

## Genotypbedingte Veränderungen der Proteinqualität bei der Gärfutterbereitung von Rotklee

Krawutschke, M.<sup>1</sup>, Weiher, N.<sup>1</sup>, Gierus, M.<sup>1</sup>, Thaysen, J.<sup>2</sup> und Taube, F.<sup>1</sup>

*Keywords: red clover, ensiling process, protein quality, polyphenol oxidase*

View metadata, citation and similar papers at [core.ac.uk](http://core.ac.uk)

brought to you by  CORE

*Ensilage of red clover results in lower concentrations of non-protein nitrogen compared to other forage legumes. It is assumed that the polyphenol oxidase (PPO) activity in red clover is related to this effect. Therefore, a laboratory ensiling trial was carried out to quantify the changes in crude protein (CP) fractions during the ensiling process using the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. At four cutting dates, fresh, wilted and ensiled herbage of three red clover genotypes and white clover grown in two systems (with and without mechanical stress) was sampled. The specific PPO activity was measured photometrically in fresh leaves of the plants. Concentrations of fraction A increased from 130-197 g/kg CP to 372-544 g/kg CP during the fermentation process leading to a drop in true protein, primarily fraction B1. The most important source of variance was the ensiling stage, except for fraction C. Despite differences in protein fractions between genotypes, these variations can not be explained by the specific PPO activity.*

### Einleitung und Zielsetzung

Futterleguminosen sind als proteinreiches Grundfutter von zentraler Bedeutung in der ökologischen Wiederkäuerfütterung. Für die Winterfütterungsperiode ist es demzufolge unerlässlich, dass Silagen mit hoher Qualität und möglichst geringen Nährstoffverlusten produziert werden. Der im Gärungsverlauf stattfindende Proteinabbau verursacht jedoch qualitative Veränderungen (Papadopoulos & McKersie 1983, Richardt & Steinhöfel 2007). Aus ernährungsphysiologischer Sicht sind hohe Gehalte an schnell abbaubarem Protein bei unzureichender Energiezufuhr im Pansen als problematisch zu bewerten. Die Silierung von Rotklee ist im Vergleich zu anderen Futterleguminosen gekennzeichnet durch eine deutlich geringere Proteolyse (u.a. Papadopoulos & McKersie 1983). Dieser Effekt wird häufig auf die Polyphenoloxidase (PPO)-Aktivität im Rotklee zurückgeführt (z.B. Sullivan & Hatfield 2006), obwohl in den meisten Fällen die PPO-Aktivität nicht gemessen wurde. Im Hinblick auf die Verbesserung der N-Nutzungseffizienz beim Wiederkäuer ist eine durch die PPO reduzierte Proteolyse von großem Interesse.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es daher, die Veränderungen der Rohproteinfraktionen nach dem Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) von verschiedenen Rotklee-Genotypen während des Silierprozesses zu quantifizieren und hierbei den Einfluss der spezifischen PPO-Aktivität zu bewerten.

### Methoden

<sup>1</sup> Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung - Grünland und Futterbau/Ökologischer Landbau, Christian-Albrechts-Universität, Hermann-Rodewald-Str. 9, 24118 Kiel, Deutschland, [mkrawutschke@email.uni-kiel.de](mailto:mkrawutschke@email.uni-kiel.de)

<sup>2</sup> Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein, Abteilung Pflanzenbau/Pflanzenschutz/ Landtechnik, Am Kamp 15-17, 24768 Rendsburg, Deutschland, [jthaysen@lksh.de](mailto:jthaysen@lksh.de)

Das Pflanzenmaterial für die vorliegende Untersuchung stammte aus einem zweifaktoriellen Feldversuch mit drei Wiederholungen, der im Juni 2007 auf den Versuchsflächen der Norddeutschen Pflanzenzucht in Hohenlieth angelegt wurde (Jahresniederschlagssumme: 805 mm, Jahresmitteltemperatur: 8,9 °C, Bodenart: Ls, Bodentyp: Braunerde). Die Prüffaktoren waren Genotyp (12 Rotkleegenotypen und Weißklee als Kontrolle) und System (ohne und mit mechanischem Stress). Im System mit mechanischem Stress wurden etwa drei Wochen vor dem geplanten Nutzungstermin die Parzellen mit einer Cambridgewalze zweimal gewalzt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass mechanischer Stress zu einer Erhöhung der PPO-Aktivität führen kann (vgl. Eickler 2008). Im ersten Hauptnutzungsjahr 2008 erfolgten vier Schnitte in einem Abstand von jeweils sechs Wochen (1. Aufwuchs: vegetatives Stadium; 2. Aufwuchs: frühes Knospenstadium; 3. Aufwuchs: Knospenstadium/Blühbeginn; 4. Aufwuchs: vegetatives Stadium). Unmittelbar vor dem Schnitttermin entnommenes Blattmaterial diente für die photometrische Messung der PPO-Aktivität in Anlehnung an Escribano et al. (1997). Darüber hinaus erfolgte die Erfassung des Blatt/Gewichtsverhältnisses (BGV).

