein (Faktor 2)

Um den Einfluss des prozentualen RE-Anteils (RE/Rp, w/w) auf die Konzentration der identifizierten Komponenten in den analysierten Extrakten zu untersuchen, wurden zur Bestimmung der p-Wert die in dieser Studie eingesetzten Futtermittel nach ihren prozentualen RE-Anteilen vom Rp in vier Gruppen < 40 %, 40-50 %, 50-70 % und > 70 % eingeteilt. Die quantifizierten Gras- und Heu-Extrakte gehörten zu der Gruppe mit > 70 % RE-Anteil. Für die statistische Auswertung der Mehrfachvergleiche von RE-Anteil-Gruppen wurden einfaktorielle ANOVA-Varianzanalyse (Abkürzung aus dem Engl.: **A**nalysis **O**f **V**ariance) bzw. ONEWAY deskriptive Statistiken und Post-Hoc-Test durchgeführt (s. Tab. 5.9-5.10).

Der Einfluss des prozentualen RE-Anteils (RE/Rp, w/w) auf die Konzentration der identifizierten Komponenten in den nicht gelagerten Futtermittel-Extrakten (sVnE-GS) wurde im Kapitel 3.4.3.2 detailliert diskutiert und als Resultat keine signifikanten Konzentrationsunterschiede ermittelt (s. Tab. 5.10). Bei der Gruppe der gelagerten Grassilage-Extrakte (LnE-GS) für die Silagen mit 40-50 % und 50-70 % RE-Anteil wurden nur bei einigen Flavonoiden signifikante Konzentrationsunterschiede festgestellt (s. Tab. 5.7).

**Tabelle 5.7** Mehrfachvergleiche-Post-Hoc-Test der Flächenintegrale für die identifizierten Komponenten in den gelagerten Grassilage-Extrakten (LnE-GS) nach der Gruppierung ihrer RE-Anteile in % vom Rp (w/w). (p: Signifikanz, \*: schwach signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\*: signifikant ( $p < 0,01$ )).

Identifizierte Komponenten	Vergleiche nach RE-Anteile in % vom Rp (w/w)	p
Apigenin	40-50 % / 50-70 %	0,032*
Acaciin	40-50 % / 50-70 %	0,033*
Kaempferol	40-50 % / 50-70 %	0,004**
Quercetin	40-50 % / 50-70 %	0,031*

**Tabelle 5.8** Gruppenstatistiken mittels t-Test für die Flächenintegralwert bei unabhängigen Stichproben der in den Futtermitteln identifizierten Komponenten durch die Gruppierung der Lagerzeiteffekte und RE-Anteile (N: Gesamtzahl der Futtermittel-Proben, in denen die identifizierten Substanzen detektiert wurden; log. Mittelwert: logarithmische Mittelwert; s: Standardabweichung, sf: Standardfehler, GS: Grassilage, H: Heu, G: Gras, sVE-GS: sofortige Vermessung der gefriergetrockneten Grassilagen nach der Extraktion, sVE-H-G: sofortige Vermessung der gemahlene Heu- und gefriergetrockneten Gras-Proben nach der Extraktion, LnE-GS: Lagerung der gefriergetrockneten Grassilagen nach der Extraktion bei 4 °C für 1-2 Wochen (vor der Vermessung), \*: schwach signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\*: signifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\*: hoch signifikant ( $p < 0,001$ ), --: Da mindestens eine der Gruppen leer ist, konnten die entsprechenden Werte nicht berechnet werden.).

Gruppenstatistiken (sVE-GS/LnE-GS)										
Identifizierte Komponenten	Lagerzeiteffekt	RE/Rp in % (w/w)	N	log. Mittelwert	s	sf des Mittelwertes	p-Wert sVE-GS/LnE-GS			
							< 40 % RE/Rp (w/w)	40-50 % RE/Rp (w/w)	50-70 % RE/Rp (w/w)	Gesamt (unabhängig vom RE/Rp-Faktor)
L-Phenylalanin	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	18,7468	0,52259	0,23371	0,110			
	ja (LnE-GS)	< 40 %	12	16,8439	0,81339	0,23481				
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	17,4560	0,43555	0,17781		0,024*		
	ja (LnE-GS)	40-50 %	21	16,9272	0,84555	0,18451				
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	17,0613	1,82084	1,05126			0,077	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	18	16,8070	0,75928	0,17896				
	nein (sVnE-GS)	Gesamt		14	17,8324	1,09145	0,29170			0,215
L-Tryptophan	ja (LnE-GS)	Gesamt	51	16,8651	0,79403	0,11119				
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	5	14,1132	1,12733	0,50416				
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	18,2448	1,70369	0,76191	0,374			
	ja (LnE-GS)	< 40 %	12	15,2076	1,49636	0,43196				
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	15,3498	0,90301	0,36865		0,146		
	ja (LnE-GS)	40-50 %	21	14,2997	1,25173	0,27315				
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	16,3635	3,23267	1,86638			0,000	
L-Tyrosin	ja (LnE-GS)	50-70 %	18	14,8632	0,72770	0,17152				
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	16,6009	2,14226	0,57254				0,004**
	ja (LnE-GS)	Gesamt	51	14,7122	1,19916	0,16792				
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	5	13,4201	0,94088	0,42078				
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	15,1298	0,76732	0,34316	0,366			
	ja (LnE-GS)	< 40 %	12	14,1480	0,96706	0,27917				
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	14,6567	0,62738	0,25613		0,868		
	ja (LnE-GS)	40-50 %	21	14,4210	0,69595	0,15187				
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	14,3614	2,02653	1,17002			0,001***	

2-Phenyl-ethylamin	ja (LnE-GS)	50-70 %	18	14,1134	0,64107	0,15110		
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	14,7624	1,02885	0,27497		0,241
	ja (LnE-GS)	Gesamt	51	14,2482	0,74881	0,10485		
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	5	11,9135	0,58120	0,25992		
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	9	13,0021	1,15803	0,38601		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	13	13,0497	0,88577	0,24567		
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	10	12,7921	0,65096	0,20585		
Chlorogensäure	nein (sVnE-GS)	Gesamt	0	--	--	--		--
	ja (LnE-GS)	Gesamt	32	12,9558	0,88644	0,15670		
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	1	11,2664	--	--		
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--		
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	2	12,8253	0,74833	0,52915		
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	0	--	--	--		--
p-Cumarsäure	ja (LnE-GS)	Gesamt	2	12,8253	0,74833	0,52915		
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	5	13,0676	1,16712	0,52195		
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	4	12,9958	0,25073	0,12537	0,351	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	8	12,6169	0,75806	0,26801		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	3	11,8501	0,84660	0,48879	0,877	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	16	12,4385	0,81508	0,20377		
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	12,4700	0,32271	0,18632	0,136	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	15	12,3612	0,55177	0,14247		
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	10	12,4943	0,67353	0,21299		0,825
	ja (LnE-GS)	Gesamt	39	12,4454	0,69948	0,11201		
Ferulasäure	nein (sVE-H-G)	> 70 %	1	12,4730	--	--		
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	13,8704	0,87533	0,39146	0,667	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	11	13,3417	0,71941	0,21691		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	5	13,2834	0,82789	0,37024	0,786	



	ja (LnE-GS)	40-50 %	21	13,3311	0,85317	0,18618			
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	13,1148	0,98002	0,56581		0,747	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	17	12,9540	0,76752	0,18615			
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	13	13,4703	0,86995	0,24128			0,341
	ja (LnE-GS)	Gesamt	49	13,2027	0,80064	0,11438			
Kaffeensäure	nein (sVE-H-G)	> 70 %	1	11,2384	--	--			
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	12,8749	1,08655	0,48592	0,808		
	ja (LnE-GS)	< 40 %	10	12,7324	0,96290	0,30449			
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	4	13,0274	0,28183	0,14092		0,082	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	13	13,0349	0,90059	0,24978			
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	12,4074	1,89953	1,09670		0,006**	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	13	12,6328	0,67971	0,18852			
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	12	12,8089	1,08181	0,31229			0,313
	ja (LnE-GS)	Gesamt	36	12,8057	0,84086	0,14014			
3-Phenyl- propionsäure	nein (sVE-H-G)	> 70 %	2	11,9650	0,82226	0,58143			
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--	--		
	ja (LnE-GS)	< 40 %	1	13,9869	--	--			
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--	--		
	ja (LnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--			
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	0	--	--	--		--	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	0	--	--	--			
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	0	--	--	--			--
	ja (LnE-GS)	Gesamt	1	--	--	--			
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	0	--	--	--			
Acacetin	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	14,0626	1,11646	0,49930	0,739		
	ja (LnE-GS)	< 40 %	12	13,8098	1,25653	0,36273			
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	15,7484	1,35779	0,55432		0,096	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	21	14,0880	0,85609	0,18681			
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	14,8779	1,84606	1,06582		0,217	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	14	14,1257	1,14131	0,30503			
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	14,9598	1,48831	0,39777			0,175
	ja (LnE-GS)	Gesamt	47	14,0282	1,03986	0,15168			
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	3	12,3958	0,76313	0,44060			
Apigenin	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	14,3093	0,12990	0,05809	0,045*		

Diosmetin	ja (LnE-GS)	< 40 %	10	12,8557	0,58261	0,18424		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	13,6722	0,41898	0,17105	0,098	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	18	12,9865	0,85676	0,20194		
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	13,5452	0,98412	0,56818	0,854	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	13	12,1730	0,89788	0,24903		
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	13,8725	0,58165	0,15545		0,382
	ja (LnE-GS)	Gesamt	41	12,6967	0,87375	0,13646		
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	1	12,3515	--	--		
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	14,9547	1,12727	0,50413	0,429	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	12	14,7833	0,80565	0,23257		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	16,3550	0,79630	0,32509	0,697	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	21	14,7135	0,91283	0,19920		
nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	15,2332	0,84248	0,48641	0,521		
ja (LnE-GS)	50-70 %	17	14,4718	0,61706	0,14966			
nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	15,6145	1,09460	0,29254		0,109	
ja (LnE-GS)	Gesamt	50	14,6480	0,79199	0,11200			
nein (sVE-H-G)	> 70 %	3	12,5493	0,22009	0,12707			
nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	13,2516	1,14496	0,51204	0,399		
ja (LnE-GS)	< 40 %	12	13,0086	0,66599	0,19225			
nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	13,4807	0,86422	0,35281	0,441		
ja (LnE-GS)	40-50 %	21	13,0617	0,68436	0,14934			
nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	14,2181	2,23204	1,28867	0,244		
ja (LnE-GS)	50-70 %	15	12,3229	1,28760	0,33246			
nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	13,5569	1,26354	0,33769		0,228	
ja (LnE-GS)	Gesamt	48	12,8175	0,95446	0,13776			
nein (sVE-H-G)	> 70 %	2	11,8256	0,36399	0,25738			
nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	14,1195	1,28382	0,57414	0,797		
ja (LnE-GS)	< 40 %	12	15,0088	0,98639	0,28475			
nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	14,2496	1,07886	0,44044	0,941		
ja (LnE-GS)	40-50 %	21	14,8270	1,09705	0,23940			
nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	14,6639	1,01369	0,58525	0,560		
ja (LnE-GS)	50-70 %	18	15,8223	1,29172	0,30446			
nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	14,2919	1,07568	0,28749		0,766	
ja (LnE-GS)	Gesamt	51	15,2210	1,21200	0,16971			
Acaciin								

Diosmin	nein (sVE-H-G)	> 70 %	5	15,7563	1,23223	0,55107		
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	15,4673	1,27541	0,57038	0,977	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	12	16,0098	1,23839	0,35749		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	15,5631	1,04124	0,42509		0,694
	ja (LnE-GS)	40-50 %	21	15,9400	1,06441	0,23227		
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	15,8697	0,65025	0,37542		0,474
	ja (LnE-GS)	50-70 %	18	16,1622	0,88664	0,20898		
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	15,5946	1,00335	0,26816		0,696
Isoorientin	ja (LnE-GS)	Gesamt	51	16,0348	1,03326	0,14469		
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	5	15,9842	1,18036	0,52787		
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	14,4265	1,26413	0,56534	0,373	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	12	14,9837	0,80235	0,23162		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	14,7975	0,62944	0,25697		0,165
	ja (LnE-GS)	40-50 %	21	14,4684	1,16418	0,25404		
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	14,6086	0,72316	0,41752		0,309
	ja (LnE-GS)	50-70 %	18	15,3058	1,12825	0,26593		
Isorhoifolin	nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	14,6245	0,86804	0,23199		0,189
	ja (LnE-GS)	Gesamt	51	14,8852	1,12051	0,15690		
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	5	14,5121	1,22965	0,54992		
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	5	12,3474	0,27758	0,12414		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	8	11,9700	0,73394	0,25949		
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	0	--	--	--	--	
Luteolin 7-O-rutinosid	ja (LnE-GS)	50-70 %	10	12,2590	1,21191	0,38324		
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	0	--	--	--		--
	ja (LnE-GS)	Gesamt	23	12,1777	0,90082	0,18783		
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	4	13,1718	0,81865	0,40932		
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	7	13,0821	0,38784	0,14659		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	10	12,4670	0,53663	0,16970		
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	11	12,6756	1,59768	0,48172		

	nein (sVnE-GS)	Gesamt	0	--	--	--			--
	ja (LnE-GS)	Gesamt	28	12,7027	1,06443	0,20116			
Orientin	nein (sVE-H-G)	> 70 %	5	13,5910	0,96474	0,43144			
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	4	13,0702	1,11074	0,55537	0,816		
	ja (LnE-GS)	< 40 %	8	13,5552	1,51199	0,53457			
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	13,5312	0,56637	0,23122		0,003**	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	14	13,2480	1,65605	0,44260			
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	2	12,5597	0,23208	0,16411			0,841
	ja (LnE-GS)	50-70 %	18	13,9821	0,33744	0,07954			
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	12	13,2156	0,79210	0,22866			0,461
	ja (LnE-GS)	Gesamt	40	13,6398	1,21852	0,19266			
Pectolarin	nein (sVE-H-G)	> 70 %	2	13,1368	0,73276	0,51814			
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	1	12,5576	--	--	--		
	ja (LnE-GS)	< 40 %	9	12,8224	1,01467	0,33822			
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	5	12,6080	0,79548	0,35575		0,934	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	13	12,8866	0,84905	0,23548			
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	2	10,6494	0,66364	0,46926			0,457
	ja (LnE-GS)	50-70 %	16	13,2769	1,25873	0,31468			
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	8	12,1120	1,11348	0,39367			0,583
	ja (LnE-GS)	Gesamt	38	13,0357	1,06900	0,17341			
Saponarin	nein (sVE-H-G)	> 70 %	4	14,1736	2,36094	1,18047			
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	14,2336	0,36913	0,16508	0,040*		
	ja (LnE-GS)	< 40 %	12	14,4647	0,98670	0,28483			
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	13,7248	0,98872	0,40364		0,757	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	21	14,1232	0,83038	0,18120			
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	13,7222	2,19601	1,26787			0,040*
	ja (LnE-GS)	50-70 %	18	14,5735	0,95480	0,22505			
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	13,9059	1,10637	0,29569			0,871
	ja (LnE-GS)	Gesamt	51	14,3625	0,91790	0,12853			
Vitexin	nein (sVE-H-G)	> 70 %	5	13,7665	0,91919	0,41107			
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	13,1208	0,62489	0,27946	0,850		
	ja (LnE-GS)	< 40 %	9	13,3888	0,63951	0,21317			
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	13,2961	0,46706	0,19068		0,325	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	16	13,4765	0,71871	0,17968			

	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	12,9641	0,39373	0,22732		0,418	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	18	13,4396	0,90632	0,21362			
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	13,1624	0,49588	0,13253			0,325
	ja (LnE-GS)	Gesamt	43	13,4427	0,77196	0,11772			
Kaempferol	nein (sVE-H-G)	> 70 %	0	--	--	--			
	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	17,0462	0,55558	0,24846	0,144		
	ja (LnE-GS)	< 40 %	12	15,0948	1,86530	0,53847			
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	15,9590	0,52879	0,21588		0,208	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	21	15,4604	1,37048	0,29906			
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	3	14,9991	3,10958	1,79532		0,143	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	15	13,6273	1,43150	0,36961			
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	14	16,1416	1,52364	0,40721			0,345
	ja (LnE-GS)	Gesamt	48	14,7961	1,69703	0,24494			
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	2	10,9947	0,20370	0,14404			
Quercetin	nein (sVnE-GS)	< 40 %	5	15,1468	0,58100	0,25983	0,147		
	ja (LnE-GS)	< 40 %	10	14,1515	1,02005	0,32257			
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	6	13,8952	0,88565	0,36156		0,752	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	18	14,3222	0,81745	0,19268			
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	2	15,0481	1,77244	1,25330		0,271	
	ja (LnE-GS)	50-70 %	9	13,2804	0,99570	0,33190			
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	13	14,5539	1,05130	0,29158			0,942
	ja (LnE-GS)	Gesamt	37	14,0227	0,99156	0,16301			
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	0	--	--	--			
	Rutin	nein (sVnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--	--	
ja (LnE-GS)		< 40 %	0	--	--	--			
nein (sVnE-GS)		40-50 %	0	--	--	--	--		
ja (LnE-GS)		40-50 %	0	--	--	--			
nein (sVnE-GS)		50-70 %	0	--	--	--		--	
ja (LnE-GS)		50-70 %	1	12,8780	--	--			
nein (sVnE-GS)		Gesamt	0	--	--	--			--
ja (LnE-GS)		Gesamt	1	--	--	--			
nein (sVE-H-G)		> 70 %	3	13,5380	0,48112	0,27778			
Genistein		nein (sVnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--			

	nein (sVnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--	--	
	ja (LnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--	--	
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	0	--	--	--	--	--
	ja (LnE-GS)	50-70 %	1	12,3596	--	--	--	--
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	0	--	--	--	--	--
	ja (LnE-GS)	Gesamt	1	--	--	--	--	--
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	0	--	--	--	--	--
Biochanin A	nein (sVnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--	--	--
	ja (LnE-GS)	< 40 %	0	--	--	--	--	--
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--	--	--
	ja (LnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--	--	--
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	0	--	--	--	--	--
	ja (LnE-GS)	50-70 %	1	15,2716	--	--	--	--
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	0	--	--	--	--	--
	ja (LnE-GS)	Gesamt	1	--	--	--	--	--
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	0	--	--	--	--	--
Formononetin	nein (sVnE-GS)	< 40 %	3	13,4922	0,44513	0,25700	0,005**	
	ja (LnE-GS)	< 40 %	2	12,2208	1,70503	1,20564		
	nein (sVnE-GS)	40-50 %	0	--	--	--	--	--
	ja (LnE-GS)	40-50 %	2	12,3077	2,06708	1,46165		
	nein (sVnE-GS)	50-70 %	1	13,7780	--	--	--	--
	ja (LnE-GS)	50-70 %	3	13,5551	2,26126	1,30554		
	nein (sVnE-GS)	Gesamt	4	13,5636	0,39052	0,19526		0,079
	ja (LnE-GS)	Gesamt	7	12,8175	1,83807	0,69472		
	nein (sVE-H-G)	> 70 %	0	--	--	--	--	--

**Tabelle 5.9** Einfaktorielle ANOVA-Statistiken der Flächenintegrale für die identifizierte Komponenten in den gelagerten und nicht gelagerten Grassilage-Extrakten mit der Gruppierung der RE-Anteile (Komp.: Komponenten, df: Freiheitsgrad, F: empirische Verteilungsfunktion, p: Signifikanz, GS: Grassilage, sVE-GS: sofortige Vermessung der gefriergetrockneten Grassilagen nach der Extraktion, LnE-GS: bei 4 °C für 1-2 Wochen Lagerung der gefriergetrockneten Grassilagen nach der Extraktion, \*: schwach signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\*: signifikant ( $p < 0,01$ )).

Einfaktorielle ANOVA							
Lagerzeit- effekt	identifizierte Komp.	Vergleichung	Quadrat- summe	df	Mittel der Quadrate	F	p
nicht gelagerte Grassilage- Extrakte	L-Phenyl- alanin	Zwischen den Gruppen	6,815	2	3,407	4,322	0,041*
		innerhalb der Gruppen	8,672	11	0,788		
		Gesamt	15,487	13			
Gruppe	L-Tryptophan	Zwischen den Gruppen	23,073	2	11,537	3,468	0,068
		innerhalb der Gruppen	36,588	11	3,326		
		Gesamt	59,661	13			
sVE-GS $\Sigma n = 14$	L-Tyrosin	Zwischen den Gruppen	1,224	2	0,612	0,537	0,599
		innerhalb der Gruppen	12,537	11	1,140		
		Gesamt	13,761	13			
	p-Cumarsäure	Zwischen den Gruppen	2,252	2	1,126	4,307	0,060
		innerhalb der Gruppen	1,830	7	0,261		
		Gesamt	4,083	9			
	Ferulasäure	Zwischen den Gruppen	1,355	2	0,677	0,876	0,446
		innerhalb der Gruppen	7,727	10	0,773		
		Gesamt	9,082	12			
	Kaffeesäure	Zwischen den Gruppen	0,696	2	0,348	0,257	0,779
		innerhalb der Gruppen	12,177	9	1,353		
		Gesamt	12,873	11			
	Acacetin	Zwischen den Gruppen	7,776	2	3,888	2,035	0,177
		innerhalb der Gruppen	21,020	11	1,911		
		Gesamt	28,796	13			
	Apigenin	Zwischen den Gruppen	1,516	2	0,758	2,893	0,098
		innerhalb der Gruppen	2,882	11	0,262		
		Gesamt	4,398	13			
	Diosmetin	Zwischen den Gruppen	5,903	2	2,951	3,356	0,073
		innerhalb der Gruppen	9,673	11	0,879		
		Gesamt	15,576	13			
	Luteolin	Zwischen den Gruppen	1,813	2	0,906	0,526	0,605
		innerhalb der Gruppen	18,942	11	1,722		
		Gesamt	20,755	13			
	Acaciin	Zwischen den Gruppen	0,575	2	0,287	0,218	0,807
		innerhalb der Gruppen	14,468	11	1,315		
		Gesamt	15,042	13			
	Diosmin	Zwischen den Gruppen	0,314	2	0,157	0,135	0,875
		innerhalb der Gruppen	12,773	11	1,161		
		Gesamt	13,087	13			
	Isoorientin	Zwischen den Gruppen	0,376	2	0,188	0,220	0,806
		innerhalb der Gruppen	9,419	11	0,856		
		Gesamt	9,795	13			
	Orientin	Zwischen den Gruppen	1,543	2	0,771	1,295	0,320
		innerhalb der Gruppen	5,359	9	0,595		
		Gesamt	6,902	11			
	Pectolarin	Zwischen den Gruppen	5,707	2	2,854	4,802	0,069
		innerhalb der Gruppen	2,972	5	0,594		
		Gesamt	8,679	7			
	Saponarin	Zwischen den Gruppen	0,835	2	0,417	0,305	0,743

		innerhalb der Gruppen	15,078	11	1,371		
		Gesamt	15,913	13			
	Vitexin	Zwischen den Gruppen	0,234	2	0,117	0,434	0,658
		innerhalb der Gruppen	2,963	11	0,269		
		Gesamt	3,197	13			
	Kaempferol	Zwischen den Gruppen	8,207	2	4,104	2,054	0,175
		innerhalb der Gruppen	21,972	11	1,997		
		Gesamt	30,179	13			
	Quercetin	Zwischen den Gruppen	4,849	2	2,425	2,882	0,103
		innerhalb der Gruppen	8,414	10	0,841		
		Gesamt	13,263	12			
	Formononetin	Zwischen den Gruppen	0,061	1	0,061	0,309	0,634
		innerhalb der Gruppen	0,396	2	0,198		
		Gesamt	0,458	3			
gelagerte Grassilage- Extrakte	L-Phenyl- alanin	Zwischen den Gruppen	0,147	2	0,074	0,112	0,894
		innerhalb der Gruppen	31,377	48	0,654		
		Gesamt	31,525	50			
	L-Tryptophan	Zwischen den Gruppen	6,930	2	3,465	2,560	0,088
		innerhalb der Gruppen	64,969	48	1,354		
		Gesamt	71,899	50			
<b>Gruppe</b>	L-Tyrosin	Zwischen den Gruppen	1,075	2	0,538	0,957	0,391
		innerhalb der Gruppen	26,961	48	0,562		
		Gesamt	28,036	50			
LnE-GS $\Sigma n= 51$	2-Phenyl- ethylamin	Zwischen den Gruppen	0,402	2	0,201	0,243	0,786
		innerhalb der Gruppen	23,957	29	0,826		
		Gesamt	24,359	31			
	<i>p</i> -Cumarsäure	Zwischen den Gruppen	0,342	2	0,171	0,338	0,716
		innerhalb der Gruppen	18,250	36	0,507		
		Gesamt	18,592	38			
	Ferulasäure	Zwischen den Gruppen	1,610	2	0,805	1,270	0,290
		innerhalb der Gruppen	29,159	46	0,634		
		Gesamt	30,769	48			
	Kaffeesäure	Zwischen den Gruppen	1,125	2	0,563	0,786	0,464
		innerhalb der Gruppen	23,621	33	0,716		
		Gesamt	24,747	35			
	Acacetin	Zwischen den Gruppen	0,781	2	0,390	0,351	0,706
		innerhalb der Gruppen	48,959	44	1,113		
		Gesamt	49,740	46			
	Apigenin	Zwischen den Gruppen	5,330	2	2,665	4,017	0,026*
		innerhalb der Gruppen	25,208	38	0,663		
		Gesamt	30,538	40			
	Diosmetin	Zwischen den Gruppen	0,838	2	0,419	0,658	0,522
		innerhalb der Gruppen	29,897	47	0,636		
		Gesamt	30,735	49			
	Luteolin	Zwischen den Gruppen	5,360	2	2,680	3,220	0,049*
		innerhalb der Gruppen	37,457	45	0,832		
		Gesamt	42,817	47			
	Acaciin	Zwischen den Gruppen	10,309	2	5,155	3,919	0,027*
		innerhalb der Gruppen	63,138	48	1,315		
		Gesamt	73,447	50			
	Diosmin	Zwischen den Gruppen	0,488	2	0,244	0,222	0,802
		innerhalb der Gruppen	52,893	48	1,102		
		Gesamt	53,382	50			
	Isoorientin	Zwischen den Gruppen	6,950	2	3,475	2,988	0,060
		innerhalb der Gruppen	55,828	48	1,163		
		Gesamt	62,777	50			



