

Proteinqualität verschiedener Rotklee-Genotypen unter Berücksichtigung der spezifischen Polyphenoloxidase-Aktivität

Weiber, N.¹, Krawutschke, M., Gierus, M. und Taube, F.

Keywords: red clover, polyphenol oxidase, specific PPO-activity, forage legume

Abstract

Increasing protein quality of forages in ruminant nutrition may contribute to reduce nitrogen losses in specialised dairy farms in Europe. Red clover is known to have high polyphenol oxidase (PPO) activity among forage legumes. The enzyme oxidises phenols to quinones. These highly reactive quinones form stabilised quinone-protein-complexes, protecting protein from fast degradation. The objective of this study was to investigate the effect of the specific PPO activity on the protein fractions of twelve red clover genotypes in two management systems (without and with mechanical stress) in pure red clover swards. The results showed that genotype seem to be of minor importance compared to the variation in PPO activity induced by mechanical stress and particular by cut. Furthermore, with increasing specific PPO activity fraction A decreased and fraction C increased slightly. However, specific PPO activity was poorly related to the protein fractions, expressed by a low R^2 .

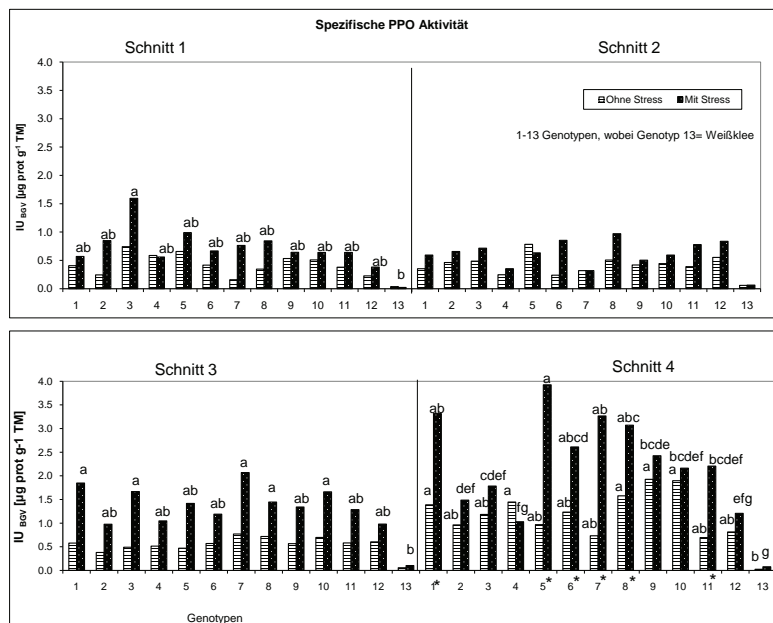
Einleitung und Zielsetzung

Futterleguminosen können durch ihre Gehalte an schnell abbaubaren Protein bei einem ungünstigen Protein-Energie-Quotienten des Futters von den Mikroorganismen im Pansen der Wiederkäuer oft nur unzureichend verwertet werden. Als Maßnahme zur Verringerung der Stickstoffverluste kann die Verbesserung der N-Nutzungseffizienz (NUE) der Wiederkäuer durch bestimmte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie kondensierte Tannine oder die Polyphenoloxidase (PPO) dienen. Die im Rotklee vorkommende PPO ist verantwortlich für die enzymatische Bräunungsreaktion, bei der sehr reaktive o-Chinone gebildet werden, die an Proteine oder Phenole binden und Chinon-Protein-Komplexe bilden. Diese können hemmend auf den raschen Proteinabbau in Silagen und in den Vormägen der Wiederkäuer wirken (Sullivan & Hatfield 2006) und damit die NUE verbessern. Eine Methode für die Schätzung des ruminalen Proteinabbaues stellt die chemische Rohproteinfraktionierung dar. Überprüft wird in dieser Arbeit, welchen Einfluss die spezifische PPO-Aktivität unter Berücksichtigung von Genotyp und Nutzung auf die Proteinqualität verschiedener Rotklee-Genotypen hat. Frühere Untersuchungen durch Eickler et al. (2007) zeigten, dass durch Beweidung die PPO-Aktivität signifikant höher war als in einem 3- und 5-Schnitt-System. Weitere Versuche zeigten, dass auch mechanischer Stress durch Walzen (simulierte Beweidung) zu einer Erhöhung der PPO-Aktivität führt. Es ist zu erwarten, dass mit steigender PPO-Aktivität sich eine Verschiebung der Proteinfraktionen von den schnell abbaubaren hin zu den langsamer abbaubaren Fraktionen ergibt.

