

# Verwertung von $^{15}\text{N}$ -Harnstoff für die intestinale Synthese von Bakterienprotein und für die Milchbildung

R. Schubert

Friedrich-Schiller-Universität, Jena  
Biologische Fakultät  
Institut für Ernährung und Umwelt

**Schlüsselwörter:** Ponystute,  $^{15}\text{N}$ -Harnstoff, Bakterien, Milchaminosäurensynthese

## Einleitung

Gegenwärtig wird angenommen, daß die hohe intestinale mikrobielle Proteinsynthese beim adulten Pferd eine nur geringe Bedeutung für die Aminosäurebedarfsdeckung hat. Dazu liegen wenige quantitative Angaben vor (Slade et al., 1971; Wysocki und Baker, 1975).

Das Ziel der Untersuchungen bestand unter anderem darin, den Weg von oral verabreichtem Harnstoff- $^{15}\text{N}$  bei laktierenden Ponystuten zu verfolgen sowie die Verwertung des Harnstoff-N für die Milch-Aminosäurensynthese zu bestimmen.

## Material und Methode

Zwei laktierende Ponystuten erhielten über einen Zeitraum von 6 Tagen oral 9 g Harnstoff- $^{15}\text{N}$  je Tier und Tag. Die relative  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit des Gesamt-N der Ration für Tier 1 bzw. 2 betrug 13,28 bzw. 15,12 Atom-%- $^{15}\text{N}$ -Überschuß (weiterhin mit Atom-%  $^{15}\text{N}$  bezeichnet). An den folgenden 8 Tagen nach der ersten  $^{15}\text{N}$ -Gabe wurden Proben von Blut, Milch, Harn und Kot genommen. Zwei Tage nach der letzten  $^{15}\text{N}$ -Gabe erfolgte die Schlachtung und Entnahme des Chymus aus verschiedenen Segmenten.

Die Bakterienisolierung aus Kot und Ingesta erfolgte durch fraktionierte Zentrifugation. Die Bestimmung und präparative Gewinnung zur emissionsspektrometrischen  $^{15}\text{N}$ -Analyse erfolgte für Gesamt-N nach dem Mikro-Kjeldahl-Verfahren, für Ammoniak und Harnstoff (letzterer nach Spaltung mit Urease) mittels Conway-Mikrodiffusionsmethode sowie für Aminosäuren mittels säulenchromatographischer Trennung.

Die Berechnung der Plateauwerte und Geschwindigkeitskonstanten für die  $^{15}\text{N}$ -Anreicherung (Atom-%  $^{15}\text{N}$ ) erfolgte nach:

Anreicherungsperiode  $y = A(1 - e^{-kt})^n$

Abklingperiode  $y = A(e^{-kt})^n$

## Zusammenfassung

Es wurde die Verwertung von Harnstoff- $^{15}\text{N}$  für die Milchaminosäurensynthese bestimmt. 2 laktierende Ponystuten erhielten an 6 Tagen orale Gaben von 9 g Harnstoff- $^{15}\text{N}$  je Tier und Tag. Die  $^{15}\text{N}$ -Anreicherung in Harn, Milch und Plasma resultierte vorwiegend aus dem Anteil an Harnstoff- $^{15}\text{N}$ . Die  $^{15}\text{N}$ -Anreicherung der Milch-Aminosäuren begann bereits innerhalb 1 h nach der ersten  $^{15}\text{N}$ -Harnstoffgabe. Markiertes Lysin stammte wahrscheinlich aus Dünndarm-Bakterien. Die Verwertung des Harnstoff- $^{15}\text{N}$  für die Bakterienaminosäurensynthese betrug bei den beiden Tieren 4,6 bzw. 2,3 % und für die Milchaminosäurensynthese nur 0,79 bzw. 0,63 %.

## Utilization of $^{15}\text{N}$ -urea for intestinal synthesis of bacterial protein and for milk production in pony mares

The utilization of urea  $^{15}\text{N}$  for milk amino acid synthesis was investigated. On 6 days two lactating pony mares were given orally doses of 9 g urea  $^{15}\text{N}$  per animal per day. The labelling of urine, milk and plasma predominately results from urea  $^{15}\text{N}$ . The labelling of milk amino acids started already within one hour after first  $^{15}\text{N}$  administration. The origin of labelling lysine probably was from bacteria of the small intestine. The utilization of urea  $^{15}\text{N}$  for bacteria amino acid synthesis of the two animals was 4.6 and 2.3 and for milk amino acid synthesis only 0.79 and 0.63 % respectively.