Isorhoifolin	Zwischen den Gruppen	0,555	2	0,278	0,321	0,729
	innerhalb der Gruppen	17,297	20	0,865		
	Gesamt	17,853	22			
Luteolin 7-O-rutinosid	Zwischen den Gruppen	1,571	2	0,785	0,677	0,517
	innerhalb der Gruppen	29,020	25	1,161		
	Gesamt	30,591	27			
Orientin	Zwischen den Gruppen	4,316	2	2,158	1,490	0,239
	innerhalb der Gruppen	53,591	37	1,448		
	Gesamt	57,907	39			
Pectolarin	Zwischen den Gruppen	1,629	2	0,815	0,701	0,503
	innerhalb der Gruppen	40,653	35	1,162		
	Gesamt	42,282	37			
Saponarin	Zwischen den Gruppen	2,130	2	1,065	1,278	0,288
	innerhalb der Gruppen	39,998	48	0,833		
	Gesamt	42,127	50			
Vitexin	Zwischen den Gruppen	0,045	2	0,022	0,036	0,965
	innerhalb der Gruppen	24,984	40	0,625		
	Gesamt	25,029	42			
Kaempferol	Zwischen den Gruppen	30,829	2	15,414	6,636	0,003**
	innerhalb der Gruppen	104,526	45	2,323		
	Gesamt	135,355	47			
Quercetin	Zwischen den Gruppen	6,739	2	3,370	3,998	0,028*
	innerhalb der Gruppen	28,656	34	0,843		
	Gesamt	35,395	36			
Formononetin	Zwischen den Gruppen	2,864	2	1,432	0,329	0,737
	innerhalb der Gruppen	17,407	4	4,352		
	Gesamt	20,271	6			

**Tabelle 5.10** Mehrfachvergleiche-Post-Hoc-Test der Flächenintegrale für die identifizierte Komponenten in den gelagerten und nicht gelagerten Grassilage-Extrakten nach der Gruppierung ihrer RE-Anteile in % vom Rp (w/w). (mitt. Diff.: mittlere Differenz, sf: Standardfehler, p: Signifikanz, sVE-GS: sofortige Vermessung der gefriergetrockneten Grassilagen nach der Extraktion, LnE-GS: bei 4 °C für 1-2 Wochen Lagerung der gefriergetrockneten Grassilagen nach der Extraktion, \*: schwach signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\*: signifikant ( $p < 0,01$ )).

Mehrfachvergleiche Post-Hoc-Test (Scheffé-Prozedur)								
Lagerzeit- effekt	Identifizierte Komponenten	Vergleiche nach RE-Anteile in % vom Rp (w/w)		mitt. Diff.	sf	p	95%-Konfidenz- intervall	
							Unter- grenze	Ober- grenze
nicht gelagerten Grassilage- Extrakte	L-Phenyl- alanin	< 40 %	40-50 %	1,2908	0,5376	0,099	-0,2265	2,8082
			50-70 %	1,6855	0,6484	0,072	-0,1444	3,5155
		40-50 %	< 40 %	-1,2908	0,5376	0,099	-2,8082	0,2265
			50-70 %	0,3947	0,6278	0,824	-1,3772	2,1665
			< 40 %	-1,6855	0,6484	0,072	-3,5155	0,1444
			40-50 %	-0,3947	0,6278	0,824	-2,1665	1,3772
<b>Gruppe</b>	L-Tryptophan	< 40 %	40-50 %	2,8951	1,1041	0,069	-0,2216	6,0117
			50-70 %	1,8813	1,3319	0,400	-1,8775	5,6401
		40-50 %	< 40 %	-2,8951	1,1041	0,069	-6,0117	0,2216
			50-70 %	-1,0138	1,2896	0,740	-4,6532	2,6257
			< 40 %	-1,8813	1,3319	0,400	-5,6401	1,8775
			40-50 %	1,0138	1,2896	0,740	-2,6257	4,6532
sVE-GS $\sum n=14$	L-Tyrosin	< 40 %	40-50 %	0,4731	0,6465	0,770	-1,3513	2,2974
			50-70 %	0,7684	0,7796	0,628	-1,4319	2,9686
		40-50 %	< 40 %	-0,4731	0,6465	0,770	-2,2974	1,3513

		50-70 %	0,2953	0,7549	0,927	-1,8351	2,4257
	50-70 %	< 40 %	-0,7684	0,7796	0,628	-2,9686	1,4319
		40-50 %	-0,2953	0,7549	0,927	-2,4257	1,8351
Kaffeensäure	< 40 %	40-50 %	1,0872	0,8558	0,471	-1,3280	3,5024
		50-70 %	2,0471	1,0321	0,186	-0,8658	4,9599
	40-50 %	< 40 %	-1,0872	0,8558	0,471	-3,5024	1,3280
		50-70 %	0,9599	0,9994	0,642	-1,8605	3,7802
	50-70 %	< 40 %	-2,0471	1,0321	0,186	-4,9599	0,8658
		40-50 %	-0,9599	0,9994	0,642	-3,7802	1,8605
<i>p</i> -Cumarsäure	< 40 %	40-50 %	1,1456	0,3906	0,060	-0,0565	2,3478
		50-70 %	0,5257	0,3906	0,447	-0,6764	1,7279
	40-50 %	< 40 %	-1,1456	0,3906	0,060	-2,3478	0,0565
		50-70 %	-0,6199	0,4175	0,384	-1,9050	0,6653
	50-70 %	< 40 %	-0,5257	0,3906	0,447	-1,7279	0,6764
		40-50 %	0,6199	0,4175	0,384	-0,6653	1,9050
Ferulasäure	< 40 %	40-50 %	0,5871	0,5560	0,589	-1,0055	2,1796
		50-70 %	0,7557	0,6420	0,523	-1,0833	2,5946
	40-50 %	< 40 %	-0,5871	0,5560	0,589	-2,1796	1,0055
		50-70 %	0,1686	0,6420	0,966	-1,6703	2,0076
	50-70 %	< 40 %	-0,7557	0,6420	0,523	-2,5946	1,0833
		40-50 %	-0,1686	0,6420	0,966	-2,0076	1,6703
Acacetin	< 40 %	40-50 %	-1,6858	0,8371	0,178	-4,0481	0,6766
		50-70 %	-0,8153	1,0095	0,728	-3,6643	2,0338
	40-50 %	< 40 %	1,6858	0,8371	0,178	-0,6766	4,0481
		50-70 %	0,8705	0,9775	0,682	-1,8881	3,6291
	50-70 %	< 40 %	0,8153	1,0095	0,728	-2,0338	3,6643
		40-50 %	-0,8705	0,9775	0,682	-3,6291	1,8881
Apigenin	< 40 %	40-50 %	0,6371	0,3100	0,167	-0,2377	1,5118
		50-70 %	0,7641	0,3738	0,170	-0,2909	1,8191
	40-50 %	< 40 %	-0,6371	0,3100	0,167	-1,5118	0,2377
		50-70 %	0,1270	0,3620	0,941	-0,8945	1,1485
	50-70 %	< 40 %	-0,7641	0,3738	0,170	-1,8191	0,2909
		40-50 %	-0,1270	0,3620	0,941	-1,1485	0,8945
Diosmetin	< 40 %	40-50 %	-1,4003	0,5678	0,089	-3,0028	0,2022
		50-70 %	-0,2785	0,6848	0,921	-2,2112	1,6542
	40-50 %	< 40 %	1,4003	0,5678	0,089	-0,2022	3,0028
		50-70 %	1,1218	0,6631	0,280	-0,7495	2,9932
	50-70 %	< 40 %	0,2785	0,6848	0,921	-1,6542	2,2112
		40-50 %	-1,1218	0,6631	0,280	-2,9932	0,7495
Luteolin	< 40 %	40-50 %	-0,2292	0,7946	0,959	-2,4717	2,0133
		50-70 %	-0,9666	0,9583	0,615	-3,6712	1,7380
	40-50 %	< 40 %	0,2292	0,7946	0,959	-2,0133	2,4717
		50-70 %	-0,7374	0,9279	0,736	-3,3561	1,8813
	50-70 %	< 40 %	0,9666	0,9583	0,615	-1,7380	3,6712
		40-50 %	0,7374	0,9279	0,736	-1,8813	3,3561
Acaciin	< 40 %	40-50 %	-0,1301	0,6945	0,983	-2,0899	1,8298
		50-70 %	-0,5444	0,8375	0,813	-2,9081	1,8192
	40-50 %	< 40 %	0,1301	0,6945	0,983	-1,8298	2,0899
		50-70 %	-0,4144	0,8109	0,879	-2,7030	1,8742
	50-70 %	< 40 %	0,5444	0,8375	0,813	-1,8192	2,9081
		40-50 %	0,4144	0,8109	0,879	-1,8742	2,7030
Diosmin	< 40 %	40-50 %	-0,0958	0,6525	0,989	-1,9373	1,7457
		50-70 %	-0,4024	0,7870	0,879	-2,6233	1,8185
	40-50 %	< 40 %	0,0958	0,6525	0,989	-1,7457	1,9373
		50-70 %	-0,3066	0,7620	0,923	-2,4570	1,8438
	50-70 %	< 40 %	0,4024	0,7870	0,879	-1,8185	2,6233

			40-50 %	0,3066	0,7620	0,923	-1,8438	2,4570
	Isoorientin	< 40 %	40-50 %	-0,3710	0,5603	0,807	-1,9524	1,2103
			50-70 %	-0,1821	0,6758	0,964	-2,0892	1,7251
		40-50 %	< 40 %	0,3710	0,5603	0,807	-1,2103	1,9524
			50-70 %	0,1890	0,6543	0,959	-1,6577	2,0356
		50-70 %	< 40 %	0,1821	0,6758	0,964	-1,7251	2,0892
			40-50 %	-0,1890	0,6543	0,959	-2,0356	1,6577
	Orientin	< 40 %	40-50 %	-0,4610	0,4981	0,664	-1,9143	0,9923
			50-70 %	0,5105	0,6683	0,754	-1,4393	2,4603
		40-50 %	< 40 %	0,4610	0,4981	0,664	-0,9923	1,9143
			50-70 %	0,9715	0,6301	0,348	-0,8668	2,8098
		50-70 %	< 40 %	-0,5105	0,6683	0,754	-2,4603	1,4393
			40-50 %	-0,9715	0,6301	0,348	-2,8098	0,8668
	Saponarin	< 40 %	40-50 %	0,5088	0,7089	0,777	-1,4919	2,5095
			50-70 %	0,5113	0,8550	0,839	-1,9017	2,9243
		40-50 %	< 40 %	-0,5088	0,7089	0,777	-2,5095	1,4919
			50-70 %	0,0025	0,8279	1,000	-2,3339	2,3389
		50-70 %	< 40 %	-0,5113	0,8550	0,839	-2,9243	1,9017
			40-50 %	-0,0025	0,8279	1,000	-2,3389	2,3339
	Vitexin	< 40 %	40-50 %	-0,1754	0,3143	0,858	-1,0622	0,7115
			50-70 %	0,1566	0,3790	0,919	-0,9130	1,2263
		40-50 %	< 40 %	0,1754	0,3143	0,858	-0,7115	1,0622
			50-70 %	0,3320	0,3670	0,674	-0,7037	1,3677
		50-70 %	< 40 %	-0,1566	0,3790	0,919	-1,2263	0,9130
			40-50 %	-0,3320	0,3670	0,674	-1,3677	0,7037
	Kaempferol	< 40 %	40-50 %	1,0872	0,8558	0,471	-1,3280	3,5024
			50-70 %	2,0471	1,0321	0,186	-0,8658	4,9599
		40-50 %	< 40 %	-1,0872	0,8558	0,471	-3,5024	1,3280
			50-70 %	0,9599	0,9994	0,642	-1,8605	3,7802
		50-70 %	< 40 %	-2,0471	1,0321	0,186	-4,9599	0,8658
			40-50 %	-0,9599	0,9994	0,642	-3,7802	1,8605
	Quercetin	< 40 %	40-50 %	1,2516	0,5554	0,128	-0,3395	2,8426
			50-70 %	0,0987	0,7674	0,992	-2,0997	2,2970
		40-50 %	< 40 %	-1,2516	0,5554	0,128	-2,8426	0,3395
			50-70 %	-1,1529	0,7489	0,345	-3,2983	0,9925
		50-70 %	< 40 %	-0,0987	0,7674	0,992	-2,2970	2,0997
			40-50 %	1,1529	0,7489	0,345	-0,9925	3,2983
gelagerte Grassilage- Extrakte	L-Phenyl- alanin	< 40 %	40-50 %	-0,0833	0,2926	0,960	-0,8224	0,6558
			50-70 %	0,0369	0,3013	0,993	-0,7243	0,7981
		40-50 %	< 40 %	0,0833	0,2926	0,960	-0,6558	0,8224
			50-70 %	0,1202	0,2597	0,899	-0,5359	0,7762
		50-70 %	< 40 %	-0,0369	0,3013	0,993	-0,7981	0,7243
<b>Gruppe</b>			40-50 %	-0,1202	0,2597	0,899	-0,7762	0,5359
	L-Tryptophan	< 40 %	40-50 %	0,9080	0,4210	0,109	-0,1555	1,9715
			50-70 %	0,3444	0,4336	0,731	-0,7509	1,4397
LnE-GS Σn= 51		40-50 %	< 40 %	-0,9080	0,4210	0,109	-1,9715	0,1555
			50-70 %	-0,5636	0,3737	0,329	-1,5076	0,3805
		50-70 %	< 40 %	-0,3444	0,4336	0,731	-1,4397	0,7509
			40-50 %	0,5636	0,3737	0,329	-0,3805	1,5076
	L-Tyrosin	< 40 %	40-50 %	-0,2731	0,2712	0,606	-0,9582	0,4120
			50-70 %	0,0346	0,2793	0,992	-0,6710	0,7402
		40-50 %	< 40 %	0,2731	0,2712	0,606	-0,4120	0,9582
			50-70 %	0,3077	0,2407	0,448	-0,3004	0,9158
		50-70 %	< 40 %	-0,0346	0,2793	0,992	-0,7402	0,6710
			40-50 %	-0,3077	0,2407	0,448	-0,9158	0,3004
	2-Phenyl-	< 40 %	40-50 %	-0,0476	0,3941	0,993	-1,0644	0,9691

ethylamin		50-70 %	0,2101	0,4176	0,882	-0,8673	1,2874
	40-50 %	< 40 %	0,0476	0,3941	0,993	-0,9691	1,0644
		50-70 %	0,2577	0,3823	0,798	-0,7286	1,2439
Kaffeensäure	50-70 %	< 40 %	-0,2101	0,4176	0,882	-1,2874	0,8673
		40-50 %	-0,2577	0,3823	0,798	-1,2439	0,7286
	< 40 %	40-50 %	-0,3025	0,3559	0,700	-1,2146	0,6097
p-Cumarsäure	50-70 %	< 40 %	0,0996	0,3559	0,962	-0,8125	1,0118
	40-50 %	< 40 %	0,3025	0,3559	0,700	-0,6097	1,2146
		50-70 %	0,4021	0,3319	0,488	-0,4485	1,2527
Ferulasäure	50-70 %	< 40 %	-0,0996	0,3559	0,962	-1,0118	0,8125
		40-50 %	-0,4021	0,3319	0,488	-1,2527	0,4485
	< 40 %	40-50 %	0,1784	0,3083	0,847	-0,6088	0,9655
Acacetin	50-70 %	< 40 %	0,2557	0,3117	0,717	-0,5402	1,0516
	40-50 %	< 40 %	-0,1784	0,3083	0,847	-0,9655	0,6088
		50-70 %	0,0773	0,2559	0,955	-0,5760	0,7307
Apigenin	50-70 %	< 40 %	-0,2557	0,3117	0,717	-1,0516	0,5402
		40-50 %	-0,0773	0,2559	0,955	-0,7307	0,5760
	< 40 %	40-50 %	0,0106	0,2963	0,999	-0,7390	0,7602
Diosmetin	50-70 %	< 40 %	0,3877	0,3081	0,459	-0,3916	1,1670
	40-50 %	< 40 %	-0,0106	0,2963	0,999	-0,7602	0,7390
		50-70 %	0,3771	0,2598	0,357	-0,2800	1,0342
Luteolin	50-70 %	< 40 %	-0,3877	0,3081	0,459	-1,1670	0,3916
		40-50 %	-0,3771	0,2598	0,357	-1,0342	0,2800
	< 40 %	40-50 %	-0,2783	0,3817	0,768	-1,2453	0,6888
Acaciin	50-70 %	< 40 %	-0,3160	0,4150	0,750	-1,3673	0,7354
	40-50 %	< 40 %	0,2783	0,3817	0,768	-0,6888	1,2453
		50-70 %	-0,0377	0,3640	0,995	-0,9598	0,8844
Diosmin	50-70 %	< 40 %	0,3160	0,4150	0,750	-0,7354	1,3673
		40-50 %	0,0377	0,3640	0,995	-0,8844	0,9598
	< 40 %	40-50 %	-0,1308	0,3212	0,921	-0,9491	0,6875
Acaciin	50-70 %	< 40 %	0,6827	0,3426	0,151	-0,1900	1,5554
	40-50 %	< 40 %	0,1308	0,3212	0,921	-0,6875	0,9491
		50-70 %	0,8135	0,2965	0,032*	0,0583	1,5687
Diosmetin	50-70 %	< 40 %	-0,6827	0,3426	0,151	-1,5554	0,1900
		40-50 %	-0,8135	0,2965	0,032*	-1,5687	-0,0583
	< 40 %	40-50 %	0,0698	0,2886	0,971	-0,6598	0,7994
Luteolin	50-70 %	< 40 %	0,3115	0,3007	0,588	-0,4487	1,0717
	40-50 %	< 40 %	-0,0698	0,2886	0,971	-0,7994	0,6598
		50-70 %	0,2417	0,2602	0,652	-0,4161	0,8995
Acaciin	50-70 %	< 40 %	-0,3115	0,3007	0,588	-1,0717	0,4487
		40-50 %	-0,2417	0,2602	0,652	-0,8995	0,4161
	< 40 %	40-50 %	-0,0531	0,3302	0,987	-0,8889	0,7827
Diosmin	50-70 %	< 40 %	0,6857	0,3534	0,164	-0,2088	1,5803
	40-50 %	< 40 %	0,0531	0,3302	0,987	-0,7827	0,8889
		50-70 %	0,7388	0,3084	0,067	-0,0420	1,5196
Acaciin	50-70 %	< 40 %	-0,6858	0,3534	0,164	-1,5803	0,2088
		40-50 %	-0,7388	0,3084	0,067	-1,5196	0,0420
	< 40 %	40-50 %	0,1818	0,4150	0,909	-0,8666	1,2302
Diosmin	50-70 %	< 40 %	-0,8135	0,4274	0,174	-1,8933	0,2662
	40-50 %	< 40 %	-0,1818	0,4150	0,909	-1,2302	0,8666
		50-70 %	-0,9953	0,3684	0,033*	-1,9259	-0,0647
Diosmin	50-70 %	< 40 %	0,8135	0,4274	0,174	-0,2662	1,8933
		40-50 %	0,9953	0,3684	0,033*	0,0647	1,9259
	< 40 %	40-50 %	0,0698	0,3799	0,983	-0,8898	1,0294
Diosmin	50-70 %	< 40 %	-0,1523	0,3912	0,927	-1,1406	0,8359
	40-50 %	< 40 %	-0,0698	0,3799	0,983	-1,0294	0,8898

