

DISS. ETH NO. 19938

**MODULATION OF RUMINAL METHANOGENESIS AND BIOHYDROGENATION OF FATTY
ACIDS BY PHENOLS PRESENT IN TROPICAL AND TEMPERATE FORAGE PLANTS**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

ANURAGA JAYANEGARA

M.Sc (Agricultural Sciences in the Tropics and Subtropics), University of Hohenheim, Germany

born June 02, 1983

citizen of Indonesia

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Michael Kreuzer, examiner

Dr. Florian Leiber, co-examiner

Dr. Hans Dieter Hess, co-examiner

2011

Zusammenfassung

Neben der Verbesserung der Produktivität sind die Senkung der Methanemissionen durch Wiederkäuer sowie auch die Erhöhung der Konzentration physiologisch wertvoller Fettsäuren, wie omega-3 Fettsäuren und der c9,t11 CLA in den Produkten wichtige Ziele der gegenwärtigen Nutztierforschung. Neben seinem Einfluss auf die Erwärmung der Atmosphäre stellt Methan auch einen erheblichen Energieverlust während der fermentierenden Verdauung durch den Wiederkäuer dar. In demselben Prozess werden die mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus dem Futter durch die sogenannte Biohydrogenierung schrittweise gesättigt und somit physiologisch entwertet. Beide Vorgänge, Methanogenese und Biohydrogenierung, werden durch die Aktivität verschiedener Pansen-Mikroorganismen bewirkt. Weil diese wiederum durch die Zusammensetzung und Beschaffenheit des Futters gefördert oder gehemmt werden können, ist dieses ein wesentlicher Faktor für die beiden hier behandelten Prozesse. Daher sind Ernährungsstrategien, die sowohl die Methanogenese als auch die Biohydrogenierung mindern könnten, ohne gleichzeitig die Pansenverdauung allzu stark negativ zu beeinflussen, sehr gefragt. In der hier vorgelegten Arbeit wurde der Einfluss von Phenolverbindungen aus einerseits tropischen und andererseits alpinen Futterpflanzen auf Methanogenese und Biohydrogenierung mit einer Reihe von *in vitro* Experimenten untersucht.

Die Proben von tropischen Futterpflanzen (27 verschiedene Arten) wurden auf West Java, Indonesien, in der Region Bogor (180 m n.N. und 350 m n.N.) gesammelt. Die europäischen alpinen Proben wurden an drei verschiedenen Orten in Graubünden, Schweiz gesammelt, welche sich im Misox (800 m n.N.), im Rheinwald (1400 m n.N.) und am Albulapass (1800-2300 m n.N.) befanden. Alle Pflanzen wurden kurz nach der Sammlung bei 50-60°C getrocknet und danach mit 1 mm Siebgröße gemahlen. Alle Proben wurden auf ihre chemische Zusammensetzung (Rohnährstoffe, Faserfraktionen, Phenolfraktionen und Fettsäuremuster) hin analysiert. Alle Experimente wurden nach den Prinzipien des Hohenheimer Futterwerttests durchgeführt, d.h. die Proben wurden mit einer Pansensaft-Pufferlösung für 24 Stunden bei 39°C inkubiert. Für die Experimente, die sich auf die Methanogenese bezogen, wurden die Pflanzen sowohl einzeln als auch in bestimmten Mischungen inkubiert. Für die Experimente zur Fettsäuren-Biohydrogenierung wurde den Inkubationen Leinöl als Quelle für hochungesättigte Fettsäuren zugegeben. Alle Parameter wurden nach Abschluss der Inkubation bestimmt. Für

die Metaanalyse wurde eine Datenbank aus publizierten *in vitro* und *in vivo* Studien zum Zusammenhang von Tanninen und Methanemissionen aufgebaut und in einer Metaanalyse mit einem gemischten Modell ausgewertet.

Sowohl tropische als auch alpine Futterpflanzen die einen vergleichsweise hohen Gehalt an Phenolen aufwiesen, zeigten ein Potential zur Verminderung der Methanemissionen. Dies waren insbesondere *Swietenia mahagoni*, *Acacia villosa*, *Eugenia aquea*, *Myristica fragrans* und *Clidemia hirta* unter den tropischen sowie *Castanea sativa*, *Alchemilla xantochlora* und *Sambucus nigra* unter den alpinen Pflanzen. Das Potential zur Verminderung der Methanproduktion beschränkte sich allerdings nicht allein auf diese Einzelpflanzen. Die Metaanalyse über viele publizierte Versuche bestätigte ebenfalls das Potential von tanninreichen Pflanzen oder Tanninextrakten, die Methanogenese zu verringern. Die Korrelationen zwischen Phenolfractionen und Methanbildungsraten in den eigenen Experimenten zeigten das Methan hemmende Potential aller Fraktionen, also sowohl der nicht-tannin Phenole als auch der hydrolysierbaren und der kondensierten Tannine, wobei die letzteren die stärkste Wirksamkeit entfalteteten.

