

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen  
in der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Arbeitsgruppe funktionelle Pflanzenstoffe  
(Leiter: Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Johannes Novak)

**Bestimmung von Gesamtphenolen und Photosynthesepigmenten  
in Heuproben aus der Praxis**

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von Adina Barbara Wachsmann

Wien, im Juli 2022

**Betreuer**

Ao.Univ.-Prof. Dr.phil. Remigius Chizzola

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizinischen  
Universität Wien

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe der Veterinärmedizinischen Univer-  
sität Wien

**Gutachterin**

Ass.-Prof. Dr. Susanne Kreuzer-Redmer

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizinischen  
Universität Wien

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe der Veterinärmedizinischen Univer-  
sität Wien

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, welche mich auf dem langen Weg der Pferdewissenschaften begleitet und unterstützt haben.

Besonders großer Dank gebührt:

- meiner Familie, die mich durch mein ganzes Studium unterstützt und mir bei allen Belangen geholfen hat.
- meiner Studienkollegin Sophie, ohne deren Überzeugungskraft, Motivation und positiver Einstellung ich dieses Studium nie alleine geschafft hätte.
- meinen Kolleginnen Ines und Sonja, welche mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.
- Dijana, die mich bei allen Höhen und Tiefen im Labor begleitet und mir immer geholfen hat, wo ich nicht mehr weiterwusste.
- Ao.Univ.-Prof. Dr.phil. Remigius Chizzola für eine ausgezeichnete, sehr präzise geführte und lehrreiche Betreuung und Unterstützung.

**Herzlichen Dank**



## Abkürzungsverzeichnis

aNDFOM .....	Neutral - Detergenzien - Faser nach Amylasebehandlung und Veraschung
C.....	Kohlenstoff
Chlor .....	Chlorophyll
HPLC .....	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ra .....	Rohasche
Rp .....	Rohprotein
Stabw.....	Standardabweichung
TS .....	Trockensubstanz

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung .....	1
2. Literaturübersicht .....	3
2.1. Allgemeines über Heu .....	3
2.2. Qualitativer Heutest .....	3
3. Pflanzenstoffe .....	6
3.1. Gesamtflavonoide .....	6
3.2. Gesamtphenole .....	8
3.3. Chlorophyll .....	9
3.4. Carotinoide .....	11
4. Material und Methode .....	12
4.1. Herkunft der Proben .....	12
4.2. Methoden zur Analyse der Gesamtphenole und Photosynthesepigmente .....	14
4.2.1. Probenextrahierung .....	14
4.2.1.1. Allgemeines .....	14
4.2.1.2. Durchführung .....	14
4.2.1.3. Anwendungsmethode und Vorgehensweise .....	15
5. Ergebnisse und Diskussion .....	23
6. Zusammenfassung .....	34
7. Abstract .....	35
8. Abbildungsverzeichnis .....	36
9. Literaturverzeichnis .....	37
10. Anhang .....	39

## 1. Einleitung und Fragestellung

Das Pferd ist seit hunderten von Jahren an der Seite des Menschen. Als Mitglied der Familie der Herbivore deckt es seinen Energiebedarf allein aus pflanzlichem Futter ab. Im Mittelpunkt seiner Ernährung stehen grobfaserige Pflanzen. Hierfür wird in unseren Breitengraden Heu verwendet. Ein Pferd benötigt täglich als Futter um die 2% seines Körpergewichts an Trockenmasse. Je nach Alter und Trainingsintensität variiert diese Menge.

[https://www.lsu.edu/vetmed/ehsp/horse\\_health/aaep\\_tips/hay.php](https://www.lsu.edu/vetmed/ehsp/horse_health/aaep_tips/hay.php)

Pferdeheu zählt zu einem eigenen Wirtschaftszweig. Die Nachfrage nach "Qualitätsheu" ist groß, und die Preise schwanken je nach Angebot und Nachfrage sowie der Möglichkeit, bestimmte Heuschnitte anbieten zu können.

Um alle Nährstoffe optimal abzudecken, ist gutes Pferdeheu von Vorteil. Heu ist eine Mischung an getrockneten Gräsern und variiert, je nach Vegetationszone und Bodenbeschaffenheit in der Zusammensetzung. Sie hängt vom Erfolg der Keimung des Saatguts, vom Alter des Heubestands (Jahre seit der Aussaat), davon, ob es sich um erst- oder zweitgeschnittenes Heu handelt, und von den Wachstumsbedingungen, wie der Regenmenge, ab.

[http://omafra.gov.on.ca/english/livestock/horses/facts/info\\_hay.htm](http://omafra.gov.on.ca/english/livestock/horses/facts/info_hay.htm)

Bei der Heubeurteilung werden die Qualitätsmerkmale anhand einfacher Kriterien erhoben. Beurteilt werden Farbe und Aussehen, Geruch, Griff, Verunreinigungen, botanische Zusammensetzung und Giftpflanzen. Diese Eigenschaften geben einen Hinweis auf die Heubeschaffenheit und die Verwendungsmöglichkeit für Pferde oder Nutztiere.

Der Futterwert und Nährstoffgehalt wird dann in einer angefügten Untersuchung bestimmt, in der Rohprotein, Rohasche, Rohfaser und Energiegehalte aufgeschlüsselt werden. Weitere Messungen wie Kalzium-, Selen- und Vitamin-D-Gehalte geben dann einen tieferen Einblick in die Heuuntersuchung. (Meyer H. Coenen M., 2013)

Im Rahmen dieser Arbeit soll herausgefunden werden, ob die grobsinnliche Farbeinteilung der gezogenen Proben in Zusammenhang mit den Photosynthesepigmenten steht. Da die Farbe ein Bewertungscharakteristikum ist, und Chlorophyll a und Chlorophyll b den Inhalt dieser des Heus messen kann, besteht die Annahme einer gewissen Korrelation zwischen diesen beiden Werten.

Weiters gibt es die Überlegung, ob es andere Zusammenhänge mit phenolischen Inhaltsstoffen und den Nährwertbestimmungen gibt. In diesem Bezug werden Gesamtphenole, Gesamtflavonoide sowie Chlorophyll betrachtet. Ziel ist es anhand der ordinal skalierten Werte der Sinnenprüfung sowie der metrischen Werte des Photometers eine Korrelation zu finden.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Allgemeines über Heu

Die Grünlandflächen in Österreich sind in den letzten 50 Jahren um ca. 25% gesunken, da große Teile verwaldet sind oder verbaut wurden. Trotzdem benötigen die rund 100.000 viehhaltenden Betriebe Futter für ihre Tiere. Dieses wird auf 1,9 Mio. ha Grünland erzeugt. Der prozentuell größte Teil stellt hier Ökogrünland mit 63% dar, sprich extensive Wiesen und Weiden, die primär der Rauhfuttermittellversorgung der Tiere dienen. (Buchgraber K., 2018)

Eine Wiese setzt sich, je nach Bodenbeschaffenheit, aus verschiedenen Gräsern, Leguminosen und Kräutern zusammen. Die prozentualen Werte schwanken je nach Bodenzusammensetzung und Lage. Generell dominieren die Gräser mit 60-70% vom Gesamtanteil, Leguminosen 15-20% und an letzter Stelle die Kräuter mit 10-20%. (Dielacher, 2016) Die getrockneten Bestandteile dieser Pflanzen werden in der deutschen Sprache als Heu bezeichnet. Das Wort stammt von dem mittelhochdeutschen Worte *höu[we]* und ist eng verwandt mit unserem Wort "hauen, etwas zu schlagen" ("Heu | Rechtschreibung, Bedeutung, Definition, Herkunft", (Duden.de, 2022))

Im Gegensatz zu Stroh wird Heu vor der Todreife geerntet, wobei es nicht immer möglich ist, die Grenze eindeutig zu definieren. (Dielacher, 2016)

Je nach Blatt- und Stängelanteil im Heu, variieren die Inhaltsstoffe und Nährwerte des Heus. Nutzungsintensität sowie Dünger Regime beeinflussen die Nährstoffbilanz des Heus sowie dessen Gehalt an Spurenelementen. Auch der Verschmutzungsgrad beeinflusst die Inhaltsstoffe, wie zum Beispiel den Rohasche Anteil.

Der Rohfettanteil steigt mit dem Blätteranteil so wie auch der Rohaschegehalt. (Buchgraber K., 2018)

### 2.2. Qualitativer Heutest

Die Beurteilung von Heu soll mittels Sinnenprüfung Informationen über den Futterwert, die Zusammensetzung, sowie den Hygienestatus liefern. Die Beurteilungsmethoden bedienen sich weniger technischen Hilfsmitteln, um die Konstitution des Heus zu bewerten.



In Abhängigkeit vom Aufwuchs (1. Schnitt, 2. Schnitt und Folgeschnitte), Vegetationsstadium (Ähren-, Rispschieben, Blütenwachstum) sowie Rohfaser und Rohproteinanteil (%TS) wird das Heu auf den Futterwert ermittelt. Die Faktoren sind dann für die spätere Sinnenprüfung miteinzubeziehen.

(Mayer H. Bronsch K. Leibetseder J., 1993)

Für die Verwendung von Heu werden die Leitgräser wie Goldhafer oder Knaulgras herangezogen. Befinden sich diese zu Beginn des Ährenschiebens wird das Wirtschaftsgrünland für die Heuproduktion verwendet. (Buchgraber K., 2018)

Die Sinnenprüfung des Heus ist eine qualitative Methode, um den Heuschnitt zu bewerten. Als Parameter der Überprüfung werden Griff, Geruch, Farbe sowie Verunreinigung genommen. Der Futterwert ist zu diesen Parametern vorgegeben und wird in Punkten abgestuft, je nachdem welche Werte erreicht werden. Zum Futterwert wird auch noch der Hygienestatus bestimmt, welcher ebenfalls mit Punkten bewertet wird. Die Beurteilung erfolgt somit separat für den Futterwert als auch den Hygienestatus und wird, abgestuft, von sehr gut bis sehr gering.

(Mayer H. Bronsch K. Leibetseder J., 1993)

Ein häufig verwendetes Schema zur Beurteilung ist der ÖAG-Schlüssel:

<b>Heubewertung nach Sinnenprüfung ÖAG-Schlüssel<sup>1)</sup>, 1999</b>			
<b>1. GERUCH:</b>			
<input type="checkbox"/>	außerordentlich guter, aromatischer Heugeruch .....	<b>Punkte</b> 5	
<input type="checkbox"/>	guter, aromatischer Heugeruch .....	3	
<input type="checkbox"/>	fad bis geruchlos .....	1	
<input type="checkbox"/>	schwach muffig, brandig .....	0	
<input type="checkbox"/>	stark muffig (schimmelig) oder faulig .....	-3	
<b>2. FARBE:</b>			
<input type="checkbox"/>	einwandfrei, wenig verfärbt .....	5	
<input type="checkbox"/>	verfärbt, ausgebleichen .....	3	
<input type="checkbox"/>	stark ausgebleichen .....	1	
<input type="checkbox"/>	gebräunt bis schwärzlich oder schwach schimmelig .....	0	
<b>3. GEFÜGE:</b>			
<input type="checkbox"/>	blattreich (Klee-, Kräuter- und Grasblätter erhalten, ebenso Knospen u. Blütenstände), weich und zart im Griff .....	7	
<input type="checkbox"/>	blattärmer, wenig harte Stängel, etwas hart im Griff .....	5	
<input type="checkbox"/>	sehr blattarm, viele harte Stängel, rau und steif im Griff .....	2	
<input type="checkbox"/>	fast blattlos, viele verholzte Stängel grob und überständig .....	0	
<b>4. VERUNREINIGUNG:</b>			
<input type="checkbox"/>	keine (keine Staubentwicklung) .....	3	
<input type="checkbox"/>	mittlere (geringe Staubentwicklung) .....	1	
<input type="checkbox"/>	starke (Erde- bzw. Mistreste) .....	0	
<b>Die unter 1., 2., 3. und 4. erreichten Punkte werden addiert</b>			
<b>Punkte:</b>	<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>	<b>Güteklasse:</b> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>	<b>Wertminderung durch Heubereitung</b>
<b>20 - 16</b>	<b>1 sehr gut bis gut</b>	<b>gering</b>	
<b>15 - 10</b>	<b>2 befriedigend</b>	<b>mittel</b>	
<b>9 - 5</b>	<b>3 mäßig</b>	<b>hoch</b>	
<b>4 - -3</b>	<b>4 verdorben</b>	<b>sehr hoch</b>	
<small>1) Abgeleitet nach dem DLG-Schlüssel</small>			

Abbildung 1. ÖAG-Schlüssel für Heubewertung Jahr: 1999.

Neuerdings wird auch eine App für die Heubeurteilung eingesetzt. Diese wurde auf der Veterinärmedizinischen Universität Wien unter Prof. Zebeli, am Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe, entwickelt, und bereits im letzten Jahr öfters in Übungen an der Universität verwendet.