Zur Quantifizierung der Qualitätsveränderungen während der Silierung wurden drei diploide Rotkleegenotypen (Milvus, Montana, Harmonie) sowie Weißklee (Sorte Vysocan) in frischem, angewelktem und siliertem Zustand beprobt. Als Siliergefäße wurden 1,5 l Weckgläser genutzt. Die Lagerungsdauer betrug 90 Tage. Alle Proben wurden bei 58 °C getrocknet, anschließend auf 1 mm vermahlen und mittels Nah-Infrarot-Reflex-Spektroskopie die Qualitätsparameter geschätzt. Als Referenzmethode für die Bestimmung der Proteinfractionen auf Basis des CNCPS dienten die Vorgaben von Licitra et al. (1996). Der N-Gehalt wurde mit dem C/N-Analyser vario MAX CN nach Dumas gemessen. Die nachträgliche Korrektur des TM-Gehaltes der Silagen erfolgte unter Anwendung einer vereinfachten Gleichung. Für die varianzanalytische Auswertung der Daten wurde ein gemischtes lineares Modell (SAS 9.1) herangezogen, wobei der TM-Gehalt der Proben als Kovariable Berücksichtigung fand.

## Ergebnisse

Die Kovarianzanalyse ergab für die Proteinfractionen A, B1 und B3 eine signifikante Wechselwirkung Genotyp x Silierstadium. Im Fall von Fraktion B2 konnte die Wechselwirkung System x Silierstadium statistisch abgesichert werden, wohingegen bei Fraktion C die Hauptwirkungen Genotyp und Silierstadium signifikant waren. Während der Silierung kam es zu einem signifikanten Anstieg von Fraktion A, der von angewelktem zu siliertem Pflanzenmaterial deutlich stärker ausfiel. Signifikante Unterschiede zwischen den Rotkleegenotypen konnten nur im silierten Zustand beobachtet werden. Weißklee hatte in allen Silierstadien signifikant höhere Anteile an Fraktion A als die Rotkleegenotypen. Der Genotyp Milvus wies den signifikant niedrigsten Anteil an Fraktion A und den signifikant höchsten Anteil an Fraktion B3 auf. Fraktion B verringerte sich signifikant von 733-753 g/kg XP auf 345-469 g/kg XP. Die größte Abnahme fand mit 47-67 % bei Fraktion B1 statt. Der Anteil von Fraktion C am XP war bei allen Genotypen im silierten Zustand am höchsten. Unabhängig vom Silierstadium erreichte Weißklee die niedrigsten und die Genotypen Milvus sowie Montana die höchsten Gehalte an Fraktion C (Tabelle 1).

Die spezifische PPO-Aktivität bezogen auf das BGV ist Tabelle 2 zu entnehmen. Lediglich im Herbstaufwuchs traten Signifikanzen zwischen den Rotkleegenotypen auf. Weißklee erzielte jeweils die niedrigsten Werte. Ein Zusammenhang zwischen der spezifischen PPO-Aktivität und den Proteinfractionen konnte bei den silierten Rotkleegenotypen nicht festgestellt werden. Allerdings reduzierte sich der Anteil von Fraktion A mit zunehmendem TM-Gehalt. Dieser Zusammenhang war im ersten und dritten Aufwuchs signifikant ( $R^2=0,36$ ;

$P=0,0050$  bzw.  $R^2=0,83$ ;  $P<0,0001$ ).

**Tabelle 1: Veränderung der Rohproteinfraktionen (g/kg XP) während des Silierprozesses in Abhängigkeit vom Genotyp**

Silierstadium	Genotyp	Rohproteinfraktionen <sup>1)</sup>				
		Fraktion A	Fraktion B1	Fraktion B2	Fraktion B3	Fraktion C
frisch	Weißklee	197 aC	160 aA	336	229 bA	73
	Milvus	127 bC	129 bA	339	273 aA	128
	Montana	134 bC	134 bA	341	260 aA	126
	Harmonie	130 bC	145 abA	332	269 aA	119
angewelkt	Weißklee	285 ab	110 aB	316	230 bA	61
	Milvus	179 bB	97 aA	332	268 aA	128
	Montana	186 bB	105 aA	335	252 aA	126
	Harmonie	186 bB	115 aA	341	253 aA	105
siliert	Weißklee	544 aA	52 aC	186	111 dB	109
	Milvus	372 dA	69 ab	205	202 aB	157
	Montana	390 cA	68 ab	207	185 bB	154
	Harmonie	406 bA	69 ab	220	167 cB	140

<sup>1)</sup> nach dem TM-Ertrag der einzelnen Aufwüchse gewichtete Jahresmittelwerte; Bestimmtheitsmaße der NIRS-Kalibration: 0,94-0,96; a,b kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb eines Silierstadiums; A,B kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Silierstadien innerhalb eines Genotyps (Bonferroni-Holm;  $P<0,05$ ).

