

Doctoral dissertation

**The effect of dietary polyphenols on methanogenesis
and biohydrogenation in ruminants**

**Wpływ dodatku polifenoli w dawce pokarmowej
na procesy metanogenezy i biouwodorowania
u przeżuwaczy**

Yulianri Rizki Yanza

Field of science: Agricultural sciences

Discipline of science: animal science and fisheries

PhD thesis supervisor: prof. dr hab. Adam Cieślak

POZNAŃ UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES

**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
AND ANIMAL SCIENCE**

DEPARTMENT OF ANIMAL NUTRITION

POZNAŃ – POLAND

2022

I gratefully acknowledge to The Polish National Agency For Academic Exchange, NAWA (Narodowa Agencja Wymiany Akademickiej) which fully funded my Ph.D. study in Poland through Ignacy Lukasiewicz scholarship 2016-2020.



Grant no 015/IL/1617

I gratefully acknowledge to The Polish National Science Centre, NCN (Narodowe Centrum Nauki) which partially funded my experimental research for my dissertation through Preludium grant no 16 (2018-2021).



Research grant no UMO-2018/31/N/NZ9/01589

And I am also grateful to The Poznan University of Life Science, which supports all my studies and lets me conduct the partially planned experiments for my dissertation through the Young Scientist Research Award.



Grant award no 507.533.09

Abstract

In recent years, plant biologically active compounds (BACs) have been beneficial in reducing methane (CH₄) and improving ruminant product quality. The *Coleus amboinicus* Lour. (CAL) is one of the potential plants containing BACs, such as phenolic acids, flavonoids, and diterpenes. Hence, the hypothesis is that CAL inclusion in the ruminant's diet modulates ruminal fermentation and microbial population, reduces CH₄ production, and regulates biohydrogenation (BH) in the rumen and muscle tissues without adverse effects on ruminant performance or meat quality. The present study aimed to investigate the nutritional composition and BACs content in CAL and the impact of CAL on rumen fermentation, CH₄ production, BH, microbial populations, especially methanogens and bacteria involved in ruminal BH without adverse effects on FA biosynthesis in meat (*longissimus thoracis*) of ruminants. The study was designed into 1) the *in vitro* Hohenheim gas test (0, 2.5, 5, 10, and 20% of the CAL in the diet), 2) the *in vitro* RUSITEC (0, 10, 15, and 20% of the CAL in the diet), 3) the *in vivo* trial on the cannulated lambs fed with and without CAL (0 vs. 190 g/d), and 4) the *in vivo* trial on reared lambs fed with and without CAL (0 vs. 190 g/d).

The present study revealed that CAL modulated rumen fermentation and reduced *in vitro* CH₄ production in ruminants by 44 to 51% due to the diminished methanogens, without any adverse effects on *in vitro* degradability. The increased dose of CAL in the diet also positively enhanced ruminal *Entodiniomorpha*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes*, *Prevotella spp.*, *B. proteoclasticus*, and total bacteria abundance, but not *Holotricha*. Consequently, such a condition modulates the ruminal VFA profile indicated by the lower C₂/C₃ ratio and BH shown by the increased linoleic acid (LA), linolenic acid (LNA), and conjugated isomers of linoleic acid in the rumen. In the *in vivo* experiments, CH₄ production was reduced by 29%, linked with the diminished methanogens but not affecting digestibility (exp. 4). Rumen protozoa and some bacterial species (*R. albus*, *M. elsdenii*, *B. proteoclasticus*, and *B. fibrisolvens*) of lambs were positively modulated by dietary CAL (190 g/d/lamb; exp. 3 and exp. 4). The CAL also increased LNA content in the ruminal fluid and the meat and decreased mRNA genes (*FASN*, *SCD*, *LPL*, and *FADS1*) in ruminant muscles/meat. Moreover, CAL positively altered meat's physical and sensory quality, beneficial from a customer standpoint and commercial storability.

