



# Bestimmung des Fasergehaltes in Futtermitteln bei ALP

Silvia Ampuero Kragten, Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, CH-1725 Posieux

Auskünfte: Silvia Ampuero K., E-mail: [silvia.ampuero@alp.admin.ch](mailto:silvia.ampuero@alp.admin.ch), Tel. +41 26 40 77 359

## 1. Das Prinzip

### 1.1. RF

### 1.2. NDF

### 1.3. ADF

### 1.4. Lignin

### 1.5. Hemicellulose

### Gesamtübersicht über die Methoden

## 2. Die an ALP eingesetzten Methoden

### 2.1. RF oder RFB

### 2.2. NDFB

### 2.3. ADFB

### 2.4. LIGB

### 2.5. HEMB

## **1. Das Prinzip**

Ein wichtiger Bestandteil der Futtermittel sind die Fasern. Sie sind diejenige Fraktion eines Futtermittels, die am schwierigsten zu verdauen ist. Beim Wiederkäuer können die unterschiedlich grosse Menge sowie die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Fasern im Futtermittel die Leistung und Produktivität des Tieres beeinträchtigen und vor allem die Fermentation im Pansen, den Stoffwechsel, den Fettgehalt in der erzeugten Milch und schliesslich die Tiergesundheit langfristig verändern [1].

Der Begriff Fasern bezeichnet generell die Zellwandbestandteile der Pflanzen und umfasst eine grosse Vielfalt struktureller Polysaccharide, die häufig an Proteine und Phenole gebunden sind, insbesondere an Lignin. Die Hauptpolysaccharide der Pflanzenzellwände sind: Zellulose, verschiedene Hemicellulosen (z.B. Arabinoxylane,  $\beta$ -Glucane, Xyloglucane, Arabinogalactane) und Pektin-Polysaccharide [2]. Lignin ist ein phenolisches Polymer aus Phenylpropan-Einheiten und dient dazu, die Zellwände zu verkitten und zu verhärten.

### **1.1 Rohfaser (englisch : crude fiber, CF)**

Der Fasergehalt wird seit Mitte des 19. Jahrhunderts bestimmt [2], um den Energiewert und folglich die Qualität von Futtermitteln zu schätzen. Heute ist die weit verbreitete Methode zur Schätzung der Rohfaser als Weender Analyse bekannt (RF oder RFB bei ALP). Diese rein empirische Methode (allein durch die Analysenmethode selbst definiert) ist sehr robust und lässt sich bei allen Futtermittelarten anwenden. Jedoch führt die Behandlung mit einer sauren und anschliessend mit einer basischen Lösung zu einer teilweisen Lösung der

Strukturpolysaccharide ebenso wie des anfänglich in der Probe vorhandenen Lignins. Dies bedeuten, dass bei der Bestimmung der Rohfaser nicht alle Zellwandbestandteile erfasst werden können (siehe Abbildung). Je nach Futtermittel kann die Rohfaserfraktion einer Probe zwischen 40 und 100 % Zellulose, zwischen 15 und 20 % Pentosane (Hemicellulose) und zwischen 5 und 90 % Lignin enthalten [3].

## **1.2 Zellwände, in neutralen Detergenzien unlösliche Fasern (englisch : *neutral detergent fiber, NDF*)**

Im Jahre 1967 publizierten Van Soest und Wine [4] zum ersten Mal eine Methode, um die Fraktion der unlöslichen Fasern (insoluble dietary fibre), welche aus Zellulose, Hemicellulose und Lignin besteht, aus den Zellwänden von Pflanzen zu isolieren.

Die allgemein akzeptierte Definition von NDF im Zusammenhang mit Wiederkäuern und nicht-wiederkäuenden Herbivoren lautet folgendermassen: **NDF ist die organische Fraktion des Futtermittels – abgesehen von der Rohasche – welche langsam verdaulich oder unverdaulich ist und Platz im Magen-Darm-Trakt einnimmt.** Diese NDF-Definition schliesst die langsam fermentierenden komplexen Polysaccharide aus den Zellwänden wie Zellulose und Hemicellulose mit ein, lässt jedoch die schnell fermentierenden Polysaccharide wie die Pektine ebenso wie die löslichen Polysaccharide (Fruktane etc.) ausser Acht.

