

Einfluss von Ofen- bzw. Gefriertrocknung auf die Rohproteinfraktionen von Rotklee und Zusammenhänge mit der spezifischen Polyphenoloxidase - Aktivität

N. Weiher, M. Krawutschke, M. Gierus, F. Taube

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, -Grünland und Futterbau/Ökologischer
Landbau-, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24118 Kiel
Email: nweiher@email-uni.kiel.de

Einleitung und Problemstellung

Der im Rotklee vorkommenden Polyphenoloxidase (PPO) wird mehrfach zugeschrieben, hemmend auf den raschen Proteinabbau in der Silage und in den Vormägen der Wiederkäuer wirken zu können und damit deren N-Nutzungseffizienz zu verbessern. In der Literatur werden positive Effekte allerdings oft der PPO zugeschrieben ohne dass deren Enzymaktivität gemessen oder deren Zusammenhang mit den Proteinfraktionen ermittelt wird (GRABBER, 2009; GRABBER & COBLENTZ, 2009). Verglichen mit der Gefriertrocknung (FD) sollten bei Ofentrocknung (OD) die PPO-Aktivität, die daraus resultierende Chinonbildung und die Bildung von Protein-Chinon-Komplexen während der ersten Stunden des Trocknungsprozesses ungehindert ablaufen können. Demzufolge müsste es nach OD zu einer Verschiebung der Proteinfraktionen von den rasch zu den langsam abbaubaren Fraktionen kommen, nicht aber nach FD, bei der durch sofortiges Einfrieren die PPO-Aktivität unterbunden sein müsste. Ziel dieser Arbeit ist, den Einfluss von OD bzw. FD auf die Rohproteinfraktionen von Rotklee, sowie Zusammenhänge zwischen der spezifischen PPO-Aktivität und den Proteinfraktionen abzuleiten.

Material und Methoden

Am Standort Hohenlieth (Ls, Ø 8,9 °C, Ø 804,5 mm) wurden in einem zweijährigen Feldversuch 12 Rotklee (*Trifolium pratense* L.) -sorten mit unterschiedlicher geographischer Herkunft mit Weißklee (*T. repens*) als Kontrolle in den beiden Systemen ohne und mit mechanischem Stress (Cambridge-Walze drei Wochen vor dem Schnitt, simulierte Beweidung) unter einer Vierschnittnutzung in drei Wiederholungen geprüft. Zu jedem Schnitttermin wurden das phänologische Entwicklungsstadium (mean stage by count - MSC), Erträge und Blatt/Gewichts-Verhältnis (BGV) erfasst. Das Pflanzenmaterial wurde mit einer

Rasenkantenschere von jeweils zwei bis drei Quadraten mit einer Fläche von 0,25 m² in einer Schnitthöhe von 5 cm entnommen. Proben zur Bestimmung der Futterqualität wurden zweigeteilt, und entweder ofengetrocknet bei 58°C oder bei -27°C eingefroren und gefriergetrocknet, anschließend auf 1 mm vermahlen und NIRS gescannt. Die Bestimmung der PPO in den tiefgekühlten Blättern erfolgte in Anlehnung an ESCRIBANO *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 BGV bezogen und als $\text{PPO}_{\text{BGV}} = \text{PPO [IU]} \cdot \text{BGV [\%]} / 100$ angegeben. Die Proteinfractionierung erfolgte nach LICITRA *et al.* (1996), hierbei wird das Protein anhand seiner ruminalen Abbaubarkeit in fünf Fraktionen unterteilt. Fraktion A stellt die Nicht-Protein-Stickstoff (NPN)-Verbindungen dar und ist löslich in Natrium-Wolframatlösung. Fraktion B, das Reinprotein, wird in drei Untergruppen unterteilt (schnell, mittel und langsam abbaubar), wobei B1 löslich in Borat-Phosphat-Puffer, B3 unlöslich in neutraler, aber löslich in saurer Detergenz ist, die unverfügbare Fraktion C ist unlöslich in saurer Detergenz. Fraktion B2 wird rechnerisch über die Differenz der Fraktionen A, B1, B3 und C vom Gesamt-Stickstoff ermittelt.

Die gewonnenen Daten wurden einer Varianzanalyse bzw. Regressionsanalyse mit SAS 9.1 unterzogen. Für die Varianzanalyse wurden gewichtete Jahresmittelwerte gebildet, MSC fand als Kovariable Berücksichtigung. Es erfolgten multiple Mittelwertsvergleiche mit anschließender Bonferroni-Holm Adjustierung. Zusammenhänge zwischen den Proteinfractionen und der spezifischen PPO-Aktivität wurden mittels Regressionsanalyse überprüft. Zudem erfolgte eine multiple Regressionsanalyse zwischen den Proteinfractionen und den möglichen Parametern Nicht-Struktur-Kohlenhydrate, BGV, spezifische PPO-Aktivität, N-Ertrag, Temperatursumme, Niederschlagssumme und Globalstrahlung, wobei jeweils die Parameter, die das Signifikanzniveau von $P = 0,05$ erreichten, in das Modell zur Erklärung der jeweiligen Proteinfraction eingingen.