Keywords: biohydrogenation, methane, *Coleus amboinicus* Lour., meat quality, rumen

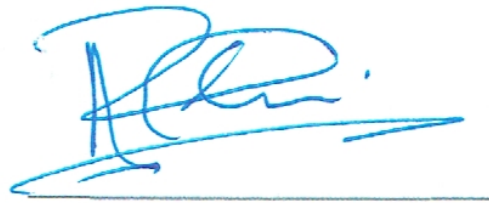
Streszczenie

W ostatnich latach stosowanie w żywieniu zwierząt jako komponentów dawek pokarmowych roślinnych związków biologicznie aktywnych (BAC) ograniczyło produkcję metanu (CH_4) i poprawiło jakość produktów pochodzących od przeżuwaczy (mięsa i mleka). *Coleus amboinicus* Lour. (CAL) jest jedną z roślin zawierających BAC, takie jak kwasy fenolowe, flawonoidy i diterpeny. Stąd hipoteza, że włączenie CAL do dawki pokarmowej dla przeżuwaczy może modulować populację drobnoustrojów i fermentację w żwaczu, ograniczać produkcję CH_4 i regulować proces biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych (BH) w żwaczu bez negatywnego wpływu na wydajność przeżuwaczy lub jakość mięsa. Celem niniejszej pracy było określenie zawartości podstawowych składników pokarmowych i BAC w CAL oraz wpływu CAL na fermentację w żwaczu, proces BH i produkcję CH_4 , populacje drobnoustrojów, przede wszystkim metanogenów i bakterii biorących udział w procesach BH w żwaczu. Określono również wpływ CAL na jakość i profil kwasów tłuszczowych w mięśniu *longissimus thoracis* u jagniąt. W ramach badań przeprowadzono cztery doświadczenia: 1) Hohenheim Gas Test *in vitro*, w którym badano dodatek 0, 2.5, 5, 10 i 20% CAL w dawce dla krów mlecznych, 2) test RUSITEC *in vitro*, w którym badano dodatek 0, 10, 15 i 20% CAL w dawce dla jagniąt, 3) doświadczenie *in vivo* z wykorzystaniem kaniulowanych jagniąt żywionych dawką pokarmową z i bez CAL (0 vs 190 g/d) oraz 4) doświadczenie *in vivo* z wykorzystaniem rosnących jagniąt żywionych dawką pokarmową z i bez CAL (0 w porównaniu do 190 g/dzień).

Przeprowadzone badania wykazały, że dodatek CAL modulował fermentację w żwaczu i zmniejszał produkcję CH_4 *in vitro* u przeżuwaczy o 44 do 51% poprzez ograniczenie liczebności metanogenów, bez negatywnego wpływu na strawność określaną w warunkach *in vitro*. Zwiększony udział CAL w dawce zwiększył również liczebność pierwotniaków *Entodiniomorpha*, bakterii *R. albus*, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes*, *Prevotella* spp., *B. proteoclasticus* oraz całkowitą liczebność bakterii w żwaczu, ale nie miał wpływu na liczebność populacji *Holotricha*. Taki stan w konsekwencji moduluje profil lotnych kwasów tłuszczowych w żwaczu, na co wskazuje niższy stosunek C2/C3. Stwierdzono również wpływ CAL na proces BH wyrażony wzrostem zawartości kwasu linolowego (LA), kwasu linolenowego (LNA) i sprzężonego izomeru kwasu linolowego (CLA) w żwaczu. W doświadczeniach *in vivo* produkcja CH_4 została ograniczona o 29%, w efekcie ograniczenia liczebności metanogenów. Nie stwierdzono wpływu na strawność dawki pokarmowej (190 g/dzień, doświadczenie 3 i 4). Udział CAL w dawce pokarmowej pozytywnie wpłynął na populacje pierwotniaków oraz

bakterii (*R. albus*, *M. elsdenii*, *B. proteoclasticus*, i *B. fibrisolvens*) w żwaczu jagniąt (doświadczenia 3 i 4) oraz zwiększył zawartość LNA w płynie żwacza i mięsie. CAL ograniczył ekspresję genów FASN, SCD, LPL i FADS1 w mięśniach/mięsie przeżuwaczy. CAL pozytywnie wpłynął na fizyczną i sensoryczną jakość mięsa, co jest efektem korzystnym z punktu widzenia konsumenta.

Słowa kluczowe: biouwodorowanie, metan, *Coleus amboinicus* Lour., jakość mięsa, żwacz

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping letters and a long horizontal stroke at the bottom.