( $y$  = Atom-%  $^{15}\text{N}$  zum Zeitpunkt  $t$ ;  $A$  = Plateauwert;  $k$  = Geschwindigkeitskonstante;  $t$  = Zeit nach Beginn der Tracergabe, in der Abklingphase gilt für  $t = t_y - t_0$ , wobei  $t_y$  die Zeit nach der ersten  $^{15}\text{N}$ -Gabe und  $t_0$  der Zeitpunkt der letzten  $^{15}\text{N}$ -Gabe bzw. zu Beginn des Kurvenabfalls darstellt;  $n$  = Exponent).

Die Berechnung von  $A$ ,  $k$  und  $n$  erfolgte mittels eines iterativen Parameter-Schätzverfahrens für nichtlineare Regressionsprobleme nach Gauss-Newton (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1990). Das Kriterium der Anpassung ist dabei die Minimierung der Summe der Abweichungsquadrate zwischen experimenteller und theoretischer Kurve. Das Plateau wurde als erreicht betrachtet, wenn die extrapolierte  $^{15}\text{N}$ -Anreicherung 95 % des Plateauwertes (Glieder „ $A$ “ der Exponentialfunktion) betrug. Nach Hübner et al. (1966) wird dieser Punkt als „quasistationärer Zustand“ bezeichnet.

Die Verwertung des Harnstoff- $^{15}\text{N}$  für die Aminosäurensynthese (anteilige Verwendung des aufgenommenen  $^{15}\text{N}$  für die Aminosäurensynthese bei unendlicher unendlich langer  $^{15}\text{N}$ -Gabe) wurde nach den von Hübner et al. (1966) begründeten und von Ulbrich (1989) für ein 3-Pool-Modell beschriebenen Gleichungen aus den jeweiligen Plateauwerten berechnet.

## Ergebnisse und Diskussion

Die  $^{15}\text{N}$ -Anreicherung von Harn, Milch und Plasma resultierte vorwiegend aus dem Anteil an Harnstoff-N. Mit dem Harn wurden rund 71 % des verzehrten  $^{15}\text{N}$  ausgeschieden, davon rund 64 % als Harnstoff-N. Fast die Hälfte des mit der Milch ausgeschiedenen  $^{15}\text{N}$  war Harnstoff-N (Tab. 1). Der Verlauf der  $^{15}\text{N}$ -Anreicherung des Harnstoffs war in den Körperflüssigkeiten fast deckungsgleich. Bei beiden

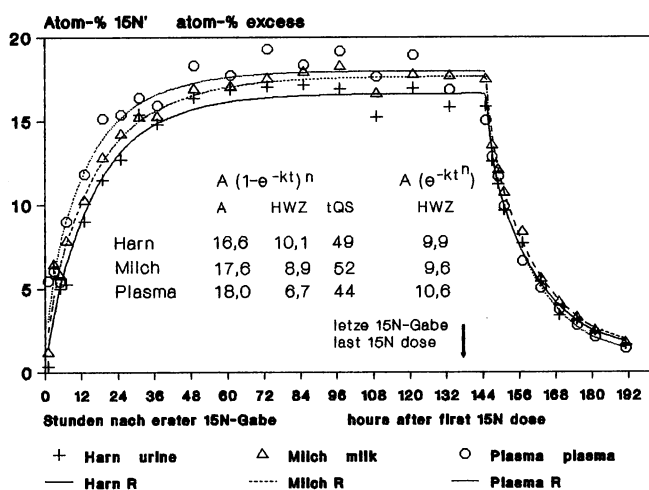
**Tab. 1:** Anteil von <sup>15</sup>N aus Harnstoff und basischen Aminosäuren an der <sup>15</sup>N-Ausscheidung mit Harn und Milch (Mittel beider Tiere)  
**Table 1:** Part of <sup>15</sup>N from urea and basic amino acids on excretion of <sup>15</sup>N via urine and milk (average of both animals)

|              | <sup>15</sup> N-Ausscheidung<br>% der Aufnahme<br><sup>15</sup> N excretion<br>% of intake | davon % aus<br>% of it as |                                 |                       |                     |
|--------------|--|---------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|
|              |  | Harnstoff<br>urea         | Lysin<br>lysine                 | Histidin<br>histidine | Arginin<br>arginine |
| Harn / urine | 70,6   | 64,2                      | (nicht meßbar / not detectable) |                       |                     |
| Milch / milk | 2,15   | 45,9                      | 1,36                            | 0,45                  | 6,36                |

