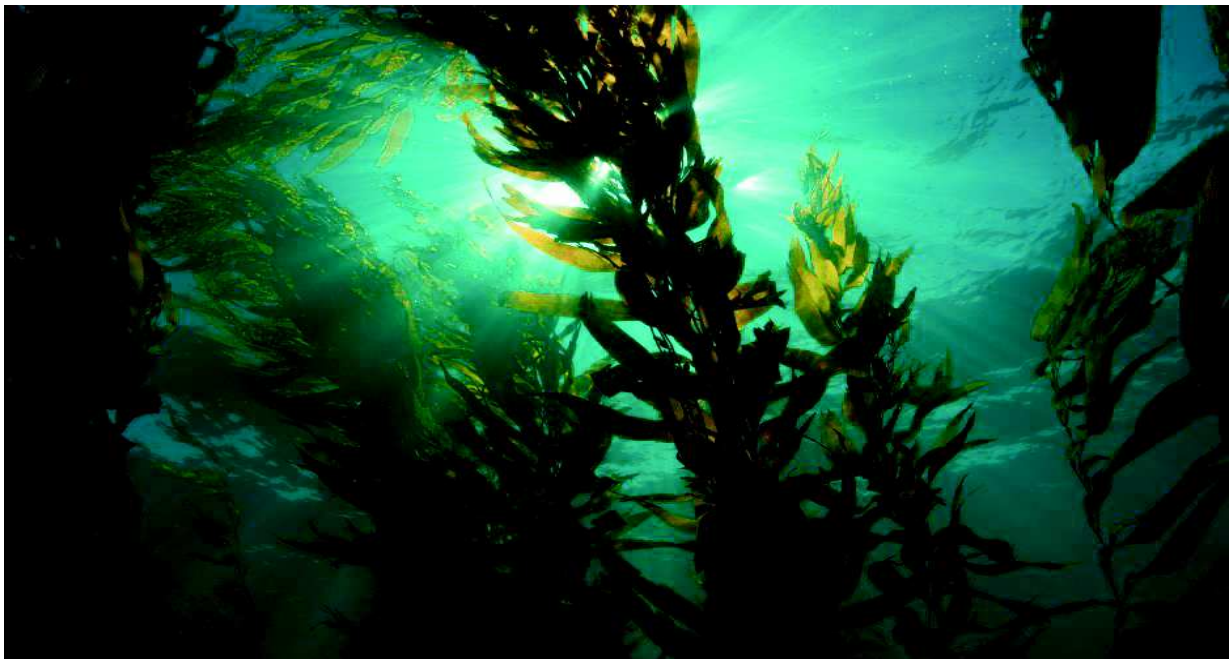




Bachelorprojekt

Anna Ærenlund Andersen (jrt521) & Natasha Jørgensen (vfp691)

Muligheden for at anvende tang som foder til kvæg med henblik på at reducere den enteriske dannelse af metan



Hovedansvarlig vejleder: Mette Olaf Nielsen, Det sundhedsvidenskabelige fakultet

Afleveret: 15/06-2018

15 ECTS

BSc husdyrvidenskab

Forord

Dette projekt er det afsluttende arbejde for vores bachelorgrad i husdyrvidenskab på Det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet. Dette bachelorprojekt svarer til 15 ECTS point og er et litteraturstudie.

Dette projekt vil øge den viden, der er omkring muligheden i at anvende tang i foder med henblik på at reducere den enteriske dannelse af metan. Projektet er derfor rettet mod studerende, videnskabsfolk, andre med interesse indenfor at reducere emissionen af drivhusgasser og landmænd med interesse i at reducere metan for at afkriminalisere kvæg i klimadebatten.

Vi vil gerne udtrykke vores taknemmelighed til vores vejleder Mette Olaf Nielsen, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, for hendes tålmodighed, ideer, vejledning og gennemgang af projektet. Herudover vil vi gerne takke Gizaw Dabessa Satessa for at sende os nogle forsøgsresultater, vi har kunne arbejde med og Hanne Helene Hansen for at lade os komme med i laboratoriet for at se, hvordan in vitro metoden foregår.

