

DISS. ETH NO. 23421

**Bioactive compounds in forage legumes:
structural changes during conservation, their fate
along the digestive tract and their potential to impact
ruminant products**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

Marion GIRARD

MSc Biology-Agronomy-Health, University of Rennes I

Born on *23.12.1988*

Citizen of France

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Michael Kreuzer, *examiner*

Dr. Giuseppe Bee, *co-examiner*

Dr. Frigga Dohme-Meier, *co-examiner*

Dr. Vincent Niderkorn, *co-examiner*

2016

Summary

Since several years now, the use of certain temperate forage legumes is gaining interest in livestock farming. In ruminants, bioactive compounds, such as condensed tannins (CT) present in some forage legumes, have beneficial effects on animal health and performances. They reduce parasitic burden by gastro-intestinal nematodes, prevent bloat and improve nitrogen utilization in ruminants. Nevertheless, few studies focused on quality of the products originating from ruminants fed bioactive compounds.

The main aim of this doctoral thesis was to determinate whether feeding tanniferous legume forage (birdsfoot trefoil; BT and sainfoin; SF) or a forage with a high polyphenol oxidase content (red clover; RC) can improve ruminant products quality and their organoleptic properties compared with CT-free legume forage (alfalfa; AF).

The first part of this doctoral thesis focused on the evolution of CT content and the different proportions of soluble and insoluble CT in BT and SF from three harvests and in different forms (fresh, wilted, ensiled or dehydrated pelleted). The thiolysis method showed that wilting of SF not only affected CT contents but also the CT structure such as the size of tannin polymers and the hydroxylation pattern. In addition, the percentage of soluble and insoluble CT varied according to plants, cultivars, harvest time and forage form. Wilting, ensiling and pelleting processes resulted in lowering the portion of soluble CT in favor of increasing the protein-bound CT portion.

In the second part, two *in vivo* studies were performed to evaluate meat, milk and cheese quality.

The first *in vivo* experiment was conducted with 48 ram lambs and aimed to evaluate the potential of legume silages to reduce the pastoral off-flavor of sheep meat and monitor changes in the fatty acid profile of sheep meat. The rams were fed silages from AF, RC, BT or SF and were slaughtered at an average age of 182 d. Perirenal fat was removed to determine skatole and indole content. The fatty acid profile of the intramuscular fat (IMF) and the sensory analysis by a trained panel were performed on the *longissimus dorsi*. Despite a slower growth, the IMF of lambs offered CT-rich plants contained more polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially n-3 fatty acids, and less saturated fatty acids (SFA). Moreover, skatole content of the perirenal fat was 2-fold lower in the SF than the AF group. The panelists found lower intensity for the flavor 'livery' and 'sheepy' in the meat of the lambs fed SF compared with BT and RC groups and a lower odor 'sheepy' in SF lambs compared with the three other groups.

In the second *in vivo* study, the goal was to determine if a diet containing CT can affect milk and cheese quality by increasing their PUFA content without affecting negatively their sensory properties. This feeding experiment was split into a control (C) and an experimental period (E) each lasting 26 d,

with 24 dairy cows. In the control period all cows were fed a basic diet (hay:corn silage:linseed:concentrate; 45:25:5:7%) and 18% of alfalfa (AF) pellets. In the experimental period, in 3 of the 4 groups AF was replaced by either sainfoin (SF; CT: 19%) or 2 cultivars of birdsfoot trefoil: polom (BTP; CT: 3%) or bull (BTB; CT: 5%). At the end of each period, milk was collected on 3 consecutive days in order to analyze the milk fatty acid profile and to fabricate Gruyère-type cheese. From the control to the experimental period, urea concentration in the milk was reduced by 23% in the SF, remained unchanged in the BTP and tended to increase in the AF and BTB groups. The odor of the fresh milk from BB cows was judged to be different than from AF cows. Switching from the control to the experimental period resulted to increase the 18:3n-3 level by 17% both in the milk and in the cheese in the SF group and by 3% in the cheese in the BTP group. Additionally, the 20:5n-3 and 22:5n-3 levels of the cheese tended to be greater in cows fed SF between the control and the experimental period. Compared to cheeses from the AF group, those from cows fed CT were judged harder and tended to be less adhesive on the palate.