Die Kombination von phenolreichen mit phenolarmen aber nährstoffreichen Futterpflanzen führte zu synergistischen Effekten, also namentlich zu einer Methanhemmung, die grösser war als das arithmetische Mittel aus den jeweiligen Einzelinkubationen. Diese synergistischen Effekte waren allerdings unabhängig von der in der jeweiligen Pflanze dominierenden Phenolfraction.

Die Principal Component Analysis (PCA) als ein multivariates statistisches Instrument erwies sich als erfolgreich um weitere Faktoren zur Methanhemmung zu identifizieren. Hier zeigte sich allerdings auch deutlich, dass hohe Phenolgehalte und niedrige Methanbildungspotentiale meistens auch mit einem schlechten Futterwert assoziiert sind. Dies impliziert, dass letztlich immer ein Kompromiss zwischen starker Methanhemmung und gutem Futterwert gesucht werden muss.

In den Experimenten zur Fettsäuren-Biohydrogenierung zeigte sich deutlich, dass die pflanzlichen Phenole, abhängig von ihrer Konzentration, bereits den ersten Sättigungsschritt deutlich hemmen können. Die zeigte sich an der negativen Korrelation zwischen der Verlustrate an C18:3 *n*-3 und C18:2 *n*-6 während der Inkubation und den Phenolgehalten in den jeweiligen Pflanzen. Für die tropischen Pflanzen konnte ausserdem eine positive Korrelation zwischen der Bildung von konjugierter Linolsäure (*c*9,*t*11 C18:2) sowie 18:0 und dem Phenolgehalt der Pflanzen gezeigt werden. Die Korrelationen für die alpinen Pflanzen

waren weniger aussagekräftig, was seine Ursache unter anderem in der wesentlich geringeren Variabilität der Phenolgehalte hatte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Phenole in Futterpflanzen ein deutliches Potential zur Beeinflussung sowohl der ruminalen Methanogenese als auch der Biohydrogenierung haben, wobei beide Prozesse in gewünschter Weise gehemmt werden. Allerdings sind diese positiven Effekte in der Regel mit negativen Wirkungen auf die gesamte Pansenfermentation und damit auf die Nährstoffverdaulichkeit verbunden. Eine Lösung könnte hier die Kombination von Futterpflanzen mit verschiedenen Eigenschaften sein, mit dem Ziel, differenzierte synergistische Effekte hervorzurufen, um sowohl von hoher Produktivität als auch von niedrigen Methanbildungsraten und von wünschenswerten Fettsäureprofilen in Milch und Fleisch zu profitieren.

Summary

Apart from improving productivity, mitigating methane (CH₄) emissions released by livestock, particularly ruminants, as well as increasing beneficial fatty acids (FA) such as omega-3 FA and ruminic acid (c9,t11 C18:2), a major isomer of conjugated linoleic acids (CLA), in their products are among the goals of current livestock production. In addition to its contribution to global warming, the release of CH₄ is related to considerable energy loss which reduces the availability of the energy for production purposes. Considerable amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFA) entering the rumen undergo transformation processes, i.e. biohydrogenation to form FA with higher saturation degree. Both methanogenesis and FA biohydrogenation processes are carried out through the actions of various ruminal microbes. Accordingly, the composition of feed consumed by ruminants is a major factor affecting both processes. Therefore, developing nutritional strategies for optimizing both aspects, i.e. mitigating CH₄ emissions and increasing the supply of beneficial FA, while maintaining optimal rumen function and fermentation is highly desirable. In the present thesis, the influence of phenols present in plants in modulating methanogenesis and FA biohydrogenation is investigated through a series of *in vitro* batch experiments and a literature meta-analysis study (for CH₄ only) by including various plants from tropical and temperate (alpine) regions.