Forsidebilledet:

Algae World News: <http://news.algaeworld.org/2017/11/seaweed-can-reduce-greenhouse-emissions/>

Abstract

Methane emission from ruminant livestock production is a major contributor to the climate change. Ruminant emissions account for 40 % of the total emissions in Danish agriculture and it is therefore important to find a solution that can reduce enteric methane production without affecting feed utilization. For this reason it is interesting to obtain knowledge about how methane occurs during fermentation and hereby try to reduce the occurrence. Some seaweed species like *Asparagopsis taxiformis* from Australia have shown strong effects inhibiting methanogenesis up to 99 % but is now illegal due to its content of the active substance bromoform which has shown some unwanted changes in the mucosa of the rumen of sheep and because they have an ozone depleting effect. The aim of this study was to investigate the possibility of reducing enteric methane emission by using seaweed from northern areas. The hypothesis tested was: *Bioactive compounds in seaweeds that can grow on northern latitudes can reduce the enteric production of methane in cattle*. The effect of using seaweed in the diet for cattle was evaluated theoretically. Some in vitro gas production experiments with brown algae species (BA; EP900) have shown some potential in reducing methane with the inclusion of BA in maize silage (MS) without affecting the feed utilization. In addition the brown algae *Ascophyllum nodosum* have also shown to reduce methane in some in vitro experiment and have shown not to affect the feed utilization, feed intake, growth rate in vivo experiments.

There have not been any in vivo experiments with *EP900* yet which means we do not know if there are any negative effects on the animals' function and productivity. Only a few studies have been conducted in this area and there is therefore a lack of knowledge and more research at the topic is needed.

Indholdsfortegnelse

1. Introduktion	6
1.1 Formål.....	8
1.2 Metode	8
1.3 Forkortelsesliste.....	10
2 Fermenteringsprocesser i vommen.....	11
2.1 Mikroorganismer	11
2.1.1 Bakterier.....	11
2.1.2 Protozoer.....	12
2.1.3 Arkæer, herunder metanogener.....	12
2.1.4 Metanogenesen.....	13
2.1.5 Svampe	14
2.2 Nedbrydning af kulhydrater.....	15
2.3 Nedbrydning af fedt.....	16
2.4 Hvad er en effektiv ko?	17
2.5 Delkonklusion.....	17
3. Tang og dets bioaktive stoffer.....	18
3.1 Tang versus terrestriske planter	18
3.2 Grønalger.....	19
3.3 Brunalger	19
3.4 Rødalger	19
3.5 Bromoform og bromochlorometan.....	20
3.6 Phlorotanniner	21
3.7 Isoprenioler/ Terpenoler/ Terpenoiler.....	22
3.8 Tungmetaller.....	23
3.9 Resultater fra in vitro og in vivo forsøg verden over.....	24
<i>Tabel 1: Oversigt over in vitro og in vivo forsøg lavet verden over</i>	<i>24</i>
3.10 Resultater over TGP produktion med tempererede algearter (EP900 og OFS)	32
3.11 Resultater over metanproduktion med tempererede algearter (EP900 og OFS).....	33
3.12 Hvordan påvirker reduktion af metan koens produktivitet?	35
3.13 Delkonklusion.....	37
4. Bæredygtighed	37

4.1 Fordele og ulemper ved at dyrke tang i havet.....	38
4.2 Delkonklusion.....	39
5. Diskussion.....	39
5.1 Reduktion af den enteriske dannelse af metan	39
5.2 Tangarter.....	40
5.3 Forsøgsresultater.....	42
5.4 Litteraturen	43
5.5 Afgrænsning	44
5.6 Det næste skridt i forskningen af tang	45
6. Konklusion	46
7. Perspektivering	46
8. Litteraturliste	48
9. Bilag.....	56

1. Introduktion

Landbruget bidrager til 16 % af den samlede emission af drivhusgasser i Danmark (Mikkelsen *et al.*, 2011), og 40 % af dette stammer fra kvægbruget (Kristensen & Lund., 2011). En stor del af dette stammer fra metan som har et globalt opvarmningspotentiale, der er 21 gange kraftigere end CO₂ over en periode på 100 år (Illerup *et al.*, 2007).

