

Innehåll av fytoöstrogen i olika rödklöversorter

Gun Bernes, Annika Höjer
Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap, SLU



Foto: Annika Höjer

SLUTRAPPORT
till Regional Jordbruksforskning för Norra Sverige
September 2013

Sammanfattning

Rödkläver är en viktig komponent i den norrländska vallen. Enligt denna studie finns skillnader mellan olika rödkläversorter i deras koncentration av fytoöstrogener. Den mest betydelsefulla skillnaden gäller formononetin pga dess östrogena aktivitet vid omvandling till equol. Här utmärkte sig den diploida nummersorten SWÅ RK 95097 med lågt innehåll, medan SW Torun och SWÅ RK 03063 hade de högsta halterna. Också coumestrol är en viktig fytoöstrogen på grund av dess starka bindning till östrogenreceptorn. Vi fann ett visst innehåll av coumestrol i rödkläver. Detta har inte tidigare rapporterats och är något som borde studeras noggrannare. Det är viktigt att fortsätta arbetet kring fytoöstrogener i rödkläver, hur halterna kan påverkas och hur man kan motverka negativa konsekvenser av ett högt innehåll.

Bakgrund

Fytoöstrogener är ett samlingsnamn på ämnen som finns i växter och som kan fungera som hormoner eftersom de har en liknande kemisk struktur som könshormoner hos däggdjur. De kan därigenom binda till samma receptorer som könshormonerna och blockera eller inducera en reaktion. Intresset för fytoöstrogener startade i Australien där problem med fruktsamheten hos tackor kunde relateras till bete av s.k. subkläver med hög halt av en viss sorts fytoöstrogen (Batterham et al., 1965). Hos nötkreatur har man inte funnit samma effekter på fruktsamheten, trots att fytoöstrogenerna verkar omsättas på samma sätt hos får och nöt (Lundh et al., 1990). De fytoöstrogener som är vanliga i rödkläver tillhör gruppen isoflavoner, där formononetin är den vanligaste typen men även daidzein, biochanin A och genistein finns.

När växter som innehåller fytoöstrogener utfodras bryts vissa av dem ner till andra ämnen utan östrogen effekt. Andra passerar relativt oförändrade genom mag-tarmkanalen och kommer ut med träcken eller tas upp och kan utsöndras via urinen. Bara en liten andel tas upp i kroppen med en eventuell östrogen effekt som följd. Det är i huvudsak den andel som i mag-tarmkanalen har ombildats till equol från formononetin och daidzein. Jämfört med formononetin och daidzein har equol en kemisk struktur som är ännu mer lik de kroppsegna hormonerna och kan därmed få en större biologisk effekt (Pfitscher et al., 2008). Genistein har lika stor bindningsförmåga till de östrogena receptorerna som equol men den bryts till stor del ner till icke-östrogena substanser i våmmen. Coumestrol anses inte vara vanligt förekommande i rödkläver, men är däremot en aktiv östrogen substans i lusern. Prunetin förekommer i rödkläver men har en låg östrogen aktivitet.

Hos tackor kan brunsten bli oregelbunden eller utebli helt när metaboliterna binder till östrogenreceptorerna (Kelly et al., 1980). Andra symptom vid utfodring av foder som innehåller fytoöstrogener till får är cystor på äggstockarna, förstorat juver och utsöndring av en mjölkliknande vätska från juvervävnaden trots att tackan inte är lakterande (Adams, 1995). Efter 4-5 månaders kontinuerlig utfodring med rödkläver kan följden bli permanent infertilitet. Livmoderhalsen förändras morfologiskt och en ökad slemsekretion hämmar spermietransport vilket gör att befruktning inte kan ske. Tackan kan också drabbas av livmoderframfall (Marshall, 1973). Svenska Djurhälsovården rekommenderar att man till tackor kring betäckning och lamning bör ha maximalt 20 % rödkläver i bete och ensilage och maximalt 30 % i hö.

I och med att klöver kan ge fruktsamhetsstörningar vore det en fördel att på gårdar med lammproduktion periodvis kunna välja rödkläversorter med låga halter fytoöstrogener. Att ha klöver i vallarna även på dessa gårdar är viktigt. Förutom att den utgör en viktig kvävefixerande komponent i växtföljden är klövern också en viktig och smaklig proteinkälla i

foderstaten. Det är framförallt växande lamm och högdräktiga och digivande tackor som har ett högt proteinbehov. Marley et al. (2007) fann i en studie att lamm hade signifikant högre foderkonsumtion och proteinintag med rödklöversilage än med rajgränsilage. I samma experiment fann man också att lammen i rödklövergruppen hade högre tillväxt än de som utfodrats med rajgränsilage. Motsvarande iakttagelser kunde vi göra i en studie där lamm utfodrades med ensilage med olika klöverhalt (Bernes et al., 2006).