		50-70 %	-0,2222	0,3372	0,806	-1,0739	0,6296
	50-70 %	< 40 %	0,1523	0,3912	0,927	-0,8359	1,1406
		40-50 %	0,2222	0,3372	0,806	-0,6296	1,0739
Isorientin	< 40 %	40-50 %	0,5154	0,3903	0,425	-,04705	1,5012
		50-70 %	-0,3221	0,4019	0,727	-1,3374	0,6932
	40-50 %	< 40 %	-0,5154	0,3903	0,425	-1,5012	0,4705
		50-70 %	-0,8375	0,3464	0,063	-1,7125	0,0376
	50-70 %	< 40 %	0,3221	0,4019	0,727	-0,6932	1,3374
		40-50 %	0,8375	0,3464	0,063	-0,0376	1,7125
Isorhoifolin	< 40 %	40-50 %	0,3774	0,5302	0,779	-1,0239	1,7787
		50-70 %	0,0884	0,5094	0,985	-1,2579	1,4347
	40-50 %	< 40 %	-0,3774	0,5302	0,779	-1,7787	1,0239
		50-70 %	-0,2890	0,4411	0,809	-1,4549	0,8769
	50-70 %	< 40 %	-0,0884	0,5094	0,985	-1,4347	1,2579
		40-50 %	0,2890	0,4411	0,809	-0,8769	1,4549
Luteolin 7-O-rutinosid	< 40 %	40-50 %	0,6151	0,5310	0,520	-0,7665	1,9966
		50-70 %	0,4065	0,5209	0,740	-0,9489	1,7619
	40-50 %	< 40 %	-0,6151	0,5310	0,520	-1,9966	0,7665
		50-70 %	-0,2085	0,4708	0,907	-1,4334	1,0164
	50-70 %	< 40 %	-0,4065	0,5209	0,740	-1,7619	0,9489
		40-50 %	0,2085	0,4708	0,907	-1,0164	1,4334
Orientin	< 40 %	40-50 %	0,3072	0,5334	0,848	-1,0531	1,6675
		50-70 %	-0,4269	0,5114	0,708	-1,7311	0,8773
	40-50 %	< 40 %	-0,3072	0,5334	0,848	-1,6675	1,0531
		50-70 %	-0,7341	0,4289	0,244	-1,8278	0,3596
	50-70 %	< 40 %	0,4269	0,5114	0,708	-0,8773	1,7311
		40-50 %	0,7341	0,4289	0,244	-0,3596	1,8278
Pectolarin	< 40 %	40-50 %	-0,0642	0,4673	0,991	-1,2589	1,1305
		50-70 %	-0,4545	0,4491	0,604	-1,6024	0,6935
	40-50 %	< 40 %	0,0642	0,4673	0,991	-1,1305	1,2589
		50-70 %	-0,3903	0,4024	0,629	-1,4190	0,6384
	50-70 %	< 40 %	0,4545	0,4491	0,604	-0,6935	1,6024
		40-50 %	0,3903	0,4024	0,629	-0,6384	1,4190
Saponarin	< 40 %	40-50 %	0,3415	0,3303	0,590	-0,4930	1,1759
		50-70 %	-0,1089	0,3402	0,950	-0,9683	0,7505
	40-50 %	< 40 %	-0,3415	0,3303	0,590	-1,1759	0,4930
		50-70 %	-0,4504	0,2932	0,316	-1,1911	0,2903
	50-70 %	< 40 %	0,1089	0,3402	0,950	-0,7505	0,9683
		40-50 %	0,4504	0,2932	0,316	-0,2903	1,1911
Vitexin	< 40 %	40-50 %	-0,0877	0,3293	0,965	-0,9249	0,7495
		50-70 %	-0,0508	0,3227	0,988	-0,8711	0,7695
	40-50 %	< 40 %	0,0877	0,3293	0,965	-0,7495	0,9249
		50-70 %	0,0369	0,2716	0,991	-0,6535	0,7272
	50-70 %	< 40 %	0,0508	0,3227	0,988	-0,7695	0,8711
		40-50 %	-0,0369	0,2716	0,991	-0,7272	0,6535
Kaempferol	< 40 %	40-50 %	-0,3656	0,5515	0,804	-1,7618	1,0306
		50-70 %	1,4675	0,5903	0,055	-0,0268	2,9618
	40-50 %	< 40 %	0,3656	0,5515	0,804	-1,0306	1,7618
		50-70 %	1,8331	0,5152	0,004**	0,5288	3,1374
	50-70 %	< 40 %	-1,4675	0,5903	0,055	-2,9618	0,0268
		40-50 %	-1,8331	0,5152	0,004**	-3,1374	-0,5288
Quercetin	< 40 %	40-50 %	-0,1707	0,3621	0,895	-1,0975	0,7561
		50-70 %	0,8711	0,4218	0,134	-0,2086	1,9508
	40-50 %	< 40 %	0,1707	0,3621	0,895	-0,7561	1,0975
		50-70 %	1,0418	0,3748	0,031*	0,0824	2,0011
	50-70 %	< 40 %	-0,8711	0,4218	0,134	-1,9508	0,2086

		40-50 %	-1,0418	0,3748	0,031*	-2,0011	-0,0824
Formononetin	< 40 %	40-50 %	-0,0869	2,0861	0,999	-7,8611	7,6873
		50-70 %	-1,3344	1,9043	0,793	-8,4312	5,7624
	40-50 %	< 40 %	0,0869	2,0861	0,999	-7,6873	7,8611
		50-70 %	-1,2475	1,9043	0,816	-8,3443	5,8494
	50-70 %	< 40 %	1,3344	1,9043	0,793	-5,7624	8,4312
		40-50 %	1,2475	1,9043	0,816	-5,8494	8,3443

## 5.2 Materialien

### 5.2.1 Analytische Anlagen

<i>Anlagen</i>	<i>Hersteller</i>
<b>Analytische RP-HPLC zur Screeninguntersuchung</b>	
Autosampler SIL-20 A prominence	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Systemcontroller SCL-6B	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Säulenofen CTO-10 AS VP	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Pumpe 2150	LKB <sup>®</sup> , Bromma, Schweden
LCController 2152	LKB <sup>®</sup> , Bromma, Schweden
Vakuum Degaser	Sykam <sup>®</sup> , Fürstenfeldbruck
Dioden-Array Detektor SPD-M 10 A VP	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Communications-Bus-Modul CBM-10 A	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Integration Class-LC 10	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Säule ReproSil Pur C18-AQ, Art. r15.aq.s2546	Dr. Maisch <sup>®</sup> GmbH, Ammerbuch
Vorsäule ReproSil Pur C18-AQ, Art. r15.aq.v0146	Dr. Maisch <sup>®</sup> GmbH, Ammerbuch
<b>FMOC-HPLC</b>	
Autosampler Sil-9A	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Säulenofen CTO-10AS VP	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Pumpe LC-20AT	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Vakuum Degaser S 7505	Sykam <sup>®</sup> , Fürstenfeldbruck
Fluoreszenzdetektor RF-10A <sub>XL</sub>	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Communications-Bus-Modul CBM-20A	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Integration Class-LC 10	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Säule ReproSil FMOC, Art. fmoc.s2504	Dr. Maisch <sup>®</sup> GmbH, Ammerbuch
Vorsäule ReproSil FMOC, Art. fmoc.v0004	Dr. Maisch <sup>®</sup> GmbH, Ammerbuch
Sättigungssäule ReproSil, Art. ss.s0404	Dr. Maisch <sup>®</sup> GmbH, Ammerbuch,
<b>NMR-Spektroskopie mit 5 mm DUL <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H</b>	
(Z-GRD) und BACS Probenwechsler	Bruker AV 400 MHz, Karlsruhe

**LC-MS/MS**

Autosampler Pro Star Model 410	Varian <sup>®</sup> , Palo Alto, CA, USA
Pumpen Pro Star Model 210	Varian <sup>®</sup> , Palo Alto, CA, USA
Detektor 500-MS, IT-Mass-Spektrometer	Varian <sup>®</sup> , Palo Alto, CA, USA
Integration MS Workstation	Varian <sup>®</sup> , Palo Alto, CA, USA
Säule Jupiter Proteo C12, Art. 00F-4396-Y0	Phenomenex <sup>®</sup> , Aschaffenburg
Vorsäule Security Guard Cartridges C12	
Art.-Nr.: AJ0-6074-S	Phenomenex <sup>®</sup> , Aschaffenburg

**MALDI-TOF-MS Micromass M@ldi**

Waters GmbH, Eschborn

**FT-IR-Spektrometer**

IR-Spektrometer Model 660-FTIR	Varian <sup>®</sup> , Palo Alto, CA, USA
Detektor DLaTGS	Varian <sup>®</sup> , Palo Alto, CA, USA
Software Resolutions Pro	Varian <sup>®</sup> , Palo Alto, CA, USA

**Präparative RP-HPLC zur Fraktionierung**

Autosampler SIL-6B	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Systemcontroller SCL-6B	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Säulenofen CTO-10 AS VP	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Pumpe 2150	LKB <sup>®</sup> , Bromma, Schweden
LCController 2152	LKB <sup>®</sup> , Bromma, Schweden
Vakuum Degaser	Sykam <sup>®</sup> , Fürstfeldbruck
Detektor 2151 Variable Wavelength Monitor	LKB <sup>®</sup> , Bromma, Schweden
Fraktionssammler FRC-10A	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Communications-Bus-Modul CBM-10 A	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Integration Class-LC 10	Shimadzu <sup>®</sup> , Duisburg
Säule ReproSil-Pur C18-AQ, Art. r15.aq.s2510	Dr. Maisch <sup>®</sup> GmbH, Ammerbuch
Vorsäule ReproSil-Pur C18-AQ, Art. r15.aq.s0310	Dr. Maisch <sup>®</sup> GmbH, Ammerbuch

**UPLC-MS (Q-Tof Premier)**

Q-Tof Premier mit ACQUITY UPLC-System	Waters GmbH, Eschborn
Detektor ESI Mass spectrometer Q-Tof premier	Waters GmbH, Eschborn
Säule, Nucleodur C18 Gravity	Machery & Nagel, Düren



**RUSITEC-System**

Gassammelbeutel (10 L), Art. 037660006	Plastigas <sup>®</sup> , Fa. Linde, München
Nylonbeutel (17 x 8 cm, Maschenweite 1 mm)	Fa. LAT <sup>®</sup> , Garbsen, Hannover
Sechskanalschlauchpumpe, Typ 103	Fa. Ole Dich, Hvidovre, Dänemark
Thermostat, Typ D8	Haake, Karlsruhe
Tygon-Schläuche (4,0 x 7,2 mm)	Omnilab, Gehrden, Hannover

**5.2.2 Geräte****Gerät****Hersteller**

Ammoniak-Analyser, Typ 9512 u. 290A	Thermo Fisher, Scientific Inc., Waltham, MA, USA, vormals Orion <sup>®</sup>
Analysenwaage Analytik AC 210S	Sartorius AG, Göttingen
Feinwaage U120-XD2	Sartorius AG, Göttingen
Gefriertrockner Delta IA	Christ GmbH, Osterode am Harz
Gelelektrophorese	MiniProtean <sup>®</sup> Tetracell, PowerPac Basic, BIO-RAD Laboratories, München
pH-Meter Metrohm 605	Metrohm AG, Herisau, Schweiz
Photospektrometer Multiskan	Thermo Labsystems, Langenselbold
Photometer Prietest ECO	QMLab, Steinfurt
Photometer UVIKON 922	Kontron Instruments, Echingen/München
Pipetten Research (diverse)	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer IKAMAG <sup>®</sup> RCT	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Schüttler Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf
Ultraschallbad super RK 510 H	Bandelin electronic, Berlin
Ultraschall zum Zellaufschluss	Sartorius, LABSONIC <sup>®</sup> M, Göttingen
Vortex-Genie Mixer	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Zentrifuge Multifuge 3s	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge ZK 401	BHG Hermle, Gosheim

### 5.2.3 Verbrauchsmaterialien

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
Autosamplerfläschchen, Art. CD0821010	Poeck Analytik-Zubehör GmbH, Langen
Deckel für Autosamplerfläschchen, Art. GVWP01300	FMillipore, Billerica, MA, USA
Einmalhandschuhe Latex	Semperguard, Semperit AG Holding, Österreich
Einmalpipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einmalspritzen	Teruma Europe NV, Leuven
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Reagiergefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Septen, BP 221 S	Sartorius, Göttingen
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Zentrifugenröhrchen (15 mL), Art. 430791	Corning Inc., Kennebunk, USA
Zentrifugenröhrchen (50 mL), Art. 430829	Corning Inc., Kennebunk, USA

### 5.2.4 Reagenzien und Chemikalien

<i>Reagenz</i>	<i>Hersteller</i>
Acacetin, Art. 00017	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acenocoumarol, Art. SML0074	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acetonitril, Art. 9017 (HPLC)	J. T. Baker <sup>®</sup> , Phillipsburg, NJ, USA
Acetonitril, Art. CL00.0175.2500 (LC-MS/MS)	CL-Chem-Lab <sup>®</sup> , Zedelgem, Belgien
ADAM-Lösung, Art. A1260	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Aflatoxin B1, Art. A6636	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agmatin, Art. A7127	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Ajmalicin, Art. 41111	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
α-Cyano-4-hydroxymizsäure, Art. C8982	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Ameisensäure, Art. 926 K12319964	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Aminosäurenstandard, Art. A2161	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Ammoniumchlorid, Art. 1145	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Ammoniumsulfat, Art. 11225	Riedel de Haën AG, Seelze

---

Apigenin, Art. A3145	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Apigenin 7- <i>O</i> -glucosid, Art. 44692	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Apigenin 7- <i>O</i> -neohesperidosid, Art. A8906	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Benzoessäure, Art. 242381	Sigma Aldrich AG, Buchs, Schweiz
Biochanin A, Art. D2016	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2,3-Bis-(4-methoxy-benzyliden)succinylsäure Art. S300144-1EA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Brain Heart Infusion, Art. 53283	Fluka Analytical, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau, Art. B-5523	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
BSA, Art. A-6793	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Caftarsäure, Art. 15029	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid, Art. C1016	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchloriddihydrat, Art. 1023820	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
4-[4-(2-Carboxybenzoyl)phenyl]buttersäure Art. 192813	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chlorogensäure, Art. C3878	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cichoriensäure, Art. C7243	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Citrullin, Art. C 7629	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Coniferylalkohol, Art. 223735	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue G-250, Art. B1131	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Curcumin, Art. C1386	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cumarin, Art. C4261	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2,4-Diaminbuttersäure (DABA), Art. D3758	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Derivatisierungs-Pufferlösung, Art. HC827346	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
(-)-Dibenzyl D-tartrate, Art. 95352	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3,4-Dihydroxybenzoessäure, Art. 37580	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3,4-Dihydroxyphenylessigsäure, Art. 850217	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure, Art. 102601	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin, Art. D9628	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2',4-Dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalkon Art. 534137	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat, Art. 105109	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid, Art. 2931	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt

---

3,4-Dimethoxyzimtsäure, Art. D133809	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2,6-Dimethyl-benzo(1,2-b,4,5-b')difuran-3,7-dicarboxylsäurediethylester, Art. R505145	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat, Art. 106566	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphatdodecahydrat, Art. 106579	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Diosmetin, Art. D7321	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diosmin, Art. D3525	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DL-Mandelsäure, Art. 63470	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA, Art. EDS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Enterodiol, Art. 45198	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Epicatechin, Art. E1753	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure, Art. 818755	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Ethanol, Art. 100983	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Ferulasäure, Art. 128708	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formaldehydlösung (36,5 %), Art. 8775	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formononetin, Art. 47752	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure), Art. A 5835	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Genistein, Art. G6649	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
[6]-Gingerol, Art. G1046	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin, Art. G2289	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin, Art. G8898	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutaminsäure, Art. G1251	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Harnstoff, Art. 108487	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Hesperetin, Art. H4125	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hesperidin, Art. H5254	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hippursäure, Art. 112003	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Histamin, Art. H7250	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
3-Hydroxybenzoesäure, Art. H20008	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-Hydroxybenzoesäure, Art. H20059	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5-Hydroxy-L-tryptophan, Art. H9772	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-Hydroxyzimtsäure, Art. H23007	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)propionsäure, Art. AMS006461	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

---

2-Hydroxyphenylelessigsäure, Art. 64635	Riedel-de Haën AG, Seelze
4-Hydroxyphenylelessigsäure, Art. H50004	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure, Art. 393533	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure, Art. H52406	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Indol-3-essigsäure, Art. I3750	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Isoorientin, Art. I1536	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaempferol, Art. K0133	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaffeesäure, Art. C0625	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid, Art. 12008	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, Art. 105108	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(III), Art. 104971	Merck KGaA, Darmstadt
Lowry Protein Assay Kit, Art. KF132546	Thermo Scientific, Rockford, USA
L-Phenylalanin, Art. P5482	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-(-)-3-Phenylmilchsäure, Art. 113069	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Prolin, Art. P0380	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Tryptophan, Art. T0254	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Tyrosin, Art. T-3754	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Luteolin, Art. L9283	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Luteolin 7-glucosid, Art. 49968	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid, Art. 814733	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchloridhexahydrat, Art. 105833	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfatheptahydrat, Art. A6414	AppliChem, Darmstadt
2-Mercaptoethanol, Art. 63689	Fluka Biochemika AG, Buchs, Schweiz
Methanol, Art. 09337G21	Carlo Erba Reactifs, Val de reuil, Frankreich
Methanol-d <sub>4</sub> , Art. 11346	Deutero GmbH, Kastellaun
Methoxyfenozid, Art. 32507	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5-Methoxyindol-3-carboxaldehyd, Art. M14943	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat, Art. 106264	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat, Art. 71347	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid, Art. 106406	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat, Art. 106370	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS), Art. L3771	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

---

Natriumhydrogencarbonat, Art. 106329	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat, Art. 106512	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Natronlauge, Art. HC 945059	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Orientin, Art. O9765	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Palmatin chloridhydrat, Art. 361615	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Peptidstandard, Art. H2016-1VL	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Phenylbrenztraubensäure, Art. 286958	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-Phenylbuttersäure, Art. P21005	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
(S)-4-Phenylbutyrylglutamin (PBGN)	Institut für Organische Chemie, G.W. Leibniz Universität Hannover
Phenylelessigsäure, Art. P16621	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Phenylethylamin, Art. 77900	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-Phenylpropionsäure, Art. W288918	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phloroglucin, Art. P3502	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
85 %-ige Phosphorsäure, Art. 100573	Merck KGaA, Darmstadt
Pinoresinol, Art. SML0073	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>p</i> -Aminohippursäure, Art. A1422	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>p</i> -Cumarsäure, Art. C9008	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>p</i> -Hydroxyphenylbrenztraubensäure, Art. 114286	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>p</i> NPP, Art. N2752-1G	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Polyarylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1); 40 % ig	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Protein Ladder, 10-200 kDa	Fermentas, Baden-Württemberg
Quercetin, Art. Q4951	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RCL, Art. S325104	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rosmarinsäure, Art. R4033	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rutintrihydrat, Art. 78095	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure, Art. 109058	Merck <sup>®</sup> KGaA, Darmstadt
Salzsaure D-Norvalinlösung, Art. N7377	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Serotonin, Art. H9523	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Sinapinsäure, Art. D7927	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sulfosalicylsäure, Art. S0640	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Tanschinon IIA, Art. T4952	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

---

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Art. T9281	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triflouressigsäure, Art. T6508	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
TRIS, Art. T1378	Sigma <sup>®</sup> , St. Louis, MO, USA
Tuning Solution, 500-MS, Art. 03-932102-01	Varian <sup>®</sup> , Palo Alto, CA, USA
Umbelliferon, Art. H24003	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zimtaldehyd, Art. 239968	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zimtsäure, Art. C80857	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

## 5.3 Methoden

Zur Untersuchung der Ursachen der Erkrankungen in Milchviehbetrieben wurden im Rahmen dieser Arbeit Grassilage-, Gras-, Heu-, Fermenter- und Serumanalysen durchgeführt. Hierbei wurden die Auswirkungen von Grassilagen mit unterschiedlichen prozentualen Reineiweißanteilen (RE) (w/w) am Rohprotein (Rp) auf den Pansensaft in-vitro untersucht. Dazu wurde Pansensaft aus RUMen SIMulation TEChnique (RUSITEC)-Fermentationsläufen gewonnen und aufgearbeitet. Zur Identifizierung der möglichen Aminosäure-, Peptid- und Protein-Verbindungen in den Fermenter-Proben wurden HPLC-FMOC-Messungen, SDS-PAGE, Lowry-, Bradford-Test, LC-ESI-MS/MS- und MALDI-Analysen durchgeführt. Die vorhandenen Komponenten in Grassilagen-, Gras-, Heu-, Pansensaft- sowie Serum-Proben wurden mittels HPLC- und LC-ESI-MS/MS-Analyse analytisch charakterisiert. Die analysierten Serum-Proben (n= 15) von Betrieben wiesen klinische Verdachtsfälle für das Auftreten der „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ auf. Somit sollte es überprüft werden, ob die definierten sechs Peaks in den fermentierten Grassilagen auch in Serum-Proben erfasst werden können.

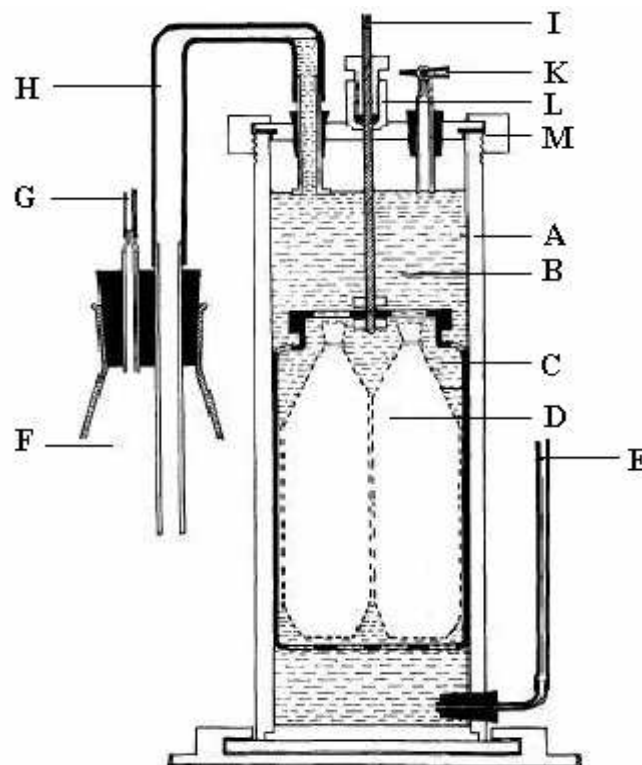
Die Aufklärung der Struktur-, Summenformeln und Zusammensetzung der unbekannt Substanzen in Futtermittel- sowie Pansensaft-Proben erfolgte zudem auch durch NMR-, FT-IR- und Q-ToF-UPLC-MS-Spektroskopie. Anschließend wurden die identifizierten Komponenten in den analysierten Proben mit einem externen Standard an der LC-ESI-MS/MS quantifiziert und somit die stattfindenden Stoffwechselreaktionen in Futtermittel und Fermenter definiert.

### 5.3.1 Rumen Simulation Technique (RUSITEC)-Fermentationssystem

Das RUSITEC-System ist ein Pansensimulationsmodell von Czerkawski und Breckenridge [254]. Es handelt sich um ein geschlossenes, semi-kontinuierliches Durchflusssystem und besteht aus sechs Einzelfermentern. Diese Methode ermöglicht Fermentationen in-vitro, mit der die mikrobiellen Stoffwechselleistungen der Pansenflora über einen Zeitraum von mehreren Wochen qualitativ und quantitativ erfasst werden können. Dieses Inkubationssystem erlaubt eine Untersuchung, ohne das Wirtstier zu belasten. Hierdurch kann künstlicher Pansensaft produziert und die mikrobiellen Stoffwechselprodukte sowie weitere Pansenparameter bestimmt werden. Die Funktion der Pansenwand kann als Nachteil dieses Systems während der Inkubation nicht erfasst werden.



Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei RUSITEC-Anlagen, die jeweils sechs identisch aufgebaute und parallel angeordnete Fermentationsbehälter mit einem Flüssigkeitsvolumen von jeweils 1.000 mL enthielten, eingesetzt. In Abbildung 5.3 ist der schematische Aufbau einer Fermentereinheit des RUSITEC-Systems dargestellt [33, 254]. Die Fermentationsbehälter wurden auf zwei Wasserbäder aufgeteilt, deren Temperatur durch ein Einhängethermostat konstant auf 39 °C gehalten wurde. Durch einen Plexiglasschraubverschluss mit Gummidichtung konnten die Fermentationsbehälter sauerstoffundurchlässig verschlossen werden. Jedes Fermentationsgefäß bestand aus einem Plexiglaszylinder, welcher ein am Deckel und Boden perforiertes Innengefäß enthielt, in dem sich zwei Nylonbeutel befanden.