Finally, the third part of this thesis tried to investigate the fate of CT from BT and SF post-ruminally in the digestive tract (abomasum, small and large intestine) with a modified method of the HCl-butanol that include acetone. Furthermore, skatole and indole production were monitored in the digesta of lambs fed AF, RC, BT and SF. The organic matter content was greater for lambs fed CT-rich silage than lambs fed AF and RC in the large intestine. Both skatole and indole were detected in the digesta. The use of acetone in the HCl-butanol-acetone method increased the CT content mainly by increasing the soluble CT content in the digesta. In addition, with the HCl-butanol-acetone method, the soluble:insoluble CT ratio was greater in the small and large intestine than in the abomasum for lambs fed BT and SF.

This doctoral thesis shows the potential of some tanniferous forage legumes to increase beneficial PUFA, especially n-3 fatty acids in meat, milk and cheese and to affect positively organoleptic quality of the products. It seems that SF was more efficient than BT to reduce biohydrogenation of dietary PUFA and to reduce protein degradation in the rumen, as confirms the reduced pastoral off-flavor of lamb meat and the lower urea concentration in the milk. The forage form by modifying the structure of CT, including the portion soluble and bound to protein, could impact differently microbial activities in the rumen.

This work raised several issues such as the importance of the structure of CT or the optimal level of CT to include in the ration. From the animal nutrition point of view, the present results highlighted the importance of the development of analytical methods to be able to measure CT structure in the insoluble portion and in the digesta.

Résumé

Depuis plusieurs années, l'utilisation de certaines légumineuses fourragères dans les zones tempérées gagne de l'intérêt dans les élevages. Chez les ruminants, les composés bioactifs tels que les tannins condensés (TC) présents dans certaines légumineuses fourragères, ont des effets bénéfiques sur la santé et la production animales. Ils réduisent la charge parasitaire induite par les nématodes gastro-intestinaux, préviennent la météorisation spumeuse et améliorent l'utilisation de l'azote chez les ruminants. Néanmoins, peu d'études relatent de la qualité des produits issus de ruminants ayant consommé des composés bioactifs.

Le but majeur de cette thèse était de déterminer si l'affouragement avec des légumineuses fourragères contenant des TC (lotier corniculé: LC ou sainfoin: SF) ou contenant une forte concentration en polyphénol oxydase (trèfle violet: TV) pouvait améliorer la qualité des produits issus des ruminants ainsi que leurs propriétés organoleptiques comparé à un affouragement sans TC (luzerne: LU).

La première partie de cette thèse étudie l'évolution de la concentration en TC et des différentes proportions en TC solubles et insolubles dans du LC et du SF provenant de trois cycles et sous différentes formes (frais, préfané, ensilé ou bouchons déshydratés). La méthode de thiolyse a montré que le préfanage affectait non seulement la concentration en TC mais aussi la structure des TC telle que la taille des polymères et le profil d'hydroxylation. De plus, le pourcentage de TC solubles et insolubles a varié selon la plante, la variété, le cycle et la forme de conservation. Le préfanage, la fabrication d'ensilage et de bouchons ont diminué la fraction soluble des TC favorisant l'augmentation de la fraction de TC liée aux protéines.

Dans la seconde partie, deux études *in vivo* ont été réalisées afin d'évaluer la qualité de la viande, du lait et du fromage.

La première expérience *in vivo*, menée sur 48 agneaux mâles, a évalué le potentiel de légumineuses ensilées à réduire la flaveur pastorale de la viande de mouton et à modifier le profil des acides gras dans cette viande. Les agneaux ont été nourris avec des ensilages de LU, TV, LC ou SF et ont été abattus à l'âge moyen de 182 j. La graisse péri-rénale a été prélevée afin de mesurer le scatole et l'indole. Le profil des acides gras dans la graisse intra-musculaire (GIM) et l'analyse sensorielle menée avec un panel entraîné ont été mesurés sur le *longissimus dorsi*. Malgré une croissance plus faible, la GIM des agneaux ayant reçu des TC était plus riche en acides gras poly-insaturés (AGPI), en particulier en n-3, et contenait moins d'acides gras saturés (AGS). De plus, le contenu en scatole de la graisse péri-rénale était deux fois plus faible pour le groupe SF que LU. Les panélistes ont décrit une flaveur 'foie' et

'mouton' moins prononcée dans la viande du groupe SF comparé aux groupes LC et TV et une odeur 'mouton' plus faible dans le groupe SF comparé aux trois autres traitements.