Även om man inte sett några effekter på fruktsamheten hos mjölkkor så kan rödklövers innehåll av fytoöstrogen vara av intresse även i mjölkproduktionen. En studie av Höjer et al. (2012) visade att med foderstater med en klöverhalt på ca 40 % av ts kan innehållet av fytoöstrogener, framförallt equol, i mjölken bli förhållandevis högt. Ekologisk mjölk hade högre koncentration av equol än konventionell mjölk i en finsk studie (Hoikkala et al., 2007), troligen beroende på en högre användning av rödklöversilage på de ekologiska gårdarna. Equol kan hos människa ha flera positiva hälsoegenskaper, bland annat kan tillväxten av cancerceller reduceras (Nielsen et al., 2012; Lund et al., 2011). Även i människans magtarmkanal kan equol bildas från fytoöstrogener i maten, främst från sojaprodukter, men i västvärlden är det bara ca 30-50 % av individerna som har denna förmåga (Rowland et al., 2000). De positiva effekterna av equol skulle alltså nå en större skara om de kunde tillföras konsumenterna via mjölk istället för från vegetabiliska källor. Jämfört med tidigare publicerade försök var koncentrationen av equol betydligt högre i den studie som utförts i SLUs forskningslagård i Röbbäcksdalen, Umeå (Höjer et al., 2012).

Innehållet av ett flertal olika substanser i växterna kan påverkas av platsberoende förhållanden, t ex jordmån, klimat eller latitud (ex. Oloumi & Hassibi, 2011; Pirbalouti et al., 2011; Zheng et al., 2011). När det gäller innehållet av fytoöstrogener finns inte så mycket gjort, men exempelvis fann Carrera et al. (2011) att det totala innehållet av isoflavonoider i sojaböna var högre i de kallare delarna av Argentina. Resultat av Höjer et al. (manuskript) visar högre koncentration av daidzein och formononetin i Umeå än i Skara. Då man använde olika sorter på de olika försöksplatserna är det dock inte helt klarlagt om det är en skillnad beroende på faktorer relaterade till växtplatsen eller sorten.

Koncentrationen av fytoöstrogen varierar mellan olika växtdelar och utvecklingsstadier (Saviranta et al., 2008). De högsta halterna finns under vår/försommar, varefter koncentrationen avtar efter blomningen (Adams, 1995). Även skördetid, odlingsplats och konserveringsmetod påverkar koncentrationen av isoflavon i rödklöver (Sivesind & Seguin 2005). Höberedning kan minska halten av östrogener medan inverkan av ensilering är mer omtvistad.

Effekten av skördetid har bekräftats i studier som nyligen genomförts i Umeå (Höjer et al., manuskript). Man fann relativt höga halter av formononetin i grönmassa av rödklöver och koncentrationen var högre än vad som redovisats av t ex Sarelli et al. (2003). När återväxten skördades i mitten på juli (5 veckor efter första skörd) var koncentrationen av både daidzein och formononetin högre än vid skörd 2 veckor senare.

Halten av fytoöstrogen kan skilja mellan olika sorter (Saviranta et al., 2008; Sivesind & Seguin, 2005). Detta har också utnyttjats i vissa länder med framträdande lammproduktion. Ett brittiskt växtförädlingsföretag anger i sin sortlista vilka rödklöversorter som har hög respektive låg halt av fytoöstrogen för att producenterna ska kunna välja olika sorter till sina djur vid olika tillfällen i produktionen. På den svenska marknaden finns inga uppgifter eller tidigare studier rörande innehållet i de sorter som säljs. Detta projekt är ett första steg för att råda bot på denna brist. Resultatet kan ligga till grund för rekommendationer av sortval vid

mjölk- och lammproduktion. Även fröfirmorna kan ha nytta av resultaten i sin sortinformation och i det vidare förädlingsarbetet.

I tabell 1 anges den totala halten fytoöstrogen och även specifikt de östrogen aktiva ämnena formononetin, daidzein och coumestrol enligt några olika undersökningar, som jämförelse med de resultat vi redovisar nedan (analysmetoderna kan skilja en del).

Tabell 1. Koncentration av fytoöstrogen enligt några olika studier, mg/kg ts.

Sort	Fytoöstrogen, totalt	Formononetin	Daidzein	Coumestrol	Referens
AberRuby (låg fyto)	-	1 690	50	id ^a	Hoerger et al., 2011
Larus	-	8 540	84	id	- ” -
Tedi	-	12 500	16	id	- ” -
Formica	-	3 300	ia ^b	ia	Moorby et al, 2004
Astra	-	4 700	ia	ia	- ” -
?	-	6 800	630	0	Mustonen et al., 2006
Betty (1a skörd)	16 335	8 571	131	ia	Höjer et al.(manuskript)
Betty (tidig 2a skörd)	21 217	8 597	47	ia	- ” -
Betty (sen 2a skörd)	12 925	6 342	40	ia	- ” -
Betty (3e skörd)	15 852	7 348	41	ia	- ” -
CRS 15 ^c	32 590	13 320	210	ia	Tsao et al. 2006
Amos ^d	11 490	7 320	260	ia	- “ -
CRS 34 ^e	9 040	5 080	230	ia	- “ -

^a id = inte detekterad

^b ia = inte analyserad

^c blad från plantor i sen blomning

^d stam från plantor i sen blomning

^e bladstjälkar från plantor i sen blomning

Material och metoder

Prover togs i befintliga sortförsök på Röbbäcksdalen. Ambitionen var att ta alla prov från samma vallålder, men för att få med så många sorter som möjligt inom budgetens ram togs prover från både Vall I och Vall II. För att också få en jämförelse över vallåldrarna provtogs SW Torun i både Vall I och Vall II.