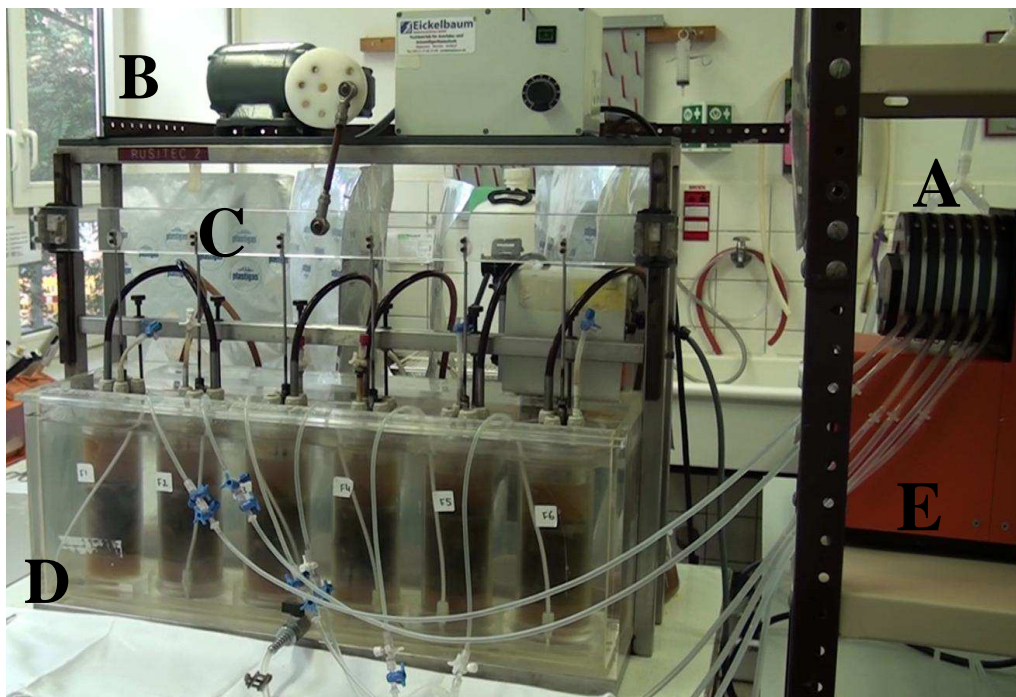


- |    |                            |    |                                     |
|----|----------------------------|----|-------------------------------------|
| A: | Fermenter                  | G: | Anschlussventil für Gassammelbeutel |
| B: | Fermenterflüssigkeit       | H: | Überlaufschlauch                    |
| C: | Perforierter Innenbehälter | I: | Hubstange                           |
| D: | Futterbeutel               | K: | Drei-Wege-Hahn für Begasung         |
| E: | Pufferzulauf               | L: | Feststellschraube                   |
| F: | Überlaufgefäß              | M: | Schraubverschluss Fermenter         |

**Abbildung 5.3** Schematischer Aufbau einer Fermentereinheit des RUSITEC-Systems [33, 254].

Die Deckel des Innengefäßes waren durch Hubstangen über ein Gestänge mit einer von einem Elektromotor angetriebenen Kurbel zusammengebunden (s. Abb. 5.4). Um die Pansenmotorik zu simulieren, wurden die Innengefäße kontinuierlich und gleichmäßig sechsmal pro Minute

auf- und abwärts bewegt. Mit einer Sechskanalschlauchpumpe wurde die kontinuierliche Infusion von täglich ca. 400 mL Pufferlösung/Fermenter zugeführt [46]. Über Tygon-Schläuche wurde der Puffer mit der gleichen Rate kontinuierlich ins Innere des Behälters gepumpt. Die Deckel der Fermentationsbehälter wiesen zwei Öffnungen auf, von denen eine mit einem Schraubverschluss gesichert war. Die andere war mit einem gasdichten Gummischlauch verbunden. Hierdurch konnte überschüssige Flüssigkeit (Überlauf) in einem Erlenmeyerkolben gesammelt werden. Das gebildete Gas strömte über einen gasdichten Schlauch in einen speziellen Gasbeutel, der mit dem Überlaufbehälter verbunden war.



**Abbildung 5.4** RUSITEC-System mit sechs Fermentern im Pansenlabor der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. A: Die Sechskanalschlauchpumpe, B: Hubmotor, C: Gasbeutel, D: Innenbehälter, E: Tygon-Schläuche (Foto: L. Lumpp) [46, 194].

### 5.3.1.1 Beladung des RUSITEC-Systems

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Schadsilagen (Silagen, welche einen RE-Anteil vom Rp von  $< 50\%$  (w/w) aufweisen; s. Tab. 5.17) zum Vergleich mit Kontrollsilagen (Silagen, welche einen RE-Anteil vom Rp von  $> 50\%$  (w/w) aufweisen; s. Tab. 5.16) in 12 RUSITEC-Fermentationsläufen fermentiert. Ein Fermentationslauf dauerte 28 Tage. In den zuvor durchgeführten achtzehn RUSITEC-Läufen im Pansenlabor der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover wurden bei den Fermenter-Proben am zwölften Tag die optimalen Ergebnisse der untersuchten RUSITEC-Parameter (wie  $\text{NH}_3$ -Konzentration, pH-Wert, Fermentationsgasmenge; s. Kap. 5.3.1.4) festgestellt [33, 46, 66, 194-195]. Aus

diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein RUSITEC-Lauf für zwölf Tage durchgeführt. Um das Ziel und den Inhalt des Versuches zu erkennen, wurden in diesem Kapitel alle Phasen eines Fermentationslaufes beschrieben.

Am Tag 1 wurde der perforierte Innenbehälter jedes Fermenters mit Futter und Pansensaft, sowie festem Panseninhalt von einem gefisteltem Rind (Spendertier) gefüllt (s. Tab. 5.11). Hierzu wurde jeder Fermenter bei einer konstanten Temperatur von 39 °C in einem anaeroben Milieu mit 500 mL Pansensaft, 200 mL RUSITEC-Puffer und 100 mL vorgewärmtem (39 °C) ionenfreien Wasser (Seradest®) beladen. Das System wurde mit RUSITEC-Puffer kontinuierlich perfundiert. Täglich wurden der überschüssige Pansensaft in einem Überlaufgefäß sowie das entstehende Gas in einem Gasbeutel aufgefangen und gemessen. Dabei erfolgten auch die Probenziehung und der wechselnde Austausch eines der im Fermenter befindlichen Futterbeutels im 24-stündigen Abstand, so dass jedes Beutel für 48 h im RUSITEC verblieb.

In den ersten 6 Tagen -Einlaufphase- wurde das System mit Heu und Kraftfutter identisch dem Fisteltier gefüttert (s. Kap. 5.3.1.2). Während der Versuchsdauer beim Austausch wurde die Kraftfuttermenge (3,4 g) in allen Fermentern nicht verändert. In der Kontrollphase (Tag 7-9) wurde die Homogenität der Fermentation durch die tägliche Messung der RUSITEC-Parameter in den 6 unabhängigen Fermentern überprüft. Ab Tag 10 -Zulagephase- wurden zu den jeweiligen Fermentern Kontroll- bzw. Schadsilage gegeben (s. Tab. 5.15-5.17). Über 10 Tage erstreckte sich diese Testphase, wobei wie im Tier die Futtermittel lediglich 48 h im Fermenter verblieben. In der Regel, um das System wieder in seine ursprünglichen Verhältnissen zu rückzuführen, sollte das System weiter über 9 Tage wie zu Beginn gefüttert werden (Erholungsphase; nicht in dieser Arbeit durchgeführt).

In dieser Arbeit wurden am zwölften Tag des Laufes aus einem Fermenter zur Analyse ca. 500 mL Fermenterflüssigkeit gewonnen. Die Beladung des Fermenters für den ersten Versuchstag des RUSITEC-Systems und die Versuchsphasen sind in den Tabellen 5.11-5.12 dargestellt.

**Tabelle 5.11** Beladung des Fermenters für den ersten Versuchstag des RUSITEC-Systems.

<b>Futtermittel und Puffer</b>	<b>Menge / Volumen</b>
Fester Panseninhalt	80 g
Heu	12 g
Kraftfutter	3,4 g
Pansensaft	500 mL
RUSITEC-Puffer	200 mL
Ionenfreies Wasser (Seradest®)	100 mL

### Die Zusammensetzung des RUSITEC-Puffers

Lösung B wird tropfenweise unter ständigem Rühren zu Lösung A gegeben [46].

Lösung A: 49,0 g NaHCO<sub>3</sub> und 46,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O werden in 4.950 mL ionenfreies Wasser (Seradest<sup>®</sup>) gelöst.

Lösung B: 47,0 g NaCl, 57,0 g KCl, 12,8 g MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O und 5,3 g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O werden in 1 L ionenfreies Wasser (Seradest<sup>®</sup>) gelöst.

**Tabelle 5.12** Versuchsphasen

Phase	Dauer [Tage]	Fütterung	Ziel
Einlauf-	0-6	Heu und Kraftfutter	Erreichung stabiler Fermentationsbedingungen
Kontroll-	7-9	Heu und Kraftfutter	Überprüfung der Homogenität
Zulage-	10-12	Grassilage und Kraftfutter	Zugabe der Silagen

#### 5.3.1.2 Zusammensetzungen der Futterkomponenten

Die Analyse des Nährstoffgehalts der Futterkomponenten erfolgte im Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Als Futtermittel wurden während der RUSITEC-Versuche Heu, Kraftfutter und Grassilage (im nativen Zustand) mit unterschiedlichen RE-Anteilen eingesetzt (s. Tab. 5.13-5.17).

#### Heu

Das in den RUSITEC-Versuchen eingesetzte native Heu wurde als Quaderballen einmalig erworben. Die Fermenter wurden mit dem für Rinder verwendeten Heu beladen, das bis zum Tag 0 des Versuches bei Raumtemperatur gelagert wurde. Vor dem Einsatz im RUSITEC wurden die Halme auf ca. 2 cm Länge gekürzt. 12 g (uS) Heu wurden abgewogen und in die Futterbeutel gegeben. Tabelle 5.13 gibt die Nährstoffgehalte des eingesetzten Heus wieder.

**Tabelle 5.13** Nährstoffgehalte des eingesetzten Heus (TS: Trockensubstanz, uS: ursprüngliche oder Frischsubstanz, Rp: Rohprotein).

Nährstoff	Gehalt
Rohasche (g/kg TS)	48,9
Rohprotein (g/kg TS)	113
Reinprotein (g/kg TS)	99,7
Reineiweiß (in % vom Rp)	87,9
Rohfaser (g/kg TS)	272
Trockensubstanz (in g/kg uS)	877

## Kraftfutter

In der Einlaufphase der künstlichen Pansensaft-Fermentation wurden 3,4 g (uS) abgewogenes Kraftfutter in die Futterbeutel gegeben. Die Zusammensetzung des eingesetzten Kraftfutters laut Herstellerangabe ist in Tabelle 5.14 dargestellt.

**Tabelle 5.14** Nährstoffgehalte, Zusatzstoffe, NEL und Zusammensetzung des eingesetzten Kraftfutters laut Herstellerangabe (NEL: Netto Energie Laktation) [194].

Parameter	Gehalt
Hersteller	BELA-Mühle GmbH
Name	Dairystar 18/III G Pellets, Art. 800061
Beschreibung	Milchleistungsfutter II (Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe)
Inhaltswerte (%)	Rohprotein: 18,0; Rohfett: 3,5; Rohfaser: 9,5; Rohasche: 6,0; Ca: 0,8; P: 0,5; Na: 0,25
NEL (MJ/kg)	6,7
Zusatzstoffe (je kg)	Vit. A: 10.000 I. E.; Vit. D <sub>3</sub> : 1.000 I. E.; Vit. E: 0,15 mg; Na-Selenit: 0,4 mg; Cu(II)SO <sub>4</sub> : 25 mg; Pentahydrat
Zusammensetzung (%)	Rapsextraktionsschrot: 32,0; Rübenmelasseschnitzel: 25,0; Weizenmehl: 15,0; Roggen: 14,3; Haferschälkleie: 7,1; Vinsasse: 3,0; Melasse/Presse: 3,0; CaCO <sub>3</sub> : 0,2; NaCl: 0,2

## Grassilagen

Die eingesetzten nativen 12 Grassilagen in den RUSITEC-Fermentationsläufen (s. Tab. 5.15) wurden in den Jahren 2005-2008 auf norddeutschen Milchviehbetrieben geworben [33, 194]. Für die Fermentation im RUSITEC-System wurden die Silagen vom Erwerb bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. In der Literatur wurde der Lagerungseinfluss auf die Fermentationsparameter untersucht. Bei einer Lagerungsdauer von über ein Jahr wurden für die tiefgekühlten Silagen geringfügig abweichende Ergebnisse ermittelt [33].

Die Silagequalität wurde bezüglich des RE-Anteils mit Hilfe der Nährstoffanalyse im Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover hin untersucht und als Kontroll- und Schadsilage in zwei Gruppen geteilt. Die Kontrollsilagen wiesen einen RE-Anteil von > 50 % (w/w) vom Rp auf und wurden bislang ohne Krankheitsfolgen verfüttert [33, 194]. Die Schadsilagen wiesen einen verringerten RE-Anteil von < 50 % (w/w) vom Rp (Ausnahme: S-08 und S-12) auf und wurden ebenfalls als Futtermittel verwendet, wobei sie Ursache für die Erkrankungen in Milchviehbetrieben (Faktorenerkrankung Milchviehherde) beschrieben werden [1, 33, 194].

Die Menge der eingesetzten Silagen wurde auf ihren Trockensubstanz (TS)-Gehalt (s. Tab. 5.15) umgerechnet, somit erfolgte die Beladung der Silagen mit gleichem TS-Gehalt

(10,5 g TS je Futterbeutel). Aufgrund des unterschiedlichen TS-Gehaltes wurden die Grassilagen im RUSITEC-System mit unterschiedlichen Mengen in g/uS fermentiert.

**Tabelle 5.15** Die eingesetzten Grassilagen im RUSITEC-System. Symbole: uS: ursprüngliche Substanz (Frischsubstanz), Fr: Fermenter, S: Schadsilage, K: Kontrollsilage.

<b>Fermenter Nr.</b>	<b>Eingesetzte Grassilage</b>	<b>Menge [g/uS]</b>
Fr-1	K-01	17
Fr-2	S-02	24
Fr-3	S-04	40
Fr-4	S-07	26
Fr-5	S-08	36
Fr-6	S-09	32
Fr-7	S-10	7
Fr-8	S-11	8
Fr-9	S-12	9
Fr-10	S-13	10
Fr-11	K-14	11
Fr-12	K-15	12

Tabellen 5.16 und 5.17 zeigen die Nährstoffzusammensetzungen der fermentierten Kontroll- und Schadgrassilagen.

**Tabelle 5.16** Nährstoffanalyse der eingesetzten Kontrollsilagen im RUSITEC-System. Die Nährstoffanalyse erfolgte im Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. (K: Kontrollsilage, TS: Trockensubstanz, NfE: N-freie Extraktstoffe, NDF: Neutrale Detergenz-Faser, ADF: Saure Detergenz-Faser, NEL: Netto-Energie-Laktation).

<b>Nährstoff</b>	<b>Einheiten</b>	<b>Kontrollsilagen</b>		
		<b>K-01</b>	<b>K-14</b>	<b>K-15</b>
<b>TS</b>	g/kg uS	472	579	615
<b>Rohasche</b>	g/kg TS	109	89	98
<b>Rohprotein</b>	g/kg TS	165	164	203
<b>Reinprotein</b>	g/kg TS	83	82	116
<b>Reineiweiß</b>	% vom Rp	50,51	50,05	56,96
<b>Rohfett</b>	g/kg TS	34	33	35
<b>Rohfaser</b>	g/kg TS	250	275	246
<b>NfE</b>	g/kg TS	443	440	418
<b>NDF</b>	g/kg TS	494	563	527
<b>ADF</b>	g/kg TS	305	321	286
<b>pH</b>		4,83	5,30	5,17
<b>NEL</b>	MJ/kg TS	6,22	6,18	6,42

**Tabelle 5.17** Nährstoffanalyse der eingesetzten Schadsilagen im RUSITEC-System. Die Nährstoffanalyse erfolgte im Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. (S: Schadsilage, TS: Trockensubstanz, NfE: N-freie Extraktstoffe, NDF: Neutrale Detergenz-Faser, ADF: Saure Detergenz-Faser, NEL: Netto-Energie-Laktation).

Nährstoff	Einheiten	Schadsilagen								
		S-02	S-04	S-07	S-08	S-09	S-10	S-11	S-12	S-13
TS	g/kg uS	321	446	410	304	413	451	329	509	445
Rohasche	g/kg TS	110	85	103	105	119	85	98	100	96
Rohprotein	g/kg TS	174	180	178	221	156	180	187	277	207
Reinprotein	g/kg TS	71	79	76	132	61	60	75	162	71
Reineiweiß	% vom Rp	40,86	43,94	42,66	59,73	39,01	33,29	40,01	58,65	34,09
Rohfett	g/kg TS	34	41	32	45	29	33	38	38	39
Rohfaser	g/kg TS	280	278	273	227	327	290	258	218	254
NfE	g/kg TS	402	417	415	401	368	410	419	367	404
NDF	g/kg TS	520	496	520	395	610	543	523	491	481
ADF	g/kg TS	318	296	310	247	385	333	325	273	292
pH		4,37	4,57	4,90	3,98	5,35	5,25	4,16	4,94	4,53
NEL	MJ/kg TS	6,02	6,23	6,13	6,55	5,58	6,14	6,30	6,78	6,38

### 5.3.1.3 Spendertier

Zur Gewinnung des festen und flüssigen Panseninhalts stand ein weibliches nicht laktierendes Rind der Rasse Deutsch-Schwarzbunte (DSB, 6 Jahre, 650 kg) mit permanenter Pansenfistel zur Verfügung. Das Versuchstier wurde 3 h vor Entnahme des Panseninhalts mit 3 kg (uS) Heu und 800 g (uS) Kraftfutter gefüttert.

### 5.3.1.4 Bestimmungen der RUSITEC-Parameter

Zur Überprüfung der Stabilität des Systems wurden während der Versuche folgende Parameter gemessen.

1. pH-Wert
2. Ammoniakkonzentration
3. Fermentationsgasmenge
4. Überstandvolumen

#### Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde täglich vor dem Wechsel der Futterbeutel in 10 mL frisch entnommener Fermenterflüssigkeit mit einem pH-Meter bestimmt. Die Kalibrierung des pH-Meters erfolgte täglich mit zwei Standardpufferlösungen bei pH 7 und pH 4.

### **Bestimmung der Ammoniakkonzentration**

NH<sub>3</sub>-Konzentrationen wurden täglich in 10 mL frisch entnommener Probe durch eine Ammoniakmeselektrode gemessen. Vor der Messung wurden 10 mL Fermenterflüssigkeit mit 100 µL 10 M NaOH versetzt, somit werden die Ammoniumionen in elektrisch neutrale Ammoniakmoleküle überführt. Die tägliche Kalibrierung der Messapparatur erfolgte mit zwei verdünnten Ammoniumchloridlösungen. Die Konzentrationen betragen 10<sup>-3</sup> M (Lösung 1) und 10<sup>-2</sup> M (Lösung 2).

### **Bestimmung der Fermentationsgasmenge**

Die gebildeten Gasvolumina des RUSITEC-Systems wurden täglich in Gassammelbeuteln aufgefangen. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines 2.000 mL Messzylinders und Dreiwegehahns nach dem Prinzip der Wasserverdrängung. Der Dreiwegehahn wurde mit dem Gassammelbeutel über einen Schlauch verbunden. Das gebildete Gas wurde über diesen Aufbau in den mit Wasser gefüllten 2.000 mL Messzylinder geleitet, der mit der Öffnung nach unten in ein Wasserbecken gehängt war. Das Volumen des Gases wurde direkt an der Skala des Messzylinders abgelesen.

### **Bestimmung des Überstandvolumens**

Um die Stabilität der Pufferzufuhr des Systems zu überprüfen, wurden täglich die einzelnen Fermenter-Überstandvolumina mit einem 1.000 mL Messzylinder gemessen. Dafür wurde von der einzelnen Fermentereinheit die überschüssige Fermenterflüssigkeit kontinuierlich in einem Überlaufgefäß (Erlenmeyerkolben) aufgefangen. Zur Entsorgung der vorhandenen Bakterien in der Fermenterflüssigkeit wurde in den Erlenmeyerkolben vor dem Start des Versuches 1 mL 0,5 M HCl zugegeben. Nach der Bestimmung des aufgefangenen Überstandvolumens wurde die Fermenterflüssigkeit mit NaOH neutralisiert und entsorgt.

### **5.3.2 Probenaufbereitung**

Die Aufarbeitungsprozesse zur Analyse der Fermenter-, Futtermittel- (Grassilage, Gras, Heu) und Serum-Proben sind im Folgenden einzeln beschrieben.



### **5.3.2.1 Fermenter-Proben**

Pansensaft-Proben aus den RUSITEC (RUMen SIMulation TEChnique)-Durchläufen wurden für 20 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert und durch 0,2 µm RC-Sterilfilter filtriert. Dadurch wurden die in der Fermenterflüssigkeit vorhandenen Protozoen entfernt. Bis zur weiteren Analyse wurden die aufgearbeiteten Fermenterflüssigkeiten in 2 mL Portionen bei -18 °C eingefroren.

### **5.3.2.2 Grassilage-, Gras- und Heu-Proben**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 65 Grassilage-, 2 Gras- und 3 Heu-Proben an der HPLC und LC-ESI-MS/MS analysiert. Die Grassilagen wurden in den Jahren 2005-2012, die Gras-Proben im Jahr 2009 und das Heu in den Jahren 2009-2010 auf norddeutschen Milchviehbetrieben gewonnen. Die erhaltenen Proben wurden am Institut für Tierernährung (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) auf 1 mm gemahlen, wobei die Grassilage- und frische Gras-Proben erst gefriergetrocknet wurden.

Über die genaue Lagerung dieser gefriergetrockneten Futtermittel bis zur Ankunft im Pansenlabor ist meist nichts bekannt. Bis zur Extraktion für die HPLC- sowie LC-MS-Analyse wurden sie bei 18 °C zwischengelagert. Tabelle 5.18 zeigt die Nährstoffzusammensetzungen der analysierten Grassilagen, Gras und Heu.

**Tabelle 5.18** Ergebnisse der Nährstoffanalyse der untersuchten Grassilage-, Gras- und Heu-Proben (ADF: Saure Detergenz-Faser, NDF: Neutrale Detergenz-Faser, NfE: N-freie Extraktstoffe, Rp: Rohprotein, TS: Trockensubstanz, uS: ursprüngliche Substanz, GS: Grassilage, S: Schadsilage, K: Kontrollsilage, H: Heu, G: Gras, k. A.: keine Angabe,  $\Sigma n$ = Die Gesamtanzahl der analysierenden Proben in den zugehörigen Gruppen). Der Hintergrund der prozentualen RE-Anteile vom Rohprotein ist markiert.

Nährstoffanalyse												
Probe Kode	Probe Merkmale	Rohasche [g/kg TS]	Rohfett [g/kg TS]	Rohfaser [g/kg TS]	TS [g/kg uS]	Roh- protein [g/kg TS]	Rein- protein [g/kg TS]	Reineiweiß [%] vom Rp (w/w)	NfE [g/kg TS]	NDF [g/kg TS]	ADF [g/kg TS]	pH
S-01*		122,35	k. A.	272	349	222,06	56,73	25,55	k. A.	550	344	4,57
S-10		85,37	32,59	290	451	180,49	60,09	33,29	410	543	333	5,25
S-03*		k. A.	k. A.	k. A.	284	212,32	71,83	33,83	k. A.	k. A.	k. A.	4,55
S-13		96,40	39,10	254	445	206,97	70,56	34,09	404	481	292	4,53
S-06	$\Sigma n= 17$	k. A.	k. A.	k. A.	289	136,33	47,06	34,52	k. A.	k. A.	k. A.	4,23
S-14*	GS-	k. A.	k. A.	k. A.	351	186,89	65,81	35,21	k. A.	k. A.	k. A.	4,45
S-15	Proben	99,03	k. A.	259	308	215,91	79,87	36,99	k. A.	k. A.	k. A.	4,07
S-16		106,44	k. A.	238	295	181,36	67,46	37,20	k. A.	k. A.	k. A.	3,77
S-17*		k. A.	k. A.	k. A.	292	228,42	85,96	37,63	k. A.	k. A.	k. A.	4,39
S-18	*5 GS-	100,00	k. A.	k. A.	325	188,92	71,38	37,78	k. A.	k. A.	k. A.	4,59
S-19	Proben	88,86	k. A.	250	440	176,36	66,82	37,89	k. A.	k. A.	k. A.	4,99
S-20*	ohne	k. A.	k. A.	k. A.	237	179,32	68,78	38,36	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
S-21	Lagerzeit-	k. A.	k. A.	k. A.	232	140,95	54,31	38,53	k. A.	k. A.	k. A.	4,32
S-22	effekt	k. A.	k. A.	k. A.	335	203,28	78,81	38,77	k. A.	k. A.	k. A.	4,47
S-09		119,00	29,10	327	413	156,42	61,02	39,01	368	610	385	5,35
S-23		k. A.	k. A.	k. A.	286	196,15	77,97	39,75	k. A.	k. A.	k. A.	4,19
S-24		k. A.	k. A.	k. A.	338	164,79	65,68	39,86	k. A.	k. A.	k. A.	4,48
S-11		98,18	37,69	258	329	187,40	74,97	40,01	419	523	325	4,16
S-25*		147,93	k. A.	301	242	200,00	80,17	40,09	k. A.	k. A.	k. A.	5,78
S-26		106,84	k. A.	265	263	185,55	74,52	40,16	k. A.	k. A.	k. A.	4,05
S-27		k. A.	k. A.	k. A.	306	177,78	71,90	40,44	k. A.	k. A.	k. A.	4,15
S-02	$\Sigma n= 27$	109,97	34,27	280	321	173,83	71,03	40,86	402	520	318	4,37
S-28	GS-	k. A.	k. A.	k. A.	214	175,23	72,90	41,60	k. A.	k. A.	k. A.	3,90
S-29*	Proben	k. A.	k. A.	k. A.	332	209,04	87,05	41,64	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
S-30		k. A.	k. A.	k. A.	325	175,38	73,54	41,93	k. A.	k. A.	k. A.	3,99
S-31		k. A.	k. A.	k. A.	348	189,08	79,31	41,95	k. A.	k. A.	k. A.	4,47
S-05		125,97	41,72	205	365	230,96	96,99	41,99	397	433	262	k. A.

