

---

## **Der Einfluss pflanzlicher Proteasen auf den Proteinabbau bei zehn verschiedenen diploiden Deutsch Weidelgras Sorten (*Lolium perenne* L.) des mittelfrühen Sortimentes**

M. Lösche, H. Salama, M. Gierus, A. Herrmann und F. Taube

Christian Albrechts Universität Kiel , Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung –  
Grünland und Futterbau/Ökologischer Landbau, 24118 Kiel

### **Einleitung und Problemstellung**

Milchvieh/Futterbaubetriebe sind trotz bedarfsgerechter Düngung durch hohe N-Salden gekennzeichnet. Einer der Gründe hierfür liegt in der geringen N-Nutzungseffizienz der Wiederkäuer. Aufgrund eines raschen Abbaus von Proteinen im Pansen bei gleichzeitig nicht ausreichend vorhandener Menge an fermentierbarer organischer Masse kommt es zur Anreicherung von Ammoniak im Pansen, welcher in Form von Harnstoff im Urin des Tieres ausgeschieden wird und auf diese Weise eine starke Belastung der Umwelt verursacht. Während in älteren Untersuchungen überwiegend davon ausgegangen wurde, dass der Proteinabbau im Pansen der Wiederkäuer ausschließlich durch die dort lebenden Mikroorganismen vermittelt wird, zeigen neuere Studien, dass während der ersten Stunden nach der Aufnahme frischen Weidefutters auch pflanzeneigene Proteasen einen bedeutenden Anteil zum Proteinabbau beisteuern können (ZHU et al., 1999).

Das Ziel des vorliegenden Projektes liegt darin, die Auswirkungen pansenähnlicher Bedingungen auf die Aktivität pflanzlicher Proteasen in frischen Blättern von zehn diploiden Deutsch Weidelgras Sorten des mittelfrühen Sortimentes zu untersuchen. Anhand der Ergebnisse lassen sich möglicherweise Sorten identifizieren, die aufgrund eines höheren Anteils unabgebauten Proteins einen höheren Futterwert aufweisen und auf diese Weise zusätzlich zur Verminderung der Umweltbelastung beitragen. Es werden die Proteingehalte der Proben nach unterschiedlicher Inkubationsdauer präsentiert und die daraus rechnerisch abgeleiteten Abbauraten diskutiert. Zusätzlich wird die Veränderung der Proteinzusammensetzung mit fortschreitender Inkubationsdauer mit Hilfe der Gelelektrophorese dargestellt und qualitativ erörtert.

## Material und Methoden

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Jahre 2006 auf dem Versuchsgut Hohenschulen der Universität Kiel durchgeführt. In Form einer einfaktoriellen Blockanlage mit dreifacher Wiederholung wurden zehn diploide Deutsch Weidelgras Sortern des mittelfrühen Sortiments zum Zeitpunkt früher Siloreife im ersten und zweiten Aufwuchs beprobt. Die Pflanzen wurden 5 cm oberhalb der Bodenoberfläche geerntet. Um nach dem Schnitt auftretende Veränderungen der Proteinstruktur möglichst gering zu halten, wurde das geerntete Pflanzenmaterial in einer Kühlbox umgehend ins Labor transportiert, wo zeitnah die Aufarbeitung der Proben erfolgte. Nach der Reinigung des Pflanzenmaterials mit destilliertem Wasser wurde mit Hilfe der Oberflächensterilisation in 80% Ethanol ein möglicher Einfluss am Pflanzenmaterial anhaftender Mikroorganismen während der anschließenden Inkubation verhindert. Jeweils 1 g des zerkleinerten Blattmaterials wurde in dreifacher Wiederholung drei unterschiedlichen Behandlungsstufen ausgesetzt. Behandlungsstufe 1 war dadurch gekennzeichnet, dass das Blattmaterial ohne Inkubation umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde und anschließend bei -70°C bis zur Analyse gelagert wurde. Im Gegensatz dazu wurden die Proben in Behandlungsstufe 2 und 3 für jeweils 6h bzw. 24h in Dunkelheit anaeroben Bedingungen ausgesetzt und bei 39°C in 100 ml Inkubationspuffer (50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM DTT, 2% Natriumazid) inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Blattmaterial den Pufferflaschen entnommen, mit destilliertem Wasser gespült und bei -70°C bis zu Analyse aufbewahrt. Zur Messung des Proteingehaltes wurden die tiefgefrorenen Proben unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu feinem Pulver vermahlen. Aliquote von 0,3 bis 0,5 g wurden in ein Eppendorfgefäß eingewogen und mit 800 µl Extraktionspuffer (50mM Tris, 2mM DTT, 1mM EDTA, 0,1% Triton X100, pH 7,5) versetzt. Nach der Homogenisierung der Probe mit Hilfe des Vortex erfolgte die Zentrifugation bei 10.000 xg für 10 min bei 4°C. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde anschließend mit der Methode nach BRADFORD (1976) gemessen. Die Zusammensetzung der Proteinabbauprodukte im Überstand wurde mittels Gelelektrophorese im Agilent 2100 Bioanalyser untersucht.