¹ Grünland und Futterbau/Ökologischer Landbau, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Hermann-Rodewald-Str.9, 24118 Kiel, Deutschland, nweiber@email.uni-kiel.de, www.grassland-organicfarming.uni-kiel.de

Methoden

Am Standort Hohenlieth (Ls, Ø 8,9 °C, Ø 804,5 mm) wurden in einem Feldversuch 12 Rotklee (*Trifolium pratense* L.) -genotypen mit Weißklee (*T. repens*) als Kontrolle in den beiden Systemen ohne und mit mechanischem Stress (Cambridge-Walze drei Wochen vor dem Schnitt) in drei Wiederholungen geprüft. Zu jedem Schnittermin wurden das phänologische Entwicklungsstadium (mean stage by count - MSC), Erträge und Blatt/Gewichtsverhältnis (BGV) erfasst. Die Bestimmung der PPO in den tiefgekühlten Blättern erfolgte in Anlehnung an Escibano et al. (1997) mit Kaffeesäure als Substrat. Angegeben wird die spezifische PPO-Aktivität in IU bezogen auf Protein ($\mu\text{g g}^{-1}$ TS) als diejenige Enzymmenge, die eine Absorptionsänderung von $0,001 \text{ min}^{-1}$ verursacht. Die ermittelten PPO-Werte wurden auf das Blatt/Gewichtsverhältnis (BGV) bezogen und als $\text{PPO}_{\text{BGV}} = \text{PPO} [\text{IU}] \cdot \text{BGV} [\%] / 100$ angegeben. Die Proteinfractionierung erfolgte nach Licitra et al. (1996). Dargestellt werden einjährige Daten der spezifischen PPO-Aktivität und Zusammenhänge mit den Proteinfraktionen verschiedener Rotklee-Genotypen. Die gewonnenen Daten wurden einer Varianzanalyse bzw. Regressionsanalyse mit SAS 9.1 unterzogen. Multiple Mittelwertvergleiche erfolgten mittels Tukey-Test ($P < 0,05$). Bei der Auswertung der spezifischen PPO-Aktivität wurden die Aufwüchse als Messwiederholung berücksichtigt.



a-g: unterschiedliche Kleinbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen Genotypen innerhalb System und Schnitt ($P < 0,05$); * zeigt signifikante Unterschiede zwischen Systemen innerhalb Genotyp und Schnitt ($P < 0,05$, $\text{SE} = 0,21$)

Abbildung 1: Spezifische Polyphenoloxidase-Aktivität in IU_{BGV} verschiedener Rotklee-Genotypen und Weißklee in Abhängigkeit von Schnitt und System (mit und ohne Stress), Hohenlieth, 2008

Ergebnisse und Diskussion

Die spezifische PPO-Aktivität wurde bei allen vier Aufwüchsen gemessen, wobei im System mit mechanischem Stress meist höhere Werte ermittelt wurden (Abbildung 1). Weißklee (Genotyp 13) zeigte stets die geringste PPO-Aktivität. Bei beiden Systemen wurden die höchsten Werte beim Herbstaufwuchs (Schnitt 4) beobachtet, was sich auch in früheren Untersuchungen zeigte (Eickler et al. 2007). Zu diesem Schnitt hatte das System einen großen Einfluss, signifikante Unterschiede konnten für die Genotypen 1, 5, 6, 7, 8 und 11 abgesichert werden. Diese Genotypen reagierten sensibler auf den Stress als die übrigen. Insgesamt zeigte sich aber, dass der Einfluss des Genotyps von untergeordneter Bedeutung ist im Gegensatz zu dem des mechanischen Stresses und des Aufwuchses. Die Einflussfaktoren auf die PPO-Aktivität werden demnach folgendermaßen rangiert: Aufwuchs > System > Genotyp.

Während Eickler et al. (2010) 63% der Variation der PPO-Aktivität durch den Niederschlag/ Temperatur-Quotienten erklären konnte, war es für die PPO-Aktivität 2008 nicht möglich, diese mit Wachstumsbedingungen wie Temperatur und Niederschlag oder Strahlung in Zusammenhang zu bringen.