<b>S-07</b>		103,00	31,52	273	410	177,80	75,85	42,66	415	520	310	4,90
<b>S-32</b>		103,51	k. A.	k. A.	313	175,08	74,76	42,70	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<b>S-33</b>		k. A.	k. A.	k. A.	387	192,51	82,69	42,95	k. A.	k. A.	k. A.	4,33
<b>S-34</b>		80,31	k. A.	k. A.	381	124,41	53,54	43,04	k. A.	k. A.	k. A.	4,32
<b>S-35</b>		k. A.	k. A.	k. A.	440	181,59	78,86	43,43	k. A.	k. A.	k. A.	4,29
<b>S-04</b>		84,98	41,03	278	446	179,60	78,92	43,94	417	496	296	4,57
<b>S-36</b>		k. A.	k. A.	k. A.	229	168,56	74,24	44,04	k. A.	k. A.	k. A.	3,97
<b>S-37</b>	* 6 GS-	k. A.	k. A.	k. A.	366	192,90	85,25	44,19	k. A.	k. A.	k. A.	4,80
<b>S-38</b>	Proben	k. A.	k. A.	k. A.	382	175,39	78,53	44,77	k. A.	k. A.	k. A.	4,43
<b>S-39</b>	ohne	k. A.	k. A.	k. A.	355	143,66	64,79	45,10	k. A.	k. A.	k. A.	4,25
<b>S-40*</b>	Lagerzeit-	157,28	k. A.	k. A.	302	242,38	109,93	45,35	k. A.	k. A.	k. A.	5,12
<b>S-41*</b>	effekt	k. A.	k. A.	k. A.	424	182,78	83,73	45,81	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<b>S-42*</b>		k. A.	k. A.	k. A.	370	143,51	66,76	46,52	k. A.	k. A.	k. A.	4,53
<b>S-43</b>		k. A.	k. A.	k. A.	432	118,29	55,56	46,97	k. A.	k. A.	k. A.	4,17
<b>S-44</b>		k. A.	k. A.	k. A.	465	143,44	68,39	47,68	k. A.	k. A.	k. A.	4,35
<b>S-45*</b>		k. A.	k. A.	k. A.	447	197,76	94,63	47,85	k. A.	k. A.	k. A.	4,44
<b>S-46</b>		112,82	k. A.	277	390	188,21	91,28	48,50	k. A.	k. A.	k. A.	4,18
<b>K-14</b>		89,12	32,82	275	579	163,63	81,89	50,05	440	563	321	5,30
<b>K-01</b>		109,11	34,11	250	472	164,83	83,26	50,51	443	494	305	4,83
<b>K-02</b>	$\Sigma n= 21$	113,39	k. A.	k. A.	493	212,98	108,11	50,76	k. A.	k. A.	k. A.	4,68
<b>K-03</b>	GS-	86,88	k. A.	k. A.	404	173,02	88,12	50,93	k. A.	k. A.	k. A.	4,85
<b>K-16</b>	Proben	107,29	42,14	262	439	198,41	101,59	51,20	390	554	310	4,83
<b>K-04</b>		90,03	k. A.	k. A.	311	216,40	111,58	51,56	k. A.	k. A.	k. A.	4,45
<b>K-05*</b>		k. A.	k. A.	k. A.	475	216,84	114,95	53,01	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<b>K-06</b>		85,39	k. A.	k. A.	575	210,43	112,35	53,39	k. A.	k. A.	k. A.	5,69
<b>K-23</b>		k. A.	k. A.	k. A.	412	155,34	83,98	54,06	k. A.	k. A.	k. A.	4,00
<b>K-07</b>	* 3 GS-	k. A.	k. A.	k. A.	574	154,18	85,02	55,14	k. A.	k. A.	k. A.	5,06
<b>K-18</b>	Proben	106,15	35,33	264	569	163,62	90,81	55,50	431	533	311	5,47
<b>K-08</b>	ohne	k. A.	k. A.	k. A.	489	194,27	109,20	56,21	k. A.	k. A.	k. A.	5,19
<b>K-09*</b>	Lagerzeit-	k. A.	k. A.	k. A.	219	218,72	123,29	56,37	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<b>K-15</b>	effekt	97,56	35,28	246	615	203,25	115,77	56,96	418	527	286	5,17
<b>S-12</b>		99,61	37,92	218	509	277,01	162,48	58,65	367	491	273	4,94
<b>S-08</b>		105,01	45,12	227	304	221,38	132,24	59,73	401	395	247	3,98
<b>K-10</b>		k. A.	k. A.	k. A.	352	185,51	114,77	61,87	k. A.	k. A.	k. A.	4,94

<b>K-11</b>		k. A.	k. A.	k. A.	495	184,04	116,57	63,34	k. A.	k. A.	k. A.	5,19
<b>K-12</b>		160,75	k. A.	k. A.	479	193,74	126,93	65,52	k. A.	k. A.	k. A.	6,10
<b>K-20</b>		k. A.	k. A.	k. A.	693	150,07	100,72	67,12	k. A.	k. A.	k. A.	5,83
<b>K-13*</b>		k. A.	k. A.	k. A.	390	190,00	127,95	67,34	k. A.	k. A.	k. A.	4,53
<b>H-01<sup>1</sup></b>	$\sum n=3$ H-Proben	k. A.	k. A.	k. A.	852	101,76	83,45	82,01	k. A.	k. A.	k. A.	6,27
<b>H-02<sup>1</sup></b>		k. A.	k. A.	k. A.	831	127,56	109,51	85,85	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<b>H-03<sup>1</sup></b>		k. A.	k. A.	k. A.	875	96,11	85,14	88,59	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<b>G-01<sup>2</sup></b>	$\sum n=2$ G-Proben	k. A.	k. A.	k. A.	552	138,59	123,73	89,28	k. A.	k. A.	k. A.	6,25
<b>G-02<sup>2</sup></b>		k. A.	k. A.	k. A.	634	84,70	80,13	94,60	k. A.	k. A.	k. A.	5,94

<sup>1</sup>: analysierte Heu-Proben, <sup>2</sup>: analysierte Gras-Proben, \*: analysierte Grassilage-Proben ohne Lagerungszeitwirkung auf die Konzentrationen der identifizierten Komponenten.

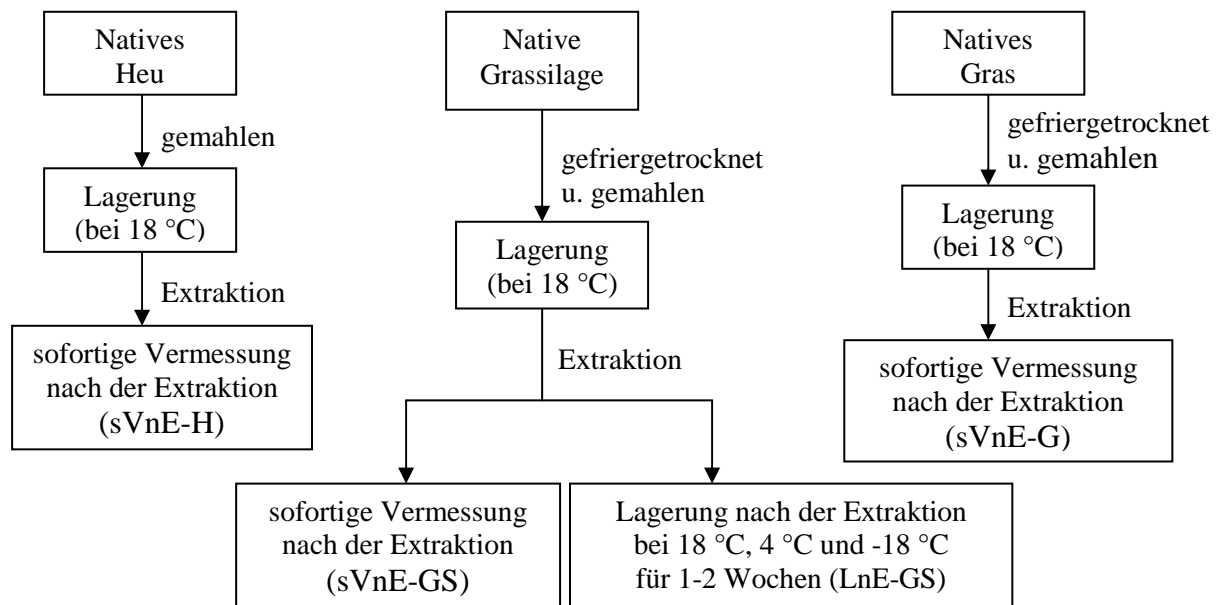
Für die Probenaufbereitung wurden 100 mg gefriergetrocknete Grassilage, Gras oder Heu eingewogen, in je 10 mL der in Tabelle 5.19 aufgeführten Puffer für 2 min bei 26.000 rpm homogenisiert. Da möglicherweise relativ große Unterschiede in der Polarität der zu findenden Substanzen vorhanden sind, wurden für die Extraktion sechs verschiedene Puffer verwendet. Anschließend wurden die homogenisierten Futtermittel für 15 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Probenüberstände durch 0,2 µm RC-Sterilfilter filtriert.

**Tabelle 5.19** Eingesetzte Puffer für die Extraktion von Grassilagen, Gras und Heu (FA: Ameisensäure, TFA: Trifluoressigsäure, ACN: Acetonitril, MeOH: Methanol, EtOH: Ethanol).

<b>Puffer</b>	<b>Analysemethode</b>
H <sub>2</sub> O + 0,1 % aq. FA	LC-MS/MS
H <sub>2</sub> O + 0,1 % aq. TFA	RP-HPLC
ACN-H <sub>2</sub> O (1:1, v/v) + 0,1 % aq. FA	LC-MS/MS und RP-HPLC
MeOH-H <sub>2</sub> O (1:1, v/v) + 0,1 % aq. FA	LC-MS/MS
EtOH + 0,1 % aq. FA	LC-MS/MS
ACN-EtOH (1:1, v/v) + 0,1 % aq. FA	LC-MS/MS

Der Puffer ACN-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) + 0,1 % aq. FA bewirkte im Vergleich zu den anderen eingesetzten Puffern unter den beschriebenen Analysebedingungen (s. Kap. 5.3.6) eine bessere Löslichkeit und Quantifizierung der identifizierten Flavonoide an der LC-MS/MS und wurde deshalb für weitere LC-MS-Quantifizierungen als Extraktionspuffer verwendet.

Außerdem wurden die Grassilage-Proben nach Extraktion als gelagerte (n= 51) und nicht gelagerte (n= 14) in zwei Gruppen eingeteilt (s. Tab. 5.18 u. Kap. 5.1.4.1). Somit wurde der Einfluss der Lagerzeit auf die Quantifizierung der Messkomponenten berücksichtigt. Die Gras- und Heu-Proben nach Extraktion wurden als nicht gelagerte extrahierte Proben (s. Abb. 5.5) an der LC-ESI-MS/MS quantifiziert (s. Kap. 3.4.3.2). Aufarbeitungsschema und Lagerungszeiten der analysierten Grassilage-, Gras- und Heu-Proben sind in Abbildung 5.5 dargestellt.



**Abbildung 5.5** Aufarbeitungsschema und Lagerungszeiten der analysierten Grassilage-, Gras- und Heu-Proben. Abkürzungen: H: Heu, GS: Grassilage, G: Gras, sVnE: sofortige Vermessung nach der Extraktion, LnE: Lagerung nach Extraktion.

### 5.3.2.3 Serum-Proben

Zur Untersuchung der Serum-Proben wurden zunächst die enthaltenen Proteine gefällt. Hierfür wurde zu 1 mL Serum 100 µL 30 %-iger Sulfosalicylsäure zugegeben. Die Lösung wurde für 45 min bei 4 °C inkubiert, anschließend bei 20.000 x g für 45 min zentrifugiert und abfiltriert. Für die Analyse wurde der Serum-Überstand genommen.

### 5.3.2.4 Standard-Chemikalien

Auf Grund der großen Unterschiede in der Polarität der zu identifizierenden Substanzen (Aminosäuren, Biogene Amine, Phenolsäuren, Flavonoide) wurden für die Probenaufbereitung zur qualitativen und quantitativen Analyse verschiedene organische und wässrige Puffer (s. Tab. 5.19) getestet. Mit dem Puffer ACN-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) + 0,1 % aq. FA wurden die besten Ergebnisse erzielt. Zudem sind die in dieser Arbeit identifizierten Flavonoide in Dimethylsulfoxid (DMSO) 100 % löslich. Alle Flavonoidstandards wurden zuerst in DMSO gelöst und anschließend um den Faktor 100 mit dem Puffer ACN-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) + 0,1 % aq. FA verdünnt.

### 5.3.3 Proteinanalytik

#### 5.3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden der Bradford- und Lowry-Test verwendet.

##### Bradford-Test

Der Bradford-Test ist einer der gebräuchlichsten kolorimetrischen Methoden zur Bestimmung der (Gesamt-)Protein-Konzentration. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue bindet an Proteine in einer sauren Lösung. Die damit verbundene Verschiebung der Absorption bei 465 nm hin zu 595 nm wird gemessen. Als Standard wurde Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 10-1.000 µg/mL verwendet.

**Bradford-Reagenz:** 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 12,5 mL 95 %-iges Ethanol, 25 mL 85 %-ige  $\text{H}_3\text{PO}_4$  auf 250 mL mit  $\text{H}_2\text{O}$ .

##### Durchführung

Nach der Vorbereitung der Proteinproben wurden je 10 µL von jedem Standard und jeder Probe in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 300 µL Bradford-Reagenz versetzt. Die Platte wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen.

##### Lowry-Test

Die Bestimmung der Proteine aus Fermenter-Proben erfolgte nach der Biuret-Methode von Lowry [255]. Im ersten Schritt wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet (Reagenz A). Dieser Komplex reduziert ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagenz (Reagenz B), wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Protein-Konzentration blau färbt. Die Absorption der Lösung wird bei 600 nm photometrisch gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 10-1.000 µg/mL.

##### Lowry-Reagenz

**Reagenz A:** Lowry Protein Test-Reagenz (Zusammensetzung: 1 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 1 %  $\text{KNa-Tartrat} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,1 N NaOH. Die 3 Lösungen im Verhältnis 1:1:98 (v:v:v) mischen.)

**Reagenz B:** Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz mit H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:1 (v/v) verdünnen.

### **Durchführung**

Für die Messung wurden je 200 µL des Standards und der Fermenter-Proben in Reaktionsgefäßen vorgelegt. In Intervallen von 15 s wurde dann je 1 mL des modifizierten Lowry-Reagenz A dazu pipettiert und sofort auf einem Vortex-Mixer gründlich durchmischt. Danach folgte eine Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur. Dann wurde wiederum in 15 Sekunden-Intervallen jeweils 100 µL vom verdünnten Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz dazugegeben, geschüttelt und in Halbmikroküvetten umgefüllt. Nach weiteren 30 min Inkubationszeit wurden die Proben am Photometer bei 600 nm vermessen.

### **5.3.3.2 Proteinfällungen**

#### **Acetonfällung**

Die Fermenterflüssigkeit wurde mit vier Volumen eiskaltes 100 % iges Aceton versetzt und 2 h bei -18 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde bei 20.000 x g und 4 °C für 20 min sedimentiert, der Überstand abfiltriert. Das Sediment wurde mit 90 % Aceton gewaschen und nach erneuter Zentrifugation kurz bei 37 °C getrocknet. Das Sediment und Überstand wurden in dem SDS-Probenpuffer aufgenommen.

#### **Ammoniumsulfatfällung**

Unter vorsichtigem Rühren wurde auf eiskalte Fermenterflüssigkeit portionsweise gemörsertes Ammoniumsulfat (40 %-, 60 %-, und 80 %-ige Ammoniumsulfatfällung) hinzugegeben, nach letzter Zugabe wurde 2 h auf Eis gerührt. Anschließend wurde die Lösung für 20 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Pellets wurden gründlich in Na-Acetat-Puffer (50 mM; pH 5,5) resuspendiert. Überstand und Pellet wurden im SDS-Probenpuffer aufgenommen.

#### **TCA-Fällung**

Die Fermenter-Proben wurden mit 1:9 Volumen eiskalter 100 % TCA (Trichloressigsäure) gemischt und 2 h auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde bei 20.000 x g und 4 °C für 20 min sedimentiert, der Überstand abfiltriert. Zur Verwendung der SDS-PAGE Methode wurde das Sediment und Überstand im jeweiligen Puffer aufgenommen.



### 5.3.3.3 SDS-PAGE

Das Prinzip der **Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)** beruht auf der Trennung von Proteingemischen im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht. Hierzu werden die Proteingemische bei 95 °C durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanol, das als Reduktionsmittel eingesetzt wird, denaturiert und entfaltet. Das SDS maskiert dabei die Eigenladung der Proteine, so dass sich ein relativ konstantes Verhältnis von Masse zu Ladung ergibt [256]. Das  $\beta$ -Mercaptoethanol spaltet eventuell vorhandene Disulfidbrücken. Somit werden die Proteine in Abhängigkeit von ihren Molekülmassen getrennt [256-257].

Ein SDS-PAGE-Gel besteht jeweils aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Sammelgel dient zum Sammeln der gesamten aufgetragenen Proben um allen Probemolekülen denselben Startpunkt für die Trennung zu ermöglichen.

#### Zusammensetzung der Gele

**12 %-iges Trenngel (für zwei Gele):** 3 mL Acrylamidmischung, 2,8 mL 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 3,2 mL H<sub>2</sub>O, 1 mL 1 %-iges SDS, 20  $\mu$ L TEMED, 20  $\mu$ L 25 %-iges APS

**5 %-iges Sammelgel (für zwei Gele):** 750  $\mu$ L Acrylamidmischung, 630  $\mu$ L 1,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 3,77 mL H<sub>2</sub>O, 300  $\mu$ L 1 %-iges SDS, 10  $\mu$ L TEMED und 10  $\mu$ L 25 %-iges APS

#### Verwendete Puffer

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS; pH 8,3 (1 x TGS)

SDS-Probenpuffer: 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA (Na-Salz), 5 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau in 90 mL H<sub>2</sub>O gelöst.

Direkt vor der Benutzung werden 10 % 2-Mercaptoethanol und 10 % Glycerin zugesetzt.

#### Durchführung

Die Proben wurden 1:1 mit dem SDS-Probenpuffer vermischt, bei 95 °C für 5 min erhitzt und anschließend abzentrifugiert.

Die Elektrophoresekammer wurde mit TGS gefüllt und das Gel in der Kammer platziert. Der Marker und die Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Es wurde eine Spannung von 100-200 V angelegt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Banden am unteren

Gelrand angekommen sind. Die Proteinbanden auf dem Gel wurden mit Hilfe der Silberfärbemethode visualisiert.

### Silberfärbung

Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt bei ca. 5 ng pro Bande. Sie ist die empfindlichste unspezifische Färbemethode und zur Überprüfung der Reinheit des Proteins geeignet. Erst werden die Silberionen an Aminosäureketten gebunden und anschließend reduziert. Für diese Färbung werden folgende Reagenzien verwendet:

- Entfärber/Fixierer: 400 mL H<sub>2</sub>O, 80 mL CH<sub>3</sub>COOH, 400 mL EtOH
- *Farmers Reducer*: 1 Spatelspitze K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 1 Spatelspitze Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in 100 mL H<sub>2</sub>O
- 0,1 %-ige AgNO<sub>3</sub>-Lösung
- 2,5 %-ige Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung
- 5 %-ige CH<sub>3</sub>COOH
- 36,5 %-ige Formaldehyd-Lösung

### Durchführung

Das Gel wurde für 30 min in dem Entfärber/Fixierer unter Schütteln inkubiert und anschließend zweimal kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Es wurde für 2,5 min in *Farmers Reducer* geschwenkt und solange mit H<sub>2</sub>O gewaschen bis das Gel vollständig entfärbt war. Zur Komplexierung von Silberionen wurde das Gel für 30 min in einer frisch zubereiteten 0,1 %-igen AgNO<sub>3</sub>-Lösung inkubiert. Es wurden für jeweils 30 s mit H<sub>2</sub>O und mit 2,5 %-iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Zur Entwicklung wurde das Gel in 100 mL 2,5 %-iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 300 µL Formaldehyd-Lösung solange inkubiert, bis deutliche Banden sichtbar wurden. Die Färbung wurde durch Schwenken des Gels für 10 min in 5 %-iger CH<sub>3</sub>COOH beendet und das Gel in H<sub>2</sub>O gelagert.

### 5.3.4 FMOC-HPLC

Zum Nachweis primärer und sekundärer Aminosäuren und Amine ist die Vorsäulenderivatisierung durch 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid (FMOC-Cl) eine weit verbreitete, empfindliche Derivatisierungsmethode. Mit dieser Methode können sekundäre Aminosäuren und Cysteinderivate mit hoher Empfindlichkeit erfasst werden. Die Isolierung an der HPLC wurde mit einer konstanten Flussrate von 1 mL/min mittels eines Gradienten

durchgeführt. Im Folgenden werden die verwendeten Reagenzien, Laufbedingungen (s. Tab. 5.20) und eingesetzter Gradient (s. Tab. 5.21) an der HPLC bei der FMOC-Methode dargestellt.

### Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien und Puffer

Natriumacetat-Puffer:	2,5 L H <sub>2</sub> O mit 7,8 mL 96 %-iger Essigsäure versetzt und mit 5 M NaOH pH 4,2 eingestellt.
Eluent A:	Natriumacetat-Puffer / Acetonitril (Verhältnis 8:2 (v/v))
Eluent B:	Natriumacetat-Puffer / Acetonitril (Verhältnis 2:8 (v/v))
Kaliumborat-Puffer:	Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )/ CaCl <sub>2</sub> / NaOH, pH 11 (18 °C)
Derivatisierungs-Pufferlösung:	Kaliumborat-Puffer, Borsäure, CaCl <sub>2</sub> , NaOH, pH 11
Aminosäurenstandard:	AS-Standard (25 µmol/L), je AS, Cystein 12,5 µmol/L, enthält zudem NH <sub>3</sub>
ADAM-Lösung:	45,6 mg Adamantanamin werden in 3 mL Boratpuffer und 3 mL Aceton (40 mM) gelöst.
FMOC-Reagenz:	2,5 mM FMOC-Cl wird in Aceton gelöst.