So wird das Futtermittel in zwei Hauptfraktionen getrennt mit unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich Verdaulichkeit und Verzehr bei Wiederkäuern und häufig auch bei Nicht-Wiederkäuern: Während die NDF-Fraktion eine variable Verdaulichkeit aufweist, Platz im Verdauungssystem einnimmt und eine nicht ganz unbeträchtliche Menge an Energie erfordert, um die Partikelgrösse durch Kauen zu verkleinern, ist die Komplementärfraktion (= 100 minus NDF) leicht verdaulich und nimmt nur wenig Platz ein, da sie schnell gelöst ist und nur ein Minimum an Kaubewegungen benötigt.

Nach einer gross angelegten Studie, die von mehreren Labors durchgeführt wurde, veröffentlichte Mertens im Jahre 2002 Empfehlungen mit mehreren Varianten zur Standardisierung der NDF-Methode [5]. Auf der Grundlage dieser Studie rät er zur Verwendung von Natriumsulfit trotz des Risikos, dass bestimmte phenolische Inhaltsstoffe (Lignin) einiger Futtermittel in Lösung gehen, da er die Entfernung der Proteinrückstände (die ohne die Verwendung von Natriumsulfit beträchtlich sind) als prioritär betrachtet. Das Sulfit löst komplexe Inhaltsstoffe wie Proteine mit Kreuzbindungen vom Typ des Keratins, indem es die S-S-Bindungen zerstört. Aber auch die Verwendung von  $\alpha$ -Amylase-Enzymen zur Eliminierung der Stärke wird kritisch betrachtet. Mertens empfiehlt ein hitzeresistentes Enzym, um die Behandlungsdauer zu reduzieren und folglich das Risiko der Lösung von Fasern zu vermindern. Auch ist es notwendig, die Menge der erforderlichen Enzyme rigoros zu standardisieren. Ferner schlägt Mertens zwei Möglichkeiten vor, wie die NDF-Gehalte ausgedrückt werden können: entweder bezogen auf die organische Substanz (nach Abzug der Rohasche, aNDFom oder NDFom) oder bezogen auf die Originalprobe (ohne Abzug der Rohasche, aNDF oder NDF). Andere Autoren halten es grundsätzlich für erforderlich, NDF bezogen auf die organische Substanz anzugeben, da z.B. unterschiedlich hohe Erdkontaminationen den NDF-Gehalt der Futtermittel stark beeinflussen können [6]. Mertens bestimmt detailliert den Einfluss verschiedener Etappen der Methode, um die Abweichungen bei der NDF-Bestimmung so gering wie möglich zu halten. Dazu gehört unter anderem die Bedeutung des sorgfältigen Waschens des Rückstands mit kochendem Wasser, weil sich dadurch die Protein- und Fettrückstände und die Rückstände anderer nicht faserartiger Kohlenhydrate entfernen lassen, die ansonsten an den Fasern haften bleiben, da sie sehr viskos sind. Auch muss der pH-Wert unbedingt zwischen 6.95 und 7.05 liegen, um zu vermeiden, dass die Fasern durch die sauren oder alkalischen Lösungen gelöst werden.

### **1.3 Lignozellulose, in sauren Detergenzien unlösliche Fasern (*englisch: acid detergent fiber, ADF*)**

ADF ist eine 1963 von Van Soest publizierte empirische Methode, die als Vorbehandlung zur Ligninbestimmung dient [7]. Bei dieser Methode erfolgt eine saure Behandlung, um Verluste des in alkalischen Lösungen löslichen Lignins zu vermeiden. Mit dem kationischen Detergens Cetyltrimethylammoniumbromid lassen sich die Proteine vom faserigen Rückstand trennen. Wie RF isoliert ADF hauptsächlich die Zellulose und das Lignin, jedoch nicht die Hemicellulose. Hinzu kommt, dass bestimmte schnell fermentierende Pektine in der stark sauren Lösung ausfallen können, was dazu führt, dass die ADF-Werte höher liegen als die NDF-Werte, insbesondere in Proben mit hohem Pektin Gehalt wie junge Luzerne oder Zitrusreife [3, 8].