I den slutliga provtagningen fanns följande sorter med:

- SW Torun (tetraploid) - Vall I och Vall II
- SW Yngve (diploid) - Vall II
- Amanda (tetraploid) - Vall II
- SWÅRK 95097 (diploid) – Vall II
- SWÅRK 03063 (tetraploid) – Vall I
- LÖRK 9735 (tetraploid) – Vall II
- Ilte (tetraploid) – Vall II
- SW Ares (tetraploid) – Vall I

Sortmaterialet har en spridning av olika ursprung och tidighetsklasser. SW Ares är en sydsvensk medelsen diploid typ, Ilte härstammar från Baltikum, LÖRK 9735 är en norsk sort och övriga är sena sorter från växtförädlingsstationen i Lännäs, Västernorrland.

Klippning

Provtagningen gjordes i återväxten vid två olika utvecklingsstadier (förstaskörd tagen 21 juni). Detta eftersom det oftast är i återväxten som klöverhalten i praktiken är som högst. Av varje sort klipptes två ytor à 0.5 m². Alla sorter klipptes under en och samma dag, den 23 juli (knoppning) respektive 14 augusti (blomning). Klipphöjden var ca 3-4 cm. Grödan lades i plastpåsar som förvarades i en låda med kylklampar tills allt var färdigklippt. Därefter förvarades proverna i kylrum (+4°C) varifrån ett i taget togs fram för vidare behandling.

Sortering

Varje prov (dvs två prover från varje sort och tillfälle) vägdes färskt och delades sedan i sin tur i två delar. Allt material som inte var rödklöver sorterades bort från den ena halvan, därefter delades detta prov i två delar (varav ett som reserv) som förpackades tätt och lades i frys (-20°C) för kommande analys av fytoöstroger. Den andra halvan av varje prov delades ytterligare i två delar. Allt material som inte var rödklöver sorterades bort. Den ena delen sorterades i olika utvecklingsstadier. Fraktionerna vägdes färskt, torkades och vägdes i torrt tillstånd. Detta material slogs sedan ihop igen för senare näringsanalys. Den återstående delen sorterades dagen efter i blad, bladstjälk, blomma och stam. Fraktionerna torkades och vägdes. Dessa prover sparades inte.

Analys

Proverna för näringsanalys maldes till 1 mm och sändes till AgriLab, Uppsala för analys. De parametrar som analyserades var råprotein som analyserades med Dumas metoden (SS-ISO 13878) samt omsättbar energi, iNDF, NDF och torrsubbstans som analyserades med NIRS.

De frysta proverna skickades för fytoöstrogeranalys till Århus universitet, Foulum, Danmark. Proverna frystorkades och analyserades därefter med vätskekromatografi (HPLC) och detekterades med tandemkopplad mass-spektrometri (MS/MS). De analyserades för innehåll av fytoöstrogenerna formononetin, daidzein, biochanin A, genistein, prunetin, equol, enterolakton, enterodiol, coumestrol, secoisolariciresinol och matairesinol.

Skördedata

Siffror på skördad mängd av respektive sort har hämtats från den ordinarie sortprovningen i intilliggande försöksrutor. Dessa skördades den 31 juli, dvs mellan våra provtagningar.

Statistik

Data analyserades med SAS mixed model med de fixa faktorerna provtagningsdatum, sort och interaktionen mellan dessa. Block inom sort och tid togs med som slumpfaktor men uteslöts i den slutliga bearbetningen då det inte hade någon signifikant inverkan. De variabler som undersöktes var andel olika växtdelar, näringsinnehåll samt koncentrationen av fytoöstroger. Dessutom har korrelationen mellan olika variabler undersökts med Pearsons korrelation i statistikprogrammet NCSS 2000.

Resultat

Baljväxtandelen var hög i proven. Ungefär 10 % sorterades bort vid första provtagnings-tillfället och 5 % vid det senare. Detta var i huvudsak ogräs men även helt vissnade delar av klöverplantor. Graderingen i den officiella sortprovningen anger en baljväxtandel på 97-100% i de olika sorterna.