**Tabelle 5.20** Laufbedingungen zur FMOC-Methode an der HPLC.

<b>Laufbedingungen</b>	
<b>Säule</b>	ReproSil FMOC-H, 5 µm Partikelgröße, 250 x 4 mm
<b>Vorsäule</b>	ReproSil FMOC-H, 5 µm Partikelgröße, 5 x 4 mm
<b>Sättigungssäule</b>	ReproSil FMOC-H, 5 µm Partikelgröße, 40 x 4 mm
<b>Säulentemperatur</b>	40 °C
<b>Flussrate</b>	1 mL/min
<b>Injektionsvolumen</b>	10 µL
<b>Messzeit</b>	65 min
<b>Detektion</b>	Fluoreszenzdetektor Anregung: 263 nm, Emission: 310 nm

**Tabelle 5.21** Eingesetzter Gradient an der HPLC bei der FMOC-Methode.

<b>Zeit [min]</b>	<b>Puffer B [%]</b>
0	0
35	40
45	70
50	100
55	100
55,01	0
65	STOP

## Durchführung

80  $\mu\text{L}$  Probe bzw. verdünnte Standardlösung, 75  $\mu\text{L}$  Boratpuffer und 5  $\mu\text{L}$  2,5 M NaOH wurden in die Probeflasche gegeben und mit 160  $\mu\text{L}$  Fmoc-Reaktionslösung versetzt. Nach Inkubation für 60 s wurden 200  $\mu\text{L}$  ADAM-Lösung zugegeben und für weitere 60 s gewartet. Anschließend wurde mit 280  $\mu\text{L}$  Eluent A verdünnt und vor der Analyse für 5 min inkubiert. Für die Analyse wurden 30  $\mu\text{L}$  der Lösung durch einen Autoinjektor auf die HPLC-Säule injiziert.

### 5.3.5 RP-HPLC-Techniken

Bei der Hoch-Leistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC, Abkürzung aus dem Engl.: **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatographie) handelt es sich um eine Spezialdisziplin der Flüssigchromatographie. Die RP-HPLC-Technik eignet sich auf Grund ihrer Reproduzierbarkeit und hohen Ausbeute besonders für die Peptidanalytik. Reversed-Phase Chromatographie trennt die Moleküle auf der Grundlage der Unterschiede in ihrer Polarität. Die Stärke der Wechselwirkungen zwischen der Probe und Partikeln der stationären Phase hängt von polaren Wechselwirkungen ab. Für die Peptide und kleine Proteine werden vermehrt apolare Alkan-Ketten verwendet, um die Stärke der Wechselwirkung zu maximieren [256]. Die Peptidverbindungen werden an der hydrophoben Oberfläche absorbiert.

## Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die analytische Säule für die Screeninguntersuchung und die präparative Säule für die Substanzfraktionierung angewendet. Das hier eingesetzte Säulenmaterial für beide Säulen besteht aus Kieselgelpartikeln, welche mit 18 C-Atomen beschichtet sind und eine Partikelgröße von 5  $\mu\text{m}$  haben. Die analytische Säule hat einen Innendurchmesser von 4,6 mm und eine Länge von 250 mm. Die Substanz-Fraktionierung erfolgte durch die präparative Säule, die einen Innendurchmesser von 10 mm und eine Länge von 250 mm aufweist. Für die beiden verwendeten Säulen wurden ein wässriges Lösungsmittel (Eluent A: ultrareines Wasser mit 0,1 %-ige Trifluoressigsäure (v/v)) und ein organisches Lösungsmittel (Eluent B: Acetonitril mit 0,1 %-ige Trifluoressigsäure (v/v)) verwendet. Nach der Equilibrierung der Säule mit Eluent A wurden die Komponenten mit Hilfe eines Gradientenanstiegs (s. Tab. 5.24) von Eluent B in 60 min eluiert, wobei die Detektion mittels UV-Detektor erfolgte. Die Fraktionen wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und

lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die optimierten Laufbedingungen für beide Trennsäulen sind in Tabellen 5.22-5.24 dargestellt.

**Tabelle 5.22** Laufbedingungen zur Screeninguntersuchung an der HPLC.

<b>Laufbedingungen</b>	
<b>Säule</b>	ReproSil Pur C18-AQ, 5 $\mu\text{m}$ Partikelgröße, 250 x 4,6 mm
<b>Vorsäule</b>	ReproSil Pur C18-AQ, 5 $\mu\text{m}$ Partikelgröße, 10 x 4,6 mm
<b>Säulentemperatur</b>	40 $^{\circ}\text{C}$
<b>Flussrate</b>	0,8 mL/min
<b>Wellenlängen</b>	195-490 nm
<b>Injektionsvolumen</b>	30 $\mu\text{L}$
<b>Sample-Loop</b>	20 $\mu\text{L}$
<b>Messzeit</b>	60 min

**Tabelle 5.23** Laufbedingungen zur Substanzfraktionierung an der HPLC.

<b>Laufbedingungen</b>	
<b>Säule</b>	ReproSil Pur C18-AQ, 5 $\mu\text{m}$ Partikelgröße, 250 x 10 mm
<b>Vorsäule</b>	ReproSil Pur C18-AQ, 5 $\mu\text{m}$ Partikelgröße, 30 x 10 mm
<b>Säulentemperatur</b>	40 $^{\circ}\text{C}$
<b>Flussrate</b>	4 mL/min
<b>Wellenlängen</b>	214 nm und 254 nm
<b>Injektionsvolumen</b>	250 $\mu\text{L}$
<b>Sample-Loop</b>	200 $\mu\text{L}$
<b>Messzeit</b>	60 min

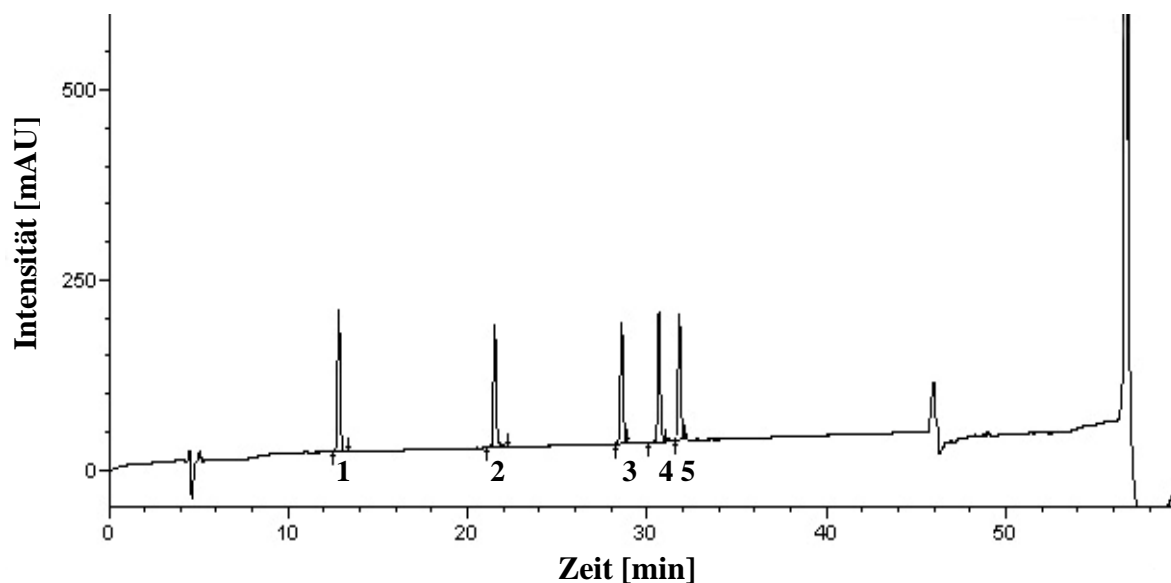
**Tabelle 5.24** Eingesetzter Gradient für die beiden verwendeten RP-HPLC-Anlagen (% B/min: 0,925).

<b>Zeit [min]</b>	<b>A [%]</b>	<b>B [%]</b>
0-40	95-58	5-42
40,1	0	100
40,1-50	0	100
50,1	95	5
50,1-60	95	5

Um die Stabilität der Analyseergebnisse zu überprüfen, wurden Peptidstandard-Proben vorbereitet und an der HPLC und LC-MS/MS als externer Standard verwendet. Der Standard wurde in 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  mit 0,1 % Ameisensäure gelöst, was einer Konzentration von 2,5 mg Peptidgemisch/mL (0,5 mg je Substanz) Standardlösung entsprach. Diese wurde mit Puffer  $\text{H}_2\text{O} + 0,1\text{ } \%$  aq. FA im Verhältnis 1:20 (v/v) verdünnt und bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 1-4 Wochen gelagert. Die Zusammensetzung des Peptidstandards mit den Retentionszeiten ist in Tabelle 5.25 sowie in Abbildung 5.6 dargestellt.

**Tabelle 5.25** Zusammensetzung des analysierten Peptidstandards.

Peptide	Molekulargewicht [g/mol]	Art.-Nr.: für einzelne Peptide	R <sub>t</sub> [min] an der RP-HPLC
Gly-Tyr	238,2	G 3502	12,80
Val-Tyr-Val	379,5	V8376	21,50
Met-Enkephalin	573,7	M 6638	28,57
Leu-Enkephalin	555,6	L 9133	30,65
Angiotensin II	1046,2	A 9525	31,79



**Abbildung 5.6** Beispiel-Chromatogramm für die Messung des Peptidstandards an der RP-HPLC. Säule: ReproSil Pur C18-AQ, 5 µm Partikelgröße, 250 x 4,6 mm; Vorsäule: ReproSil Pur C18-AQ, 5 µm Partikelgröße, 10 x 4,6 mm; Flussrate: 0,8 mL/min; Injektion: 30 µL; Temperatur: 40 °C; Eluenten: A= 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O (v/v), B= 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O/ACN mit 0,1 % TFA; Gradient: 0-60 min → 5-42 % B.

Die Präzision der RP-HPLC-Messergebnisse der analysierten Proben wurde durch fünfmal hintereinander Vermessung des Peptidstandards überprüft (s. Tab. 5.26).

**Tabelle 5.26** Ergebnisse der fünfmaligen Präzisionsmessungen an der RP-HPLC für die Peptidstandards ( $\bar{x}$ : arithmetische Mittelwerte der Flächenintegrale, s: Standardabweichung, VK: prozentualer Variationskoeffizient, Mess.: Messung).

Peak Nr.	Flächenintegral [mAU*min]					$\bar{x}$	s	VK %
	1. Mess.	2. Mess.	3. Mess.	4. Mess.	5. Mess.			
1	1.101.875	1.120.456	1.075.604	1.084.577	1.052.448	1.086.992	25.837	2,38
2	987.604	1.004.278	964.077	982.128	1.009.628	989.543	18.219	1,84
3	1.123.913	1.113.773	995.287	1.054.782	1.066.804	1.070.912	51.581	4,82
4	1.202.587	1.213.410	1.093.162	1.147.820	1.205.211	1.172.438	51.363	4,38
5	1.233.854	1.381.916	1.142.079	1.381.916	1.225.103	1.272.974	105.703	8,30

### 5.3.6 LC-MS/MS

Die Massenspektroskopie ist eine wichtige Methode der analytischen Chemie bei der Aufklärung der Struktur und Zusammensetzung von Verbindungen. Durch massenspektroskopische Analysensysteme mit hoher Massenauflösung und Massengenauigkeit können der Nachweis und die Identifizierung unbekannter Substanzen ermöglicht werden. Die Kopplung Flüssigchromatographie-Massenspektroskopie (LC-MS) verbindet die Trennleistung flüssigchromatographischer Verfahren mit dem Informationsgehalt massenspektroskopischer Darstellungen. Bei der LC-MS-Kopplung werden die Analyten aus der flüssigen Phase bei Atmosphärendruck in Gasphase und Hochvakuum ( $10^{-5}$  Torr) überführt [253]. Die Atmosphärendruck-Ionisation (APCI) und die Elektrospray-Ionisation (ESI) sind die zwei heutzutage am häufigsten angewendeten Ionisationsmethoden für die Ionisierung der Analyten bei der LC-MS. Die APCI-Methode ist für unpolare Moleküle geeignet [257]. Dagegen eignet sich die ESI-Technik insbesondere für die thermolabilen, nicht flüchtigen und polaren Verbindungen [257].

#### Durchführung

Zur Identifizierung der unbekanntenen Komponenten in den Fermenter-, Grassilage- und Serum-Proben wurden die Full Scan-, MS/MS- und MS<sup>n</sup>-Experimente im Massenbereich von  $m/z$  50-2.000 im positiven und negativen Modus durchgeführt. Die Zielsubstanzen in Extrakten lassen sich mit hinreichenden Intensitäten positiv und negativ ionisieren. Zur Optimierung der Ionisationsmethode wurden in dieser Arbeit die Atmosphärendruck-Ionisation- und auch die Elektrospray-Ionisation-Methoden geprüft. Aufgrund der Polarität der vorhandenen Zielkomponenten in Fermenter-Proben wurden in dieser Arbeit mittels Elektrospray-Ionisation optimale Ergebnisse erzielt und somit für weitere Messungen die ESI-Quellen angewendet. Zur Charakterisierung der Komponenten in den Grassilage-, Gras-, Heu-, Fermenter- und Serum-Proben wurden als Laufmittel und Lösungsmittel ultrareines Wasser mit 0,1 %-iger (v/v) Ameisensäure (Eluent A) und Acetonitril mit 0,1 %-iger (v/v) Ameisensäure (Eluent B) verwendet. Die weiteren optimierten Laufbedingungen durch die Bestimmung der Ionenintensitäten sind in Tabelle 5.27 dargestellt.

**Tabelle 5.27** Laufbedingungen an der LC-MS/MS.

<b>Laufbedingungen</b>	
<b>Säule</b>	Jupiter Proteo C12, 4 µm Partikelgröße, 150 x 3 mm
<b>Vorsäule</b>	Security Guard Cartridges C12, 4 x 3 mm
<b>Säulentemperatur</b>	40 °C
<b>Injektionsvolumen</b>	10 µL
<b>Sample-Loop</b>	100 µL
<b>Messzeit</b>	70 min
<b>Kapillare Spannung</b>	80 V
<b>Trockengastemperatur (Drying gas)</b>	350 °C
<b>Zerstäuber Gasdruck</b>	50 psi

Um eine optimale Trennung zu erreichen, wurden die Gradienten optimiert (s. Tab. 5.28).

**Tabelle 5.28** Eingesetzter Gradient an der LC-MS/MS.

<b>Zeit [min]</b>	<b>A [%]</b>	<b>B [%]</b>	<b>Flussrate [mL/min]</b>
0	95	5	0,01
0,06	95	5	0,3
60,00	60	40	0,3
60,06	5	95	0,6
65,00	5	95	0,6
65,06	95	5	0,6
70,00	95	5	0,6
70,06	95	5	0,01

Um die Stabilität der Messergebnisse zu überprüfen, wurden die Analysen der untersuchten Proben zweimal hintereinander durchgeführt. Zudem wurden die Messungen täglich mit externem Standard (Peptidstandard-Proben; s. Kap. 5.3.5 u. Tab. 5.25) kontrolliert (s. Tab. 5.29).

**Tabelle 5.29** Die Präzision der LC-ESI-MS/MS Messergebnisse der dreimaligen Peptidstandard-Analyse ( $\bar{x}$ : arithmetische Mittelwerte der Flächenintegrale, s: Standardabweichung, VK: prozentualer Variationskoeffizient).

<b>Peak Nr.</b>	<b>Flächenintegral [MCounts*min]</b>			$\bar{x}$	s	VK %
	<b>1. Messung</b>	<b>2. Messung</b>	<b>3. Messung</b>			
1	22.450	20.890	23.360	22.233	1.249	5,62
2	147.600	146.800	154.500	149.633	4.234	2,83
3	186.200	202.100	197.100	195.133	8.130	4,17
4	145.400	147.000	150.300	147.567	2.499	1,69
5	247.000	268.900	262.700	259.533	11.288	4,35



### 5.3.7 UPLC-MS/MS

Um die Summenformeln der Zielsubstanzen in Fermenter-Proben zu identifizieren, wurde ein mit einer Acquity UPLC (UPLC, Abkürzung aus dem Engl.: **Ultra Performance Liquid Chromatography**) gekoppelte Q-Tof Premier Massenspektrometer angewendet. Dieses Massenspektrometer ist ein hybrid orthogonal beschleunigtes Flugzeit-Massenspektrometer. Dadurch kann eine automatisierte Bestimmung der exakten Massen von Vorläufer- und Fragmentationen ermöglicht werden [199]. Zudem erlaubt die UPLC-Kopplung mit einer Trennschärfe extrem kurze Flüssigkeitschromatogramm-Läufe und niedrige Nachweisgrenzen.

#### Durchführung

Die Messungen wurden am Institut für Organische Chemie, G. W. Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Als Ionisationsquelle wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) im Lockspray Modus und als Stoßgas Argon eingesetzt. Außerdem wurden als Laufmittel und Lösungsmittel ultrareines Wasser mit 0,1 %-iger (v/v) Ameisensäure (Eluent A) und Methanol mit 0,1 %-iger (v/v) Ameisensäure (Eluent B) verwendet. Die optimierten Laufbedingungen sind in Tabelle 5.30 zusammengefasst.

**Tabelle 5.30** Laufbedingungen an der Q-Tof Premier UPLC-MS/MS.

<b>Laufbedingungen</b>	
<b>Säule</b>	Nucleodur C18 Gravity, 1,8 µm Partikelgröße, 50 x 2 mm
<b>Vorsäule</b>	Security Guard Cartridges C12, 4 x 3 mm
<b>Säulentemperatur</b>	35 °C
<b>Injektionsvolumen</b>	5 µL
<b>Messzeit</b>	8 min
<b>Kapillare Spannung</b>	3 kV
<b>Probenahme Cone (Kegel)</b>	30 V
<b>Quelle</b>	100 °C
<b>Desolvation</b>	250 °C
<b>Desolvation Gas</b>	650 L/h
<b>Cone Gasfluss</b>	50 L/h

Der optimierte Gradient ist in Tabelle 5.31 dargestellt.

**Tabelle 5.31** Eingesetzter Gradient an der Q-Tof Premier UPLC-MS/MS.

<b>Zeit [min]</b>	<b>A [%]</b>	<b>B [%]</b>	<b>Flussrate [mL/min]</b>
0	95	5	0,40
2,50	5	95	0,40
6,50	5	95	0,40
6,60	95	5	0,40
8,00	95	5	0,40

### 5.3.8 MALDI-TOF-MS

Die Abkürzung MALDI-TOF steht für die Kombination aus einer matrixunterstützten Laserdesorptions/ionisations-Ionenquelle (MALDI, Abkürzung aus dem Engl.: **M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onisation) und einem Flugzeitanalysator (TOF, Abkürzung aus dem Engl.: Time-of-flight). Bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie werden die zu untersuchenden Proben mit geeigneter Matrix gemischt. Als Matrix dienen kleine organische Verbindungen, die im Wellenlängenbereich des verwendeten Lasers gut absorbieren und im Vakuum eine sehr geringe Verdampfbarkeit aufweisen [256]. Beim Beschuss mit einem nur ca. 3 ns dauernden Laserpuls eines kurzwelligen Lasers wird die Strahlung von der Matrix absorbiert. Dabei werden die Matrixmoleküle angeregt, das Gitter im Festkörper zerstört und die Matrixmoleküle desorbiert. Bei diesem Phasenübergang werden die darin eingebetteten Analytmoleküle mitgerissen und ionisiert. Die erzeugten Ionen werden in einem anliegenden starken elektrischen Feld beschleunigt, in einem Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS) nach ihrer Flugzeit getrennt und am Ende in Abhängigkeit von Masse-zu-Ladungsverhältnis detektiert [256-257].

#### Durchführung

Die Messungen wurden an einer automatisierten Anlage am Institut für Technische Chemie der G. W. Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Die Substanz  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnosäure wurde als UV-absorbierende Matrix verwendet. Vor dem Ionisierungsprozess durch Laserbeschuss wurden 25 mg  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnosäure in 1 mL 1:1 (v/v) ACN/EtOH mit 0,1 % TFA gelöst und mit der zu untersuchenden Probe vermischt. 1  $\mu$ L dieser Mischung wurde auf dem Probenträger getrocknet und in die unter Vakuum stehende Probenkammer des Massenspektrometers überführt. Die Registrierung der Ionen erfolgte anschließend durch einen Detektor. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte mit einem Peptidstandard aus Angiotensin I. Die Messung der Proben wurde im maximalen Messbereich von 500-7.000 Da durchgeführt.

### 5.3.9 NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie, Abkürzung aus dem Engl.: **N**uclear **M**agnetic **R**esonance) ist eine der wichtigsten Methoden der chemischen Analyse und Untersuchung dynamischer Prozesse in organischen, anorganischen und biologischen Systemen [199]. Die NMR-Detektion ermöglicht durch die charakteristischen Werte der

chemischen Verschiebung und Kopplungskonstanten z.B. die Zuordnung von Strukturisomeren.  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie zählen zu den häufig angewandten NMR-Methoden der Strukturaufklärung der organischen Substanzen. In dieser Arbeit wurden zur Identifizierung der Fermenter-Proben  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie durchgeführt.

### Durchführung

Die  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz)- und  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz)-Messungen wurden am Institut für Organische Chemie, G. W. Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Zur NMR-Analyse wurden ca. 45 mL Fermenter-Probe Fr-1 (K-01) an der RP-HPLC fraktioniert und das Lösungsmittel mittels Gefriertrockner entfernt. 0,4 mg fraktionierte Fermenter-Probe (Peak 1) wurde in 0,7 mL MeOD- $d_4$  gelöst und diese Lösung in ein NMR-Röhrchen überführt.

Die chemische Verschiebungen  $\delta$  werden in ppm und die Kopplungskonstanten  $J$  in Hz angegeben. Die Kalibrierung der NMR-Spektren erfolgte durch den Restprotonengehalt der deuterierten Lösungsmittel verursachter Signale. Die chemische Verschiebung der Signale der Restprotonen von MeOD- $d_4$  betrug für  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren 3,35 ppm und für  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren 49,3 ppm.

### 5.3.10 FT-IR-Spektroskopie

Die meisten Verbindungen insbesondere organische Moleküle besitzen unterschiedliche charakteristische Infrarot (IR)-Spektren, die durch IR-Spektroskopie identifiziert werden können. Das gesamte Infrarot weist einen breiten Wellenlängenbereich von 1.000-1.000.000 nm auf. IR-Spektralbereiche werden als „naher“ (NIR: 1,0-2,5  $\mu\text{m}$ ), „mittlerer“ (MIR: 2,5-50  $\mu\text{m}$ ) und „ferner“ (FIR: 50-1.000  $\mu\text{m}$ ) Infrarot-Bereich in drei Gruppen eingeteilt [258]. Der mittlere IR-Bereich ist der wichtigste Anwendungsbereich zur Charakterisierung der funktionellen Gruppen sowie für die Strukturaufklärung, da die Absorptionsbanden verschiedenste Funktionalitäten enthalten [258]. Daneben treten im nahen Infrarot-Bereich (NIR) ausschließlich die Kombinationsschwingungen von C-H, N-H und O-H Gruppen auf. Deshalb wird die nahe Infrarotspektroskopie (NIR) zur Identifikation der Substanzgemische häufig angewendet. In der modernen IR-Spektroskopie wird ein entscheidender Fortschritt der Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometer mit einer robusten optischen Konstruktion und einem permanent justierten Interferometer entwickelt.

## Durchführung

Zur Identifikation der Fermenter-Proben wurden die Infrarot-Spektren mittels eines Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometers (FT-IR-Spektrometer) aufgenommen. Die Messungen wurden an dem automatisierten FT-IR-Spektrometer (Varian 660 FT-IR) im Messmodus der abgeschwächten Totalreflexion (ATR-Kristall aus Zinkselenid) im mittleren Infrarot-Bereich am Institut für Technische Chemie der G. W. Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Somit wird eine aufwändige Probenpräparation vermieden. Zur Messung wurde die Fermenterflüssigkeit komplett am Gefriertrockner getrocknet und für die Analyse wurden ca. 5 mg pulverisierte Fermenter-Proben eingesetzt. Die Spektren wurden bei 25 kHz Spiegelgeschwindigkeit und einer Auflösung von  $4\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen. Jedes Spektrum besteht aus dem Mittelwert von 256 Einzelscans. Die Detektion erfolgte mit einem pyroelektrischen und thermalen DLaTGS (deutertes L-Alanin Triglycinsulfat)-Detektor. Nach der Umwandlung der optischen Signale in elektrische Signale wurde am Detektor die ankommende IR-Strahlung als Interferogramm aufgezeichnet [259]. Anschließend wurden mittels Fourier-Transformation die in den Interferogrammen aufsummierten Frequenzen in Einzelfrequenzen zerlegt und vom Computer als konservatives IR-Spektrum wiedergegeben [259].