### 3. Pflanzenstoffe

Die Pflanzenstoffe sind maßgebend für die Eigenschaften der Gräser und Kräuter. In dieser Arbeit wird insbesondere auf die Fraktionen der Gesamtphenole, Gesamtflavonoide sowie Chlorophyll a und b und Carotinoide eingegangen.

Diese drei Pflanzenstoff-Gruppen sind wichtige Bestandteile des Heus in Hinblick auf die Vergleichbarkeit von Inhaltsstoffen und grobsinnlicher Beurteilung.

#### 3.1. Gesamtflavonoide

Flavonoide sind eine wichtige Klasse von Sekundärmetaboliten, die in Pflanzen weit verbreitet sind.

Sie tragen zum Wachstum und zur Entwicklung der Pflanzen bei und werden in der Medizin und in der Ernährung eingesetzt. Flavonoide stammen aus dem Phenylpropanoid-Stoffwechselweg und haben eine Grundstruktur, die eine C<sub>15</sub>-Struktur aus 2 Benzolringen (A,B) und einem mittleren heterocyclischen-6-gliedrigen Ring (C) umfasst (Abbildung II).

Die Flavonoidbiosynthese in Pflanzen, beinhaltet acht Zweige (Stilben, Auran, Flavon, Isoflavon, Flavonol, Phlobaphen, Proanthocyanidin und Anthocyan-Biosynthese) und vier wichtige Intermediärmetaboliten (Chalcon, Flavanon, Dihydroflavonol und Leucoanthocyanidin). Flavonoide sind eine Gruppe von Phenylpropanoiden, die als wasserlösliche Pigmente, in den Vakuolen der Pflanzenzellen gespeichert werden.

Sie können in 12 Untergruppen eingeteilt werden - Chalkone, Stilbene, Aurone, Flavanone, Flavone, Isoflavone, Phlobaphene, Dihydroflavonole, Flavonole, Leukoanthocyanidine, Proanthocyanidine und Anthocyanen. Bis heute sind mehr als 9000 Pflanzenflavonoide isoliert und identifiziert worden.

Flavonoide gehören zu den wichtigsten Pigmenten in Pflanzen, wie z. B. Anthocyane (rote, orange, blaue und violette Pigmente); Chalkone und Aurone (gelbe Pigmente); und Flavonole und Flavone (weiße und blassgelbe Pigmente), die den Pflanzen eine große Vielfalt an Farben verleihen. Pflanzenflavonoide finden auch im täglichen Leben breite Anwendung, etwa für Lebensmittel und medizinische Zwecke.

So sind beispielsweise Anthocyane und Proanthocyanidine wichtige essbare Pigmente und geschmacksregulierende Komponenten in Lebensmitteln und Wein, auch als Wirkstoffe, welche die Alterung des Nervensystems, der Immunorgane, des Fortpflanzungssystems, der Leber und der Haut verzögern und zur Vorbeugung beitragen. (Liu W., et al., 2021)

In Blüten, Früchten, Samen und Blättern spielen Flavonoide auch eine Schlüsselrolle bei der Signalübertragung zwischen Pflanzen und Mikroben, bei der männlichen Fruchtbarkeit einiger Arten, bei der Verteidigung als antimikrobielle Wirkstoffe und Abschreckungsmittel sowie als UV-Schutz.

Flavonoide haben auch bedeutsame Aktivitäten, wenn sie von Tieren aufgenommen werden, und es besteht großes Interesse an ihrem potenziellen Gesundheitsnutzen, insbesondere für Verbindungen wie die Isoflavonoide, die mit der krebshemmenden Wirkung von Sojalebensmitteln in Verbindung gebracht werden. (Winkel-Shirley B., 2013)

Flavonoide haben vielversprechende gesundheitsfördernde Wirkungen in menschlichen Zellkulturen, Tierversuchen und klinischen Studien am Menschen gezeigt. Sie haben antioxidative, hypocholesterinämische, entzündungshemmende Wirkungen sowie die Fähigkeit, die Zellsignalübertragung, die Genexpression zu modulieren und die Entwicklung von Krankheiten zu beeinflussen. Die geringe Bioverfügbarkeit von Flavonoiden ist ein Problem, da sie ihre gesundheitlichen Wirkungen einschränken oder sogar behindern kann. Daher wird versucht ihre Bioverfügbarkeit zu verbessern, um die Wirksamkeit von Flavonoiden zu erhöhen. Flavonoide bestehen aus zwei aromatischen Kohlenstoffringen, die über eine Dreikohlenstoffbrücke verbunden sind (Abbildung II.). Basierend auf dem "C"-Ring gibt es sechs in Lebensmitteln übliche Flavonoidklassen: Flavonole, Flavan-3-ole (monomere und kondensierte Tannine), Isoflavone, Flavanone, Flavone und Anthocyanine.

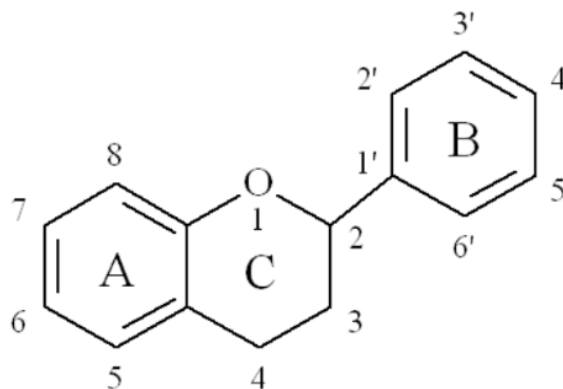


Abbildung II. Allgemeine chemische Struktur von Flavonoiden (Thilakarathna S. Rupasinghe H.P., 2013)

### 3.2. Gesamtphenole

Phenolverbindungen sind bekannte Phytochemikalien, die in allen Pflanzen vorkommen. Sie bestehen aus einfachen Phenolen, Benzoesäure und Zimtsäure, Cumarinen, Gerbstoffen, Ligninen, Lignanen und Flavonoiden. Pflanzliche Lebensmittel sind reich an Phenolen, d. h. Molekülen, die als Antioxidantien wirken können, um zur Vorbeugung von Herzerkrankungen, zur Verringerung von Entzündungen, zur Senkung des Auftretens von Krebserkrankungen und Diabetes, sowie die Mutagenese in menschlichen Zellen, verringern. Phenolische Verbindungen werden in Pflanzen teilweise als Reaktion auf ökologische und physiologische Belastungen wie Pathogen- und Insektenbefall, UV-Strahlung und Verwundung gebildet.

Pflanzliche phenolische Verbindungen werden je nach Anzahl der Phenoleinheiten im Molekül als einfache Phenole oder Polyphenole klassifiziert. Flavonoide gehören zu den häufigsten Phenolen, sind in Pflanzengewebe weit verbreitet und oft mit Carotinoiden und Chlorophyllen für die blauen, violetten, gelben, orangen und roten Farben der Pflanzen verantwortlich.

Eine weitere wichtige Klasse von phenolischen Verbindungen sind die Zellwandphenole. Sie sind unlöslich und kommen in Komplexen mit anderen Zellwandbestandteilen vor. Die beiden Hauptgruppen der Zellwandphenole sind Lignine und Hydroxyzimtsäuren. Diese Verbindungen spielen eine entscheidende Rolle in der Zellwand während des Pflanzenwachstums, indem sie vor Stressfaktoren wie Infektionen, Verwundungen und UV-Strahlung schützen. (Khoddami A. Wilkes M. Roberts T., 2013)

Während Obst und Gemüse viele freie Phenolsäuren enthalten (Abbildung III.), sind sie in Körnern und Samen, insbesondere in der Kleie oder Schale, häufig in gebundener Form vorhanden. Diese Phenolsäuren können nur durch saure oder alkalische Hydrolyse oder durch Enzyme freigesetzt werden.

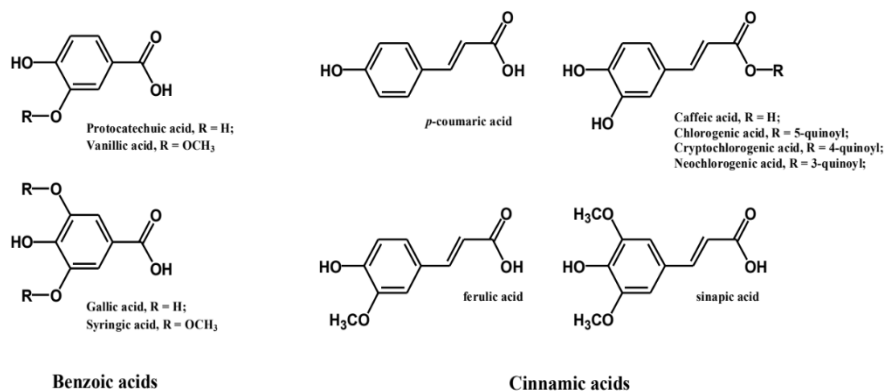


Abbildung III. Typisch phenolische Säuren in Lebensmittel

(Tsao R., 2010)

Ein Großteil der Beweise für die positive Wirkung von Polyphenolen in der Nahrung stammt aus Experimenten *in vitro* oder von Tiermodellen. Tatsächlich können Polyphenole mehrere spezifische biologische Wirkungen haben. Sie können die Vermehrung von Krebszellen und die Aufnahme von Cholesterin hemmen, die Regulierung des Zellzyklus und die Thrombozytenfunktionen beeinflussen und sie können auch endotheliale Dysfunktionen verhindern. (D'Archivio M. Filesi C. Varì R. Scazzocchio B. Masella R., 2010)

### 3.3. Chlorophyll

Chlorophyll, das am häufigsten vorkommende Pflanzenpigment, absorbiert das Sonnenlicht als Schlüsselfaktor für die Umwandlung von Sonnenenergie in chemische Energie während der Photosynthese (Abbildung IV.). Gleichzeitig ist Chlorophyll jedoch ein potenziell phototoxisches Molekül, dessen Biosynthese und Abbau streng kontrolliert werden muss.

(Das A. Guyer L. Hörtensteiner S., 2018)

Chlorophyll a und Chlorophyll b sind die essenziellen Bestandteile des Photosyntheseapparats von Landpflanzen und Grünalgen. Chlorophyll a ist für die Photochemie unerlässlich, während Chlorophyll b offenbar für die Photosynthese entbehrlich ist. Stattdessen ist Chlorophyll b für die Stabilisierung der wichtigsten lichtsammelnden Chlorophyll- bindenden Proteine von Bedeutung. Chlorophyll b wird aus Chlorophyll a synthetisiert und nach der Rückumwandlung in Chlorophyll a abgebaut. Dieses System der Umwandlung, zwischen Chlorophyll a und Chlorophyll b, wird als Chlorophyllzyklus bezeichnet. Der Chlorophyll b-Gehalt wird durch die Aktivität der drei am Chlorophyllzyklus beteiligten Enzyme bestimmt, nämlich der Chlorophyllid-a-Oxygenase, der Chlorophyll-b-Reduktase und der 7-Hydroxymethyl-Chlorophyll-Reduktase.

