



Doctoral Thesis

Sainfoin and birdsfoot trefoil: their impact on ruminal fermentation and protein metabolism of dairy cows

Author(s):

Große Brinkhaus, Anja

Publication Date:

2017

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000171113> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. _24215_

**Sainfoin and birdsfoot trefoil:
their impact on ruminal fermentation and protein metabolism of dairy cows**

A thesis submitted to attain the degree of

Doctor of Science of ETH Zurich

(Dr.sc. ETH Zurich)

presented by

Anja Große Brinkhaus

M.Sc Agricultural Biology University of Hohenheim
born October 24, 1988
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Michael Kreuzer, *examiner*
Dr. Andreas Lüscher, *co-examiner*
Dr. Giuseppe Bee, *co-examiner*
Dr. Frigga Dohme-Meier, *co-examiner*

2017

Summary

Sainfoin (SF, *Onobrychis viciifolia*) and birdsfoot trefoil (BT, *Lotus corniculatus*) are two legumes that are gaining interest in ruminant nutrition due to their substantial (but still moderate) condensed tannin content. Condensed tannins (CTs) are known to form complexes with dietary nutrients, a process which might help to decrease excessive and wasteful ruminal-protein degradation, as well as decreasing levels of methane (CH₄) formation. Existing studies of SF and BT have hinted that these legumes might be effective in improving protein utilisation and decreasing CH₄ formation. As such, the aim of the present thesis is to offer a detailed quantitative investigation of the extent to which bioactive compounds in forage legumes (SF and BT in particular) can improve ruminal fermentation and protein utilisation in dairy cows.

For this study, the SF cultivar Perly and the BT cultivars Bull and Polom were grown in Switzerland as perennial forage plants. They were harvested three times a year to produce forage in the forms of silage and dried pellets for the experiments performed for this thesis. The experiments consisted of three *in vitro* studies (Hohenheimer gas test, rumen simulation technique and a batch system) and one *in vivo* study with lactating dairy cows.

For each experiment, the general forage quality was determined, with different protein fractions also being determined within the silage. The effects of the legumes on ruminal ammonia (NH₃) and volatile fatty-acid concentration (VFA) were determined in each case. The effects of each of the *in vitro* experiments on CH₄ and gas production were also assessed. Furthermore, the influence of SF and BT on utilisable crude protein at the duodenum (uCP), the apparent digestibility of nutrients, protozoa levels, microbial protein synthesis and the ruminal biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) were also investigated *in vitro*. An N balance was carried out in the *in vivo* study and, in addition, the effects of SF and

BT upon milk yield/composition, as well as selected microbial strains and transporter genes, were determined.

It was found that the protein composition changed during the ensiling process. The protein fractions shifted mostly from the true-soluble and neutral-detergent-soluble protein fractions B₁ and B₂ to the non-protein fraction A in all the treatments. In the silage, the proportion of protein fraction A was the lowest with SF by far. Furthermore, where SF was concerned, there was a shift in the protein fractions from B₁ and B₂ to the more-desirable fractions of B₃ and C, resulting in a higher proportional supply of uCP. Besides SF, pure RC and mixtures of SF and RC had the highest uCP content *in vitro*. The amount of microbial protein synthesised was also increased with BT and SF, both on its own and when mixed with RC *in vitro*.

Taking a further look at protein utilisation, the results from the *in vitro* studies were confirmed *in vivo* with SF. The ruminal concentration of NH₃ decreased, and the concomitant decrease of the urea level in the blood, milk and urine indicates decreased ruminal-protein degradation as well. In addition, the N excretion determined *in vivo* was shifted from the urine to the faeces, without affecting the total N excretion. Accordingly, it can be stated that SF improves the protein utilisation of ruminants and is more effective in doing so than BT.