Ergebnisse und Diskussion

Während nach OD beim Rohprotein (XP) kein Unterschied zwischen den beiden Jahren zu verzeichnen war, wurde nach FD im zweiten Hauptnutzungsjahr ein höherer XP Gehalt registriert. Im zweiten Hauptnutzungsjahr waren unabhängig von der Trocknungsmethode die Gehalte an Fraktion A und B3 höher als im ersten Jahr. OD führte im Vergleich zur FD zu höheren XP Gehalten, höheren Fraktion A und B3 Gehalten sowie im zweiten Hauptnutzungsjahr zusätzlich zu mehr Fraktion C. Fraktion B1 und B2 nahmen durch die OD

im Vergleich zur FD ab (s. Tab. 1). Zunächst kann vermutet werden, dass der Shift von Fraktion B1 zu Fraktion B3 nach OD darin begründet liegt, dass bei OD verglichen mit der FD die PPO-Aktivität, die daraus resultierende Chinonbildung und die Bildung von Protein-Chinon-Komplexen während der ersten Stunden des Trocknungsprozesses ungehindert ablaufen konnten. Dies konnte nicht nach FD geschehen, bei der durch sofortiges Einfrieren die PPO-Aktivität unterbunden war.

Tab. 1: Mittelwerte (gewichtet gemittelt über die Schnitte) für die Wechselwirkung Trocknungsmethode x Jahr, Ofengetrocknet (OD) und Gefriergetrocknet (FD) für die Jahre 2008 und 2009 (N = 288)

Parameter ¹⁾	OD		FD		SE
	2008	2009	2008	2009	
XP	222,8 ^{Aa}	221,2 ^{Aa}	198,9 ^{Bb}	202,7 ^{Ab}	2,2
A	174,9 ^{Ba}	210,4 ^{Aa}	142,0 ^{Bb}	154,9 ^{Ab}	2,6
B1	104,8 ^{Ab}	72,3 ^{Bb}	201,8 ^{Aa}	181,2 ^{Ba}	4,0
B2	344,0 ^{Ab}	270,5 ^{Bb}	366,9 ^{Aa}	367,4 ^{Aa}	7,4
B3	240,0 ^{Ba}	289,2 ^{Aa}	135,4 ^{Bb}	153,4 ^{Ab}	6,2
C	136,3 ^{Bb}	157,6 ^{Aa}	153,9 ^{Aa}	140,8 ^{Bb}	5,9

A, B: Mittelwerte mit gleichen Großbuchstaben unterscheiden sich nicht zwischen den Jahren

a, b: Mittelwerte mit gleichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich nicht zwischen den Trocknungsmethoden

¹⁾: XP, Rohprotein (g kg⁻¹ TM), A – C, Rohproteinfraktionen (g kg⁻¹ XP).

Mit steigender PPO-Aktivität ergab sich nach OD eine Abnahme der Fraktionen A und B2 (Tab. 2), sowie eine Zunahme der Fraktionen B3 und C, allerdings gekennzeichnet durch geringe Bestimmtheitsmaße ($R^2 = 0,10$ und $R^2 = 0,06$ bzw. $R^2 = 0,09$ und $R^2 = 0,17$). Ähnliche Ergebnisse fanden EICKLER *et al.* (2011) Rotkleeproben nach OD. Bei den FD Proben nahm mit zunehmender PPO-Aktivität Fraktion A ab, die Fraktionen B1, B2 und C nahmen zu, ebenfalls mit sehr geringen Bestimmtheitsmaßen (s. Tab. 2).

Kein Zusammenhang konnte zwischen der spezifischen PPO-Aktivität und der Fraktion B1 in den OD Proben bzw. B3 in den FD Proben gefunden werden. Der Erwartung, dass es nach OD zu einer Verschiebung der Proteinfraktionen von den rasch zu den langsam abbaubaren

Fraktionen komme, nicht aber nach FD, bei der durch sofortiges Einfrieren die PPO-Aktivität unterbunden sein müsste, konnte nicht bestätigt werden.

Tab. 2: Zusammenhänge zwischen den Proteinfractionen und der spezifischen PPO-Aktivität (Ofengetrocknet (OD) und Gefriergetrocknet (FD) für die Jahre 2008 und 2009; RMSE = root mean square error; Kor. = Korrelation, + = positiv, - = negativ korreliert)

Fraktion	OD				FD			
	P-Wert	adj. R ²	RMSE	Kor.	P-Wert	adj. R ²	RMSE	Kor.
A	< 0,0001	0,10	37,82	-	< 0,0001	0,26	40,96	-
B1	0,8281	0,00	27,67	-	0,0442	0,01	21,77	+
B2	0,0003	0,06	48,75	-	< 0,0001	0,12	39,11	+
B3	< 0,0001	0,09	40,47	+	0,8547	0,00	29,09	-
C	< 0,0001	0,17	26,97	+	< 0,0001	0,09	21,17	+