(Tanaka R. Tanaka A., 2011)

Der Abbau von Chlorophyll wurde als Diagnoseinstrument nicht nur für die Einleitung und das Fortschreiten der Blattseneszenz, sondern auch zur Überwachung anderer Prozesse der Pflanzenentwicklung, wie Reifung von Früchten und Samen sowie als Reaktion der Pflanzen auf biotische und abiotische Stressfaktoren definiert. (Das A. Guyer L. Hörtensteiner S., 2018)

Biosynthesen in etiolierten Blättern haben gezeigt, dass die lichtabhängige Phase der Biosynthese der verschiedenen Chlorophyll- Formen in einem Blatt eine komplizierte, verzweigte Kette von photochemischen und dunklen Reaktionen ist, an denen mehrere Chlorophyll-Vorläuferformen beteiligt sind. (Belyaeva O.B. Litvin F.F., 2015)

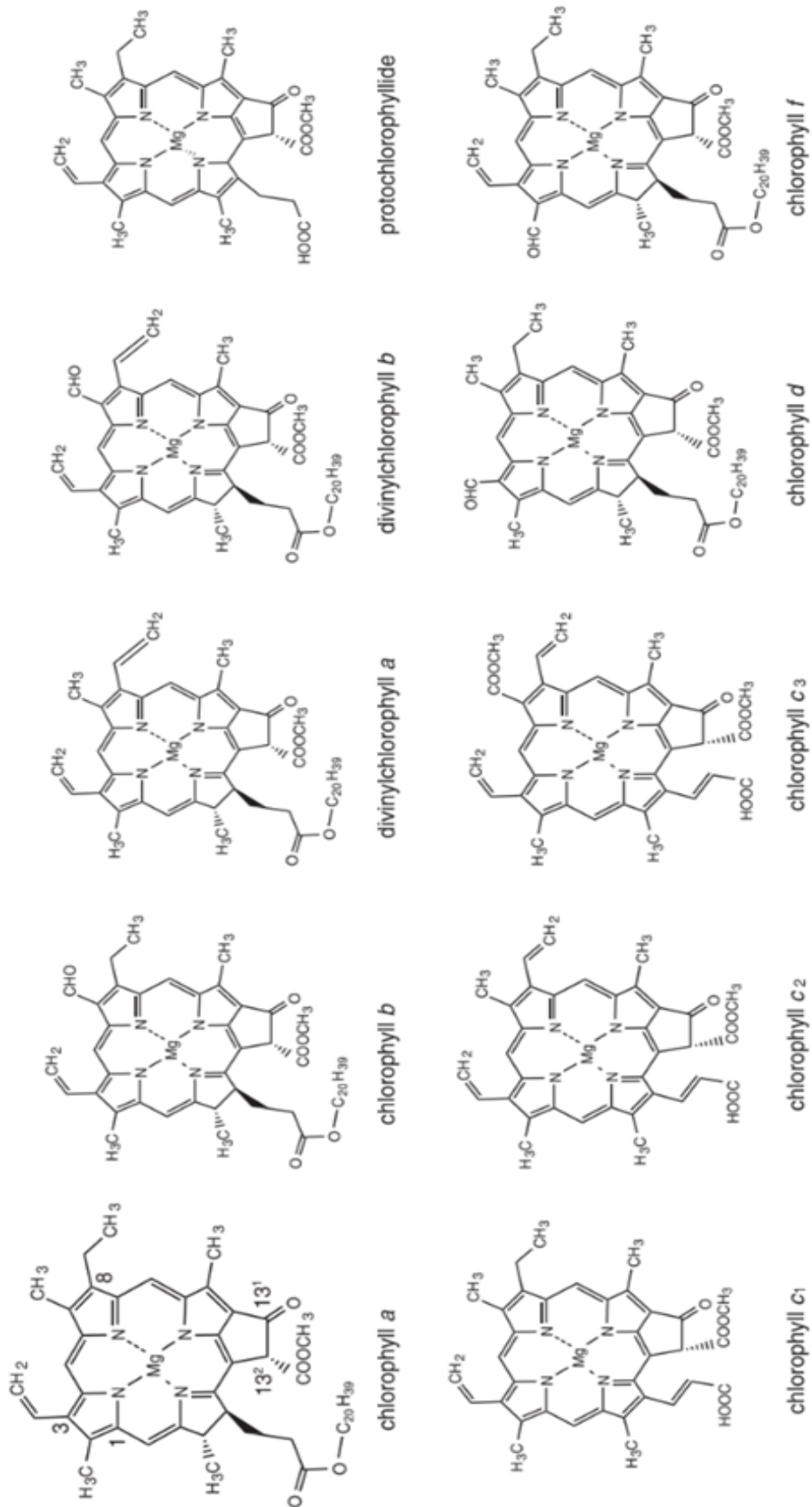


Abbildung IV. Diverse chemische Chlorophylle  
(Tanaka R. Tanaka A., 2011)

### 3.4. Carotinoide

Unter den Carotinoiden werden gelb gefärbte, lipophile Pigmente zusammengefasst, die in Plastiden vorkommen. Plastiden sind die Organellen für die Biosynthese und Speicherung von Carotinoiden in Pflanzenzellen. Es gibt verschiedene Arten von Plastiden, darunter Proplastiden, Etioplasten, Chloroplasten, Amyloplasten und Chromoplasten. Diese Plastiden unterscheiden sich erheblich in ihrer Fähigkeit, Carotinoide zu synthetisieren und zu speichern. Es liegt auf der Hand, dass die Plastiden eine zentrale Rolle bei der Steuerung der carotinogenen Aktivität, der Carotinoidstabilität und der Pigmentvielfalt spielen (Sun T, 2018).

Carotinoide sind zumeist C<sub>40</sub>-Terpenoide, eine Klasse von Kohlenwasserstoffen, die an verschiedenen biologischen Prozessen in Pflanzen beteiligt sind, z. B. an der Photosynthese, der Photomorphogenese, dem Photoprotektor und der Entwicklung. Carotinoide dienen auch als Vorstufen für zwei Pflanzenhormone und eine Reihe von Apocarotinoiden. Sie sind Farbstoffe und als Antioxidantien und Provitamin A wichtige Bestandteile der menschlichen Ernährung (Nisar N, 2015).

Zwei Vertreter der Carotinoide sind das  $\beta$ -Carotin und Lutein (Abbildungen V.-VI.)

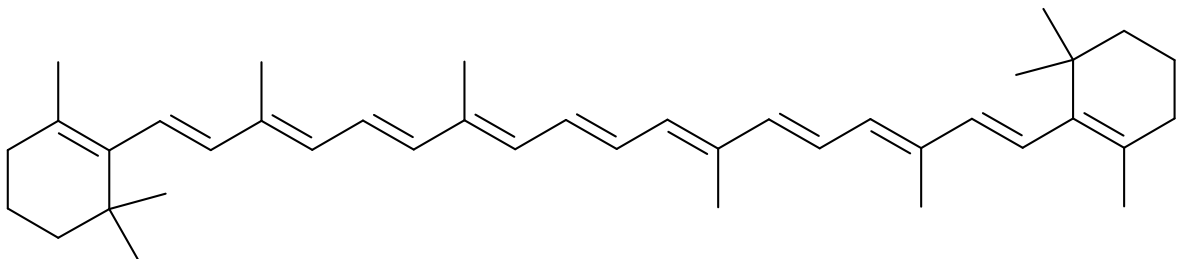


Abbildung V.  $\beta$ -Carotin Strukturformel

Xanthophylle sind oxidierte Carotinoide

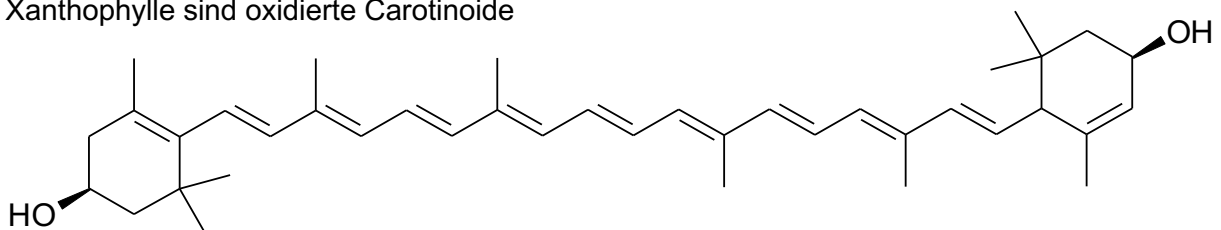


Abbildung VI. Lutein Strukturformel



## **4. Material und Methode**

### **4.1. Herkunft der Proben**

Alle Heuproben dieser Arbeit wurden zur Beurteilung an das Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe gesandt. Die genaue Herkunft oder Standorte sind nicht vollständig dokumentiert. Bei diesen Proben ist zudem nicht auszuschließen, dass es sich auch um Proben außerhalb von Österreich handelt.

Die Heuproben wurden nach den ersten Untersuchungen in Gräser Kräuter, Leguminosen, Bröckelverluste aufgeteilt und einzeln vermahlen. Für die Nährstoffbestimmung (Rohprotein, Rohasche, Rohfaser etc.) wurde jedoch die gesamte Heuprobe herangezogen. Die Heuproben sind für alle Messungen dieser Arbeit von dem Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe gemahlen zur Verfügung gestellt worden.

Es kamen 24 Heuproben zur Untersuchung, die in die Fraktionen Gräser, Kräuter und Bröckelverluste aufgeteilt wurden (Tabelle I.). Somit bestanden die 48 vorliegenden Fraktionen aus 24 Gräserproben, 13 Kräuter- und 11 Bröckelverlust-Proben. Eine der Kräuterproben (E-210539) bestand aus Leguminosen.

Tabelle I. Übersicht über die untersuchten Heuproben und deren Fraktionen (sortiert nach abnehmenden Gräseranteil in %)

Heu-Probe	% Gräser	% Kräuter	% Bröckelverl.	Anmerkung
E-210541	100			1. Schnitt
E-210542	100			1. Schnitt
E-210560	100			1. Schnitt
E_210561	99			1. Schnitt
E-210545	95			1. Schnitt, überständig
E-210548	94			1. Schnitt, überständig
E-210549	92			2. Schnitt
E-210554	91	1,3	7,7	1. Schnitt, überständig
E-210546	90,5			2. Schnitt
E-210551	90	4	6	1. + 2. Schnitt
E-210557	90	2,4	7,6	1. Schnitt
E-210559	90	4,2		1. Schnitt
E-210558	89	0,5		1. Schnitt
E-210544	88,9			1. + 2. Schnitt
E-210547	88,6			1. Schnitt
E-210552	88			1. Schnitt
E-210555	87,6	0,8	11,6	1. Schnitt
E-210550	87	4,2	8,8	2. Schnitt
E-210543	84,7	6,9	8,4	1. Schnitt
E-210553	84	8,4	7,6	1. Schnitt
E-210556	74,7	7,9	17,4	1. Schnitt
E-210539	74	8,6	17,4	1. Schnitt
E-210540	54,4	23,5	22,1	1. Schnitt, überständig
E-210538	41,9	22,5	35,1	1. Schnitt

## **4.2. Methoden zur Analyse der Gesamtphenole und Photosynthesepigmente**

### **4.2.1. Probenextrahierung**

#### **4.2.1.1. Allgemeines**

Um mit den Heuproben photometrische Tests durchführen zu können, müssen die fein gemahlene Proben zu einem Extrakt verarbeitet werden. Jenes Extrakt dient den weiterführenden Durchführungen um Ergebnisse zu erzielen und darauffolgend auszuwerten.

Für Proben-Extraktionen gibt es grundsätzlich unterschiedliche Methoden sowie Anwendungsbereiche für deren Einsatz.

#### **4.2.1.2. Durchführung**

##### Extraktion für Gesamtflavonoide,-phenole

Für die Extraktion der Proben wurden 0,3 g der gemahlene Heuproben in ein Glasgefäß (Fassungsvermögen 7 ml) eingewogen. Hierbei ist eine Standardabweichung von 5% für die Einwaage zu berücksichtigen, wurde aber für den weiteren Verlauf und deren Ergebnisse vernachlässigt. Für den Alkohol wurde eine 60%-ige Methanolösung hergestellt mit 99,9%-igem Alkohol und destilliertem Wasser. Die 0,3 g Heuprobe ist zu 6 ml Alkohol in die Gläser abgefüllt worden. Da Alkohol sehr flüchtig ist, wurde um den Verschluss zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Die Gläser sind dann für 30 min. in ein Ultraschallbad gestellt worden.

Anschließend sind die Gläser aus dem Bad entnommen, abgetrocknet und stehen gelassen worden, damit die Heupartikel zu Boden sinken konnten, um bei der späteren Filtration eine Erleichterung zu haben. Als Filtrationsmethode eignete sich ein Membran-Filter mit dem Durchmesser von 0,2 µm am besten. Die Proben wurden dadurch adäquat von jeglichen Zellwandgerüsten getrennt und sind für die weiteren Schritte zur Bestimmung der Gesamtflavonoide sowie Gesamtphenole verwendbar gewesen. Farblich befanden sich die Extrakte in einem hellen bis satten gelb.

### Extraktion für Chlorophyll

Für die Extraktion der gemahlenden Heuproben zur Chlorophyllbestimmung wurden 0,2 g in einen 25 ml Messkolben eingewogen. Hierbei ist ebenfalls eine Standardabweichung von 5% für die Einwaage zu berücksichtigen, wurde aber für den weiteren Verlauf und deren Ergebnisse vernachlässigt. Der Messkolben wurde mit ca. 20 ml Extraktionsmedium angefüllt und für eine Stunde (ohne Kühlung) in das Ultraschallbad gestellt. Nach dieser Zeit ist auf das Abkühlen des Kolbens abgewartet worden, um dann mit dem Extraktionsmedium auf die 25 ml-Marke aufzufüllen. Als Filtrationsmethode eignete sich ein 125 mm- Filterpapier, um das Extrakt von seinen Partikeln zu trennen und dann in ein geschlossenes Glasgefäß zu überführen. Da mit einer Aceton: Wasser-Lösung (1:4) als Lösungsmittel gearbeitet wurde, ist im Labor unter dem Abzug so rasch als möglich gearbeitet worden, da Aceton eine sehr flüchtige Substanz ist. Die Proben wurden dadurch vollständig von den festen Bestandteilen gefiltert und waren für die weiteren Schritte zur Bestimmung des Chlorophylls verwendbar. Die Extrakte zeigten eine mittelgrün-, bis dunkelgrüne Farbe.