EU, herunder Danmark, har forpligtet sig til at reducere udslippet af drivhusgasser med 40% inden 2030 i forhold til 1990 niveauerne (Kristensen & Lund., 2011), hvilket også gør efterspørgslen for en mere bæredygtig produktion endnu mere eftertragtet. I 2009 foreslog skattekommissionen at indføre en klimaafgift på udledning af metan i landbruget (Dubgaard, 2009), og dette er også en faktor, som gør det vigtigt at finde en metode til at reducere metan for at afkriminalisere kvæg i klimadebatten.

Der er kommet en stigende opmærksomhed på at reducere emissionen af drivhusgasser, som bidrager til den globale temperaturstigning og har store negative konsekvenser for verdens økosystemer og menneskelige levevilkår (Kristensen & Lund, 2011). Desuden vil der med det stigende antal mennesker på kloden komme en større efterspørgsel på fødevarer og dermed også afgrøde areal (Det Europæiske Miljøagentur, 2018). Det er derfor relevant at kigge på, hvilke faktorer, der kan reducere udslippet af drivhusgasser, og hvordan vi kan sikre nok fødevarer til den stigende befolkning.

Metan dannes blandt andet i vommen hos køer og andre drøvtyggere. I vommen findes der nogle forskellige mikroorganismer, som bl.a. svampe, bakterier, protozoer og arkæer, og disse udføre en anaerob nedbrydning af næringsstoffer. Nogle af disse mikroorganismer er metandannende (metanogene) og hører til en helt særlig gruppe af mikroorganismer, der kaldes arkæer. Metanogenerne danner energi ved hjælp af en åndingsproces, hvor de hovedsageligt bruger kuldioxid (CO₂) og brint (H₂) til at danne vand og metan: $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ (Madigan *et al.*, 2014a ; Hackmann *et al.*, 2013; Van Soest, 1994).

Mikroorganismene producerer som slutprodukt fra fermenteringen hovedsageligt de tre kortkædede fedtsyrer: Eddikesyre, propionsyre og smørsyre. Når man giver en større andel af kraftfoder, vil mikroorganismene i vommen syntetisere en større andel af propionsyre i forhold til

eddikesyre og smørsyre (Van Soest, 1994). Dannelsen af propionsyre er forbundet med forbrug af brint, og dermed mindsket metandannelse, mens dannelse af eddikesyre er forbundet med en netto produktion af brint og dermed metandannelse (Kristensen & Lund, 2011; Van Soest, 1994). Det betyder, at når der kommer en større andel af propionsyre, vil der være mindre substrat til metanogenerne, og der vil derfor dannes mindre metan. Omvendt vil en større tildeling af fibre medføre en større dannelse af eddikesyre og dermed også en større dannelse af metan. Smørsyre produktionen er lidt svære at manipulere med via fodring, men en høj pH og store mængder af sukker favoriserer en større produktion af smørsyre. Smørsyre dannelse medfører en nettoproduktion af brint og vil derfor give anledning til en større metandannelse (Kristensen *et al.*, 2003; Moloney *et al.*, 1994).

Selvom metoden ved at give en større andel af kraftfoder i forhold til grovfoder reducere metanproduktionen kan den dog give nogle sundhedsmæssige komplikationer hos dyret, som f.eks. vomacidose (Kristensen *et al.*, 2003).

En anden strategi, man har forsøgt sig med, er, at tildele en større andel af fedt i foderrationen. Fedt kan nedsætte metanproduktionen formodentlig, ved bl.a. at hæmme protozoer og cellulolytiske bakterier, som danner eddikesyre og kan på den måde reducere metanproduktion (Børsting *et al.*, 2003). Derudover nedbrydes fedtsyre ikke i vommen og kan derfor ikke bidrage til brintproduktion og dermed heller ikke metanproduktion (Kristensen & Lund, 2011). Fedt i foderet kan dog medvirke til en uønsket reduktion af fordøjelighed af cellevægskulhydrater, reduceret foderoptagelse og dermed også reduceret mælkeydelse (Kristensen & Lund, 2011).