Die biogenen Silikatverbindungen finden sich quantitativ in der ADF-Fraktion, werden jedoch teilweise in der NDF ausgewaschen [9]. Nicht biogenes Silizium (Sand etc.) wird hingegen in der ADF ebenso wie in der NDF vollständig wieder aufgefunden. Deshalb ist es wichtig, diese Werte mit dem Aschewert zu korrigieren (ADF<sub>om</sub> und aNDF<sub>om</sub>, bzw. ADF<sub>b</sub> und NDF<sub>b</sub> bei ALP) [6]. Verschiedene Verdauungsversuche deuten auf eine bessere Korrelation mit ADF und NDF hin, wenn diese mit dem Aschegehalt korrigiert werden [9].

### **1.4 Lignin (*englisch : acid detergent lignin, ADL*)**

Die Ligninbestimmung aus dem ADF-Rückstand kann durch die Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure (Lignin(sa), ADSL, LIGB bei ALP) oder mit Permanganat erfolgen (Lignin(pm), ADPL). Generell liegen die Ligninwerte bei der Verwendung von Permanganat höher. Lignin stellt die vollständig unverdauliche NDF-Fraktion dar.

### **1.5 Hemicellulose**

Die Hemicellulose wird im Allgemeinen durch die Differenz von NDF minus ADF geschätzt.

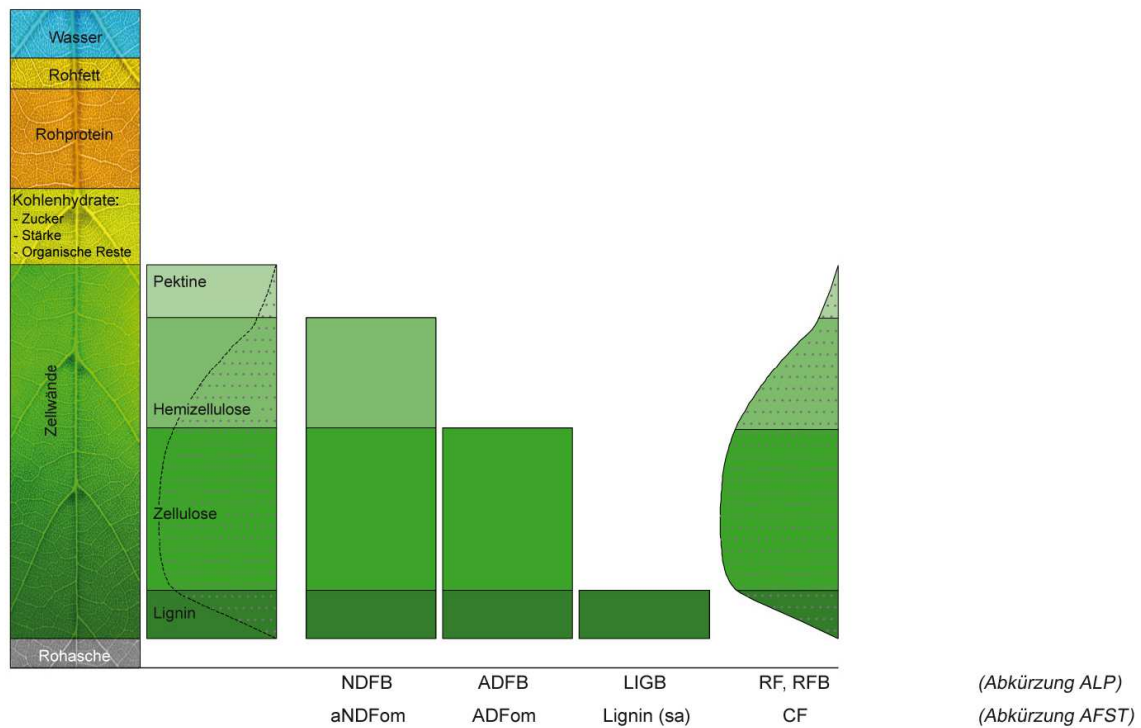
Mit der sequentiellen Analyse, zuerst NDF, dann ADF aus dem Rückstand und schliesslich Lignin, lassen sich genauere Bestimmungen der Hemicellulose und der Zellulose durchführen. Tatsächlich lassen sich auf diese Weise verschiedene Interferenzen vermeiden. Dennoch kann dieses Verfahren in bestimmten Fällen zum Verlust interessanter Fraktionen führen. Folglich ist das in NDF lösliche Pektin für die ADF-Bestimmung nicht mehr verfügbar, wodurch man tiefere ADF-Gehalte analysiert als bei der nicht-sequentiellen Analyse. Die gleiche Situation tritt in Fällen auf, in denen bedeutende Gehalte an biogenem Silizium oder an bestimmten Tanninen vorliegen. Die unterschiedlich hohen Werte, die bei einer doppelten sequentiellen Bestimmung auftreten, zum einen NDF, dann ADF und zum anderen ADF, dann NDF, weisen auf das Vorhandensein unlöslicher Tannine hin [6].