#### **4.2.1.3. Anwendungsmethode und Vorgehensweise**

##### Gesamtflavonoide

Ziel ist die Gesamtflavoniodbestimmung in Pflanzenextrakten.

##### **Grundprinzip:**

Gemeinsam mit den Chemikalien Natriumnitrit und Aluminium-III-Chlorid ergeben Flavonoide im alkalischen Bereich einen rosarot gefärbten Komplex. Jene Farbentwicklung ist photometrisch anhand des Microplate-Readers quantitativ auswertbar. Um die Resultate auswerten zu können dient ein als Reinsubstanz verfügbares Flavonoid, wie Catechin, oder Rutin. Anhand einer Kalibrierungskurve werden die Ergebnisse in Äquivalenten zu diesem Flavonoid angegeben.

**Benötigte Chemikalien:**

Aqua dest.	
Natriumnitrit	69,0 g/Mol
Aluminium-III-Chlorid	241,4 g/Mol
Natronlauge	40,0 g/Mol
Flavonoid-Standard (Catechin)	

**Herstellung der Reagenzien:**

0,5 g Natriumnitrit in 20 ml Aqua dest. gelöst	2,5%
2g Aluminium-III-Chlorid in 20 ml Aqua dest. gelöst	10%
2g Natronlauge in 50 ml Aqua dest. gelöst	1 M
10 mg Flavonoid (Catechin) in 20 ml Methanol gelöst	0,5 mg/ml

**Vorgehensweise der Bestimmung:**

Die Eichreihe (Konzentrationsreihe des Standard-Flavonoids) sowie die Proben (zu berücksichtigen ist, dass bei jeder Mikrotiterplatten-Lesung die 11. sowie 12. Probe als zwei Standard-Heuproben mitgelaufen sind) werden auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Jede Eichreihe sowie jede Probe wird jeweils viermal pipettiert sowie gemessen. Von diesen vier Messungen wird der Durchschnitt, abzüglich des Nullwertes, verwendet. Das Ergebnis wird für die Einschätzung des Gesamtflavonoidgehaltes der Proben-Extrakte verwendet. (in Catechin-Äquivalenten veranschaulicht)

Eine Platte besteht aus 24 Spalten (à 2 mal 12 Spalten)

Für die Eichreihe werden 6 benötigt.

Insgesamt darf das Limit von 250 µl auf der Mikrotiterplatte nicht über-, oder unterschritten werden.

**Pipettierschema für die Eichreihe siehe Tabelle II.**

(Kalibrierungskurve steht im Verhältnis von Flavonoid-Stammlösung zu Wasser)

*Tabelle II. Pipettierschema für die Eichreihe: Gesamtflavonoide in  $\mu\text{l}$*

	<b>Flavonoid (0,5 mg/ml) in <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>dest. H<sub>2</sub>O in <math>\mu\text{l}</math></b>
1	0 (Nullwert)	140 (Nullwert)
2	5	135
3	10	130
4	15	125
5	20	110
6	25	95

Schritte 1-5 für das Pipettieren der Eichreihe:

1. 140-(0 bis 25)  $\mu\text{l}$  Aqua dest.
2. 0 bis 25  $\mu\text{l}$  Flavonoid-Stammlösung
3. 15  $\mu\text{l}$  der 2,5% Natriumnitrit-Lösung hinzufügen
4. 15  $\mu\text{l}$  der 10 % Aluminium-III-Lösung hinzufügen
5. nach 5 min 50  $\mu\text{l}$  1M NaOH hinzufügen

**Pipettierschema für Proben:**

1. 20  $\mu\text{l}$  ethanolisches Extrakt
2. 120  $\mu\text{l}$  Aqua dest.
3. 15  $\mu\text{l}$  der 2,5% Natriumnitrit-Lösung hinzufügen
4. 15  $\mu\text{l}$  der 10% Aluminium-III-Chlorid-Lösung hinzufügen
5. nach 5 Minuten 50  $\mu\text{l}$  1M NaOH hinzufügen

Für die Nullwertmessung wurde statt der 20  $\mu\text{l}$  Extrakt 20  $\mu\text{l}$  Lösungsmittel verwendet.

Die Inkubationszeit beträgt 5 Minuten, wobei die Mikrotiterplatte mit Parafilm abgedeckt wird, da mit flüchtigen Substanzen gearbeitet wird und so eine Verdunstung dieser Stoffe reduziert werden kann. Nach den 5 Minuten wird bei 490 nm Filter photometrisch gemessen.

### Gesamtphenole

Ziel ist die Bestimmung der Gesamtphenolbestimmung in Pflanzenextrakten.

#### **Grundprinzip:**

Die gesamten phenolische Inhaltsstoffe können mit Hilfe des Folin-Ciocalteu-Reagenz (FCR) gemessen werden. Gemeinsam mit dem FCR reagieren die phenolischen Inhaltsstoffe des Pflanzenextraktes in einem basischen Milieu. Es folgt die Ausbildung einer blauen Farbe, welche man photometrisch messen kann. Anhand einer Kalibrierungskurve werden die Ergebnisse in Catechin-Äquivalenten zu diesem Flavonoid geschätzt.

#### **Benötigte Chemikalien:**

Folin-Ciocalteu Reagenz
Aqua dest.
Catechin, Gallussäure (Standard)
Natriumcarbonat

#### **Herstellung der Reagenzien:**

10 mg Catechin/Gallussäure	in 250 ml Aqua dest. gelöst	0,5 µg/µl
35g Natriumcarbonat	in 200 ml Aqua dest. gelöst	0,35 mg/ml

#### **Vorgehensweise der Bestimmung:**

Die Eichreihe (Konzentrationsreihe des Catechins/der Gallussäure) sowie die Proben (zu berücksichtigen ist, dass bei jeder Mikrotiterplatten-Lesung die 11. sowie 12. Probe als zwei Standard-Heuproben mitgelaufen sind) werden auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Jede Eichreihe sowie jede Probe wird jeweils viermal pipettiert sowie gemessen. Von diesen vier Messungen wird der Durchschnitt, abzüglich des Nullwertes, verwendet. Das Ergebnis wird für die Berechnung des Gesamtphenolgehaltes der Proben-Extrakte verwendet. (in Catechin-Äquivalenten sowie Gallussäure-Äquivalenten veranschaulicht)

Eine Platte besteht aus 24 Spalten (à 2 mal 12 Spalten).

Für die Eichreihe werden 6 benötigt.

Insgesamt darf das Limit von 250 µl auf der Mikrotiterplatte nicht über-, oder unterschritten werden.

**Pipettierschema für die Eichreihe siehe Tabelle III.**

(Kalibrierungskurve steht im Verhältnis von Flavonoid-Stammlösung zu Wasser)

*Tabelle III. Pipettierschema für die Eichreihe: Gesamtphenol in µl*

<b>Catechin / Gallussäure (0,5 mg/ml) in µl</b>	<b>Aqua dest. in µl</b>	<b>µg / Ansatz</b>
0 (Nullwert)	110 (Nullwert)	0
2	108	1,0
4	106	2,0
6	104	3,0
8	102	4,0
12	98	6,0

Schritte 1-5 für das Pipettieren der Eichreihe:

1. 5 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz (FCR) hinzufügen
2. 3 Minuten schütteln
3. 10 µl der Natriumcarbonat-Lösung hinzufügen
4. 15 µl der 10 % Aluminium-III-Lösung hinzufügen
5. 125 µl Aqua dest. hinzufügen



### Pipettierschema für Proben

1. 100 µl Aqua dest.
2. 10 µl Extrakt (Probe)
3. 5 µl der Folin-Ciocalteu-Reagenz hinzufügen
4. 10 µl der Natriumcarbonat-Lösung hinzufügen
5. 125 µl Aqua dest. hinzufügen

Für die Nullwertmessung wurde statt der 10 µl Extrakt 10 µl Lösungsmittel verwendet.

Die Inkubationszeit beträgt 60 Minuten, wobei die Mikrotiterplatte mit Parafilm abgedeckt wird, da mit flüchtigen Substanzen gearbeitet wird und so eine Verdunstung dieser Stoffe reduziert werden kann. Die Mikrotiterplatte wird für die Inkubationszeit im Dunkeln stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird bei 750 nm photometrisch gemessen.

### Chlorophylle und Carotinoide

Ziel ist die photometrische Bestimmung von Chlorophyll a, Chlorophyll b und Gesamtcarotinoiden in Pflanzenextrakten.

#### **Grundprinzip:**

Gemeinsam mit einem lipophilen Lösungsmittel werden die Pigmente extrahiert. In einem Absorptionsspektrum von 400-750 nm werden diese photometrisch aufgenommen. Anhand der ausgewählten Wellenlängen werden die Chlorophyll-, und Carotinoidgehalte berechnet.

#### **Benötigte Chemikalien:**

Aceton
Aqua dest.

**Herstellung des Extraktionsmediums:**

Für das Extraktionsmedium wird in den Versuchen Aceton und Aqua dest. verwendet. Grundsätzlich gibt es mehrere Möglichkeiten für das Anmischen des Extraktionsmediums- für diese Studie wird Aceton: Wasser gewählt.

Aceton: Wasser = 4:1

**Vorgehensweise der Bestimmung:**

Nach der Extraktion der Proben werden die Extrakte photometrisch gemessen. Da es sich um ein Aceton-haltiges Extraktionsmedium handelt werden gläserne und keine Plastikkuvetten für die Ausmessung verwendet. Hierzu wird das Extrakt zu  $\frac{3}{4}$  in eine gläserne Messküvette pipetiert. Die Referenzküvette wird mit Extraktionsmedium zu  $\frac{3}{4}$  befüllt und dient auch als Nullwert. Das Absorptionsspektrum wird von 400-750 nm aufgezeichnet.

Chlorophyll a, Chlorophyll b und Gesamtcarotinoide in den Extrakten wird dann nach Lichtenthaler und Buschmann (2001) mit den Formeln:

$(\mu\text{g/ml}) \text{ Chl a} = 12,25 * A_{663} - 2,79 * A_{647}$
$(\mu\text{g/ml}) \text{ Chl b} = 21,50 * A_{647} - 5,10 * A_{663}$
$(\mu\text{g/ml}) \text{ Carot} = (1000 * A_{470} - 1,82 * \text{Chl a} - 85,02 * \text{Chl b}) / 198$

Berechnet, wobei  $A_{470}$ ,  $A_{647}$  und  $A_{663}$  für die Extinktionen der Extrakte bei den Wellenlängen 470, 647 und 663 nm stehen. Anschließend werden die Gehalte noch auf die Einwaage (mg/g Trockensubstanz Heufraktion) bezogen.

Beispiel eines Absorptionsspektrum (400-750 nm) eines Extraktes (E21\_0553). Die Extinktionswerte bei 470, 647 und 663 nm wurden zur Berechnung der Photosynthesepigmente herangezogen. (Abbildung VII.)

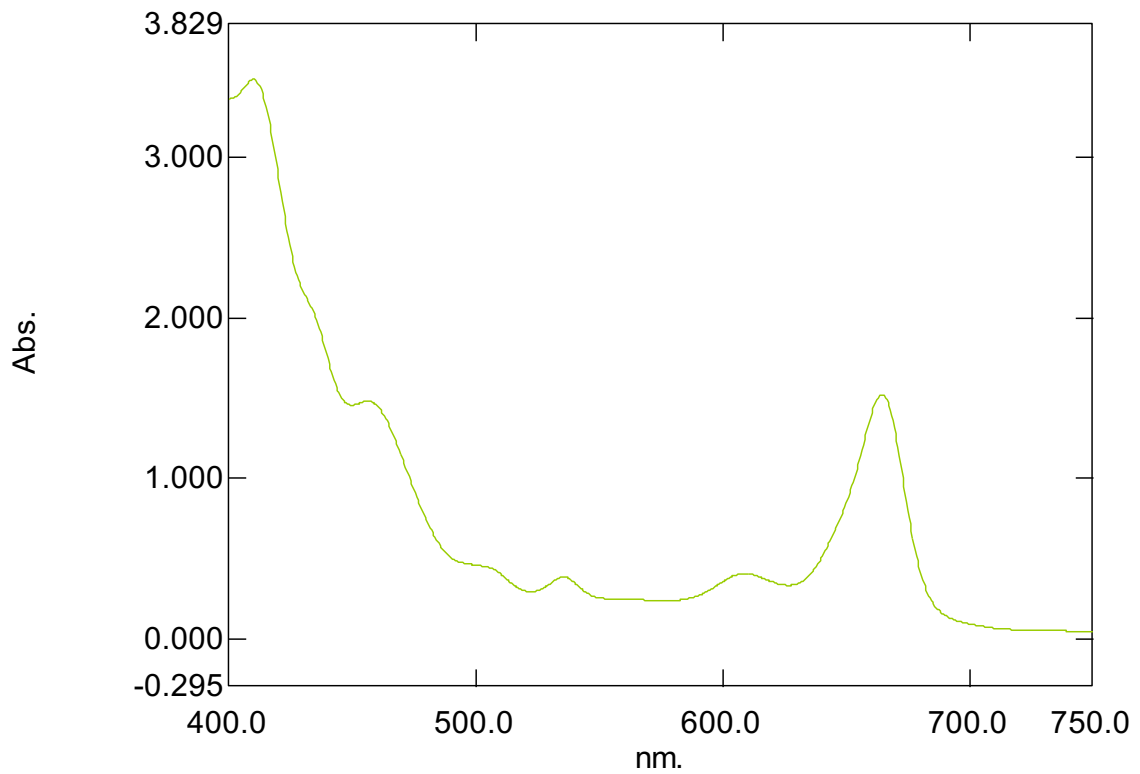


Abbildung VII. Extinktionswerte eines Extraktes

Statistik:

Für die nachfolgenden Ergebnisse wurden die erzeugten Boxplot-Diagramme und Korrelationen nach Pearson mit dem Programm SPSS Version 26 berechnet.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### Ergebnisse

#### 1. Zusammensetzung der Heuproben

Insgesamt bestanden 20 Heuproben zu mehr als 80% aus Gräsern. Bei 11 Heuproben konnten alle drei Fraktionen, Gräser, Kräuter und Bröckelverluste, untersucht werden. Die Zusammensetzung dieser Proben ist in untenstehender Abbildung VIII. angegeben (hellgrün: Gräser, dunkelgrün: Kräuter, braun: Bröckelverluste).