Eine anschließende multiple Regressionsanalyse mit den möglichen Parametern Nicht-Struktur-Kohlenhydrate, BGV, spezifische PPO-Aktivität, N-Ertrag, Temperatursumme, Niederschlagssumme und Globalstrahlung zeigte vielmehr, dass neben diesen genannten Parametern die spezifische PPO-Aktivität zu Erklärung der Variation der Proteinfractionen von untergeordneter Bedeutung ist. Lediglich 8%-Punkte (von 48%) der Variation von Fraktion A und 13%-Punkte (von 67%) der Variation in Fraktion C nach OD bzw. 3%-Punkte (von 72%) der Variation von Fraktion A und 5%-Punkte (von 36%) der Fraktion B2 nach FD konnten durch die spezifische PPO-Aktivität erklärt werden, für alle anderen Proteinfractionen konnte die spezifische PPO-Aktivität nicht als Variationsursache ins Modell Eingang finden (s. Tab. 3).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Shift innerhalb der Proteinfractionen von B1 zu B3 nach OD vermutlich temperaturbedingt ein Ergebnis der Maillard-Reaktion ist, und die spezifische PPO-Aktivität für die Variation der Proteinfractionen nicht maßgebend ist.

Tab. 3: Partielle Bestimmtheitsmaße und Bestimmtheitsmaße des Modells der multiplen Regression mit Vorwärtsselektion für die Proteinfraktionen, ofengetrocknet (OD) und gefriergetrocknet (FD) mit den Parametern Nicht-Struktur-Kohlenhydrate (NSK), Blatt/Gewichts-Verhältnis (BGV), spezif. PPO-Aktivität (IU_{BGV}), N-Ertrag, Temperatursumme (Tsum), Niederschlagssumme (Psum) und Globalstrahlung (GS)

	OD			FD		
	Parameter	Partielles R ²	Modell R ²	Parameter	Partielles R ²	Modell R ²
Fraktion A	Tsum	0,32	0,32	N-Ertrag	0,63	0,63
	IU_{BGV}	0,08	0,40	NSK	0,06	0,68
	Psum	0,04	0,44	IU_{BGV}	0,03	0,71
	BGV	0,02	0,46	Tsum	0,01	0,72
	NSK	0,02	0,48			
Fraktion B1	Psum	0,13	0,13	GS	0,08	0,08
	N-Ertrag	0,15	0,28	Tsum	0,12	0,20
	BGV	0,11	0,39	N-Ertrag	0,05	0,25
	GS	0,05	0,44	BGV	0,04	0,29
	NSK	0,01	0,45			
Fraktion B2	BGV	0,25	0,25	NSK	0,17	0,17
	Tsum	0,07	0,32	IU_{BGV}	0,05	0,21
	NSK	0,03	0,35	GS	0,08	0,29
	GS	0,04	0,39	Psum	0,02	0,31
				BGV	0,05	0,36
Fraktion B3	Tsum	0,25	0,25	Tsum	0,05	0,05
	BGV	0,16	0,41	Psum	0,02	0,08
	GS	0,05	0,46			
Fraktion C	Tsum	0,46	0,46	N-Ertrag	0,53	0,53
	IU_{BGV}	0,13	0,59	NSK	0,04	0,57
	GS	0,02	0,61	BGV	0,02	0,58
	BGV	0,03	0,64	GS	0,04	0,62
	N-Ertrag	0,03	0,67	Psum	0,03	0,66

Schlussfolgerungen

OD führte zu einem Shift der Proteinfractionen von B1 zu B3, was vermutlich der Trocknungstemperatur und der damit einhergehenden Maillardreaktion geschuldet ist. Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische PPO-Aktivität für die Erklärung der Variation in den Proteinfractionen von untergeordneter Bedeutung ist, andere Parameter wie N-Ertrag und Temperatursumme stellen geeignetere Erklärungsgrößen dar. Weitere Studien könnten exaktere Einflussgrößen für die aus tierernährerischer Sicht erwünschte Proteinfraction B3 aufzeigen.

Literatur

- EICKLER, B., GIERUS, M., KLEEN, J., TAUBE, F. (2011): Specific polyphenol oxidase activity of red clover (*Trifolium pratense*) and its relation with forage quality in field experiments. *Acta Agriculturae Scandinavica* 61, 39-49.
- 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.
- GRABBER, J.H., COBLENTZ, W.K. (2009): Polyphenol, conditioning, and conservation effects on protein fractions and degradability in forage legumes. *Crop Science* 49, 1511-1522.
- GRABBER, J.H. (2009): Protein fractions in forage legumes containing protein-binding polyphenols: Freeze-drying vs. conservation as hay or silage. *Animal Feed Science and Technology* 151, 324-329.
- LICITRA, G., HERNANDES, T.M., VAN SOEST, P.J., (1996): S Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57, 347-358.