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Eicken K. (2005) Mögliche gesundheitliche Probleme von Milchkühen bei Grassilage betonten Rationen. *Nutztierpraxis Aktuell* 13: 13-16
- [2] Künnemann G., Herrmann U. (1967) Heu und Silage vom Dauergrünland und ihr Einsatz in der Fütterung. In: Wacker H. (Hrsg.): *Aktuelle Fragen des Landbaus*. Schriftenreihe der Landwirtschaftskammer Weser-Ems. Heft 1, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg
- [3] Harrison J., Huhtanen P., Collins M. (2003) Perennial grasses. In: Buxton D. R., Muck R. E., Harrison J. H. (Hrsg.): *Silage Science and Technology*. Agronomy, Madison 42: 665-747
- [4] Smith R. H., McAllen A. B. (1974) Some factors influencing the chemical composition of mixed rumen bacteria. *Br. J. Nutr.* 31: 27-34
- [5] Engling F.-P., Egert M. (2009) Silagen: Trends im Futterwert und Charakterisierung durch die LUFA. In: Kamphues J., Kaske M., Wolf P. (Hrsg.): *Fütterung und Gesundheit im Rinderbestand – Neues und Wichtiges für die tierärztliche Praxis*. 11. -12.09.2009. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, p. 11
- [6] Holt D. A., Hilt A. R. (1969) Daily variation in carbohydrate content of selected forage crops. *Agron. J.* 61: 239-242
- [7] Wilkinson J. M., Chapman P. F., Wilkins R. J., Wilson R. F. (1983) Inter-relationships between pattern of fermentation during ensilage and initial crop composition. In: Smith J. A., Hays V. W. (Hrsg.): *Proc. Int. Grassl. Congr. 14<sup>th</sup>*. Lexington, KY, 15-24 Juni 1981, Western Press, Boulder, CO, pp. 631-634
- [8] Melvin J. F. (1965) Variations in the carbohydrate content of lucerne and the effect on ensilage. *Aust. J. Agric. Res.* 16: 951-959
- [9] Honig H. (1980) *Proceedings of the British Grassland Society Occasional Symposium Brighton 1979*, 11: 201-204 zit. nach McDonald P., Henderson N. R., Heron S. J. E. (1991)
- [10] Mahanna B., Chase L. E. (2003) Practical applications and solutions to silage problems. In: Buxton D. R., Muck R. E., Harrison J. H. (Hrsg.): *Silage Science and Technology*. Agronomy, Madison 42: 855-896
- [11] Brady C. J. (1965) Nitrogen redistribution during ensilage at low moisture level. *J. Sci. Food Agric.* 16: 508-513
- [12] Jeroch H., Flachowsky G., Weißbach F. (1993) *Futtermittelkunde*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- [13] Rohr K., Thomas C. (1984) Intake, digestibility and animal performance. In: Zimmer E., Thomas C. (Hrsg.): *Efficiency of silage systems: A comparison between unwilted and wilted silages*. Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft 69, Braunschweig, pp. 64-70
- [14] Nehring K. (1972) *Lehrbuch der Tierernährung und Futtermittelkunde*. Neumann Verlag, Radebeul
- [15] Ohshima M., McDonald P., Acamovic T. (1979) Changes during ensilage in the nitrogenous components of fresh and additive treated ryegrass and lucerne. *J. Sci. Food Agric.* 30: 97-106
- [16] Pitt R. E. (1990) Silage and hay preservation. *Nraes Publ.* 5, Nraes, Ithaca N. Y. zit. nach Mahanna B., Chase L. E. (2003)
- [17] Palo R. T., Sunnerheim K., Theander O. (1985) Seasonal-Variation of Phenols, Crude Protein and Cell-Wall Content of Birch (*Betula-Pendula* Roth.) in Relation to Ruminant in vitro Digestibility. *Oecologia* 65: 314-318
- [18] Singleton V. L. (1981) Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv. Food Res.* 27: 149-242

- [19] Śliwiński B. J., Soliva C. R., Machmüller A., Kreuzer M. (2002) Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101: 101-114
- [20] Hänsel R., Sticher O., Steinegger E. (2010) *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- [21] Block G., Patterson B., Subar A. (1992) Fruit and vegetable and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 18: 12-29
- [22] Hertog M. G. L., Feskens E. J. M., Hollman P. C. H., Katan M. B., Kromhout D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007-1011
- [23] Goldberg D. M., Hahn S. E., Parkes J. G. (1995) Beyond alcohol: Beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin. Chim. Acta* 237: 155-187
- [24] Rice-Evans C. A., Packer L. (Eds.) (1998) *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York
- [25] Watzl B., Leitzmann C. (1999) *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart
- [26] Disler P. B., Lynch S. R., Charlton R. W., Torrance J. D., Bothwell T. H., Walker R. B., Mayet F. (1975) The effect of tea on iron absorption. *Gut* 16: 193-200
- [27] Hallberg L., Rossander L. (1982) Effect of different drinks on the absorption of non-heme iron from composite meals. *Hum. Nutr. Appl. Nutr.* 36: 116-123
- [28] Hurrell R. F. (1990) The influence of polyphenol-containing beverages on iron absorption. *Bulletin de Liaison, Groupe Polyphénols, JIEP XIV, Straßburg*
- [29] Hurrell R. F., Reddy M., Cook J. D. (1997) Influence of polyphenol-containing beverages on iron absorption. In: Armadò R., Andersson H., Bardócz S., Serra F. (Eds.) *Polyphenols in food - Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop, Aberdeen, Scotland*, pp. 169-172
- [30] Bjeldanes L. F., Chang G. W. (1977) Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* 197: 577-578
- [31] MacGregor J. T. (1984) Genetic and carcinogenic effects of plant flavonoids. An overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 177: 497-526
- [32] Butler L. G., Rogler J. C. (1992) Biochemical mechanisms of the antinutritional effects of tannins. In: Ho C. T., Lee C. V., Huang M. T. (Eds.) *Phenolic compounds in food and their effects in health I*, American chemical society, Washington D. C., p. 298
- [33] Gast A. (2010) *Untersuchungen zum Einfluss von Grassilagen mit auffälligen Reineiweißgehalten auf die Zahl der Bakterien und der Protozoen im Pansensaft (in vitro)*. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [34] Statistische Ämter des Bundes und der Länder (27.11.2006): *Übersicht Viehwirtschaft*. [Internet: [www.statistik-portal.de/Statistik-Portel/de\\_jb11\\_jahrta22.asp](http://www.statistik-portal.de/Statistik-Portel/de_jb11_jahrta22.asp)]
- [35] Muck R. E., Moser L. E., Pitt R. R. (2003) Postharvest factors affecting ensilage. In: Buxton D. R., Muck R. E., Harrison J. H. (Hrsg.): *Silage Science and Technology*. Agronomy, Madison 42: 251-304
- [36] Mothes K. (1925) Ein Beitrag zur Kenntnis des N-Stoffwechsels höherer Pflanzen unter Ausschluss des Keimlingstadiums und unter besonderer Berücksichtigung der Säureamide. *Planta* 1: 472-552
- [37] Naumann C., Bassler R. (2004) *Methodenbuch Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 5. Ergänzungslieferung*, VDLUFA Darmstadt
- [38] NRC (2001) *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academy Press, Washington, D. C.

- [39] Lyttleton J. W. (1973) Protein and nucleic acids. In: Butler G. W., Bailey R. W. (Hrsg.): Chemistry and biochemistry of herbage. Acad. Press, London, New York 1: 63-105
- [40] Hegarty M. P., Peterson P. J. (1973) Free amino acids, bound amino acids, amines and ureides. In: Butler G. W., Bailey R. W. (Hrsg.): Chemistry and biochemistry of herbage. Acad. Press, London, New York 1: 2-62
- [41] Van Soest P. J. (1994) Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, London
- [42] Licitra G., Hernandez T. M., Van Soest P. J. (1996) Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 57: 347-358
- [43] Chalupa W., Sniffen C. J. (1996) Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle - today and tomorrow. Anim. Feed Sci. Technol. 58: 65-75
- [44] Buxton D. R., O'Kiely P. (2003) Preharvest plant factors affecting ensiling. In: Buxton D. R., Muck R. E., Harrison J. H. (Hrsg.): Silage Science and Technology. Agronomy, Madison 42: 199-250
- [45] Coenen M. (2004) Rohprotein und Reineiweiß in Grassilagen. Grassilagen in der Milchviehfütterung-Haben wir die richtigen Bewertungsmaßstäbe? Fortbildungsveranstaltung zur Milchviehfütterung am 27.02.2004
- [46] Gresner N. (2011) Untersuchungen zum Einfluss von Grassilagen mit auffälligen Reineiweißgehalten auf den Eiweißstoffwechsel im Pansensaft *in-vitro*. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [47] McAllan A. B., Sutton J. D., Beever D. E., Napper D. J. (1994) Rumen fermentation characteristics and duodenal nutrient flow in lactating cows receiving two types of grass silage with two levels of concentrates. Anim. Feed Sci. Technol. 46: 277-291
- [48] Kingston-Smith A. H., Davies T. E., Edwards J. E., Theodorou M. E. (2008) From plants to animals; the role of plant cell death in ruminant herbivores. J. Exp. Bot. 59: 521-532
- [49] Choe H. T., Thimann K. V. (1974) The senescence of isolated chloroplasts. Planta (Berl.) 121: 201-203
- [50] Matile P. H. (1975) The lytic compartment of plant cells. Springer Verlag, Wien, Berlin
- [51] Mckersie B. D. (1981) Proteinases and Peptidases of Alfalfa Herbage. Can. J. Plant Sci. 61: 53-59
- [52] Taiz L., Zeiger E. (2007) Plant Physiology. Das Original mit Übersetzungshilfen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- [53] Messman M. A., Weiss W. P., Koch M. E. (1994) Changes in Total and Individual Proteins During Drying, Ensiling, and Ruminant Fermentation of Forages. J. Dairy Sci. 77: 492-500
- [54] Sutton A. L., Vetter R. L. (1971) Nitrogen Studies with Lambs Fed Alfalfa (Medicago-Sativa) as Hay, Low-Moisture and High-Moisture Silages. J. Anim. Sci. 32: 1256-1261
- [55] Rooke J. A., Hatfield R. D. (2003) Biochemistry of ensiling. In: Buxton D. R., Muck R. E., Harrison J. H. (Hrsg.): Silage Science and Technology. Agronomy, Madison 42: 95-139
- [56] Kemble A. R. (1956) Studies on the nitrogen metabolism of the ensilage process. J. Sci. Food Agric. 7: 125-130
- [57] Owens V. N., Albrecht K. A., Muck R. E. (1999a) Protein degradation and ensiling characteristics of red clover and alfalfa wilted under varying levels of shade. Can. J. Plant Sci. 79: 209-222

- [58] Owens V. N., Albrecht K. A., Muck R. E., Duke S. H. (1999b) Protein degradation and fermentation characteristics of red clover and alfalfa silage harvested with varying levels of total nonstructural carbohydrates. *Crop Sci.* 39: 1873-1880
- [59] Müller-Özkan E. (2002) Wirkung anionischer Futterzusätze auf den Kohlenhydratstoffwechsel im Pansen des Rindes (*in vitro*). Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [60] Riemeier A. (2004) Einfluss der ruminalen Stickstoffbilanz (RNB) auf die Pansenfermentation, mikrobielle Proteinsynthese, Menge des am Dünndarm anflutenden nutzbaren Proteins (nXP) sowie die Stickstoffausscheidung. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [61] Irle A. (2011) Untersuchungen zum Einfluss von Clostridiengaben bei Grassilagen mit auffällig niedrigen Reineiweißanteilen auf die Pansenfermentation (*in vitro*). Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [62] Schwab G. C., Huhtanen P., Hunt C. W., Hvelplund T. (2005) Nitrogen Requirements of Cattle. In: Pfeffer E., Hristov A. (Hrsg.): Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle. CABI Publishing, Oxfordshire, pp. 13-70
- [63] Odenkirchen S. (1992) Auswirkungen von Kupfersulfat auf die Fermentation von Stärke und Harnstoff im Pansensaft des Rindes (*in vitro*). Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [64] Jasper M. (2000) Untersuchungen zum Einfluss von Sulfat auf den Thiamin- und Thiaminderivatgehalt im bovinen Pansensaft (*in vitro*). Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [65] Hoover W. H., Stokes S. R. (1991) Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74: 3630-3644
- [66] Theermann S. (2011) Untersuchung zum Einfluss von Grassilagen mit auffällig niedrigen Reineiweißanteilen auf Aminosäuren und Biogene Amine im Pansensaft (*in vitro*). Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [67] Lewis T. R., Emery I. S. (1962) Relative deamination rates of amino acids by rumen microorganisms. *J. Dairy Sci.* 45: 765-768
- [68] Mangan J. L. (1982) The nitrogenous constituents of fresh forages. *Brit. Soc. Of Animal Production: Forage Protein in Ruminant Animal Production* 6: 25-40
- [69] Nocek J. E., Russell J. B. (1988) Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71: 2070-2107
- [70] Yokoyama M. T., Johnson K. A. (1988) Microbiology of the rumen and intestine. In: Church D. C. (Hrsg.): The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition. Prentice Hall, New Jersey, p. 125
- [71] Czerkawski J. W. (1985) An introduction to rumen studies. Pergamon Press, Oxford, New York
- [72] Nolan J. V. (1993) Nitrogen kinetics. In: Forbes J. M., France J. (Hrsg.): Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Verlag CAB International, Wallingford, pp. 123-143
- [73] Wallace R. J. (1997) Peptide metabolism and its efficiency in ruminant production. In: Onodera R., Itabashi H., Ushida K. (Hrsg.): Rumen microbes and digestive physiology in ruminants. Verlag Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 95-105
- [74] Bonhomme A. (1990) Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. *Anim. Feed Sci. Technol.* 30: 203-266
- [75] Broderick G. A., Wallace R. J., Ørskov E. R. (1991) Control of rate and extent of protein degradation. In: Tsuda T., Sasaki Y., Kawashima R. (Hrsg.): Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: proceedings of the seventh



- international symposium on ruminant physiology. Verlag Academic Press, San Diego, New York, pp. 541-592
- [76] Wald C. (2003) Gewürze und Co. – eine Übersicht, Lohmann Information 3: 7-11
- [77] Teuscher E. (2004) Biogene Arzneimittel. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- [78] Pichersky E., Gang D. R. (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An Evolutionary perspective. Trends in Plant Biology 5: 237-243
- [79] Wink M. (1999) Function of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Sheffield Academic Press and CRC Press, Annu. Plant Rev. 3: p. 362
- [80] Hodek P., Trefil P., Stiborová M. (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. Chemico-Biol. Intera. 139: 1-7
- [81] Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. 2: 152-159
- [82] Hermann K. M., Weaver L. M. (1999) The shikimate pathway. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 473-503
- [83] Kikelj V., Plantier-Royon R., Portella C. (2006) A new short and efficient route to 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (KDO) and 3-deoxy-D-arabino-hept-2-ulosonic acid (DAH). Synthesis 7: 1200-1204
- [84] Haslam E. (1974) The Shikimate Pathway. Halstead Press, Wiley: New York
- [85] Hermann K. M. (1995) The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. The Plant Cell 7: 907-919
- [86] Dosselaere F., Vanderleyden J. (2001) A metabolic node in action: chorismate utilizing enzymes in microorganisms. Crit. Rev. Microbiol. 27: 75-131
- [87] Lingens F., Burkhardt H. J., Hellmann H. (1957) Isolierung von Indol-3-glycerin aus Kulturmedien von Tryptophan-Mangelmutanten von *Salmonella-Typhimurium* und *Escherichia-coli*. Z. Naturforsch. 12: 493-497
- [88] Doy C. H., Gibson F. (1959) 1-(*o*-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose, a compound formed by mutant strains of *Aerobacter aerogenes* and *Escherichia coli* blocked in the biosynthesis of tryptophan. Biochem. J. 72: 586-597
- [89] Wegman J., DeMoss J. A. (1965) The enzymatic conversion of anthranilate to indolylglycerol phosphate in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 240: 3781-3788
- [90] Hommel U., Eberhard M., Kirschner K. (1995) Phosphoribosyl anthranilate isomerase catalyzes a reversible Amadori reaction. Biochemistry 34: 5429-5439
- [91] Crawford I. P., Yanofski C. (1958) On the separation of the tryptophan synthetase of *Escherichia coli* into two protein components. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44: 1161-1170
- [92] Anderson K. S., Miles E. W., Johnson K. A. (1991) Serine modulates substrate channeling in tryptophan synthase. J. Biol. Chem. 266: 8020-8033
- [93] Anderson K. S., Kim A. Y., Quillen J. M., Sayers E., Yang X.-J., Miles E. W. (1995) Kinetic characterization of channel impaired mutants of tryptophan synthase. J. Biol. Chem. 270: 29936-29944
- [94] Dixon A. R., Paiva N. L. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. The Plant Cell 7: 1085-1097
- [95] Richter G. (1998) Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Thieme Verlag, Stuttgart
- [96] Rosler J., Krekel F., Amrhein N., Schmid J. (1997) Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. Plant Physiol. 113: 175-179
- [97] Peters A., Schneider-Poetsch H. A. W., Schwarz H., Weissenböck G. (1988) Biochemical and immunological characterization of chalcone synthase from rye leaves. J. Plant Physiol. 133: 178-182
- [98] Lu F., Ralph J. (1999) The DFRC method for lignin analysis. 7. Behavior of cinnamyl end groups. J. Agric. Food Chem. 47: 1981-1987

- [99] Bunzel M., Steinhart H. (2003) Strukturmerkmale von Ballaststoffkomponenten. *Chem. in unserer Zeit* 37: 188-196
- [100] Bunzel M., Seiler A., Steinhart H. (2005) Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9553-9559
- [101] Heller W., Forkmann G. (1988) Biosynthesis of Flavonoids. In *The Flavonoids: Advances in research since 1980* (Harborne J. B.) Chapman and Hall, London, pp. 399-425
- [102] Heller W., Forkmann G. (1994) Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne J. B. (Ed.), *The flavonoids: Advances in research since 1986*, Chapman and Hall, London, pp. 499-535
- [103] Shirley B. W. (1996) Flavonoid biosynthesis: 'new' function for an old pathway. *Trends Plant Sci.* 1: 377-382
- [104] Harborne J. B., Williams C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-505
- [105] Bors W., Michel C., Stettmaier K. (1997) Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors.* 6: 399-402
- [106] Pietta P. G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63: 1035-1042
- [107] Pannala A. S., Chan T. S., O'Brien P. J., Rice-Evans C. A. (2001) Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 1161-1168
- [108] Ritter G. (1994) Die Bedeutung der phenolischen Saft- und Weinhaltstoffe während der Verarbeitung von Äpfeln, Speierling und weißen Trauben - Der Einfluss moderner Verfahrenstechnologie auf die Qualität des Endproduktes. Justus-Liebig-Universität Gießen, Diss.
- [109] Goodenough P. W., Kessel S., Lea A. G. H., Loeffler T. (1983) Mono and diphenolase Activity from fruit of *Malus Pumila*. *Phytochemistry* 22: p. 359
- [110] Cheynier V., Osse C., Rigaud J. (1988) Oxidation of Grape juice phenolic compounds in model solutions. *J. Food Sci.* 53: 1729-1732
- [111] Cheynier V., Ricardo Da Silva J. M. (1991) Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing transcaftaric acid and Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1047-1049
- [112] Watzl B., Rechkemmer G. (2001) Phenolic acids. *Ernährungs-Umschau* 48: 413-416
- [113] Dziedzic S. Z., Hudson B. J. F. (1984) Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chem.* 14: 45-51
- [114] Thumann I., Hermann K. (1980) Über die antioxidative Wirkung von Hydroxizimtsäuren und Hydroxibenzoessäuren. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 76: 344-348
- [115] Husain S. R., Cillard J., Cillard P. (1987) Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26: 2489-2492
- [116] Robak J., Gryglewski R. J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anion. *Biochem. Pharm.* 37: 83-88
- [117] Huguet A. I., Máñez S., Alcaraz M. J. (1990) Superoxide scavenging properties of flavonoids in a non-enzymic system. *Z. Naturforsch* 45: 19-24
- [118] Rice-Evans C. A., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* 22: 375-383
- [119] Burda S., Oleszek W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2774-2779
- [120] Steinmetz K. A., Potter J. D. (1991) Vegetables, fruit, and cancer. I. *Epidemiology. Cancer Causes Control* 2: 325-357
- [121] Sies H. (1986) Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.* 98: 1061-1075

- [122] Sies H. (Ed.) (1991) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. Academic Press, London, pp. 155-169
- [123] Leake D. S. (1998) Effect of flavonoids on the oxidation of low-density lipoprotein. In: Rice-Evans C. A., Packer L. (Eds.) Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 253-276
- [124] Huang S. W., Frankel E. N. (1997) Antioxidant activity of tea catechin in different lipid systems. J. Agric. Food Chem. 45: 3033-3038
- [125] Terao J., Piskula M. K. (1998) Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In: Rice-Evans C. A., Packer L. (Eds.) Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 277-293
- [126] Arimoto-Kobayashi S., Sugiyama C., Harada N., Takeuchi M., Takemura M., Hayatsu H. (1999) Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens. J. Agric. Food Chem. 47: 221-230
- [127] Kato Y., Ogino Y., Aoki T., Uchida K., Kawakishi S., Osawa T. (1997) Phenolic antioxidants prevent peroxynitrit-derived collagen modification in vitro. J. Agric. Food Chem. 45: 3004-3009
- [128] Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo J. C., Witztum J. L. (1989) Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N. Engl. J. Med. 320: 915-924
- [129] Wagner H. (1989) Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. Planta Med. 55: 235-241
- [130] Vlietinck A. J., De Bruyne T., Apers S., Pieters L. A. (1998) Plant derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Planta Med. 64: 97-109
- [131] Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T. C. (2000) The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharm. Rev. 52: 673-751
- [132] Brinkworth R. T., Stoermer M. J., Fairlie D. P. (1992) Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2: 631-637
- [133] Fesen M. R., Kohn K. W., Leteurtre F., Pommier Y. (1993) Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 2399-2403
- [134] Gatto M. T., Falcocchio S., Grippa E., Mazzanti G., Battinelli L., Micolosi G., Lambusta D., Saso L. (2002) Antimicrobial and anti-lipase activity of Quercetin and its C-2-C-16 3-Oacyl-esters. Bioorg. Med. Chem. 10: 269-272
- [135] Scalbert A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry 30: 3875-3883
- [136] Matsuo N., Yamada K., Shoji K., Mori M., Sugano M. (1997) Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure- inhibitory activity relationship. Allergy 52: 58-64
- [137] Greenblatt D. J., Shader R. I., Abernethy D. R. (1983) Current status of benzodiazepines. N. Engl. J. Med. 309: 354-358
- [138] Martin J. R., Haefely W. E. (1995) Drugs used for the treatment of anxiety and sleep disorders. In: Munson, P. L. (Ed.), Principles of pharmacology, Chapman & Hall, New York, pp. 243-278
- [139] Kavvadias D., Sand P., Youdim K. A., Qaiser M. Z., Rice-Evans C. A., Baur R., Sigel E., Rausch W. D., Riederer P., Schreier P. (2004) The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood- brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. Br. J. Pharm. 142: 811-820
- [140] Viola H., Wasowski C., Levi de Stein M., Wolfman C., Silveira R., Dajas F., Medina J. H., Paldini A. C. (1995) Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a