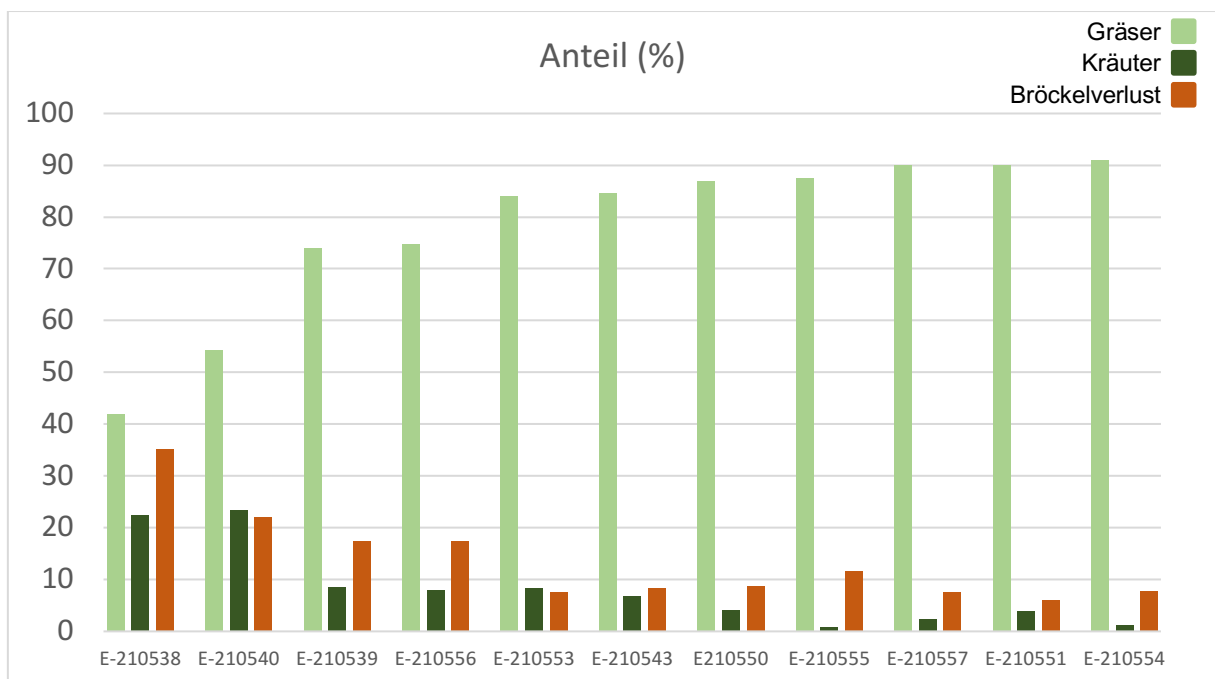


Abbildung VIII. Zusammensetzung Heuproben in %

2. Gesamtphenole, Gesamtflavonoide und Photosynthesepigmente in den Heufraktionen  
Der Bröckelverlust zeigt den höchsten Chlorophyllgehalt, während Gräser und Kräuter signifi-  
kant weniger zeigen (Abbildung IX.).

(Kräuter: n = 13 (12 Kräuter + 1 Leguminosen), Gräser: n = 24, Bröckelverluste: n = 11)

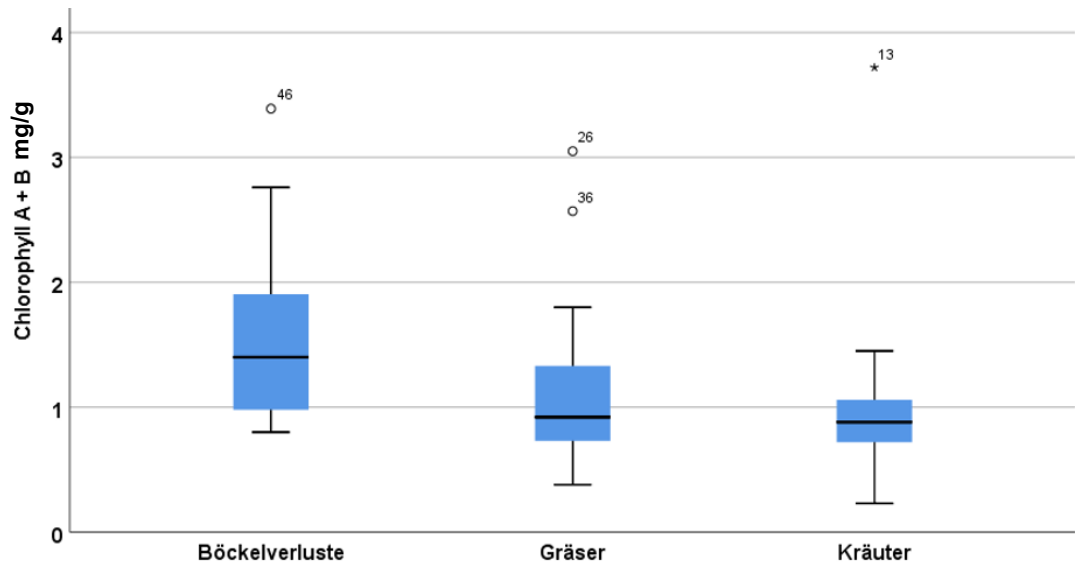


Abbildung IX. Boxplot Heuproben: Chlorophyll a und b Messungen in mg/g

Die Bröckelverluste zeigen bei den Carotinoiden die höchsten Median-Werte, aber auch die höchsten Streubreiten und sind damit deutlich höher als bei den Gräsern und Kräutern. Das ist auf den Verlust von wichtigen Bestandteilen der Pflanze, welche eine hohe Photosyntheseaktivität haben, zurückzuführen (Abbildung X.).

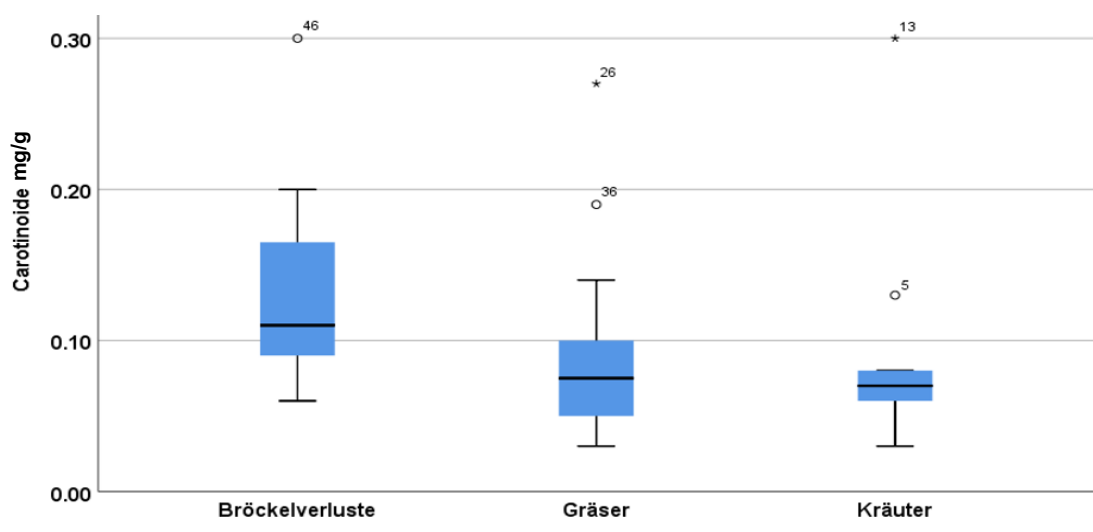


Abbildung X. Boxplot Heuproben: Carotinoide Messungen in mg/g

Den größten Gesamtphenolwert haben die Kräuter und danach die Bröckelverluste, welches auf das Blätterreichtum zurückzuführen ist und dadurch zu erhöhten Phenolwerten führt (Abbildung XI.).

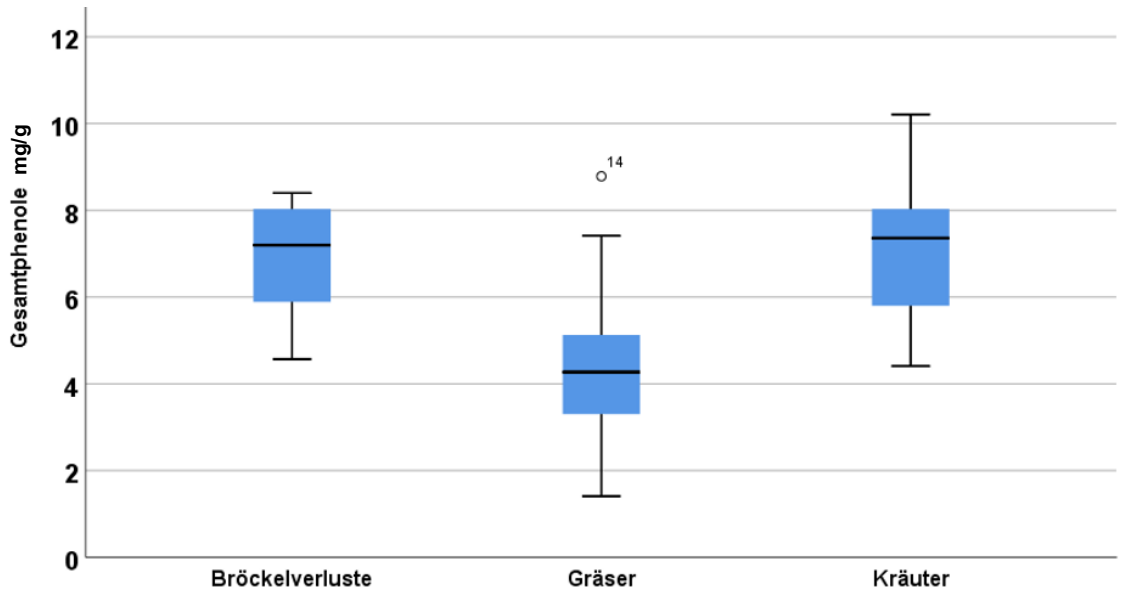


Abbildung XI. Boxplot Heuproben: Gesamtphenole in mg Catechinäquivalente/g

Ähnlich wie bei den Gesamtphenolen haben Kräuter die höchsten Werte an Gesamtflavonoiden. Da Flavonoide eine Untergruppe der Phenole sind, und Kräuter den höchsten Blattanteil haben, liegt bei ihnen der höchste Anteil sowie Wert der Gesamtflavonoide (Abbildung XII.).

