

## **Gärqualität von Rotkleegenotypen unter besonderer Berücksichtigung einer variierenden Polyphenoloxidase-Aktivität**

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

<sup>1</sup>Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung – Grünland und Futterbau/Ökologischer Landbau, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Hermann-Rodewald-Str. 9, 24118 Kiel, mkrawutschke@email.uni-kiel.de

<sup>2</sup>Landwirtschaftskammer Schleswig Holstein, Abteilung Pflanzenbau/Pflanzenschutz/Landtechnik, Am Kamp 15-17, 24768 Rendsburg

### **Einleitung und Problemstellung**

Futterleguminosen leisten in nachhaltigen Produktionssystemen einen maßgeblichen Beitrag zur Sicherstellung der Grundfuttermittellieferung und stellen zudem eine wichtige Proteinquelle in der Wiederkäuerernährung dar. Für die Winterfütterung bzw. bei ganzjähriger Silagefütterung ist es erforderlich qualitativ hochwertige Silagen mit möglichst geringen Nährstoffverlusten zu erzeugen. Bereits während des Anwelkens laufen jedoch proteinabbauende Prozesse ab, deren Ausmaß bei Rotklee deutlich geringer ist als bei anderen Futterleguminosen. Dieser Sachverhalt wird auf die Polyphenoloxidase (PPO)-Aktivität im Rotklee zurückgeführt (u. a. Jones *et al.*, 1995), wobei sog. Protein-Phenol-Komplexe hemmend auf die Proteolyse wirken. So zeigen verschiedene Studien, dass bei der Silierung von Rotklee mit einer höheren PPO-Aktivität der Ammoniak-N-Gehalt am Gesamt-N - ein wichtiger Indikator für den Proteinabbau in Silagen - signifikant niedriger ausfällt (z. B. Winters *et al.*, 2008).

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte einer genotyp- und nutzungsbedingten PPO-Aktivität auf ausgewählte Gärqualitätsmerkmale verschiedener Rotkleegenotypen untersucht. Es wird erwartet, dass ein Anstieg der spezifischen PPO-Aktivität die Ammoniak-N-Gehalte verringert.

### **Material und Methoden**

Grundlage der vorliegenden Untersuchung bildet ein zweifaktorieller Feldversuch mit den Prüffaktoren Nutzungssystem und Genotyp in dreifacher Wiederholung, der im Juni 2007 auf den Versuchsflächen der Norddeutschen Pflanzenzucht in Hohenlieth (Jahresniederschlagssumme: 805 mm, Jahresmitteltemperatur: 8,9 °C, Bodenart: sandiger Lehm, Bodentyp: Braunerde) etabliert wurde. Insgesamt werden 13 Genotypen (12 Rotkleegenotypen und Weißklee als Kontrolle) in zwei Nutzungssystemen (ohne und mit mechanischem Stress) unter einer Vierschnittnutzung geprüft. Die Simulierung des mechanischen Stresses erfolgt durch Walzen der entsprechenden Parzellen etwa drei Wochen vor dem geplanten Schnitttermin mittels einer Cambridgewalze.

Unmittelbar vor dem jeweiligen Schnitttermin wurde Blattmaterial aus den Parzellen entnommen und für die analytische Bestimmung der PPO-Aktivität in

Anlehnung an Escribano *et al.* (1997) sofort eingefroren. Ferner erfolgte die Erfassung des Blatt/Gewichtsverhältnisses (BGV).

Für die Silierung wurde das Erntegut der ausgewählten Rotkleegenotypen (Milvus, Montana, Harmonie) sowie Weißklee (Sorte: Vysocan) mit einem Häcksler auf eine Länge von ca. 3 cm zerkleinert und angewelkt. Anschließend wurden 700 – 800 g des Siliergutes in 1,5 l Laborsilos gefüllt. Vor dem Einsilieren wurde von jeder Variante die TM erfasst. Nach einer Fermentationsdauer von 90 Tagen erfolgte die Öffnung der Silos. Als Untersuchungsparameter wurden der Gärverlust, der pH-Wert und der  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalt am Gesamt-N ermittelt. Die Korrektur des TM-Gehaltes der Silagen erfolgte anhand der vereinfachten Gleichung nach WEIßBACH & STRUBELT (2008).