When looking at ruminal fermentation, the decreased apparent digestibility of organic matter, fibre and dry matter *in vitro* were not confirmed via lower total tract digestibility *in vivo*. The concentration of VFA was decreased with SF, however, in each experiment. The results concerning CH₄ production were inconsistent. While no effect on CH₄ formation was determined with the Hohenheim gas test, CH₄ formation did decrease in batch-culture studies with CT extracts and in the rumen simulation technique with BT. Furthermore, numbers of protozoa counted *in vitro* were not affected by the type of treatment, while numbers did increase *in vivo* with SF. In addition, the abundance of *Prevotella spp.* relative to total bacterial 16S rDNA decreased with SF. Other bacteria like *Butyrivibrio fibrisolvens*, which are mainly

responsible for the ruminal biohydrogenation of PUFAs, remained unaffected, although the ruminal biohydrogenation of PUFAs did decrease with CT extracts *in vitro*, while the concentration of C18:3n-3 in the milk was increased with SF *in vivo*. Besides the different methodical approaches taken in the four experiments conducted for this thesis, the vegetational stage of the plant, the dosage form and the conservation method used might explain the differences in the results obtained in the experiments.

In conclusion, SF and BT affect the ruminal fermentation of nutrients to varying extents. While BT seems to be more useful for decreasing CH₄ formation, SF appears to be more effective in improving protein metabolism by decreasing ruminal-protein degradation and increasing the uCP content. Furthermore, SF can decrease the environmental load by shifting N excretion from the urine to the faeces. This thesis indicates, therefore, that the differences between SF and BT might be due not only to CT concentration levels, but also due to variations in the composition and structures of CTs.

Zusammenfassung

Die beiden Leguminosen Esparsette (SF, *Onobrychis viciifolia*) und Hornklee (BT, *Lotus corniculatus*) erlangen immer mehr Aufmerksamkeit in der Wiederkäuerernährung aufgrund ihres erheblichen (aber dennoch relativ gemäßigten) Gehaltes an kondensierten Tanninen (CT). Die CT sind dafür bekannt, Komplexe mit Futternährstoffen einzugehen und dadurch den übermäßigen und verschwenderischen Abbau von Pflanzenprotein im Pansen sowie die Methan- (CH₄) Bildung zu reduzieren. In Studien mit SF und BT gab es erste Hinweise darauf, dass diese Pflanzen effektiv die Proteinnutzung verbessern und die CH₄ Bildung senken können. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Thesis, detaillierter zu erforschen, wie bioaktive Substanzen in Leguminosen, im Besonderen in SF und BT, die Pansenfermentation und die Proteinnutzung von Milchkühen verbessern.

Die Leguminosen SF, mit der Sorte Perly, und BT mit den Sorten Bull und Polom wurden als mehrjährige Pflanzen in der Schweiz angebaut. Sie wurden dreimal pro Jahr geerntet um Futter in Form von Silage und getrockneten Pellets für die verschiedenen Versuche dieser Thesis zu produzieren. Diese Thesis besteht aus drei *in vitro* Versuchen (Hohenheimer Futterwert Test, Pansensimulationstechnik und Batch System) und einem *in vivo* Versuch mit laktierenden Milchkühen.

In jedem Experiment wurde die Futterqualität und in der Silage zusätzlich die verschiedenen Protein Fraktionen bestimmt. Ferner wurde in jedem Versuch der Effekt der Leguminosen auf die Konzentration von Ammoniak und die flüchtigen Fettsäuren im Pansen untersucht. Zudem wurde in jedem *in vitro* Versuch die Effekte auf die CH₄ und Gasbildung bestimmt. Darüber hinaus wurden die Effekte von SF und BT auf das nutzbare Rohprotein am Dünndarm, die scheinbare Verdaulichkeit von Futternährstoffen, die Anzahl der Protozoen, die mikrobielle Protein Synthese und die Biohydrogenierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren

(PUFA) im Pansen ebenfalls in *in vitro* Versuchen untersucht. Zusätzlich wurde eine N Bilanz im Tierversuch mit Milchkühen durchgeführt und der Einfluss von SF und BT auf die Milchmenge und -zusammensetzung sowie auf bestimmte mikrobielle Stämme und Transportergene untersucht.