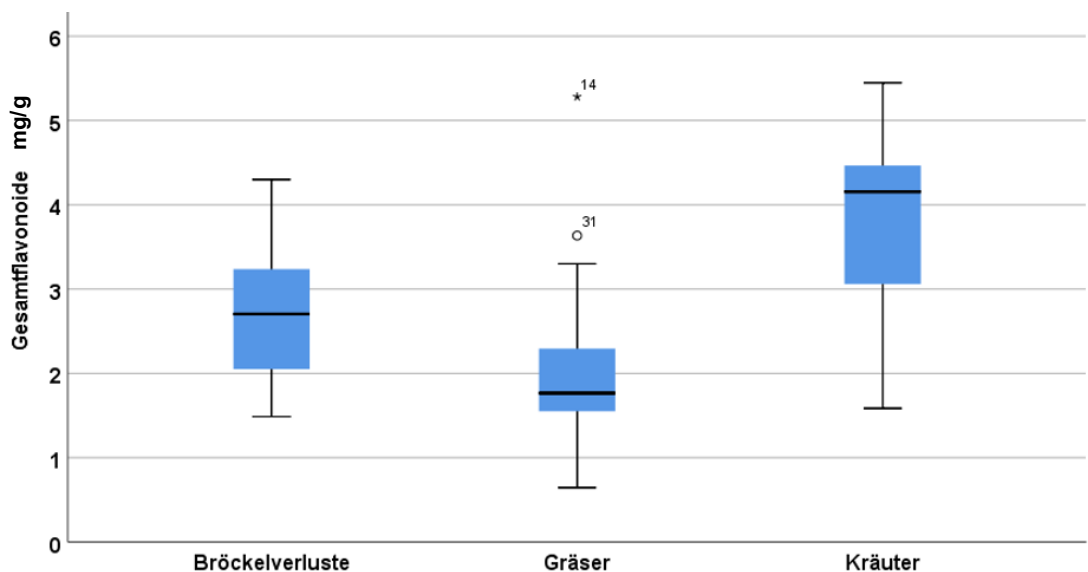


Abbildung XII. Boxplot Heuproben: Gesamtflavonoide in mg Catechinäquivalente/g

Die Abbildungen XIII. – XVI. zeigen Gesamtphenole, Gesamtflavonoide und Photosynthesepigmente in den Fraktionen der einzelnen Proben (hellgrün: Gräser, dunkelgrün: Kräuter, braun: Bröckelverluste):

Meistens sind höhere Gesamtphenol- und Gesamtflavonoid-Gehalte in den Kräutern und Bröckelverlusten als in den Gräsern.

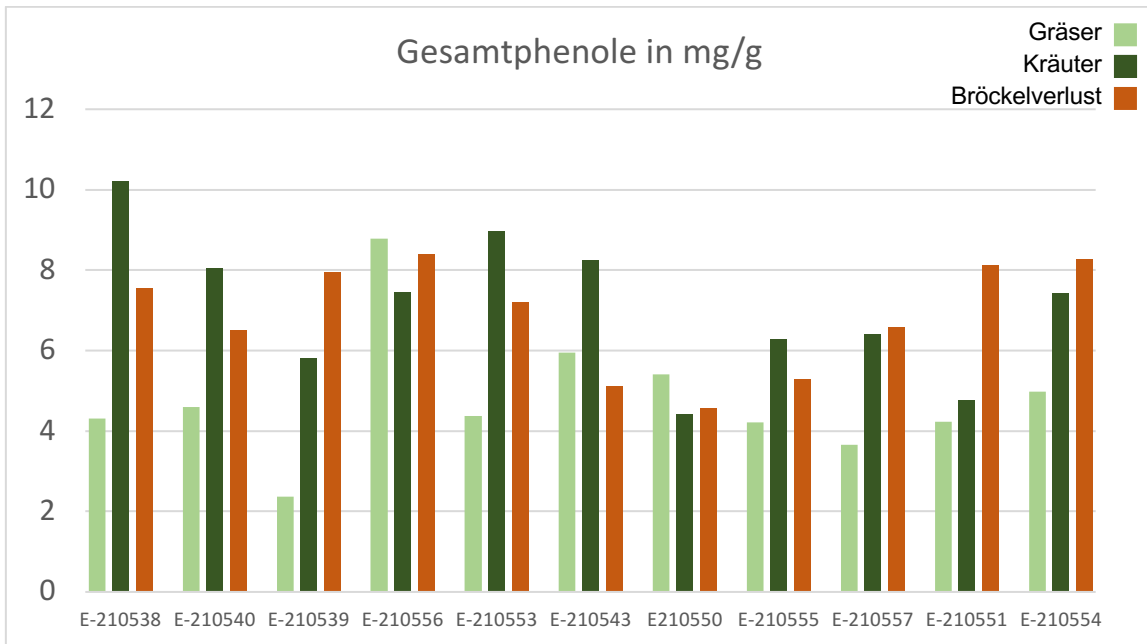


Abbildung XIII. Gesamtphenole (mg/g Catechinäquivalente) in den Fraktionen von 11 Heuproben (sortiert nach aufsteigendem Gräseranteil)

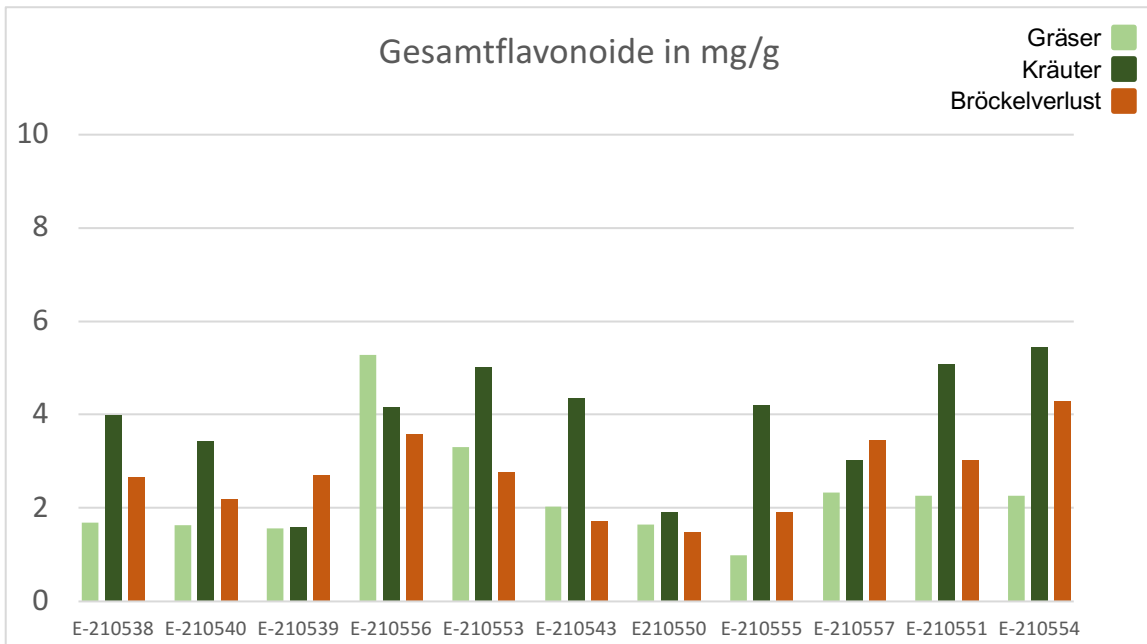


Abbildung XIV. Gesamtflavonoide (mg/g Catechinäquivalente) in den Fraktionen von 11 Heuproben (sortiert nach aufsteigendem Gräseranteil)

Innerhalb einer Heuprobe weisen Kräuter und Gräser oft vergleichbare Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalte auf, während Bröckelverluste bei diesen Parametern oft höhere Werte erreichen. Das wird dadurch bedingt, dass Bröckelverluste vorwiegend aus Blattfragmenten bestehen, während in den Gräser- und Kräuterfraktionen zumeist ein hoher, chlorophyllärmerer Anteil an Stängeln vorkommt.

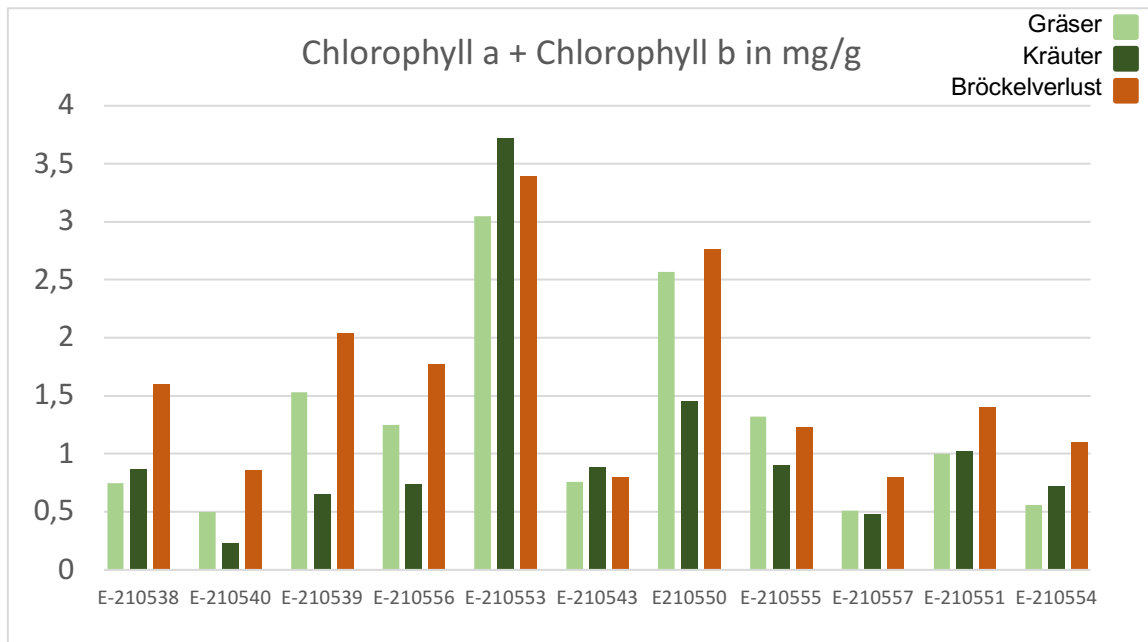


Abbildung XV. Chlorophyllgehalt (mg/g) in den Fraktionen von 11 Heuproben (sortiert nach aufsteigendem Gräseranteil)

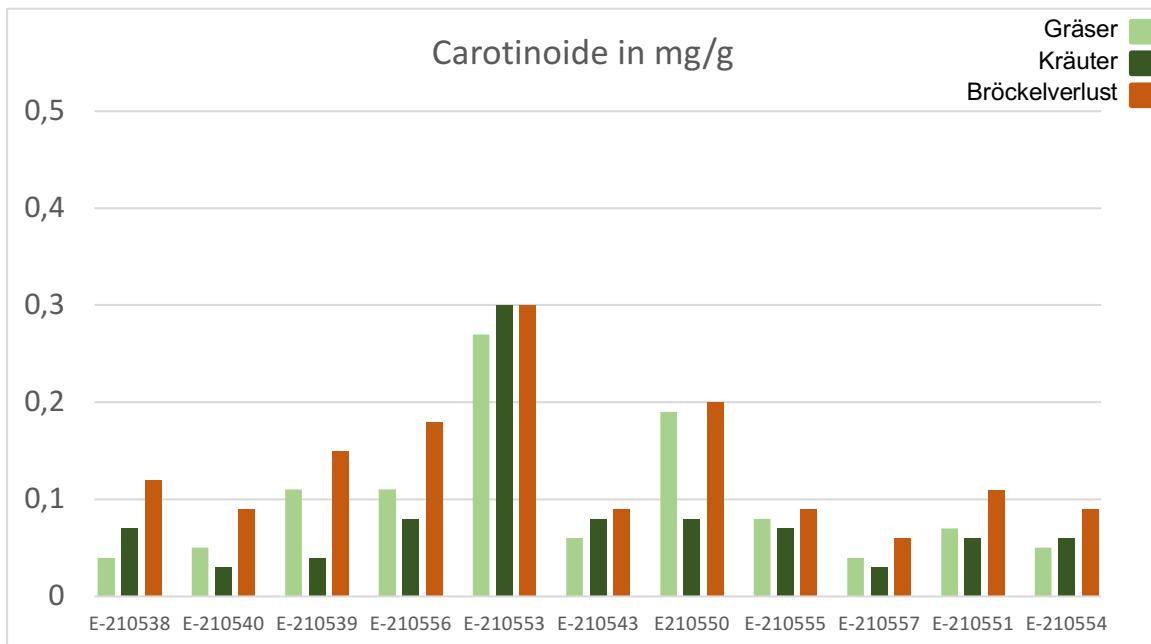


Abbildung XVI. Gesamtcarotinoid (mg/g) in den Fraktionen von 11 Heuproben (sortiert nach aufsteigendem Gräseranteil)



### 3. Zusammenhang zwischen den Inhaltsstoffen in kompletten Heuproben.

Für die 24 Heuproben wurden am Institut für Tierernährung und Funktionelle Pflanzenstoffe in der Arbeitsgruppe Tierernährung auch die grobsinnlichen Qualitätsmerkmale (Farbe, Gefüge, Qualitätspunkte) sowie die Inhaltsstoffklassen (Rohasche, Rohprotein, Rohfasern) erhoben. Bei 11 Heuproben wurden die Fraktionen Gräser, Kräuter, Bröckelverluste einzeln auf Gesamtflavonoide, Gesamtphenole und Photosynthesepigmente untersucht. Deshalb mussten für letztere, entsprechend der Zusammensetzung der Heuproben, die Werte auf die gesamte Heuprobe umgerechnet werden.