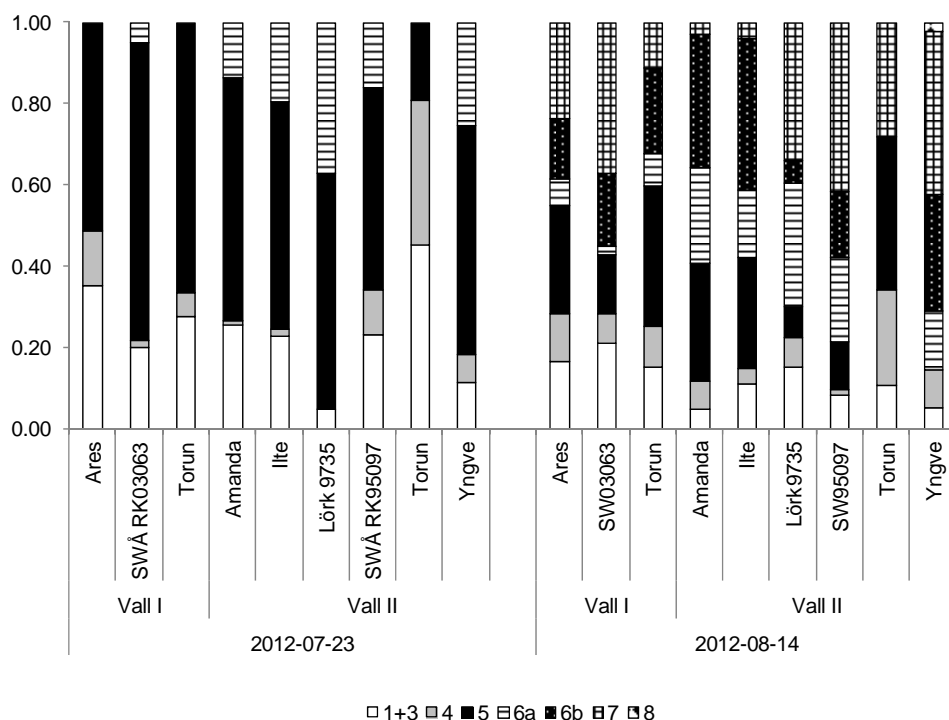
Skördad mängd

Enligt resultaten från den officiella sortprovningen varierade baljväxtskörden i återväxten den 31 juli från knappt 2 400 kg ts (SWÅRK 03063) till drygt 2 800 kg ts (Amanda). Några statistiska jämförelser från denna provning är inte publicerade ännu.

Utvecklingsstadier

Sorteringen i olika utvecklingsstadier visade att vid det första provtagningsstillfället var 0,37 viktandelar av skotten i den mest utvecklade sorten (LÖRK 9735) i blomning och 0,58 i knoppsträckning (Figur 1). I den minst utvecklade sorten (SW Torun Vall II) var 0,20 viktandelar av skotten i knoppsträckning. Resten var i knoppansvällning, stjälksträckning eller bladstadium.

Vid det senare provtagningsstillfället hade den mest utvecklade sorten (SW Yngve) börjat få skott i fröbildningsstadium. Den minst utvecklade (SW Torun Vall I + Vall II) hade fortfarande 0,35–0,37 viktandelar av skotten i knoppsträckning och en mindre andel skott i blomning.

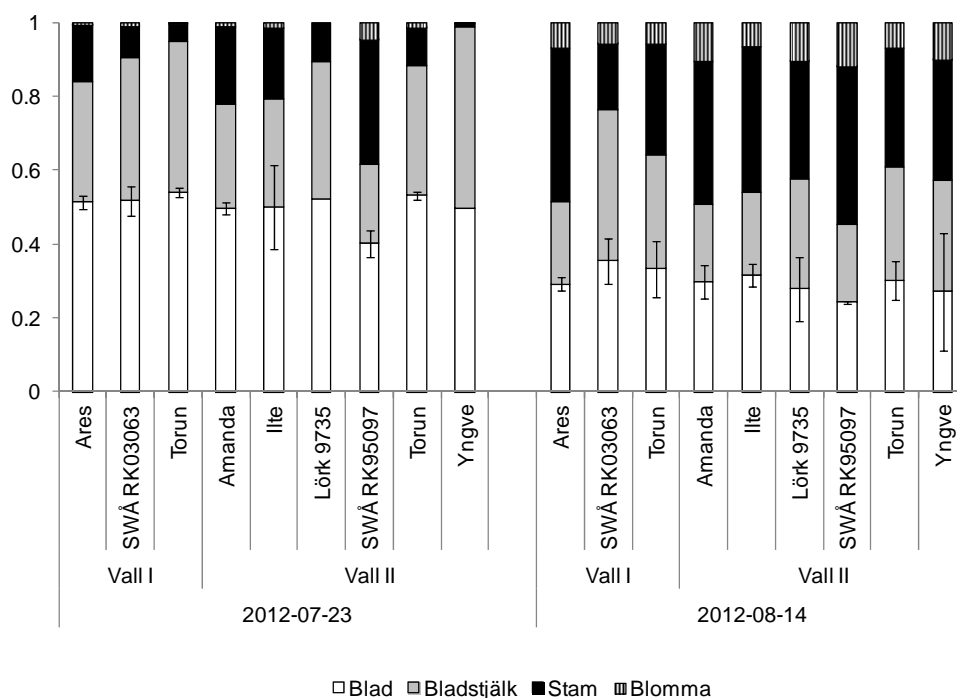


Figur 1. Utvecklingsstadium (i torrviktsandel) av olika sorter av rödklöver provtagna vid två tidpunkter (knoppning och blomning) i återväxten. Stadium 1+3 är bladstadium + stjälksträckning, 4 knoppansvällning, 5 knoppsträckning, 6a blomning, 6b sen blomning, 7 mycket sen blomning och 8 fröbildning.

I den officiella sortprovningsgraderades Amanda, Ilte, LÖRK 9735 och SW Yngve till stadium 5 (knoppsträckning) och de övriga till stadium 6 (blomning) den 31 juli.