Während des Einsilierens ändert sich die Proteinzusammensetzung. Der Anteil der Proteinfractionen verschob sich am meisten von der Fraktion B₁ (pufferlösliches Reinprotein) und der Fraktion B₂ (pufferunlösliches Reinprotein) hin zu nicht-Protein N bei allen Behandlungen. In der Silage war der Anteil an nicht-Protein N bei Weitem am niedrigsten mit SF. Zusätzlich verlagerte sich in der SF Silage die Protein Fraktionen B₁ und B₂ hin zu den bevorzugten Fraktionen B₃ (zellwandgebundenes lösliches Reinprotein) und C (zellwandgebundenes unlösliches Reinprotein). Daraus resultiert das höchste Verhältnis von nutzbarem Rohprotein am Dünndarm (nXP) zu gesamten Rohprotein. Neben SF zeigten Rotklee und die Mischung aus Rotklee und SF das größte Potential um den Anteil an nXP zu steigern. Zudem war der Anteil an synthetisiertem mikrobiellen Protein mit BT und SF allein und der Mischung mit Rotklee erhöht *in vitro*.

Bei näherer Betrachtung der Proteinnutzung konnten die mit SF *in vitro* erzielten Ergebnisse in dem Tierversuch bestätigt werden. Die Ammoniakkonzentration im Pansen wurde neben der Harnstoff Konzentration im Blut, der Milch und im Urin gesenkt. Dies deutet auf einen reduzierten Proteinabbau im Pansen hin. Zusätzlich konnte mit der N Bilanz eine Verlagerung der N Ausscheidung vom Harn in den Kot festgestellt werden, ohne die Gesamtausscheidung zu beeinflussen. SF scheint die Proteinnutzung der Wiederkäuer verbessern zu können und ist dabei effektiver als BT.

Bei Betrachtung der Pansenfermentation, konnte die *in vitro* erzielte geringere scheinbare Verdaulichkeit von organischer Substanz, Fasern und Trockensubstanz im Tierversuch nicht bestätigt werden. Die Konzentration an flüchtigen Fettsäuren war in jedem Versuch mit SF reduziert. Dagegen waren die Ergebnisse zur CH₄ Bildung inkonsistent.

Während mit dem Hohenheimer Futterwert Test keine Effekte auf die CH₄ Bildung nachweisbar war, war sie mit der Pansensimulationstechnik und im Batch System mit BT und CT Extrakten reduziert. Zusätzlich zeigten die Behandlungen keinen Einfluss auf die Anzahl der gezählten Protozoen *in vitro*, wohingegen im Tierversuch die Anzahl mit SF erhöht war. Zudem war der relative Anteil an *Prevotella spp.* an der gesamten bakteriellen 16S rDNA reduziert mit SF. Andere Bakterien dagegen wie *Butyrivibrio fibrisolvens*, das hauptverantwortlich für die Biohydrogenierung von PUFA im Pansen ist, blieben unbeeinflusst, obwohl die Biohydrogenierung der PUFA durch CT Extrakte reduziert und die Konzentration der C18:3n-3 in der Milch mit SF erhöht war. Neben den verschiedenen methodischen Ansätzen in den vier Versuchen, können der Vegetationsstatus, die Darreichungsform und die Art der Futterkonservierung möglicherweise die Unbeständigkeit der Ergebnisse erklären.

Schlussendlich hat diese Arbeit gezeigt, dass SF und BT einen Einfluss auf die Pansenfermentation von Futternährstoffen haben, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Während BT effektiver scheint in der Reduzierung von CH₄, scheint SF besser geeignet zu sein, den Protein Metabolismus zu verbessern mittels reduziertem Proteinabbau im Pansen und erhöhtem Anteil an nXP. Zusätzlich scheint SF die Umweltbelastung durch Verlagerung der N Ausscheidung von Urin zum Kot zu reduzieren. In dieser Arbeit konnten zudem erste Hinweise erzielt werden, dass die Unterschiede zwischen SF und BT nicht nur auf die unterschiedliche CT Konzentration zurück zu führen sind, sondern dass die unterschiedlichen CT Zusammensetzung und CT Strukturen auch berücksichtigt werden müssen.