Tieren erreichte aber die <sup>15</sup>N-Anreicherung im Harnstoff aus Plasma das höchste Plateau (A), gefolgt von Milch und Harn. Die Geschwindigkeit der <sup>15</sup>N-Anreicherung (Halbwertszeit [HWZ] 6,7, 8,9 bzw. 10,1 h bis zum Erreichen von 50 % des Plateauwertes) erfolgte in gleicher Reihenfolge (Abb. 1). Das könnte ein Hinweis dafür sein, daß Harnstoff-N nach dessen Absorption (<sup>15</sup>N-Anreicherung im Plasma-Harnstoff) über die Milchdrüse etwas schneller an die Milch abgegeben wird als über die Niere an den Harn. Der quasistationäre Zustand (QS) des Milch-Harnstoff-<sup>15</sup>N stellte sich aber am spätesten ein, was auf einen höheren Zufluß von nichtmarkiertem Harnstoff aus abgebautem Körperprotein deutete.

Die <sup>15</sup>N-Anreicherung der Milch-Aminosäuren begann bereits innerhalb 1 h nach der ersten <sup>15</sup>N-Harnstoffgabe. 1 bzw. 3 h nach der ersten <sup>15</sup>N-Gabe stammten rund 1 bzw. 2 % des Milch-<sup>15</sup>N aus Lysin, der Anteil war bei Arginin und Histidin mit 4 bzw. 12 % höher. Ein intensiverer <sup>15</sup>N-Einbau in das Milch-Lysin erfolgte erst 24 h nach der ersten <sup>15</sup>N-Gabe (Abb. 2).

Dabei stellt sich die Frage nach der Herkunft des markierten Lysins. Im Gegensatz zu Arginin und Histidin, bei

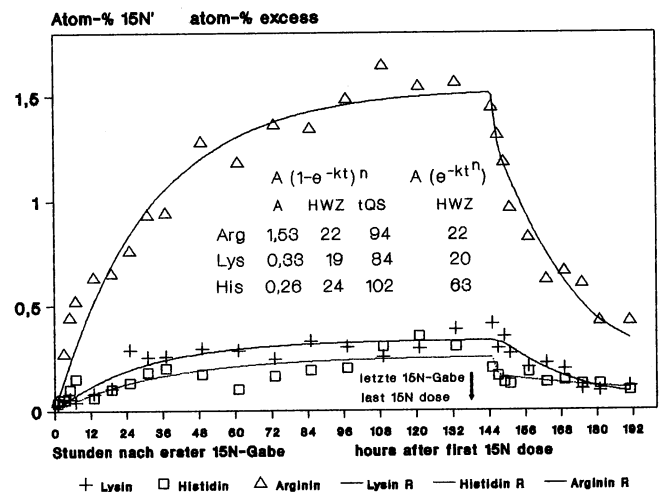


(HWZ: Halbwertszeit, tQS: Dauer des quasi-stationären Zustands, R = Regression)

(HWZ: half live time, tQS: time of state quasi stationary, R: regression)

**Abb. 1:** <sup>15</sup>N-Anreicherung des Harnstoffs aus Harn, Plasma und Milch (Mittel beider Tiere).

**Figure 1:** <sup>15</sup>N-labelling of urea from urine, plasma and milk (mean of both animals).



(HWZ: half live time, tQS: time of state quasi stationary, R: regression)

**Abb. 2:** <sup>15</sup>N-Anreicherung von Lysin, Histidin und Arginin der Milch (Mittel beider Tiere).

**Figure 2:** <sup>15</sup>N-labelling of lysine, histidine and arginine of milk (mean of both animals).

denen <sup>15</sup>N durch Aminierung über den Ornithinzyklus oder durch Transaminierung übertragen werden kann, ist bei dem nichttransaminierenden Lysin eine <sup>15</sup>N-Anreicherung auf diesem Wege nahezu nicht möglich. Die geringe Menge an markiertem Lysin kann jedoch aus Dünndarm-Bakterien stammen. Eine Absorption von Bakterien-Aminosäuren aus dem Dickdarm kann weitgehend ausgeschlossen werden (Wysocki und Baker, 1975; McMeniman et al., 1987; Slade et al., 1971; Schmitz et al., 1990). Erste Ergebnisse aus gemeinsamen Arbeiten mit Kolonwänden von Pferden zeigten, daß die basischen Aminosäuren bei physiologischen Konzentrationen die Kolonwand nahezu nicht passieren (Bochröder et al., 1992).