Bladandel

Det fanns inga signifikanta skillnader mellan sorterna beträffande andel blad, varken vid provtagningen i knoppstadium eller vid blomning (Figur 2). Däremot var det en tendens till skillnader i andel stam, bladstjälk samt andel blad + bladstjälk vid knoppning ($P = 0,052$; $P = 0,058$ och $P = 0,059$ för respektive), med större andel stam men lägre andel bladstjälk samt blad + bladstjälk i SWÅRK 95097 än i SW Yngve. Vid blomning var det inga skillnader. För alla sorter var bladandelen betydligt lägre vid blomning än vid knoppning. Frånvaron av signifikanta skillnader mellan sorterna kan delvis bero på det begränsade antalet prover per sort och provtillfälle.



Figur 2. Torr viktsandel av växtdelar hos olika sorter av rödklöver provtagna vid två tidpunkter (knoppning och blomning) i återväxten. Felstaplar anger standardavvikelsen i bladandelen. Värdena är medeltal av två prover av varje sort/ tillfälle utom för första tillfället av LÖRK 9735 och SW Yngve som baseras på bara ett prov per sort.

Näringsinnehåll

Tabell 2 visar näringsinnehållet vid de båda provtagningstillfällena. Det fanns inga signifikanta skillnader mellan sorterna men för samtliga variabler var det skillnader mellan provtagningstillfällena.

Innehåll av fytoöstrogener

De fytoöstrogener som hittades i proverna var daidzein, genistein, prunetin, coumestrol, biochanin A och formononetin (Tabell 3). Inget av proverna innehöll equol, enterodiol, enterolakton, secoisolariciresinol eller matairesinol.

Vallåldern påverkade inte innehållet av någon av de undersökta fytoöstrogenerna, det vill säga det var inga signifikanta skillnader mellan Vall I och Vall II för SW Torun.

Provtagningsstidpunkten påverkade koncentrationen av genistein, formononetin, biochanin A, prunetin och coumestrol och gav högre värden vid det tidigare skördetillfället än vid det senare. Koncentrationen av daidzein påverkades inte av skördetidpunkten.

Vid sammanslagning av alla fytoöstrogener var det, i medel över de båda provtagnings-tillfällena, högre koncentration i LÖRK 9735 än i SW Yngve och SWÅRK 95097 men ingen skillnad mot de andra sorterna. Koncentrationen i Ilte var även den högre än i SWÅRK 95097 men den skilde sig inte från de andra sorterna.

De fytoöstrogener som förkom i högst koncentration var formononetin och biochanin A. Koncentrationen av formononetin var signifikant högre i SWÅRK 03063, SW Torun vall I och Ilte än vad den var i SWÅRK 95097 och koncentrationen av biochanin A var högre i LÖRK 9735 än den var i SWÅRK 03063, SW Torun (Vall I och II), SWÅRK 95097 och SW Yngve och även högre i SW Ares än den var i SW Yngve. I övrigt skilde sig inte sorterna.

Koncentrationen av prunetin var högst i LÖRK 9735 och därefter i fallande ordning Amanda, SWÅRK 03063, SW Yngve, SWÅRK 95097, Ilte, SW Torun och lägst var värdena i SW Ares.

Koncentrationen av coumestrol påverkades av interaktioner mellan tid och sort. Därför analyserades den inom varje provtagningsstidpunkt för sig (Tabell 4). Resultaten visade att vid det första tillfället var det högre koncentration i SWÅRK 03063 och Ilte än vad det var i Amanda och SW Yngve men inga skillnader i övrigt. Vid det senare tillfället var det högre koncentration i SW Torun Vall I än i SWÅRK 95097 men inga andra skillnader.

Koncentrationerna av daidzein och genistein skilde inte mellan sorterna.

Tabell 2. Innehåll av omsättbar energi (OE), råprotein (RP), NDF samt iNDF i prover av de olika rödklöversorterna. Värdena är medeltal av de två proverna av varje sort/tillfälle.

Datum	Vallålder	Sort	OE, MJ/kg ts	RP, g/kg ts	NDF, g/kg ts	iNDF, g/kg NDF
23 juli	Vall I	SW Ares	11,1	229	286	274
		SWÅRK 03063	11,1	216	272	260
		SW Torun	11,3	223	260	267
	Vall II	Amanda	11,0	204	287	294
		Ilte	10,9	224	301	285
		LÖRK 9735	10,8	202	302	308
		SWÅRK 95097	11,1	207	309	290
		SW Torun	11,1	223	271	252
		SW Yngve	11,2	218	275	295
14 augusti	Vall I	SW Ares	10,7	177	369	329
		SWÅRK 03063	10,7	196	322	284
		SW Torun	10,8	194	335	310
	Vall II	Amanda	10,6	164	370	361
		Ilte	10,6	171	378	347
		LÖRK 9735	10,6	164	389	352
		SWÅRK 95097	10,4	162	395	379
		SW Torun	10,5	185	348	309
		SW Yngve	10,2	177	384	407

Tabell 3. Koncentration av fytoöstrogener i olika sorter av rödklöver provtagna vid två olika tidpunkter i återväxten (23 juli och 14 augusti). Små bokstäver efter koncentrationen fytoöstroger anger signifikanta skillnader mellan sorter (radvis). Stor bokstav anger skillnad mellan skördetidpunkterna.