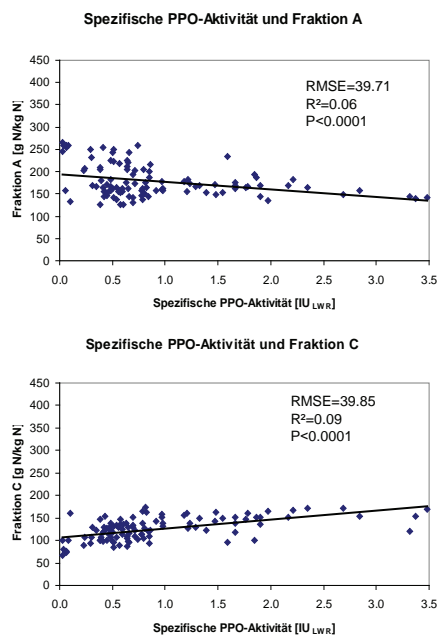


Abbildung 2: Zusammenhänge zwischen spezifischer Polyphenoloxidase-Aktivität und Fraktion A bzw. C

Bei der Rohproteinfraktionierung erzielte Weißklee bei Fraktion A die höchsten Werte (Weißklee 228,9 g/kg XP; Rotklee 174,8 g/kg XP), außer beim dritten Aufwuchs. Den mengenmäßig größten Anteil an den Fraktionen nahm bei Rotklee wie auch bei Weißklee Fraktion B2 ein (217,3-423,7 g/kg XP). Während auf Fraktion B1 sowohl Aufwuchs als auch Genotyp einen signifikanten Einfluss hatten, wurde für Fraktion B2 und B3 jeweils eine signifikante Wechselwirkung zwischen System und Aufwuchs festgestellt.

Mit steigender PPO-Aktivität ergab sich eine Abnahme der Fraktion A (NPN-Verbindungen) sowie eine Zunahme der Fraktion C (Abbildung 2, $P < 0.0001$), allerdings gekennzeichnet durch geringe Bestimmtheitsmaße ($R^2 = 0,06$; $R^2 = 0,09$). Bei den B-Fraktionen (Reinprotein) konnten keine Zusammenhänge mit der spezifischen PPO-Aktivität gefunden werden. Die geringen Bestimmtheitsmaße sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass die PPO-Aktivität im Blatt und die Proteinfraktionen in der oberirdischen Gesamtpflanze bestimmt wurden.

Schlussfolgerungen

Neben Genotyp und Nutzungssystem spielte der Aufwuchs für die spezifische PPO-Aktivität wie auch für die Proteinfraktionen eine maßgebliche Rolle. Es bedarf noch weiterer Überlegungen, die Variation der PPO-Aktivität zufrieden stellend zu erklären. Für das erste Hauptnutzungsjahr 2008 bestätigte sich allerdings die Verschiebung der Rohproteinfraktionen mit steigender PPO-Aktivität von den schnell abbaubaren hin zu den langsamer abbaubaren Fraktionen nicht so deutlich wie erwartet. Hinsichtlich der Bedeutung der spezifischen PPO-Aktivität für die Proteinfraktionen lassen sich gesicherte Aussagen und Rückschlüsse auf Basis der bisher nur einjährig ausgewerteten Daten noch nicht treffen.

Literatur

- Eickler B., Gierus M., Taube F. (2007): Einfluss der Grünlandnutzung auf die PPO-Aktivität in Rotklee. In: Zikeli S., Claupein W., Dabbert S., Kaufmann B., Müller T. und Valle Zárate A. (Hrsg.): Beiträge zur 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Hohenheim, 541-544.
- Eickler, B.; Gierus, M.; Kleen, J; Taube, F. (2010): Specific polyphenol oxidase activity of red clover (*Trifolium pratense*) and its relation with forage quality in field experiments, *Acta Agriculturae Scandinavica*, *in press*.
- Escribano J., Cabanes J., Chazarra S., Garcia-Carmona F. (1997): Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. Determination of kinetic parameters on the tyramine/dopamine pair. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 4209-4214.
- Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P.J., (1996): S Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 57: 347-358.
- Sullivan M.L., Hatfield R.D. (2006): Polyphenol oxidase and o-diphenols inhibit postharvest proteolysis in red clover and alfalfa. *Crop Science*, 46: 662-670.