Schließlich wurden 4 weitere Heuproben dazugenommen, die aus 99-100% Gräsern bestanden, so dass für die weiteren Korrelationsrechnungen Daten von 15 kompletten Heuproben vorlagen (Tabelle IV.).

Tabelle IV. Korrelationen nach Pearson zwischen Qualitätsmerkmalen und Inhaltsstoffen in gesamten Heuproben (n = 15)

	Flavonoide	Carotin	Chl A + B	Gräseranteil	QualPkt	Gefüge	Farbe	Rohasche	Rohprotein	NDFOM10	ADFOM10
Phenole	.717**	0,089	-0,013	-.521*	-0,052	-0,077	-0,121	0,124	-0,010	-.565*	-0,230
Flavonoide		0,373	0,232	-0,352	-0,083	0,227	0,075	0,202	0,195	-.569*	-0,314
Carotin			.963**	-0,120	0,342	.549*	0,005	.699**	.885**	-.788**	-.866**
Chl A + B				-0,072	0,457	.610*	0,004	.763**	.927**	-.749**	-.851**
Gräseranteil					0,272	0,243	0,007	-0,071	-0,166	0,471	0,251
QualPkt						.634*	-0,328	0,478	0,508	-0,312	-0,379
Gefüge							0,099	.584*	.683**	-0,432	-.597*
Farbe								-0,289	-0,184	-0,006	-0,001
Rohasche									.802**	-.616*	-.669**
Rohprotein										-.721**	-.858**
NDFOM10											.883**

Signifikante Korrelationen sind farblich hervorgehoben (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

Da Flavonoide eine Untergruppe der Gesamtphenole sind, muss eine hohe Korrelation zwischen diesen beiden Inhaltsstoffen bestehen, welche auch hier als positive Korrelation abzulesen ist. Weiters herrscht ein starker Zusammenhang zwischen Chlorophyll a und b sowie dem Carotin. Da Carotinoide sowie Chlorophylle Teil der natürlichen Farbstoffe der Pflanzen sind, ist hier ein starker Zusammenhang erwünscht. Bei dem Zusammenhang zwischen Chlorophyll a und b mit Rohprotein kann man darauf schließen, dass Pflanzenanteile mit viel Protein, wie Blätter, auch der Ort für eine erhöhte Photosyntheseaktivität, und damit vermehrter Erzeugung von Chlorophyll, ist.

#### 4. Vergleich von 15 Heuproben in einem Dendrogramm

Zur Berechnung der Ähnlichkeiten und der Darstellung im Dendrogramm werden mehrere Merkmale ausgewertet. Die 15 untersuchten Heuproben wurden dabei grob in drei Gruppen aufgeteilt (Abbildung XVII).

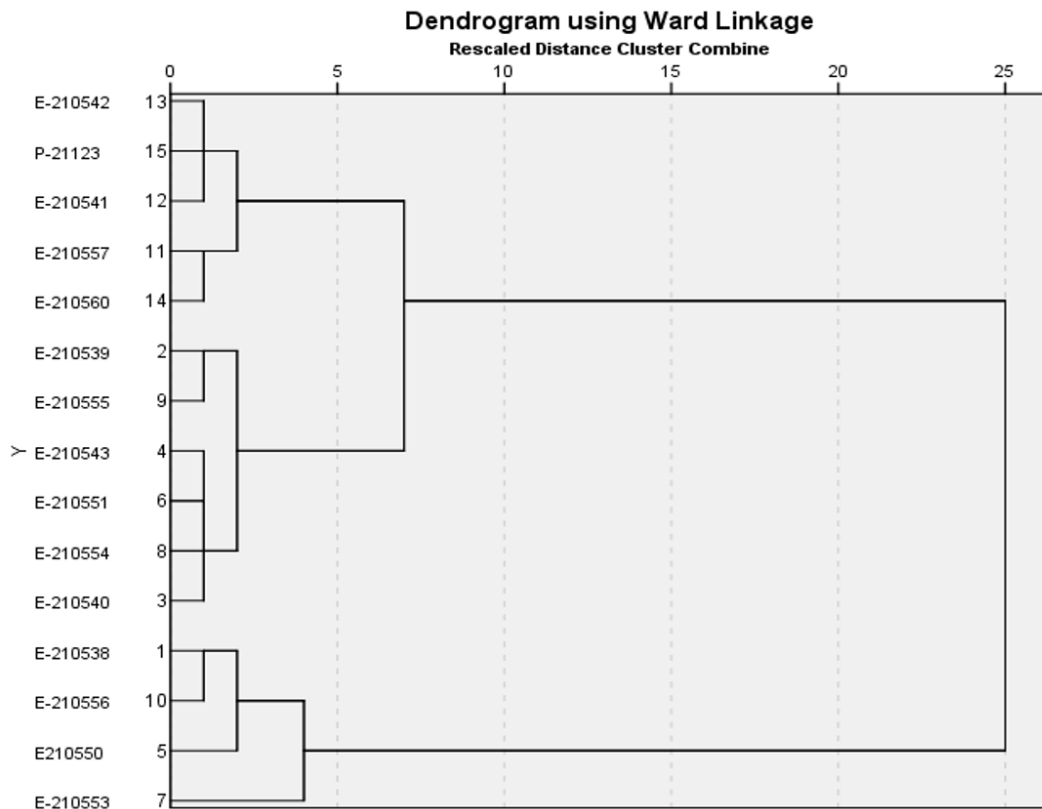


Abbildung XVII. Dendrogramm: Merkmalszusammenhang von 11 Gräserproben anhand von ähnlichen Merkmalen

Ein Vergleich der Mittelwerte für die einzelnen Parameter in den drei Gruppen des Dendrogramms ist in Tabelle V. angegeben

*Tabelle V. Vergleich der im Dendrogramm ausgewiesenen Gruppen*

	<b>oben Gruppe 1</b>	<b>mitte Gruppe 2</b>	<b>unten Gruppe 3</b>
N	5	6	4
Gräseranteil %	97.80	80.28	71.90
Phenole (mg/g)	4.14	4.93	6.41
Flavonoide (mg/g)	1.68	2.02	3.12
Carotinoide (mg/g)	0.05	0.07	0.16
Chlorophyll a + b (mg/g)	0.70	0.96	2.01
Qualitätspunkte	94.00	96.67	112.50
Gefüge	3.60	4.17	4.50
Farbe	2.80	1.50	2.25
Rohasche (%)	6.82	8.12	9.45
Rohprotein (%)	6.87	10.26	12.66
NDFOM (%)	73.66	65.20	51.25
ADFOM (%)	44.46	39.07	34.26

Gruppe 1 (oben) umfasst die Heuproben, die fast ausschließlich aus Gräsern bestehen, während Gruppe 3 den geringsten Gräseranteil aufweist. Dementsprechend findet man in Gruppe 1 Proben mit niedrigeren Gesamtphenolen, Gesamtflavonoiden, Chlorophyll, Carotinoiden, Rohasche und Proteingehalten aber mit höheren Rohfaser-Werten. Bei den Kräuterreichen / Gräserarmen Heuproben der Gruppe 3 verhält es sich umgekehrt. Die Proben der Gruppe 2 liegen dazwischen.

## Diskussion

### Gesamtauswertung aller 48 Heufraktionen qualitativer und quantitativer Werte

Aufgrund der Endergebnisse kann gesagt werden, dass die farbliche Kategorisierung der Sinnenprüfung nicht mit dem Chlorophyll a oder Chlorophyll b zusammenhängt. Das Merkmal Farbe korrelierte mit keiner der anderen erhobenen Parameter (Tabelle IV). Beide Chlorophyllfraktionen korrelieren positiv miteinander als auch mit den Carotinoiden und dem Gefüge. Hier besteht die Annahme, dass blätterreiches Heu einen hohen Chlorophyllanteil besitzt und so auch die Qualitätspunkte beeinflusst. Nach dem ÖAG-Schlüssel (Abbildung I.) wird einem Heu mit guter, typischer Farbe 4 oder 5 Punkte zugeordnet, während bereits verfärbte oder ausgebleichene Proben 3 oder weniger Punkte bekommen. Unter den 24 Heuproben waren nur 2 (E21\_0539 und E21\_0559), die jeweils mit 4 Farb-Punkten bewertet worden sind. Der Chlorophyllgehalt in der Hauptfraktion der Gräser lag mit 0,85 und 1,53 mg/g mal unter dem Durchschnitt und mal über dem Durchschnitt von 1,24 mg/g. Es können daher in farblich schlechter bewerteten Proben durchaus noch hohe Chlorophyll-Werte gemessen werden.

Auf Basis der Werte kann angenommen werden, dass ein hoher Anteil an Rohfasern in Heu zu einem niedrigen Anteil an Chlorophyll führt, da es Blattarm und Stängelreich ist.

Die Korrelation von Chlorophyll a mit Rohprotein kommt dadurch zustande, dass ein blätterreiches Heu auch chlorophyllreich ist und somit viel Protein enthält, wodurch es zu einem niedrigen Zellwandmaterialanteil kommt. Die Gesamtphenole sowie Gesamtflavonoide korrelieren, wie erwartet, positiv miteinander. Der Zusammenhang von den Phenolen mit aNDFOM kann dadurch erklärt werden, dass Zellulose ausgelöst wurde.

### Kräuter

Aufgrund der vergrößerten Blattmasse haben Kräuter die meisten Phenole und Flavonoide. Man sieht einen sehr guten Zusammenhang zwischen Rohprotein und Chlorophyll a und b, welche vermutlich auf der Blattmasse beruhen. Die Blätter sind reich an Proteinen, welche mit der Photosynthese zu tun haben. Die gesamten Synthesen der Zucker finden in Blättern vermehrt statt, und da Kräuter den größten Blattanteil haben, besitzen sie den höchsten Proteingehalt aller Proben.

## Gräser

Der Gräseranteil der Heuproben variierte von 47-100%. Grasarme Proben haben höchstwahrscheinlich einen höheren Proteingehalt durch eine eventuell frühere Ernte, wo ein höherer Kräuteranteil ist und es durch den Kräuterreichtum zu einer Gräserverdrängung kommt, da Kräuter blattreicher sind. Die erhobenen Proteinwerte stehen immer für die gesamte Probe - ergo muss es zu einer Gräserverdrängung kommen. Dies führt zum Schluss, dass Gräserreichtum mehr Rohfasergehalt bedeutet.

## Zusammenhang der Mittelwerte aller 48 Heufraktionen

Der direkte Vergleich der Heufraktionen „Gräser“, „Kräuter“ (respektive einer Probe Leguminosen) und „Bröckelverlust“ kann zwischen den photometrischen Daten und der Sinnenprüfung nicht direkt verglichen werden. Da bei der Sinnenprüfung des Heus der Gesamteindruck bewertet wird, und nicht die Unterfraktionen einzeln, geben die Werte nur eine Aussage über den Gesamtstatus des Heus, aber nicht explizite Aussagen über die Gräser-, Kräuter-, und Bröckelverlustproben.

## **Gräsergruppierung und Zusammenhänge anhand von Heufraktionen**

In den untersuchten Proben ergaben sich elf Heuproben, von denen die Fraktionen Gräser, Kräuter sowie Bröckelverlust vorhanden waren. Der Vergleich der Fraktionen innerhalb dieser Dreiergruppen (Abbildung XIII – XVI) zeigt, dass sehr viele Nährstoffe verloren gehen und sich im Bröckelverlust ansammeln. Dadurch entsteht ein großer Nährstoffverlust im Heu, da der Bröckelverlust als nicht verwertbarer Teil des zu fütternden Heus übrigbleibt.

Die Überlegung bezüglich dieser Auswertung liegt auch darin, inwiefern das Heu verarbeitet und geerntet wird. Es stellt sich die Frage, inwieweit die Trocknung und Lagerung berücksichtigt werden, und demnach ein erhöhtes oder erniedrigtes Abbröckeln entsteht.

Bei einer Dreiergruppe (E\_210553) waren die Chlorophyll-Werte sehr hoch. Hier liegt die Vermutung nahe, dass dieses Heu eventuell besser getrocknet wurde und daher der hohe Wert in Chlor a in allen drei Fraktionen zu erklären ist.

Bei den jeweiligen Heuproben ist die Zusammensetzung innerhalb der Gräser oder Kräuter ebenfalls zu beachten. So wurde auch versucht, möglichst viele Pflanzen in den Heuproben zu identifizieren (Tabelle im Anhang), aber die Proben enthielten immer viele Stängel- und

Blattanteile, die nicht zugeordnet werden konnten. Eine Aufschlüsselung des Anteils einzelner Pflanzenarten in den Heuproben ist daher nicht möglich.