Tab.1: Mittlerer Proteingehalt (µg/g FM) der 10 Genotypen über alle Behandlungsstufen.

Genotyp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mittlerer Proteingehalt (µg/g FM)	42,2 <sup>b</sup>	42,4 <sup>b</sup>	48,2 <sup>ab</sup>	37,3 <sup>b</sup>	48,3 <sup>ab</sup>	49,9 <sup>ab</sup>	50,1 <sup>ab</sup>	44,3 <sup>b</sup>	48,2 <sup>ab</sup>	58,7 <sup>a</sup>

## Ergebnisse und Diskussion

Hinsichtlich der gemessenen Proteingehalte wurden neben den Haupteffekten Genotyp (G), Behandlungsstufe (BS) und Aufwuchs (A) die Wechselwirkung zwischen G x BS, A x G, A x BS und A x G X BS statistisch untersucht. Signifikanzen konnten jedoch lediglich für die drei Haupteffekte und die Wechselwirkung zwischen Aufwuchs und Behandlungsstufe festgestellt werden. Der mittlere Proteingehalt der untersuchten Genotypen über alle Behandlungsstufen

Tab. 2: Veränderungen des durchschnittlichen Proteingehaltes (µg/g FM) im Inkubationsverlauf

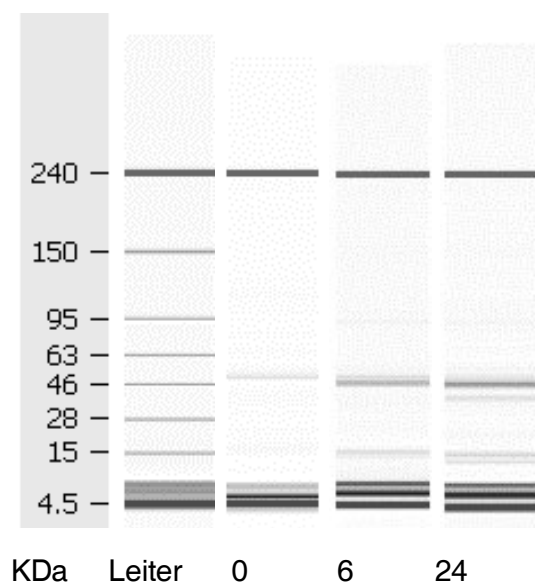
Behandlungsstufe	Erntetermin	
	1. Aufwuchs	2. Aufwuchs
1 (0 Std.)	72,1 <sup>a</sup>	126,7 <sup>a</sup>
2 (6 Std.)	24,8 <sup>b</sup>	35,7 <sup>b</sup>
3 (24 Std.)	7,9 <sup>c</sup>	14,7 <sup>c</sup>

ist in Tab. 1 dargestellt. Die Werte schwanken in einem Bereich von 37,3 bis 58,7 µg/g FM. Genotyp 10 weist signifikant höhere Gehalte auf als Genotypen 1, 2, 4 und 8.

Tab. 2 zeigt den Einfluss der Inkubationsdauer auf den durchschnittlichen Proteingehalt (µg/g FM) getrennt für beide Aufwüchse. Wie zu erkennen ist,

unterscheiden sich bei beiden Aufwüchsen die Werte des durchschnittlichen Proteingehaltes jeder Behandlungsstufe signifikant voneinander. Während die nicht inkubierten Proben die höchsten Proteingehalte aufweisen, ist mit zunehmender Inkubationsdauer eine signifikante Abnahme der Proteingehalte festzustellen. Im ersten Aufwuchs nimmt der Proteingehalt im Zeitraum von 24 Stunden um 89% ab, im zweiten Aufwuchs beträgt die Abnahme 88,2%. Die ermittelten Werte stützen die Ergebnisse von BEHA et al. (2002), die bei Inkubationsversuchen mit Deutschem Weidelgras im gleichen Zeitraum eine Abnahme von 82,3% ermittelten. Anhand der gemessenen Proteingehalte der Proben wurden die jeweiligen Abbauraten rechnerisch ermittelt. Die prozentuale stündliche Abbaurate schwankt bei beiden Aufwüchsen zwischen 7,0 und 12,2%. Signifikante Unterschiede zwischen den Abbauraten der untersuchten Genotypen konnten nicht festgestellt werden. Die ermittelten Abbauraten zeigen jedoch, dass die von BEHA et al. (2002) getroffene Aussage, dass bereits nach vier Stunden ein Drittel Ausgangsproteins abgebaut ist, zum Teil sogar übertroffen wird.