Zur statistischen Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SAS 9.1 eine Varianzanalyse auf der Basis eines gemischten linearen Modells, wobei der TM-Gehalt des Siliergutes als Kovariable und die verschiedenen Aufwüchse als wiederholte Messung berücksichtigt wurden. Multiple Mittelwertvergleiche erfolgten mittels Tukey-Test bei einem Signifikanzniveau von  $P < 0,05$ . Die Zusammenhänge zwischen den Untersuchungsparametern wurden mittels Regressionsanalyse überprüft.

### **Ergebnisse und Diskussion**

Die Kovarianzanalyse zeigte für den Gärverlust und den Ammoniak-N-Gehalt am Gesamt-N eine signifikante Wechselwirkung Aufwuchs x Genotyp x Nutzungssystem ( $P < 0,0001$ ). Wie aus Tab. 1 ersichtlich wird, traten beim Gärverlust unter den geprüften Rotkleegenotypen nur innerhalb der Sorte Harmonie Signifikanzen auf. Auffällig war, dass die Weißkleesilage in beiden Nutzungssystemen des vierten Aufwuchses sowohl die signifikant geringsten Gärverluste als auch die signifikant niedrigsten Ammoniak-N-Gehalte aufwies. Tendenziell erzielte der Primäraufwuchs die geringsten  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalte, wobei der in der Literatur angegebene Grenzwert von 8 % zumeist nur in den Folgeaufwüchsen überschritten wurde. Ursächlich hierfür sind vermutlich unterschiedliche Zucker/Pufferkapazitätsquotienten. So wurden bei der Rotkleesorte Harmonie im ersten Aufwuchs deutlich höhere Werte gegenüber den Folgeaufwüchsen erreicht. Darüber hinaus handelte es sich beim Herbstaufwuchs um relativ junges Pflanzenmaterial, was die Pufferkapazität zusätzlich erhöht. Somit war nicht genügend Substrat für eine ausreichende Milchsäurebildung vorhanden. Hinzu kommt noch, dass nach Voss (1967) Verbindungen wie Ammoniak eine abpuffernde Wirkung auf die bereits gebildete Milchsäure haben und damit eine schnelle pH-Wert-Absenkung verzögern, die für das Ausmaß des Proteinabbaus während des Silierprozesses eine wichtige Rolle spielt. Die gemessenen pH-Werte in der Silage (nicht dargestellt) unterstützen diesen Sachverhalt, da der pH-Wert mit zunehmendem  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalt signifikant anstieg ( $R^2=0,33$ ;  $P=0,0003$ ;  $RSME=0,18$ ). Demzufolge wurde der kritische pH-Wert in den meisten Silagen überschritten.

Die in Tab. 2 dargestellte spezifische PPO-Aktivität wurde auf das BGV korrigiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen konnten nur im vierten Aufwuchs beobachtet werden, wobei diese Werte deutlich höher lagen als die der anderen Aufwüchse. Bezüglich des Einflusses der PPO-Aktivität auf den  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalt am Gesamt-N konnten keine einheitlichen Zusammen-

hänge festgestellt werden. Lediglich im vierten Aufwuchs ohne mechanischen Stress nahmen die NH<sub>3</sub>-N-Gehalte der Rotklee genotypen mit steigender PPO-Aktivität ab. Zwar wurden im Nutzungssystem ohne mechanischen Stress des zweiten und dritten Aufwuchses Bestimmtheitsmaße von 69 % bzw. 70 % erreicht, diese sind statistisch nicht abgesichert. Somit konnten die Ergebnisse von Winters *et al.* (2008) nicht bestätigt werden. Möglicherweise wurden die Effekte der PPO durch den Anwelkgrad überlagert.

Tab. 1: Gärverlust (SE=0,3) und Ammoniak-N-Gehalt (SE=1,38) in Abhängigkeit von Nutzungssystem, Genotyp und Aufwuchs (TM=37,4 %)