Fytoöstroger mg/kg ts	Medel per sort för båda provtagningstillfällena									Medel alla sorter per tidpunkt		P-värden		
	Vall I			Vall II						Knoppn. 23 jul	Blomn. 14 aug	Tid	Sort	Tid* sort
	SW Ares	SWÅRK 03063	SW Torun	Amanda	Ilte	LÖRK 9735	SWÅRK 95097	SW Torun	SW Yngve					
Daidzein	72	100	126	105	139	105	92	121	106	112	103	0,43	0,30	0,75
Genistein	356	258	371	365	381	454	331	323	290	373 A	322 B	0,004	0,11	0,15
Formonon.	6882 Ab	9409 a	9165 a	7266 ab	8873 a	8111 ab	5275 b	8462 ab	7273 ab	10978 A	4737 B	<0,0001	0,015	0,27
Prunetin	300 F	754 abcde	364 def	799 ab	370 cdef	961 a	471 bcdef	360 def	591 abcdef	620 A	484 B	0,001	0,0008	0,13
Biochanin A	8542 Ab	6226 bc	5805 bc	7115 abc	7498 abc	10122 a	5055 bc	5263 bc	3913 c	9771 A	3460 B	<0,0001	0,003	0,24
Totalt fytoöstroger	16256 abc	16942 abc	15934 abc	15648 abc	17375 ab	19676 a	11296 c	14611 abc	12290 bc	21971 A	9146 B	<0,0001	0,009	0,24

Tabell 4. Koncentration av coumestrol i olika sorter av rödklöver provtagna vid två olika tidpunkter i återväxten (23 juli och 14 augusti). Små bokstäver efter koncentrationen coumestrol anger signifikanta skillnader mellan sorter för varje tidpunkt eller mellan tidpunkterna. Stor bokstav anger skillnad mellan tidpunkterna.

Coumestrol mg/kg ts	Sort									Tid	P-värden		
	Vall I			Vall II							Tid	Tid	Sort
Tidpunkt	SW Ares	SWÅRK 03063	SW Torun	Amanda	Ilte	LÖRK 9735	SWÅRK 95097	SW Torun	SW Yngve				
Knoppn. 23 juli	121 Ab	164 a	126 ab	79 b	161 a	143 ab	100 ab	130 ab	82 b	123 A	<0,0001	0,013	0,022
Blomn. 14 augusti	53 Ab	55 ab	61 a	44 ab	42 ab	40 ab	33 b	45 ab	43 ab	46 B		0,019	

Samband mellan olika parametrar

Korrelationer har beräknats mellan alla olika uppmätta parametrar. De båda provtagnings-tillfällena har räknats tillsammans för att öka antalet observationer. I tabell 5 redovisas de samband som är signifikanta ($P < 0,001$) och som har ett R^2 -värde på minst 0,6.

Det finns en positiv korrelation mellan andelen blad och flera av fytoöstrogenerna, framförallt formononetin. Troligen är det kopplingen till andel blad som ligger bakom många av de övriga starka samband som finns. Fytoöstroginnehållet är även korrelerat till innehållet av NDF och råprotein; ju mer NDF och mindre råprotein desto mindre formononetin, biochanin A och coumestrol. Detta gör att den vanliga näringsanalysen kan användas som en vägledning till fytoöstroginnehållet i fodret.

Halterna av biochanin A, formononetin och coumestrol är starkt positivt korrelerade till den totala fytoöstroginhalten, vilket är naturligt för de båda förstnämnda då de utgör en stor del av totalen.

Tabell 5. Korrelationer mellan halter av olika fytoöstrogen och näringsvärde, utvecklingsstadium samt andel växtdelar i motsvarande provrutor. Alla fytoöstrogen testades mot varandra samt mot alla växtdelar och alla utvecklingsstadier men bara signifikanta samband med ett R^2 -värde på minst 0,6 redovisas.

	Formononetin	Biochanin A	Coumestrol
Formononetin		0,79	0,91
Biochanin A	0,79		0,82
Coumestrol	0,91	0,82	
Fytoöstrogen, totalt	0,94	0,95	0,91
MJ/kg ts	0,63		0,61
Rp/kg ts	0,80	0,61	0,78
NDF/kg ts	-0,84	-0,67	-0,77
iNDF/kg NDF	-0,67		-0,66
Utvecklingsstadium 6b	-0,60		
Utvecklingsstadium 7	-0,61		
Andel blad	0,89	0,77	0,81
Andel stam	-0,74		-0,64
Andel blommor	-0,74	-0,68	-0,67

Slutsatser

Liksom i tidigare studier var skillnaden i fytoöstroginhalt mellan provtagnings-tidpunkterna betydande. Det kan förklaras av förändringar både i graden av utveckling och i andelen blad. Denna skillnad var ofta större än skillnaden mellan sorter, men det fanns viktiga signifikanta sortskillnader, bl a i den totala koncentrationen av fytoöstrogin. LÖRK 9735 verkar vara en sort med hög koncentration och även Ilte hade lite högre koncentration än övriga sorter. Bland sorterna med lägre koncentration fanns främst SWÅRK 95097 men även SW Yngve, båda diploida sorter. Den mest betydelsefulla skillnaden gäller formononetin pga dess höga halt och östrogena aktivitet vid omvandling till equol. Här utmärkte sig SWÅRK 95097 med lågt innehåll, medan SW Torun och SWÅRK 03063 hade de högsta halterna.