Abb. 1: Qualitative Auswertung der Proteinabbauprodukte



Der Einfluss der Inkubation auf die Polypeptidzusammensetzung der Proben wird in Abbildung 1 verdeutlicht. Die Analyse des nicht inkubierten Materials zeigte, dass mehrere Banden sichtbar waren. Am deutlichsten trat eine Bande im Bereich zwischen 50-60 kDa hervor. Zusätzlich war eine schwache Bande zwischen 15-20 kDa zu erkennen. Allerdings konnten in der vorliegenden Untersuchung keine deutlichen Unterschiede zwischen den Genotypen beobachtet werden. Die Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von BEHA et al. (2002) und ZHU et al. (1999). Sie konnten ebenfalls bei 55 kDa ein Polypeptid nachweisen, welches sie als große Untereinheit (LSU) der Rubisco identifizierten. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Untersuchungen konnten sie zusätzlich das light harvesting chlorophyll binding protein des Photosystems II (LHCPII) identifizieren, dessen Molekulargröße bei 24 kDa liegt. BEHA et al. (2002) erwähnen in ihrer

Veröffentlichung ebenfalls ein Polypeptid im Bereich einer Molekulargröße von 15 kDa, von dem sie vermuten, dass es sich um die kleinere Untereinheit der Rubisco handle. Im Gegensatz dazu sprechen ZHU et al. (1999) davon, dass die Molekulargröße der kleineren Untereinheit von Rubisco unter 14 kDa liegt. Die Proben der zweiten Behandlungsstufe (6 h) waren dadurch gekennzeichnet, dass eine Verschiebung der vormals deutlichsten Bande aus der Zone zwischen 50-60 kDa in den Bereich zwischen 45-50 kDa stattfand. Zusätzlich war eine Anreicherung von Polypeptiden in der Region zwischen 15-20 kDa erkennbar. BEHA et al. (2002) und ZHU et al. (1999) konnten in ihren Studien ebenfalls eine Abnahme der großen Untereinheit der Rubisco verbunden mit dem Auftauchen eines potentiellen Abbauproduktes im Bereich zwischen 45-50 kDa belegen. Die Proben der 3. Behandlungsstufe (24 h) zeichneten sich dadurch aus, dass das zu Beginn deutlichste Polypeptid im Bereich zwischen 50-60 kDa häufig nicht mehr nachzuweisen war. Der bereits nach sechs Stunden erkennbare Prozess der Bandenverschiebung in die Region zwischen 45-50 kDa setzte sich fort. Im Vergleich mit den Proben der 2. Behandlungsstufe tauchte neben dem bereits erwähnten Polypeptid zwischen 45-50 kDa häufig ein weiteres mögliches Abbauprodukt in der Region um 40 kDa auf. Des Weiteren war eine weitere Anreicherung von Polypeptiden in der Zone unter 20 kDa festzustellen. Die beschriebene Abnahme des zu Beginn deutlichsten Polypeptids wird ebenfalls in der Literatur beschrieben. KINGSTON-SMITH et al. (2005)

betonen in diesem Zusammenhang, dass das Polypeptid bereits nach 16 Stunden nicht mehr nachweisbar sei. ZHU et al. (1999) berichten in diesem Zusammenhang dass das als große Untereinheit der Rubisco identifizierte Polypeptid nach 24 Stunden nicht mehr zu messen sei. In Übereinkunft mit den hier vorliegenden Ergebnissen wird auch bei Ihnen von einer Anreicherung möglicher Abbauprodukte unter 20 kDa gesprochen.

### Schlussfolgerungen

Als Resultat lässt sich festhalten, dass die Abnahme der Proteinkonzentration mit fortschreitender Inkubationsdauer den Einfluss pflanzlicher Proteasen am Proteinabbau belegt. Eine Selektion von Genotypen mit geringerer Proteinabbaurate ist, basierend auf Daten des ersten Versuchsjahres, nicht möglich.

### Literatur

- BEHA E.M., THEODOROU M.K., THOMAS B.J., KINGSTON-SMITH A.H. (2002): Grass cells ingested by ruminants undergo autolysis which differs from senescence: implications for grass breeding targets and livestock production. *Plant, Cell and Environment* 25, 1299-1312.
- KINGSTON SMITH A.H., BOLLARD A.L. SHAW R., DAVIES T.E., THEODOROU M.K. (2003): Correlations between protein content and protease activity in forage crops. *Aspects of Applied Biology* 70, 101-106.
- ZHU W.Y., KINGSTON-SMITH A.H., TRONCOSO D., MERRY R.J., DAVIES D.R. PICHARD G. THOMAS H., THEODOROU M.K. (1999): Evidence of a role for plant proteases in the degradation of herbage proteins in the rumen of grazin cattle. *Journal of Dairy Science* 82, 2651-2658
-