Ausser der gravimetrischen Methoden für die Bestimmung des Fasergehaltes gibt es andere, neuere Methoden, welche ursprünglich zur Verwendung in der Humanernährung entwickelt worden sind. Bei der enzymatisch-chemischen Methode (Uppsala Methode [10]) werden spezifische Enzyme verwendet, um Zucker und Stärke aus der Probe zu beseitigen. Anschliessend werden die verbleibenden löslichen Polysaccharide mit Hilfe von 80%igem Ethanol ausgefällt. Nach der Hydrolyse der Rückstände (NSP = nicht Stärke Polysaccharide) mit 12 M Schwefelsäure erfolgt die fraktionelle Analyse der monomeren Bestandteile. Der Monomertyp „neutrale Zucker“ wird mittels GC, jener des Typs „saure Zucker“ mittels Kolorimetrie und Lignin nach Klason [2, 3, 10] mittels Gravimetrie analysiert. Die Summe der unterschiedlichen Fraktionen entspricht der NDF. Die Modifikation vorgegeben durch Knudsen [11] ermöglicht die Bestimmung der Hemicellulose (NCP = nicht Cellulose Polysaccharide) durch die Benutzung von 1 M statt 12 M Schwefelsäure für die Hydrolyse der Rückstände in einzelnen Monomeren. Letztlich ist die Cellulose NSP minus NCP. Auch

wenn die Analyse der einzelnen Fraktionen genauere Informationen liefert, sind diese Methoden weniger reproduzierbar und deutlich weniger wirtschaftlich als die gravimetrischen Methoden mit Detergenzien.

Schliesslich können mit der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) sowohl quantitative Bestimmungen der chemischen Zusammensetzung erfolgen als auch direkte Nährwertanalysen im Futtermittel [12, 13].

## Chemische Zusammensetzung von Futtermitteln unter besonderer Berücksichtigung der Faserfraktionen



## Analysen-Methoden für Zellwandbestandteile in Futtermitteln

Die Spalte „AFST“ gibt die Bezeichnung wieder, wie sie von der Zeitschrift *Animal Feed Science and Technology* empfohlen wird. Die Spalte „ALP“ enthält die an ALP gebräuchlichen Bezeichnungen und Methoden-Nummern. Die Spalten ISO (International Organization of Standardization), AOAC (Association of analytical communities) und VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten) geben die Methoden-Nummern dieser Institutionen wieder.