Nutzungssystem	Genotyp	Gärverlust [%]			
		1. Aufwuchs	2. Aufwuchs	3. Aufwuchs	4. Aufwuchs
ohne mechanischen Stress	Weißklee	6,1 aAx	5,6 aAx	5,7 aAx	4,1 bBx
	Milvus	6,1 aAx	5,6 aAx	5,7 aAx	5,7 aAx
	Montana	6,1 aAx	6,0 aAx	5,6 aAx	5,8 aAx
	Harmonie	5,9 aAx	5,9 aAy	5,5 aAx	5,8 aAx
mit mechanischen Stress	Weißklee	6,2 aAx	5,5 bABx	5,5 aABx	4,3 bBx
	Milvus	6,2 aAx	6,0 abAx	5,6aAx	5,5 abAx
	Montana	5,9 aAx	6,6 abAx	5,6 aAx	6,5 aAx
	Harmonie	6,1 aABx	7,3 aAx	5,6 aBx	6,0 aABx
Ammoniak-N-Gehalt [% Gesamt-N]					
ohne mechanischen Stress	Weißklee	7,3 aBx	17,4 aAx	11,3 aABx	10,1 bBx
	Milvus	6,1 aBy	10,3 bBx	10,0 aBx	18,3 aAx
	Montana	7,2 aBx	12,3 abABx	10,1 aABx	16,2 aAx
	Harmonie	7,1 aAx	13,1 abAy	10,0 aAx	12,5 abAx
mit mechanischen Stress	Weißklee	8,0 aBx	14,6 aAx	10,5 aABx	8,6 bABx
	Milvus	8,9 aAx	13,2 aAx	8,3 aAx	12,9 abAy
	Montana	8,3 aCx	15,4 aABx	9,7 aBCx	18,3 aAx
	Harmonie	7,0 aBx	16,4 aAx	10,0 aABx	15,2 aAx

a,b kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb eines Systems und einem Aufwuchs (Tukey-Test; P<0,05); A,B kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Aufwüchsen innerhalb eines Systems und einem Genotyp (Tukey-Test; P<0,05); x,y kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Systemen innerhalb eines Genotyps und einem Aufwuchs (F-Test; P<0,05).

Tab. 2: Spezifische PPO-Aktivität (SE=0,19) bezogen auf das Blatt/Gewichtsverhältnis in Abhängigkeit von Nutzungssystem, Genotyp und Aufwuchs

Nutzungssystem	Genotyp	spezifische PPO-Aktivität [IU/µg Protein/g TS]			
		1. Aufwuchs	2. Aufwuchs	3. Aufwuchs	4. Aufwuchs
ohne mechanischen Stress	Weißklee	0,04 aAx	0,03 aAx	0,08 aAx	0,04 cAx
	Milvus	0,24 aAy	0,38 aAy	0,48 aAx	1,20 bAx
	Montana	0,16 aBy	0,31 aBx	0,73 aABx	1,31 bAy
	Harmonie	0,53 aBx	0,42 aBx	0,58 aBx	2,45 aAx
mit mechanischen Stress	Weißklee	0,04 aAx	0,04 aAx	0,11 aAx	0,08 cAx
	Milvus	0,89 aABx	0,86 aABx	0,59 aBx	1,48 bAx
	Montana	0,85 aBx	0,39 aBx	0,93 aBx	3,27 aAx
	Harmonie	0,66 aBx	0,64 aBx	0,80 aBx	2,42 abAx

a,b; A,B; x,y siehe Tab. 1

### Schlussfolgerungen

Auf der Basis der vorliegenden einjährigen Versuchsergebnisse können vorerst keine eindeutigen Aussagen zu den Auswirkungen einer variierenden PPO-Aktivität auf den Ammoniak-N-Gehalt von Rotklee silage getroffen werden. Vielmehr zeigt sich, dass die verschiedenen Aufwüchse im Vergleich zum Nutzungssystem sowie den ausgewählten Genotypen einen deutlich stärkeren Einfluss auf die untersuchten Gärqualitätsparameter ausüben.

### Literatur

- ESCRIBANO, J., CABANES, J., CHAZARRA, S. and GARCÍA-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.
- JONES, B.A., MUCK, R.E. and HATFIELD, R.D. (1995): Red clover extracts inhibit legume proteolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67, 329-333.
- VOSS, N. (1967): Untersuchungen über den Proteinabbau in Gras- und Luzernesilage. *Das wirtschaftseigene Futter* 13, 130-145.
- WINTERS, A.L., MINCHIN, F.R., MICHAELSON-YEATES, T.P.T., LEE, M.R.F. and MORRIS, P. (2008): Latent and active polyphenol oxidase (PPO) in red clover and use of a low PPO mutant to study the role of PPO in proteolysis reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2817-2824.
- WEIßBACH, F. und STRUBELT, C. (2008): Die Korrektur des Trockensubstanzgehaltes von Silagen als Substrat für Biogasanlagen. *VDLUFA-Kongress*, 29-31.