Die Verwertung des aufgenommenen Harnstoff-<sup>15</sup>N für die bakterielle Aminosäuresynthese betrug bei Tier 1 bzw. 2 ohne Berücksichtigung des verdauten Bakterien-N aufgrund der hohen renalen <sup>15</sup>N-Exkretion 4,6 bzw. 2,3 % und für die Milchaminosäuresynthese einschließlich der aus abgebautem Körperprotein stammenden N-Menge nur 0,79 bzw. 0,63 %. Für Wiederkäuer beträgt die Verwertung von oral, intraruminal oder intravenös verabreichtem <sup>15</sup>N aus Nicht-Protein-Verbindungen für die Milchproteinsynthese dagegen 4 – 19 % (z. B. Kühe Hübner et al., 1966: 9 – 10 %; Ziegen Schlieper, 1991: 16,1 %; Schafe Ulbrich et al., 1989: 4,3 – 10,7 %).

## Schlussfolgerung

Die ermittelte vernachlässigbare Konvertierung von oral verabreichtem Harnstoff- $^{15}\text{N}$  in Milchaminosäuren unterstreicht die Notwendigkeit der Bestimmung des Aminosäurenbedarfes, speziell Lysin, für laktierende Stuten.

## Literatur

- Bochröder, B., Schubert, R., und Bödeker, D.* (1992): In-vitro-Untersuchungen zur mukosal-serosalen Passage freier Aminosäuren durch die Kolonwand von Pferden. Unveröffentlichte Ergebnisse.
- Hübner, G., Gürtler, H., Ulbrich, M., und Wetzels, K.* (1966): Untersuchungen zum N-Stoffwechsel beim laktierenden Rind unter Verwendung von oral verabreichtem Harnstoff- $^{15}\text{N}$ . 14. Mitteilung: Zusammenfassender Bericht. Arch. Tierernähr. 16, 443 - 456.
- McMeniman, N. P., Elliot, R., Groenendyk, S., und Dowsett, K. F.* (1987): Synthesis and absorption of cysteine from the hindgut of the horse. Equine vet. J. 19, 192 - 194.
- Schlieper, M.* (1991): Studien zur Stickstoff-Kinetik bei laktierenden Ziegen unter Verwendung des stabilen Isotopes  $^{15}\text{N}$ . Diss. Univ. Bonn
- Schmitz, M., Abrens, F., und Hagemeister, H.* (1990): Beitrag der Absorption von Aminosäuren im Dickdarm zur Proteinversorgung bei Pferd, Rind und Schwein. J. Animal Physiol. Animal Nutr. 64, 12 - 13.
- Slade, L. M., Bishop, R., Morris, J. G., und Robinson, D. M.* (1971): Digestion and absorption of  $^{15}\text{N}$ -labelled microbial protein in the large intestine of the horse. Br. Vet. J. 127, XI - XIII.
- Ulbrich, M.* (1989): Darstellung eines für Wiederkäuer allgemeingültigen 3-Pool-Modells des N-Umsatzes. Isotopenpraxis 25, 185 - 189
- Ulbrich, M., Boldt, E., und Geissler, Ch.* (1989): Stickstoffverwertung aus Futterprotein und NPN zur Milchsynthese beim Mutterschaf. Isotopenpraxis 25, 189 - 191.
- Wysocki, A. A., und Baker, J. P.* (1975): Utilization of bacterial protein from the lower gut of the equine. Proc. 4th Eq. Nutr. Physiol. Symp., Pomona, 21 - 43.

*Dr. R. Schubert*  
 Friedrich-Schiller-Universität  
 Biologische Fakultät  
 Institut für Ernährung und Umwelt  
 Dornburgerstr. 24  
 O-6900 Jena