<sup>1</sup> AFST	Beschreibung	ALP	<sup>4</sup> ISO	<sup>5</sup> AOAC	<sup>6</sup> VDLUFA	Bemerkungen/ Referenzen
<b>CF</b>	Rohfaser, nach Subtraktion des Veraschungsrückstands ( <i>Crude Fibre</i> )	<b>RF</b> <sup>2</sup> [ME 7046] <b><sup>3</sup>RFB</b> [ME 5826]	6865 :2000	978.10	6.1.4	Weender Methode
<b>NDF</b>	Zellwände, unlösliche Fasern in neutralen Detergenzien ( <i>Neutral Detergent Fibre</i> )				6.5.1	Van Soest and Wine, 1967
<b>aNDF</b>	NDF mit Verwendung von hitzeresistenten Amylase-Enzymen ( <i>NDF assayed with heat stable amylase</i> )		16472:2006	2002.04	6.5.1 Bemerkung 8	
<b>NDFom</b>	NDF nach Abzug der Rohasche ( <i>NDF expressed as organic matter</i> )				6.5.1 Bemerkung 8	
<b>aNDFom</b>	NDF mit Verwendung von hitzeresistentes Amylase-Enzymen und nach Abzug der Rohasche ( <i>NDF assayed with heat stable amylase and expressed as organic matter</i> )	<b><sup>3</sup>NDFB</b> [ME 7054]	16472:2006	2002.04		Mertens, 2002
<b>ADF</b>	Lignozellulose, unlösliche Fasern in sauren Detergenzien ( <i>Acide Detergent Fibre</i> )				6.5.2	Van Soest, 1963
<b>ADFom</b>	ADF nach Abzug der Rohasche ( <i>ADF expressed as organic matter</i> )	<b><sup>3</sup>ADFB</b> [ME 7053]			6.5.2 Bemerkung 8	
<b>Lignin (sa)</b>	Lignin nach Behandlung des ADF-Rückstands mit konzentrierter Schwefelsäure (ADL) ( <i>Lignin by cellulose solubilization with sulphuric acid</i> )	<b><sup>3</sup>LIGB</b> [ME 7055]		973.18	6.5.3	
<b>Lignin (pm)</b>	Lignin mit Lignin-Oxidation mit Permanganat ADF (ADL). ( <i>Lignin by lignin oxidation with permanganate</i> )					

<sup>1</sup>Animal Feed Science and Technology. <sup>2</sup>[ME ...]: Methode ALP. <sup>3</sup>B = Batch-System. <sup>4</sup>International Organization of Standardization. <sup>5</sup>Association of analytical communities.

<sup>6</sup>Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten.

## **2. Die an ALP eingesetzten Methoden zur Bestimmung der Zellwandbestandteile in Futtermitteln**

### **2.1 Rohfaser (RF oder RFB)**

Die Probe wird zunächst mit einer 1.25%igen Schwefelsäurelösung und anschliessend mit einer 1.25%igen Natriumhydroxidlösung behandelt. Die Lösungen werden nahe des Siedepunktes appliziert und jede Behandlung dauert  $30 \pm 1$  Minuten. Proben mit einem Fettgehalt von mehr als 60g/kg werden vorher mit Azeton entfettet. Der Rückstand wird jedes Mal mit heissem Wasser gewaschen und getrocknet. Schliesslich wird der Rückstand während einer Stunde bei 530°C verascht. Nach einer sauren und anschliessend einer basischen Behandlung und Subtraktion des Veraschrückstands stellt der verbleibende Rückstand die RF dar und wird in g/kg ausgedrückt. Diese Methode kommt an ALP einzeln (Fibertec, RF) oder auch in einem Batchsystem (Ankom, RFB) zur Anwendung.

### **2.2 Zellwände (NDFB)**

Die Probe wird während 60 Minuten bei 98°C mit einer neutralen Detergenzlösung behandelt, die Natriumlaurylsulfat, Natriumsulfit und eine hitzebeständige  $\alpha$ -Amylase-Lösung enthält. Nach wiederholtem Waschen mit kochendem Wasser wird der Rückstand mit Azeton entfettet, anschliessend getrocknet und während einer Stunde bei 530 bis 550°C verascht. NDF stellt den Rückstand dar nach der Behandlung mit dem neutralen Detergenz und der Subtraktion der Asche. Diese Analyse wird an ALP ausschliesslich mit einem Batchsystem (Ankom, NDFB) durchgeführt.