Dans la seconde étude *in vivo*, le but était de déterminer si un régime riche en TC pouvait affecter la qualité du lait et du fromage en augmentant leur contenu en AGPI sans influencer négativement leur propriété sensorielle. Cette expérience a été divisée en une période contrôle et une expérimentale, chacune de 26 j, avec 24 vaches laitières. Durant la période contrôle, toutes les vaches ont reçu une ration de base (foin:ensilage de maïs:graines de lin:concentré; 45:25:5:7%) et 18% de bouchons de luzerne (LU). En période expérimentale, dans 3 des 4 groupes, la LU a été remplacée par des bouchons soit de sainfoin (SF; TC: 19%) ou soit de lotier de 2 cultivars: polom (LCP; TC: 3%) ou bull (LCB; TC: 5%). À la fin de chaque période, le lait de 3 jours consécutifs a été collecté afin d'analyser le profil des acides gras et de fabriquer des fromages de type Gruyère. Entre les périodes contrôle et expérimentale, la concentration en urée a diminué de 23% avec le SF, n'a pas changé avec le LCP et tendait à diminuer dans les groupes LU et LCB. L'odeur du lait issu du groupe LCB a été jugée différente de celle du groupe LU. Le passage de la période contrôle à la période expérimentale a augmenté le niveau de 18:3n-3 de 17% à la fois dans le lait et dans le fromage du groupe SF et de 3% dans le fromage du groupe LCP. Les contenus en 20:5n-3 et 22:5n-3 tendaient à augmenter dans le fromage du groupe SF entre les deux périodes. Finalement, comparé aux fromages du groupe LU, ceux issus des vaches ayant consommé des TC ont été jugés plus durs et tendent à être plus adhésifs au palet.

Finalement, la troisième partie de cette thèse tente d'élucider le devenir des TC de LC et SF après leur passage dans le rumen (abomasum, intestin grêle, gros intestin) en utilisant une méthode modifiée du HCl-butanol qui inclue de l'acétone. La production de scatole et indole a aussi été mesurée dans les digesta d'agneaux ayant reçu de la LU, du TV, du LC et du SF. Le contenu en matière organique était supérieur chez les agneaux nourris avec des TC que ceux recevant de la LU et du TV dans le gros intestin. Du scatole et de l'indole ont pu être détecté dans les digesta. L'utilisation de l'acétone dans la méthode HCl-butanol-acétone a augmenté la concentration en TC, principalement en augmentant la concentration en TC solubles dans les digesta. De plus, avec la méthode HCl-butanol-acétone, le ratio TC soluble:insoluble était meilleure dans les intestins que dans l'abomasum des agneaux ayant consommé du LC et du SF.

Cette thèse démontre le potentiel de certaines légumineuses fourragères à augmenter des AGPI bénéfiques, en particulier les n-3, dans la viande, le lait et le fromage issus des ruminants et à améliorer les propriétés organoleptiques des produits. Il semble que le SF soit plus efficace que le LC à réduire la biohydrogénation des AGPI d'origine alimentaire et à diminuer la dégradation protéique dans le rumen, comme le confirme la flaveur pastorale moins prononcée dans la viande d'agneaux et la concentration plus faible en urée dans le lait. La forme de conservation du fourrage, en modifiant la

structure des TC, y compris les proportions solubles et liées aux protéines, pourrait agir différemment sur les activités microbiennes.

Ce travail soulève différentes questions telles que l'importance de la structure des TC ou le niveau optimal en TC à inclure dans la ration. Du point de vue de la nutrition animale, ces résultats montrent l'importance de développer des méthodes analytiques capables de déterminer la structure des TC dans la partie insoluble ainsi que dans les digesta.