I jämförelse med andra studier (tabell 1) är fytoöstrogenhalten i denna studie i nivå med vad som tidigare har setts vid försök vid Röbbäcksdalen och andra platser. I tabell 1 finns sorter med betydligt högre fytoöstrogeninnehåll än vad denna undersökning visat men resultaten kan variera stort beroende på vilka växtdelar som undersöks och när de skördats. Skillnaden mellan den högsta och lägsta sortens totala fytoöstrogeninnehåll var här nästan 60 %, vilket måste anses som betydande.

Förekomsten av coumestrol i proverna var oväntad då man i de flesta tidigare studier inte analyserat eller kunnat detektera coumestrol i rödklöver (se tabell 1). Det kan dock bero på att många studier fokuserat på isoflavoner och därmed har innehållet av coumestrol i rödklöver inte analyserats. Koncentrationen av coumestrol vid den tidigare skörden i detta material (123 mg/kg ts i medel för alla sorter) är i samma nivå eller något lägre än det som rapporterats i lusern (Seguin et al., 2004; Seguin & Zheng, 2006). I tidigare genomförda studier vid SLU Umeå har inte koncentrationen av coumestrol analyserats utan bara innehållet av isoflavoner och lignaner. Coumestrol är en viktig fytoöstrogen på grund av dess starka bindning till östrogenreceptorn. På grund av detta är förekomsten av coumestrol i rödklöver något som borde studeras noggrannare.

Man kan göra en enkel beräkning av dessa rödklöversorters eventuella inverkan på en tacka. Enligt en sammanställning av Adams (1996) behövs det 40 mg formononetin eller 1 mg coumestrol per kg levande vikt och dag för att påverka fruktsamheten. En tacka på 70 kg kan äta minst 2 kg ts ensilage. Det skulle då räcka med en klöverhalt på 16 % med en sort som innehåller 9 000 mg formononetin per kg ts för att riskera en negativ påverkan. Om sorten i stället innehåller 5 000 mg formononetin är motsvarande andel 28 % klöver. Motsvarande siffror för 80 eller 160 mg coumestrol per kg ts ger en möjlig rödklöverandel på 44 eller 22 %. Vid högre ensilagekonsumtion blir den ”tillåtna” klöverinblandningen lägre. Detta är särskilt motsägelsefullt i ekologisk produktion, där man eftersträvar hög vallfoderandel i foderstaten, och samtidigt en hög klöverandel i växtföljden. Det är alltså viktigt att vi fortsätter arbetet med att undersöka hur man kan sänka halterna fytoöstrogen i rödklöver, och hur man kan motverka negativa konsekvenser hos djuren.

Om man på liknande sätt för mjölkkor jämför sorter med högt eller lågt fytoöstrogeninnehåll skulle utfodring av ensilage med 50 % rödklöver av en sort med högt innehåll av formononetin ge 2,6 mg equol per kg mjölk medan utfodring av en sort med lägre innehåll skulle ge 1,4 mg equol per kg mjölk om samma utbyte som i studierna av Höjer et al. (2012) antas. Konsekvenserna av denna skillnad är svårare att uppskatta än vid utfodring till får då kunskapen om effekter på människan av equol från mjölkprodukter är begränsad.

Som en fortsättning på denna pilotundersökning planerar vi att gå vidare med utfodringsförsök med mjölkkor och får. På så sätt kan vi ta fram underlag för att utnyttja rödklövern och dess sortmaterial på bästa sätt, antingen för att undvika risker för störningar hos djuren eller för att framställa mjölk med positiva hälsoeffekter för human konsumtion.

Fortsatt informations spridning

Resultaten från projektet ska enligt ansökan presenteras i institutionens serie av faktablad (s k Nytt-blad) under 2013. Ytterligare publicering kan bli aktuell.

Fortsatta studier

En ansökan om uppföljande studier i olika rödklöversorter har skickats till SLF och hälften av medlen har utlovats. Resterande medel har sökts från Stiftelsen Svensk Fårforskning och CL Behms fond men inte beviljats. En studie kan troligen ändå genomföras om än i reducerad form under säsongen 2014.

En ansökan om fortsatta studier med mjölkkor söktes från Stiftelsen Lantbruksforskning (SLF) våren 2013 men beviljades inte.

En ansökan om utfodringsförsök med får har skickats till SLU Ekoforsk och ska även sändas till RJN samt SLF.