### **2.3 Lignozellulose, (ADFB)**

Die Probe wird mit einer sauren Detergenzlösung behandelt: N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammonium-Bromid in 0.5 M Schwefelsäure. Das saure Detergenz wird heiss angewandt und rasch zum Kochen gebracht, die Behandlung dauert 60 Minuten. Der Rückstand wird dreimal sorgfältig mit kochendem Wasser gewaschen. Er wird mit Azeton entfettet und anschliessend getrocknet und eine Stunde lang bei 530 bis 550°C verascht. Der Rückstand der Behandlung mit dem sauren Detergenz wird nach Subtraktion der Asche als ADF bezeichnet. Diese Analyse erfolgt an ALP ausschliesslich mit einem Batchsystem (Ankom, ADFB).

### **2.4 Lignin (LIGB)**

Der Rückstand ADFB wird vor der Veraschung mit einer 72%igen Schwefelsäurelösung während drei Stunden bei 20 bis 23°C behandelt. Er wird zunächst mit kaltem und anschliessend mit kochendem Wasser sorgfältig gewaschen bis ein neutraler pH-Wert erreicht ist. Anschliessend erfolgt eine Entfettung des Rückstands mit Azeton und danach dessen Trocknung und Veraschung während einer Stunde bei 550°C. Lignin stellt den Rückstand abzüglich der Asche dar. Da ADF an ALP ausschliesslich mit einem Batchsystem analysiert wird (ADFB), wird Lignin folglich als LIGB bezeichnet.

### **2.5. Hemicellulose (HEMB)**

Errechnet sich aus: NDFB minus ADFB.

Generell erfolgen diese Analysen bei ALP als Parallelanalysen, also nicht-sequentiell.

## Referenzen

1. Mertens D. R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 1463-1481.
2. Hindrichsen K., Kreuzer M., Madsen J. and Bach Knudsen K. E. 2006. Fiber and lignin analysis in concentrate, forage and feces: Detergent versus enzymatic-chemical method. *J. Dairy Sci.* 89: 2168-2176.
3. Mertens D. R. 2003. Challenges in measuring insoluble dietary fiber. *J. Anim. Sci.* 81: 3233-3249.
4. Van Soest P. J. and Wine R. H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV Determination of plant cell wall constituents. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 50-50.
5. Mertens D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC International* 85/6 1217-1240.
6. Van Soest P. J., Robertson J. B. and Lewis B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
7. Van Soest P. J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *J. Assoc. Off. Agr. Chem.* 46: 825-829.
8. Animal Feed Science and Technology editorial. 2005. Use of detergent system terminology and criteria for submission of manuscripts on new or revised, analytical methods as well as descriptive information on feed analysis and/or variability. *Anim. Feed Sci. Techn.* 118: 181-186.
9. Crocker L. M., DePeters E. J., Fadel J. G., Essex S. E., Perez-Monti H. and Taylor S. J. 1998. Ash content of detergent fibers in feeds, digesta, and feces and its relevance in fiber digestibility calculations. *J. Dairy Sci.* 81:1010-1014.
10. Theander O., Aman P., Westerlund E., Anderson R. and Pattersson D. 1995. Measurement of dietary fiber using sugar analyses: collaborative study. *J. AOAC Int.* 78: 1030-1044.
11. Knudsen K. E. 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim. Feed Sci. Tech.* 67: 319-338.
12. Coleman S. W. and Moore J. E. 2003. Feed quality and animal performance. *Field Crops Research* 84: 17-29.
13. Mentink R. L., Hoffman P. C. and Bauman L. M. 2006. Utility of near-infrared reflectance spectroscopy to predict nutrient composition and in vitro digestibility of total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 89: 2320-2326.

Original: „Détermination de la teneur en fibres dans les aliments pour animaux à ALP“.

ALP-Mitteilung, August 2008