The tropical plant samples (n = 27 species) were collected from the area of Bogor, West Java, Indonesia, situated at Bogor Agricultural University (180 m elevation) and Indonesian Research Institute for Animal Production (350 m elevation). The alpine plant samples were collected from three grazing alpine sites, i.e. Misox valley, Rhine forest (Sufers) and Albula valley at altitudes of 800, 1400 and 1800–2300 m above sea level, respectively, located in canton of Grisons, south-eastern Switzerland. Shortly after collection, all samples were oven-dried at 50–60 °C, and ground to pass a 1 mm sieve. Samples were characterized for their chemical composition, i.e. proximate composition, fiber fractions, phenolic fractions and FA profiles. Samples were incubated *in vitro* with rumen fluid:buffer mixture using the Hohenheim gas test apparatus, kept at 39 °C for 24 h. For experiments related to methanogenesis, plant samples were incubated either individually (Chapter 2 for tropical plants and Chapter 3 for alpine plants) or in mixtures (Chapter 4; for tropical plants only). For experiments related to FA biohydrogenation, linseed oil as a source of PUFA was added to the tropical plants (Chapter 6) as well as the alpine plants (Chapter 7). Methane productions and FA profiles as well as other

rumen fermentation parameters were analyzed after terminating the incubations. For the literature study, a database was constructed from both *in vitro* and *in vivo* experiments where dietary tannins and CH₄ emissions were specified. The data were then examined through a statistical meta-analysis approach based on mixed model methodology.

Plants from tropical and alpine forages being rich in phenols, either total phenols (TP) or total tannins (TT), were demonstrated to have the property to mitigate CH₄ emissions. These plants were *Swietenia mahagoni*, *Acacia villosa*, *Eugenia aquea*, *Myristica fragrans*, *Clidemia hirta* (tropical plants), *Castanea sativa*, *Alchemilla xanthochlora* and *Sambucus nigra* (alpine plants). The respective property was not only obvious from these individual experiments. The meta-analysis study across different experiments also confirmed the potential of plants rich in phenols or extracts rich in them in mitigating CH₄ emissions, both from *in vivo* and *in vitro* studies. All phenolic fractions, i.e. non-tannin phenols (NTP), condensed tannins (CT) and hydrolysable tannins (HT) appeared to contribute to suppressing CH₄ formation as shown by negative correlations of the fractions in plants and CH₄/total gas or CH₄/digestible OM. Comparing between CT and HT, the former appears to be more effective in mitigating CH₄ emission than the latter as indicated by the steeper negative slope of CT against CH₄/digestible OM compared to that of HT.

Apart from decreasing CH₄ emissions linearly, combining plants rich in phenols with a high quality forage plant (with negligible phenol contents) may provide additional benefits due to the presence of the synergistic associative effects, which then may decrease CH₄ further than what is expected. Although these plants contain quite different phenolic fractions, the effects are more determined by the TP contents rather than by the different fractions. Combining plants that are distinct in their CH₄ production potential appears to be a prerequisite for obtaining the benefit of the associative effects.

Principal component analysis (PCA) as a multivariate statistical method was proven to be successful in identifying factors contributing to low CH₄ emissions and factors related to high forage quality, both in tropical and alpine plants. In both groups of plants, phenolic fractions were arranged in the opposite direction of CH₄/total gas (based on the loading plots of PCA). Unfortunately, for plants containing substantial amounts of phenols, low CH₄/total gas is partially associated with low forage quality. This may imply that there is little probability in finding many plants with both high CH₄ mitigating properties and high forage quality; rather a compromise between the two target parameters has to be found.

The results from the incubations of tropical and alpine plants with additional linseed oil suggest the ability of plant phenols in modulating FA biohydrogenation, i.e. by decelerating the process right from the first step. This was indicated by lower disappearance of C18:3 *n*-3 and C18:2 *n*-6 in the incubations of plants containing high phenols such as *A. villosa*, *S. mahagoni*, *E. aquea*, *C. hirta* and *M. fragrans* among the tropical plants, and *C. sativa* among the alpine plants. In relation to the biohydrogenation intermediates of C18 FA, in the case of the main CLA isomer, i.e. *c*9,*t*11 C18:2, there was inconsistency in the results between tropical and alpine plants. A positive correlation between TP and the appearance of the respective CLA isomer was observed for the tropical plants, while this did not occur for the alpine plants. In the case of *t*11 C18:1, TP in tropical plants did not show any significant relationship with that biohydrogenation intermediate, while a positive correlation was observed for TP in alpine plants. Plants from both origins which were high in phenolic contents caused a low appearance of C18:0.

In conclusion, phenols present in plants have been proven to be able to modulate methanogenesis and biohydrogenation processes in the rumen simultaneously towards a desirable direction. However, caution is needed in making recommendations for feeding since high levels of phenols may cause adverse effects on general rumen fermentation and digestibility of nutrients. Related to this aspect, searching for plants that contain low to moderate phenol contents but possess high activity with respect to lowering methanogenesis and FA biohydrogenation are of primary importance. Another promising solution seems to combine plants containing high phenols with high quality forage plants in order to profit from all potential benefits concomitantly, i.e. high productivity of the animals, low CH₄ emissions, and milk and meat lipids rich in desired FA profiles.