Mit den dargelegten Werten steht die Fragestellung im Raum, inwieweit man die Sinnenprobe als Basiswerte heranziehen kann, da diese auf subjektivem Beurteilen ruhen und auch personenabhängig sind. Selbst wenn sehr erfahrene Prüfer die Untersuchungen durchführen, existiert trotz alledem eine gewisse Ungenauigkeit, welche im Labor bei quantitativen Auswertungen nicht berücksichtigt werden kann.

Auch das Korrelieren von Werten mit ordinaler und metrischer Skala bringt die Frage mit sich, ob der tatsächliche Vergleich korrekt gegeben ist. Während die Laboruntersuchungen mit ausgewählten Stoffen als Referenzen geeicht werden, gibt es in der Sinnenprüfung nur ein Einstufungssystem von z.B gut bis schlecht, wobei die Übergänge zwischen den Stufen fließend verlaufen.

Als Möglichkeit, die photometrischen Werte noch genauer fraktioniert zu untersuchen, wäre eine Untersuchung mit HPLC als beste Methode geeignet. Insbesondere bei den Messungen von Chlorophyll a, Chlorophyll b und den Carotinoiden wäre es interessant herauszufinden, wie genau die Konzentrationsverteilungen der jeweiligen Werte liegen.

Die größte Schwierigkeit besteht jedoch darin, dass die Sinnenprüfung nicht in einzelnen Fraktionen untersucht (Untersuchung Kräuter, Gräser, Leguminosen etc.), sondern gemeinsam bewertet wird. Somit werden dann alle quantitativ ausgewerteten Ergebnisse in gewisser Weise auf alle Einzelfraktionen des Heus überschlagsmäßig verallgemeinert und sind damit eventuell nicht sehr aussagekräftig.

Für zukünftige Versuche wäre es von Vorteil, sowohl das gesamte Heu als auch alle Einzelbestandteile zu bewerten, um dann einen direkten Vergleich zwischen Gesamtheu und Gräser, Kräuter, Leguminosen etc. zu haben.

## 6. Zusammenfassung

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Proben wurden im Rahmen einer Heuprobensammlung der Arbeitsgruppe Tierernährung, des Instituts für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe der Veterinärmedizinischen Universität Wien, hinsichtlich einer Datenerfassung verschiedenster Heuproben zur Verfügung gestellt.

Nach dem photometrischen Auswerten der Werte Gesamtflavonoide, Gesamtphenole und Chlorophyll a und b, wurden diese unter Querverweis mit den Daten der zur Verfügung gestellten Sinnenprüfung beurteilt und ausgewertet.

Die Hypothese, dass die Farbe mit dem Chlorophyll a und b zusammenhängt, konnte nicht bestätigt werden. Es gab weder eine positive noch negative Korrelation zwischen diesen Werten.

Dass bei den Werten der Gesamtphenole und Gesamtflavonoide eine enge positive Korrelation zu sehen ist, bestätigt das richtige Arbeiten während der photometrischen Messungen, da die Gesamtphenole eine Übergruppe der Flavonoide sind.

Bei weiterer Einzelbetrachtung der Proben konnte festgestellt werden, dass Kräuter die phenolreichste Fraktion darstellen, vermutlich dadurch bedingt, dass Kräuter im Vergleich zu Gräsern einen höheren Blattanteil und geringeren Stängelanteil aufweisen. Auch konnte anhand der Anteile bei den einzelnen Proben festgestellt werden, dass bei hohen Proteingehalten ein hoher Kräuteranteil im Heu vorhanden ist, und es dadurch indirekt zur Grasarmut kommt. Direkt proportional dazu kann man ablesen, dass grasreiche Proben einen hohen Rohfasergehalt haben, da weniger Blätter und mehr Stängel vorhanden sind.

Unter allen 24 Heuproben kristallisierten waren 11, wo alle 3 Fraktionen (Gräser, Kräuter und Bröckelverlust), ausgewertet werden konnten. Die Hypothese wurde aufgestellt, dass sich viele Nährstoffe in dem Bröckelverlust befinden müssten, und anhand von dem Chlorophyll a konnte dies auch bestätigt werden.

In einem Dendrogramm konnten 15 Heuproben grob nach dem Gräseranteil in drei Gruppen eingeteilt werden, die sich auch in ihren Inhaltsstoffgruppen unterscheiden.

## 7. Abstract

The samples, on which this work is based on, were provided within the framework of a hay sample collection of the working group Animal Nutrition of the Institute of Animal Nutrition and Functional Plant Materials of the University of Veterinary Medicine Vienna with regard to a data collection of various hay samples.

After photometric evaluation of the values of total flavonoids, total phenols and chlorophyll a and b, these were assessed and evaluated by cross-referencing with the data from the sensory test provided.

The hypothesis that color was related to chlorophyll a and b could not be confirmed. There was neither a positive nor negative correlation between these values.

The fact that a close positive correlation is seen in the values of total phenols and total flavonoids confirms the correct work during the photometric measurements, since total phenols are a supergroup of flavonoids.

Further individual analysis of the samples showed that herbs represent the fraction richest in phenols, presumably due to the fact that herbs have a higher leaf content and lower stem content compared to grasses. It could also be determined from the proportions of the individual samples that a high proportion of herbs is present in the hay when the protein content is high, and that this indirectly leads to grass poverty. Directly proportional to this, it can be seen that grass-rich samples have a high crude fiber content, since fewer leaves and more stems are present.

Among all 24 hay samples, 11 pairs where all 3 fractions were found (grasses, forbs and crumb loss), could be evaluated. It was hypothesized that many nutrients must be present in the friable loss, and based on the chlorophyll a, this could be confirmed.

In a dendrogram, 15 hay samples could be roughly divided into three groups according to the proportion of grasses, which also differed in their constituent groups.



## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung I.	ÖAG-Schlüssel für Heubewertung Jahr: 1999.....	5
Abbildung II.	Allgemeine chemische Struktur von Flavonoiden.....	7
Abbildung III.	Typisch phenolische Säuren in Lebensmittel .....	8
Abbildung IV.	Diverse chemische Chlorophylle .....	10
Abbildung V.	$\beta$ -Carotin Strukturformel .....	11
Abbildung VI.	Lutein Strukturformel .....	11
Tabelle I.	Übersicht über die untersuchten Heuproben und deren Fraktionen (sortiert nach abnehmenden Gräseranteil in % .....	13
Tabelle II.	Pipettierschema für die Eichreihe: Gesamtflavonoide in $\mu$ l .....	17
Tabelle III.	Pipettierschema für die Eichreihe: Gesamtphenol in $\mu$ l.....	19
Abbildung VII.	Extinktionswerte eines Extraktes .....	22
Abbildung VIII.	Zusammensetzung Heuproben in % .....	23
Abbildung IX.	Boxplot Heuproben: Chlorophyll a und b Messungen in mg/g.....	24
Abbildung X.	Boxplot Heuproben: Carotinoide Messungen in mg/g .....	24
Abbildung XI.	Boxplot Heuproben: Gesamtphenole in mg Catechinäquivalente/g .....	25
Abbildung XII.	Boxplot Heuproben: Gesamtflavonoide in mg Catechinäquivalente/g.....	25
Abbildung XIII.	Gesamtphenole (mg/g Catechinäquivalente) in den Fraktionen von 11 Heuproben (sortiert nach aufsteigendem Gräseranteil).....	26
Abbildung XIV.	Gesamtflavonoide (mg/g Catechinäquivalente) in den Fraktionen von 11 Heuproben (sortiert nach aufsteigendem Gräseranteil).....	26
Abbildung XV.	Chlorophyllgehalt (mg/g) in den Fraktionen von 11 Heuproben (sortiert nach aufsteigendem Gräseranteil) .....	27
Abbildung XVI.	Gesamtcarotinoid (mg/g) in den Fraktionen von 11 Heuproben (sortiert nach aufsteigendem Gräseranteil) .....	27
Tabelle IV.	Korrelationen nach Pearson zwischen Qualitätsmerkmalen und Inhaltsstoffen in gesamten Heuproben (n = 15) .....	28
Abbildung XVII.	Dendrogramm: Merkmalszusammenhang von 11 Gräserproben anhand von ähnlichen Merkmalen.....	29
Tabelle V.	Vergleich der im Dendrogramm ausgewiesenen Gruppen.....	30

## 9. Literaturverzeichnis

- Belyaeva, O., & Litvin, F. (2015). Spectral Dependence of Chlorophyll Biosynthesis Pathways in Plant Leaves. *Biochemistry (Moscow)*, 80(13), 1716-22., doi: 10.1134/S0006297915130076.
- Buchgraber K. (2018). *Zeitgemäße Grünlandbewirtschaftung*. Leopold Stocker Verlag.
- D'Archivio M. Filesi C. Varì R. Scazzocchio B. Masella R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-42, doi: 10.3390/ijms11041321.
- Das A. Guyer L. Hörtensteiner S. (2018). Chlorophyll and Chlorophyll Catabolite Analysis by HPLC. *Methods Mol Biol*. 1744, 223-235, doi: 10.1007/978-1-4939-7672-0\_18.
- Dielacher, V. (2016). *„Das“ große Buch vom Heu: richtiges Mähen, Trocknen & Verwenden : kochen, Wellness, basteln*. Leopold Stocker Verlag.
- Duden.de*. (2022). Von Duden. abgerufen
- Heu | Rechtschreibung, Bedeutung, Definition, Herkunft*. (kein Datum). Abgerufen am 10. June 2022 von Duden: <https://www.duden.de/rechtschreibung/Heu>
- Khoddami A. Wilkes M. Roberts T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-75, doi: 10.3390/molecules18022328.
- Lichtenthaler H. K., B. C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1-F4.3.8 .
- Liu W., F. Y., Suhang, Y., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12824, doi: 10.3390/ijms222312824.
- Mayer H. Bronsch K. Leibetseder J. (1993). *Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung*. Alfeld Hannover ( Deutschland): M. & H. Schaper.
- Meyer H. Coenen M. (2013). *Pferdefütterung*. Leipzig: Enke Verlag.
- Nisar N, L. L. (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant* 8, 68-82.
- Sun T, Y. H. (2018). Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. *Molecular Plant* 11, 58-74.
- Tanaka, R., & Tanaka, A. (2011 ). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807(8), 968-76, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.01.002.

- Thilakarathna S. Rupasinghe H.P. (2013). Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5(9), 3367-87, doi: 10.3390/nu5093367.
- Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12):1231-46, doi: 10.3390/nu2121231.
- Winkel-Shirley B. (2013). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Nutrients*, 126(2), 485-93, doi: 10.1104/pp.126.2.485.

## 10. Anhang

Tabelle: In den Heuproben vorgefundene Pflanzen

	Gräser	Kräuter	Leguminosen
E_210538	Lieschgras, Knaulgras, Weidelgras, Rispengräser, Goldhafer Ruchgras	Storchschnabel, Schafgarbe, Spitzwegerich, Distel	
E_210539	Weidelgras, Glatthafer, Knaulgras		Klee, Wiesen-Platterbsen
E_210540	Knaulgras, Rispengräser, Wolliges Honiggras	Spitzwegerich, Stängel von Beikräutern (nicht diff.)	
E_210541	Knaulgras, Glatthafer, Lieschgras, Weidelgras, Goldhafer		
E_210542	Knaulgras, Glatthafer, Lieschgras, Weidelgras, Goldhafer		
E_210543	Reitgras, Knaulgras, Goldhafer, Rispengräser, Kammgras, Deutsches Weidelgras	Ampfer	
E_210544	Knaulgras, Rispengräser, Wolliges Honiggras		
E_210545	Knaulgras, Lieschgras, Deutsches Weidelgras, Rispengräser (zerfallen)		
E_210546			
E_210547	Knaulgras, Glatthafer, Kammgras, Rispengräser	Flockenblume	
E_210548	keine Blütenstände sichtbar		
E_210549			
E_210550		Schafgarbe, Spitzwegerich	
E_210551	Knaulgras, Wolliges Honiggras, Glatthafer	Spitzwegerich, Flockenblume	
E_210552			
E_210553	Knaulgras, Glatthafer, Rispengräser	Spitzwegerich, andere Stängel	
E_210554	Knaulgras, Glatthafer, Ruchgras, Wieserrippe, Deutsches Weidelgras	Spitzwegerich	
E_210555	Lieschgras, Weidelgras, Knaulgras, Wieserrippe		
E_210556	Glatthafer, Knaulgras, Strausgräser	<b>Herbstzeitlose, Johanniskraut, Spitzwegerich, Klappertopf</b>	
E_210557	Reitgras (ca. 90%), Knaulgras, Rispengräser	Spitzwegerich, Schafgarbe	
E_210558	Knaulgras, Rispengräser	Spitzwegerich	
E_210559	Knaulgras, Rispengräser, Ruchgras, Glatthafer		
E_210560	Glatthafer, Wiesenlieschgras, Knaulgras, Gemeine Rispe, Weisches Weidelgras		
E_210561	Knaulgras, Lieschgras, Glatthafer		