**Tabelle 2: Spezifische PPO-Aktivität (IU/ $\mu$ g Protein/g TS) in Abhängigkeit von Genotyp, System und Aufwuchs**

System	Genotyp	spezifische PPO-Aktivität bezogen auf das BGV ( $SE=0,19$ )			
		1. Aufwuchs	2. Aufwuchs	3. Aufwuchs	4. Aufwuchs
ohne mech.	Weißklee	0,04 a	0,03 a	0,08 a	0,04 c
	Milvus	0,24 a	0,38 a	0,48 a	1,20 b
	Montana	0,16 a	0,31 a	0,73 a	1,31 b
Stress mit mech.	Harmonie	0,53 a	0,42 a	0,56 a	2,45 a
	Weißklee	0,04 b	0,04 b	0,11 b	0,08 d
	Milvus	0,89 a	0,85 a	0,59 ab	1,48 c
Stress	Montana	0,85 a	0,39 ab	0,93 a	3,27 a
	Harmonie	0,66 ab	0,64 ab	0,80 ab	2,42 b

a,b kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb eines Systems und einem Aufwuchs (Bonferroni-Holm;  $P<0,05$ ).

## Diskussion

Im Verlaufe des Silierprozesses kam es unabhängig vom Genotyp zu einem Anstieg des NPN-Anteils (Fraktion A) am XP und einer Abnahme des Reinproteins, was primär zu Lasten von Fraktion B1 ging. Diese Veränderungen in der Proteinqualität werden von Richardt & Steinhöfel (2007) sowie Guo et al. (2008) bestätigt. Zur Reduzierung des Proteinabbaus bietet sich der Einsatz eines geeigneten Siliermittels an. Im Vergleich zur unbehandelten Silage wird der NPN-Anteil verringert bei gleichzeitiger Erhöhung des Anteils von Fraktion B1 (Guo et al. 2008). Eine weitere Möglichkeit zur Verminderung der Proteolyse kann die Erhöhung des Anwelkgrades darstellen, wobei dieser Effekt nicht immer bei allen Aufwüchsen auftritt (Papadopoulos & McKersie 1983). Generell sollten bei der Gärfutterbereitung alle siliertechnischen Maßnahmen genutzt werden, um den Proteinabbau zu minimieren.

In zahlreichen Arbeiten wird die hemmende Wirkung der durch die PPO gebildeten  $\alpha$ -Chinone auf die Proteolyse während des Silierprozesses beschrieben (z.B. Sullivan & Hatfield 2006). Hierzu ist jedoch grundsätzlich anzumerken, dass für die Bestimmung der PPO-Aktivität bzw. der  $\alpha$ -Chinone keine anerkannte und damit zuverlässige Methode zur Verfügung steht. Aus diesem Grund kann die methodische Vorgehensweise zu differierenden Resultaten führen. Hinzu kommt, dass die meisten Untersuchungen unter kontrollierten Versuchsbedingungen und nicht wie in der vorliegenden Arbeit unter Freilandbedingungen durchgeführt wurden (vgl. Sullivan & Hatfield 2006). Demzufolge können die vorherrschenden Umweltbedingungen sowohl einen maßgeblichen Einfluss auf die PPO-Aktivität als auch auf die Proteinqualität ausüben. Die genotypbedingten Unterschiede bei den Protein-

fraktionen der Silagen liegen vermutlich in einer unterschiedlichen proteolytischen Aktivität begründet, die jedoch nicht mit der spezifischen PPO-Aktivität erklärt werden kann.

### Schlussfolgerungen

Das Silierstadium hat den größten Einfluss auf die Veränderungen der Proteinfractionen während des Silierprozesses, die in Abhängigkeit vom Genotyp unterschiedlich stark ausfallen können. Hieraus ergibt sich ein Potential für die Rotkleezüchtung, um die Proteinqualität und damit die N-Nutzungseffizienz beim Wiederkäuer zu verbessern. Auf der Basis einjähriger Ergebnisse scheint in diesem Zusammenhang der Einfluss der spezifischen PPO-Aktivität eine untergeordnete Rolle zu spielen.

### Danksagung

Die Autoren danken der H. Wilhelm Schaumann Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

### Literatur

- Eickler B. (2008): Nutritive value of forage legumes with special reference to polyphenol oxidase activity in red clover. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4209-4214.
- Guo X.S., Ding W.R., Hana J.G., Zhou H. (2008): Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. *Animal Feed Science and Technology* 142: 89-98.
- Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P.J. (1996): Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57: 347-358.
- Papadopoulus Y.A., McKersie B.D. (1983): A comparison of protein degradation during wilting and ensiling of six forage species. *Canadian Journal of Plant Science* 63: 903-912.
- Richardt W., Steinhöfel O. (2007): Untersuchungen zur Veränderung der Proteinqualität bei der Silierung von Grobfuttermitteln. *VDLUFA-Schriftenreihe* 63, S. 421-427.
- 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.