Referensgrupp

Anne-Maj Gustavsson, SLU Umeå (docent, växtodlingsexpert)

Linda Öhlund, Lantmännen Lantbruk (SW), Lännäs (rödklöverförädlare)

Oskar Rönngren och Regina Olofsson, Bergsåkersgården, Lövvånger (ekologiska lammproducenter med hög andel rödklöver i vallarna)

Referenser

- Adams, N.R, 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 1509-1515.
- Batterham, T.J., Hart, N.K., Lamberton, J.A, Braden, A.W.H. 1965. Metabolism of oestrogenic isoflavones in sheep. *Nature* 206(4983): 509.
- Bernes, G., Hetta, M., Martinsson, K. 2006. Vallfodrets kvalitet påverkar lammens konsumtionsförmåga. *Nytt från institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap/Husdjur*, 3.
- Carrera, C., Martinez, M.J., Dardanelli, J. 2011. Environmental variation and correlation of seed components in nontransgenic soybeans: protein, oil, unsaturated fatty acids, tocopherols, and isoflavones. *Crop Science* 51 (2), 800-809 DOI: 10.2135/cropsci2010.06.0314
- Hoerger, C.C., Praplan, A.P., Becker, L., Wettstein, F.E., Hungerbühler, K., Bucheli, T.D. 2011. Quantification of five isoflavones and coumestrol in various solid agroenvironmental matrices using ¹³C₃-labeled internal standards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 847-856,
- Hoikkala, A., Mustonen, E., Saastamoinen, I., Jokela, T., Taponen, J., Saloniemi, H., Wähälä, K. 2007. High levels of equol in organic skimmed Finnish cow milk. *Molecular Nutrition and Food Research* 51:782-786.
- 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. *Journal of Dairy Science* 95(8), 4520-4540.
- Höjer, A., Nadeau, E., Purup, S., Hansen-Møller, J., Gustavsson, A-M. Phytoestrogens in red clover and birdsfoot trefoil as influenced by cutting time, site and year. (Manuskript.)
- Kelly, R.W., Shackell, G.H., Allison, A.J. 1980. Reproductive performance of ewes grazing red clover (Grasslands Pawere) or white clover-grass pasture at mating. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 8, 87-91
- Lund, T.D., Blake, C., Bu, L.H, Hamaker, A.N, Lephart, E.D. 2011 Equol and isoflavonoid: potential for improved prostate health, *in vitro* and *in vivo* evidence. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9:4.
- Lundh, T.J.O., Pettersson, H.I., Martinsson, K.A. 1990. Comparative levels of free and conjugated plant estrogens in blood-plasma of sheep and cattle fed estrogenic silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(7): 1530-1534.
- Marley, C.L., Fychan, R., Fraser, M.D., Sanderson, R. 2007. Effects of feeding different ensiled forages on the productivity and nutrient efficiency of finishing lambs. *Grass and Forage Science* 62: 1-12.
- Marshall, T. 1973. Clover disease – what we know and what we can do. *Journal of Agriculture, Western Australia* 14, 198-206.
- Moorby, J.M., Fraser, M.D., Theobald, V.J., Wood, J.D., Haresign, W. 2004. The effect of red clover formononetin content on live-weight gain, carcass characteristics and muscle equol content of finishing lambs. *Animal Science* 79, 303-313

- Mustonen, E.A., Jokela, T., Saastamoinen, I., Taponen, J., Taponen, S., Saloniemi, H., Wähälä, K. 2006. High serum S-equol content in red clover fed ewes: the classical endocrine disruptor is a single enantiomer. *Environmental Chemistry Letters* 3, 154-159
- Nielsen, T.S., Höjer, A., Gustavsson, A-M., Hansen-Møller, J., Purup, S. 2012. Proliferative effect of whey from cow's milk varying in phyto-oestrogens in human breast and prostate cancer cells. *Journal of Dairy Research*, 79(2), 143-149.
- Oloumi, H., Hassibi, N. 2011. Study of the correlation between some climate parameters and the content of phenolic compounds in roots of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (25), 6011-6016 DOI: 10.5897/JMPR11.666
- Pirbalouti, A.G., Moalem, E., Yosefi, M. 2011. Influence of ecological factors on carvacrol content of *Satureja khuzestanica Jamzad*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 14 (5), 630-638.
- Pfitscher, A., Reiter, E., Jungbauer, A. 2008. Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 112 (1-3), 87-94.
- Rowland, I.R., Wiseman, H., Sanders, T.A.B., Adlercreutz, H., Bowey, E. A. 2000. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutrition and Cancer* 36:1, 27-32.
- Sarelli, L., Tuori, M., Saastamoinen, I., Syrjälä-Qvist, L., Saloniemi, H. 2003. Phytoestrogen content of birdsfoot trefoil and red clover: Effects of growth stage and ensiling method. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A - Animal Science* 53, 58-63
- Saviranta, N.M., Anttonen M.J., von Wright, A., Karjalainen, R.O. 2008. Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88(1): 125-132.
- Seguin, P., Zheng, W. 2006. Phytoestrogen content of alfalfa cultivars grown in eastern Canada. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86 (5), 765, 771.
- Seguin, P., Zheng, W., Souleimanov, A. 2004. Alfalfa phytoestrogen content: Impact of plant maturity and herbage components. *Journal of Agronomy and Crop Science* 190 (3), 211-217.
- Sivesind, E., Seguin, P. 2005. Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:6397-6402.
- Tsao, R., Papadopoulos, Y., Yang, R., Young, J.C., McRae, K., 2006. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 5797-5805.
- Zheng, J., Kallio, H., Linderborg, K., Yang, B.R. 2011. Sugars, sugar alcohols, fruit acids, and ascorbic acid in wild Chinese sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides ssp sinensis*) with special reference to influence of latitude and altitude. *Food Research International* 44 (7) SI, 2018-2026 DOI: 10.1016/j.foodres.2010.10.0076