- central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med.* 61: 213-216
- [141] Häberlein H., Tschiersch K.-P., Schäfer H. L. (1994) Flavonoids from *Leptospermum scoparium* with affinity to the benzodiazepine receptor characterized by structure activity relationships and in vivo studies of a plant extract. *Pharmazie* 49: 912-922
- [142] Tsukaho H., Yoshimoto O. (1985) Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase activation and isoflavone glucoside accumulation in suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*, by phytoalexin elicitors, vanadate, and elevation of medium pH. *Plant Cell Physiol.* 26: 1101-1110
- [143] Rozema J., Björn L. O., Bornman J. F., Gaberscik A., Häder D.-P., Trost T., Germ M., Klisch M., Gröniger A., Sinha R. P., Lebert M., He Y.-Y., Buffoni-Hall R., de Bakker N. V. J., van de Staaij J., Meijkamp B. B. (2002) The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems- an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 66: 2-12
- [144] Yaginuma S., Shiraishi T., Ohya H., Igarashi K. (2002) Polyphenol increases in safflower and cucumber seedlings exposed to strong visible light with limited water. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 65-72
- [145] Nikfardjam M. S. P. (2001) Polyphenole in Weißweinen und Traubensäften und ihre Veränderung im Verlauf der Herstellung. Instituts für Oenologie und Getränkforschung der Forschungsanstalt Geisenheim; im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement; Justus-Liebig-Universität Gießen, Diss.
- [146] Zeyuan D., Bingyin T., Xiaolin L., Jinming H., Yifeng C. (1998) Effect of green tea and black tea on the blood glucose, the triglycerides, and antioxidation in aged rats. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3875-3878
- [147] Maruta A., Enaka K., Umeda M. (1979) Mutagenicity of quercetin and kaempferol on cultured mammalian cells. *Gann* 70: 273-6
- [148] Carver J. H., Carrano A. V., MacGregor J. T. (1983) Genetic effects of the flavonols quercetin, kaempferol, and galangin on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Mutat. Res.* 113: 45-60
- [149] Aeschbacher H. U., Meier H., Ruch E. (1982) Nonmutagenicity in vivo of the food flavonol quercetin. *Nutr. Cancer* 4: 90-8
- [150] MacGregor J. T., Wehr C. M., Manners G. D., Jurd L., Minkler J. L., Carrano A. V. (1983) In vivo exposure to plant flavonols. Influence on frequencies of micronuclei in mouse erythrocytes and sister-chromatid exchange in rabbit lymphocytes. *Mutat. Res.* 124: 255-70
- [151] Gaspar J., Laires A., Monteiro M., Laureano O., Ramos E., Rueff J. (1993) Quercetin and the mutagenity of wines. *Mutagenesis* 8: 51-55
- [152] Manach C., Régéat F., Texier O., Agullo G., Demigne C., Rémésy C. (1996) Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr. Res.* 16: 517-544
- [153] Andlauer W., Kolbe J., Stehle P., Fürst P. (2000) Absorption and metabolism of genistein in isolated rat small intestine. *J. Nutr.* 130: 843-846
- [154] Heilmann J., Merfort I. (1998) Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. *Pharm. in unserer Zeit* 27: 58-65
- [155] Heilmann J., Merfort I. (1998) Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharm. in unserer Zeit* 27: 173-183

- [156] Hollman P. C. H., de Vries J. H. M., van Leeuwen S. D., Mengelers M. J. B., Katan M. B. (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1276-1282
- [157] Manach C., Morand C., Texier O., Favier M. L., Agullo G., Demigné C., Régéat F., Rémésy C. (1995) Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr.* 125: 1911-1922
- [158] Braune A., Gütschow M., Engst W., Blaut M. (2001) Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5558-5567
- [159] Blaut M., Schoefer L., Braune A. (2003) Transformation of Flavonoids by Intestinal Microorganisms. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 73: 79-87
- [160] Prior R. L. (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 570-578
- [161] Rechner A. R., Smith M. A., Kuhnle G., Gibson G. R., Debnam E. S., Srai S. K., Moore K. P., Rice-Evans C. A. (2004) Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Rad. Biol. Med.* 36: 220-235
- [162] Williamson G., Manach C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 243-255
- [163] Bokkenheuser V. D., Shackleton C. H. L., Winter J. (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochem. J.* 248: 953-956
- [164] Griffiths L. A., Barrow A. (1972) Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem. J.* 130: 1161-1162
- [165] Clark W. G., MacKay E. M. (1950) The absorption and excretion of rutin and related flavonoid substances. *J. Am. Med. Assoc.* 143: 1411-1415
- [166] Gugler R., Leschik M., Dengler H. J. (1975) Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Europ. J. Clin. Pharm.* 9: 229-234
- [167] Murray C. W., Booth A. N., DeEds F., Jones F. T. (1954) Absorption and metabolism of rutin and quercetin in the rabbit. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 43: 361-365
- [168] Booth A. N., Murray C. W., Jones F. T., DeEds F. (1956) The metabolic fate of rutin and quercetin in the animal body. *J. Biol. Chem.* 223: 251-257
- [169] Baba S., Furuta T., Horie M., Nakagawa H. (1980) Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVI: Determination of urinary metabolites of rutin in humans. *J. Pharm. Sci.* 70: 780-782
- [170] Baba S., Furuta T., Fujioka M., Goromaru T. (1982) Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVII: Urinary metabolites of rutin in rats and the role of intestinal microflora in the metabolism of rutin. *J. Pharm. Sci.* 72: 1155-1158
- [171] Cheng K.-J., Jones G. A., Simpson F. J., Bryant M. P. (1969) Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic rutin degradation. *Can. J. Microbiol.* 15: 1365-1371
- [172] Sharma C. P., Kaushal G. P., Sareen V. K., Sudarshan Singh, Bhatia I. S. (1981) The in vitro metabolism of flavonoids by whole rumen contents and its fractions. *J. Vet. Med. Series A* 28: 27-34
- [173] McDonald I. A., Bussard R. G., Hutchison D. M., Holdeman L. V. (1984) Rutin induced  $\beta$ -glucosidase activity in *Streptococcus faecium* VGH-1 and *Streptococcus* sp. Strain FRP-17 isolated from human feces: Formation of the mutagen, quercetin, from rutin. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 350-355
- [174] Kim D. H., Kim S. Y., Park S. Y., Han M. J. (1999) Metabolism of quercetin by human intestinal bacteria and its relation to some biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* 22: 749-751

- [175] Griffiths L. A. (1982) Mammalian metabolism of flavonoids. In: Harborne J. B., Mabry T. J. (Hrsg.): The Flavonoids: Advances in Research. Chapman and Hall, London-New York, pp. 681-718
- [176] Metz G. (2000) Flavonoide Teil II - Trotz Resorptionsschwächen gut wirksam. Pharm. Ztg. 145: 2206-2208
- [177] Schneider H., Blaut M. (2000) Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. Arch. Microbiol. 173: 71-75
- [178] DeEds F. (1968) Flavonoid metabolism. In: Florkin M., Stotz E. H., Comprehensive Biochemistry. Eds., Elsevier, Amsterdam 20: 127-171
- [179] Petrakis P. L., Kallianos A. G., Wender S. H., Shetlar M. R. (1959) Metabolic studies of quercetin labelled with C<sup>14</sup>. Arch. Biochem. Biophys. 85: 264-271
- [180] Kallianos A. G., Petrakis P. L., Shetlar M. R., Wender S. H. (1959) Preliminary studies on degradation products of quercetin in the rat's gastrointestinal tract. Arch. Biochem. Biophys. 81: 430-433
- [181] Krishnamurty H. G., Cheng K.-J., Jones G. A., Simpson F. J., Watkin J. E. (1970) Identification of products produced by the anaerobic degradation of rutin and related flavonoids by *Butyrivibrio* sp. C<sub>3</sub>. Can. J. Microbiol. 15: 759-767
- [182] Ueno I., Nakano N., Hirono I. (1983) Metabolic fate of [<sup>14</sup>C] quercetin in the ACI rat. Japan. J. Exp. Med. 53: 41-50
- [183] Heider J., Fuchs G. (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. Eur. J. Biochem. 243: 577-596
- [184] Booth A. N., Jones F. T., DeEds F. (1958) Metabolic fate of hesperidin, eriodictyol, homoeriodictyol, and diosmin. J. Biol. Chem. 230: 661-668
- [185] Bell J. R. C., Donovan J. L., Wong R., Waterhouse A. L., German J. B., Walzem R. L., Kasim-Karakas S. E. (2000) (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving reconstituted red wine. Am. J. Clin. Nutr. 71: 103-108
- [186] Booth A. N., Jones F. T., DeEds F. (1958) Metabolic and glucosuria studies on naringin and phloridzin. J. Biol. Chem. 233: 280-282
- [187] Griffiths L. A., Smith G. E. (1972) Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Biochem. J. 128: 901-911
- [188] Cova D., De Angelis L., Giavarini F., Palladini G., Perego R. (1992) Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers. Int. J. Clinical Pharm. Therapy Toxic. 30: 29-33
- [189] Honohan T., Hale R. L., Brown J. P., Wingard R. E. (1976) Synthesis and metabolic fate of hesperetin-3-<sup>14</sup>C. J. Agric. Food Chem. 24: 906-911
- [190] Hattori M., Shu Y.-Z., El-Sedawy A. I., Namba T. (1988) Metabolism of homoeriodictin by human intestinal bacteria. J. Nat. Prod. 51: 874-878
- [191] Coldham N. G., Darby C., Hows M., King L. J., Zhang A.-Q., Sauer M. J. (2002) Comparative metabolism of genistein by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism. Xenobiotica 32: 45-62
- [192] Von Keyserlingk M. A. G., Shelford J. A., Puchala R., Swift M. L., Fisher L. J. (1996) In situ disappearance of amino acids from grass silages in the rumen and intestine of cattle. J. Dairy Sci. 81:140-149
- [193] Kalač P. (2011) The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. Food Chem. 125: 307-317
- [194] Lumpp L. (2011) Einfluss von Grassilagen mit auffällig niedrigen Reineiweißanteilen auf den Kohlenhydratstoffwechsel im Pansensaft *in vitro*. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [195] Wichern A. (2011) Untersuchungen zum Einfluss von Grassilagen mit auffällig niedrigen Reineiweißanteilen auf bislang nicht identifizierte Substanzen im Pansensaft (*in vitro*).

- Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [196] Dirksen G. (1985) Der Pansenacidose-Komplex - neuere Erkenntnisse und Erfahrungen. Tierärztl. Prax. 13: 501-512
- [197] Gäbel G. (1990) Pansenacidose: Interaktionen zwischen den Veränderungen im Lumen und in der Wand des Pansens. Übers. Tierernährung 18: 1-38
- [198] Höltershinken M. (1990) In-vitro-Untersuchungen über die Wirkungen von Baquiloprim/Sulfadimidin auf die Fermentationsvorgänge im Pansensaft des Rindes. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [199] Hesse M., Meier H., Zeeh B. (2012) Spektroskopische Methoden in der organische Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- [200] Cunningham P. J., Foot J. Z., Reed K. F. M. (1993) Perennial ryegrass (*Lolium perenne*) endophyte (*Acremonium lolii*) relationships: the Australian experience. Agric. Ecosyst. Environ. 44: 157-168
- [201] Cremin Jr. J. D., McLeod K. R., Harmon D. L., Goetsch A. L., Bourquin L. D., Fahey Jr. G. C. (1995) Portal and hepatic fluxes in sheep and concentrations in cattle ruminal fluid of 3-(4-hydroxyphenyl)propionic, benzoic, 3-phenylpropionic, and *trans*-cinnamic acids. J. Anim. Sci. 73: 1766-1775
- [202] Chesson A., Stewart C. S., Wallace R. J. (1982) Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 44: 597-603
- [203] Hungata R. E., Stack R. J. (1982) Phenylpropionic acid: Growth Factor for *Ruminococcus albus*. Appl. Environ. Microbiol. 44: 79-83
- [204] Khan R. I., Onodera R., Amin M. R., Mohammed N. (2002) Aromatic amino acid biosynthesis and production of related compounds from *p*-hydroxyphenylpyruvic acid by rumen bacteria, protozoa and their mixture. Amino Acids 22: 167-177
- [205] Pretsch E., Bühlmann P., Affolter C. (2001) Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- [206] Caristi C., Bellocco E., Panzera V., Toscano G., Vadalà R., Leuzzi U. (2003) Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from Sicilian cultivars. J. Agric. Food Chem. 51: 3528-3534
- [207] Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi U., Caristi C. (2007) Flavonoid composition of *cirus* juices. Molecules 12: 1641-1673
- [208] Campanero M. A., Escolar M., Perez G., Quetglas E. G., Sadaba B., Azanza J. R. (2010) Simultaneous determination of diosmin and diosmetin in human plasma by ion trap liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: Application to a clinical pharmacokinetic study. J. Pharm. Biomed. Anal. 51: 875-881
- [209] Barrière Y., Riboulet C., Mèchin V., Maltese S., Pichon M., Cardinal A., Lapierre C., Lübberstedt T., Martinant J. P. (2007) Genetics and genomics of lignification in grass cell walls based on maize as model species. Global Science Books; Genes, Genomes and Genomics 1: 133-156
- [210] Krizsan S. J., Westad F., Ådnøy T., Odden E., Aakre S. E., Randby Å. T. (2007) Effect of volatile compounds in grass silage on voluntary intake by growing cattle. The Anim. Consortium 1: 283-292
- [211] Fusi E., Baldi A., Cheli F., Rebutti R., Ayuso E., Sejrsen K., Purup S. (2008) Effects of putrescine, cadaverine, spermine, spermidine and  $\beta$ -Phenylethylamine on cultured bovine mammary epithelial cells. Ital. J. Anim. Sci. 7: 131-140
- [212] Marita J. M., Hatfield R. D., Brink G. (2010) In vitro proteolytic inhibition, polyphenol Oxidase activity and soluble *o*-diphenols in grasses and cereals. J. Agric. Food Chem. 58: 959-966

- [213] Fraisse D., Carnat D., Viala D., Pradel P., Besle J. M., Coulon J. B., Felgines C., Lamaison J. L. (2007) Polyphenolic composition of a permanent pasture: Variations related to the period of harvesting. *J. Sci. Food Agric.* 87: 2427-2435
- [214] Besle J. M., Viala D., Martin B., Pradel P., Meunier B., Berdaguè J. L., Fraisse D., Lamaison J. L., Coulon J. B. (2010) Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *J. Dairy Sci.* 93: 2846-2856
- [215] Ralph J., Quideau S., Grabber J. H., Hatfield R. D. (1994) Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*: 3485-3498
- [216] Simpson F. J., Jones G. A., Wolin E. A. (1969) Anaerobic degradation of some bioflavonoids by microflora of the rumen. *Can. J. Microbiol.* 15: 972-974
- [217] Cheng K.-J., Krishnamurty H. G., Jones G. A., Simpson F. J. (1971) Identification of products produced by anaerobic degradation of naringin by *Butyrivibrio sp. C3*. *Can. J. Microbiol.* 17: 129-131
- [218] Mustonen E. A., Tuori M., Saastamoinen I., Taponen J., Wähälä K., Saloniemi H., Vanhatalo A. (2009) Equol in milk of dairy cows is derived from forage legumes such as red clover. *Br J. Nutr.* 102: 1552-1556
- [219] Wang X.-L., Shin K.-H., Hur H.-G., Kim S.-I. (2005) Enhanced biosynthesis of dihydrodaidzein and dihydrogenistein by a newly isolated bovine rumen anaerobic bacterium. *J. Biotech.* 115: 261-269
- [220] Rosler J., Krekel F., Amrhein N., Schmid J. (1997) Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.* 113: 175-179
- [221] Flores-Sanchez I. J., Verpoorte R. (2009) Plant polyketide synthases: A fascinating group of enzymes. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 167-174
- [222] Lewinsohn E., Britsch L., Mazur Y., Gressel J. (1989) Flavanone glycoside biosynthesis in *citrus*. *Plant Physiol.* 91: 1323-1328
- [223] Benavente-Garcia O., Castillo J. del Rio Conesa J. A. (1993) Changes in neodiosmin levels during the development of *citrus aurantium* leaves and fruits. Postulation of a neodiosmin biosynthetic pathway. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1916-1919
- [224] Wollenweber, E. (1986) In the flavonoids. In: Williams C. A., Harborne J. B. (Hrsg.): *Advances in research since*, Chapman and Hall, London pp. 259-386
- [225] Bar-Peled M., Lewinsohn E., Fluhr R., Gressel J. (1991) UDP-rhamnose: Flavanone-7-O-glucoside-2"-O-rhamnosyltransferase. Purification and characterization of an enzyme catalyzing the production of bitter compounds in citrus. *J. Biol. Chem.* 266: 20953-20959
- [226] Schröder G., Wehinger E., Lukačín R., Wellmann F., Seefelder W., Schwab W., Schröder J. (2004) Flavonoid methylation: a novel 4'-O-methyltransferase from *Catharanthus roseus*, and evidence that partially methylated flavanones are substrates of four different flavonoid dioxygenases. *Phytochemistry* 65: 1085-1094
- [227] Wollersen H. (2004) Bestimmung und Identifizierung von Flavonoiden in Gerste mit HPLC-DAD-MS/MS.  
Department Chemie der Universität Paderborn, Diss.
- [228] Perego P., Beccaglia P., Angelini M., Villa P., Cova D. (1993) Pharmacokinetic studies of diosmin and diosmetin in perfused rat liver. *Xenobiotica* 23: 1345-1352
- [229] Schuster B., Herrmann K. (1985) Bildung von Hydroxybenzoesäuren aus Flavonoiden bei enzymatischen und alkalischen Hydrolysen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 181: 467-469
- [230] Hong Y. J., Tomas-Barberan F. A., Kader A. A., Mitchell A. E. (2006) The Flavonoid Glycosides and Procyandin Composition of Deglet Noor Dates (*Phoenix dactylifera*). *J. Agric. Food Chem.* 54: 2405-2411



- [231] Fulcrand H., Mané C., Preys S., Mazerolles G., Bouchut C., Mazauric J.-P., Souquet J.-M., Meudec E., Li Y., Cole R. B., Cheynir V. (2008) Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry* 69: 3131-3138
- [232] Jin A., Ozga J. A., Lopes-Lutz D., Schieber A., Reinecke D. M. (2012) Characterization of proanthocyanidins in pea (*Pisum sativum* L.), lentil (*Lens culinaris* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.) seeds. *Food Res. Internat.* 46: 528-535
- [233] Hegnauer R. (1963) *Chemotaxonomie der Pflanzen: Band 2: Monocotyledoneae*, Birkhäuser Verlag, Basel
- [234] Bratt K. (2000) Secondary plant metabolites as defense against herbivores and oxidative Stress. Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, University of Uppsala, Sweden, Diss.
- [235] Sunnerheim K., Bratt K. (2004) Identification of centrolol as the platyphylloside metabolite responsible for the observed effect on in vitro digestibility of hay. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5869-5872
- [236] Sunnerheim K., Knutsson P. (1995) Playphylloside: Metabolism and digestibility reduction in vitro. *J. Chem. Ecol.* 21: 1339-1347
- [237] Tung N. H., Kwon H. J., Kim J. H., Ra J. C., Ding Y., Kim J. A., Kim Y. H. (2010) Anti-influenza diarylheptanoids from the bark of *Alnus japonica*. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 20: 1000-1003
- [238] Palo R. T. (1987) Phenols as defensive compounds in birch. Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Sveriges Lantbruksuniversitet Uppsala, Sweden, Diss.
- [239] Anand P., Thomas S. G., Kunnumakkara A. B., Sundaram C., Harikumar K. B., Sung B., Tharakan S. T., Misra K., Priyadarsini I. K., Rajasekharan K. N., Aggarwal B. B. (2008) Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharm.* 76: 1590-1611
- [240] Claeson P., Pongprayoon U., Sematong T., Tuchinda P., Reutrakul V., Soontornsaratune, P., Taylor W. C. (1996) Non-phenolic linear diarylheptanoids from *Curcuma xanthorrhiza* : A novel type of topical anti-inflammatory agents: Structure-activity relationship. *Planta Medica* 62: 236-240
- [241] Ammon H. P. T., Anazodo M. I., Safayhi H., Dhawan B. N., Srimal R. C. (1992) Curcumin - a potent inhibitor of leukotriene-B4 formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). *Planta Medica* 58: 226
- [242] Höjer A., Adler S., Purup S., Hansen-Møller J., Martinsson K., Steinshamn H., Gustavsson A.-M. (2012) Effects of feeding dairy cows different legume-grass silages on milk phytoestrogen concentration. *J. Dairy Sci.* 95: 4526-4540
- [243] Steinshamn H., Purup S., Thuen E., Hansen-Møller J. (2008) Effects of Clover-Grass Silages and Concentrate Supplementation on the Content of Phytoestrogens in Dairy Cow Milk. *J. Dairy Sci.* 91: 2715-2725
- [244] Chesson A., Provan G. J., Russel W. R., Scobbie L., Richardson A. J., Stewart C. (1999) Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J. Sci. Food Agric.* 79: 373-378
- [245] Setchell K., Bull R., Adlercreutz H. (1979) Steroid Excretion During the Reproductive Cycle and in Pregnancy of the Vervet Monkey (*Cercopithecus aethiopus pygerythrus*). *J. Steroid Biochem.* 12: 375-384
- [246] Setchell K., Lawson A., Mitchell F., Adlercreutz H., Axelson M. D. K. (1980) Lignans in Man and in Animal Species. *Nature* 287: 740-742
- [247] Raffaelli B., Hoikkala A., Leppälä E., Wähälä K. (2002) Enterolignans. *J. Chromatogr. B* 777: 29-43

- [248] Clavel T., Borrmann D., Braune A., Dore J., Blaut M. (2006) Occurrence and Activity of Human Intestinal Bacteria Involved in the Conversion of Dietary Lignans. *Anaerobe* 12: 140-147
- [249] Heinonen S., Nurmi T., Liukkonen K., Poutanen K., Wähälä K., Deyama T., Nishibe S., Adlercreutz H. (2001) In Vitro Metabolism of Plant Lignans: New Precursors of Mammalian Lignans Enterolactone and Enterodiol. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3176-3186
- [250] Loew D., Koch E. (2008) Cumarine – Differenzierte Risikobetrachtung mit dem Beispiel eines pflanzlichen Arzneimittels. *Zeitschrift für Phytotherapie* 29: 28-36
- [251] Rietjens I. M. C. M., Boersma M. G., Zaleska M., Punt A. (2008) Differences in simulated liver concentrations of toxic coumarin metabolites in rats and different human populations evaluated through physiologically based biokinetic (PBBK) modeling. *Toxicology in Vitro* 22: 1890-1901
- [252] Garcia-Conesa M.-T., Kroon P. A., Ralph J., Mellon F. A., Colquhoun I. J., Saulnier L., Thibault J.-F., Williamson G. (1999) A cinnamoyl esterase from *Aspergillus niger* can break plant cell wall cross-links without release of free diferulic acids. *Eur. J. Biochem.* 266: 644-652
- [253] Crespo, M.E., Galvez J., Cruz T., Ocete M.A., Zarzuelo A. (1999) Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. *Planta Med.* 65: 651-653
- [254] Czerkawski J. W., Breckenridge G. (1977) Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 38: 371-384
- [255] Lowry O. H., Rosebrough N. J., Lewis Farr A., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- [256] Lottspeich F., Engels J. W. (2006) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, München
- [257] Rehm H. (2000) *Proteinbiochemie / Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin
- [258] Thimm L. (2009) FT-IR und FT-NIR spektroskopische Untersuchungen in Kombination mit chemometrischen Auswertalgorithmen zur Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung von Straßenbaubitumen. Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen, Diss.
- [259] P. W. Atkins, J. de Paula (2006) *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim

---

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name	Selvihan Özmen, geb. Haldan
Geburtsdatum	26.01.1979
Geburtsort	Findikli / Türkei
Familienstand	verheiratet
Anzahl, Alter der Kinder	Sohn, 11 Jahre alt
Staatsangehörigkeit	Türkisch
Anschrift	Deisterstr. 56 31785 Hameln

### Studium

01/2010 – 01/2014	Promotionsstudium am Institut für Technische Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper in Kooperation mit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
10/2009 – 12/2009	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
11/2003 – 08/2009	Chemiestudium an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Abschluss Diplom Chemikerin
10/1996 – 02/2000	Chemiestudium (7 Semester) an der Atatürk Universität Türkei
10/1998 – 02/2000	Studium der Pädagogik (3 Semester) an der Atatürk Universität Türkei

### Schulbildung

1989 – 1995	Iyidere Gymnasium in Rize, Türkei, Abschluss: Abitur
1984 – 1989	Iyidere Grundschule in Rize, Türkei

### Stipendium

11/2010 – 05/2013	Stipendium von der Evonik-Stiftung, Essen
-------------------	---