Vi vil i dette projekt prøve at finde ud af, om der kunne være andre mere optimale strategier end de metoder beskrevet tidligere til at reducere metanproduktionen i vommen hos kvæg uden at det går ud over foderudnyttelsen. Vi vil gennem projektet beskrive muligheden i at anvende tang i foder til kvæg med henblik på at reducere den enteriske dannelse af metan.

Tang og dets bioaktive stoffer har vist sig at være effektive til at reducere metanproduktionen i vommen i forskellige in vitro og in vivo forsøg (Machado *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2008; Kinley *et al.*, 2016a; Kinley *et al.*, 2016b; Belanche *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). In vitro forsøgene har brugt nogle tangarter, heriblandt *Asparagopsis taxiformis* (*A. taxiformis*), *Dictyota* og *Ascophyllum*

nodosum (*A.nodosum*), som har vist sig at have potentiale til at inhibere produktionen af enterisk metan på grund af en høj antimikrobiel aktivitet, som kan påvirke fermenteringen af forskellige substrater (Machado *et al.*, 2014; Belanche *et al.*, 2015). *A.taxiformis* har i flere in vitro forsøg vist sig at kunne reducere metan med 96-100 % (Machado *et al.*, 2014; Kinley *et al.*, 2016a; Kinley *et al.*, 2016b; Machado *et al.*, 2015). Man har fundet ud af, at *A.taxiformis* ikke kan være løsningen på metan emission, da den har det bioaktive stof bromoform (BF), som har vist sig at kunne ophobe sig i kød tæt på grænseværdierne for humant konsum og er derfor blevet forbudt i Australien (Tomkins *et al.*, 2009).

1.1 Formål

Formålet med dette projekt er at undersøge, om det er muligt at reducere kvægs enteriske dannelse af metan ved at inkludere tang, som produkt i foderet til kvæg. Herunder vil vi undersøge hvilke bioaktive stoffer i tang, som kan inhibere dannelsen af metan samt evaluere om det er en fødevarerikkerhedsmæssig fremgangsmåde. Dette gøres via et litteraturstudie, hvor vi vil afdække, hvilke tangarter der indeholder nogle særlige bioaktive stoffer, som kan inhibere methanogenerne uden at det går ud over foderudnyttelsen. Herudover kommer vi ind på, hvilke typer af tang, der er mulige at dyrke i Danmark. Vores hypotese er: *Bioaktive stoffer i tang, som kan dyrkes på nordlige breddegrader, kan reducere den enteriske dannelse af metan hos kvæg.* For at kunne bekræfte vores hypotese er følgende spørgsmål sat:

- Hvad er metan og hvilke fermenteringsprocesser i vommen leder til metanogenese?
- Hvilke bioaktive stoffer kan påvirke metanogenerne, og i hvilke tangarter findes disse?
- Er der fremtidsmuligheder i at bruge de bioaktive stoffer i tang, og hvilke fordele og udfordringer kan der opstå i forbindelse med dette.

Det er i øvrigt ikke formålet at komme nærmere ind på ernæringsmæssige egenskaber af tang, da formålet er at undersøge, om det er muligt at reducere den enteriske dannelse af metan ved at inkludere tang, som produkt i foderet til kvæg og ikke dets næringsværdi.

1.2 Metode

Vores opgave er et litteraturstudium. De videnskabelige artikler er brugt til at opnå viden omkring fermenteringens støkiometri, som inkluderer: Mikroorganismer, herunder protozoer, arker, svampe

og bakterier. I øvrigt opnår vi viden omkring forskellige tangarter og de grupper, man typisk inddeler makroalger i, herunder også eventuelle indhold af bioaktive stoffer. Vi vil have hovedfokus på tangarter, der kan anvendes i Danmark, og hvilke metanogene processer man kan påvirke med de bioaktive stoffer.

Litteraturstudier, som repræsenterer den nuværende litteratur inden for emner, er opnået ved brug af: Cab abstract (Ovid), AGRICOLA (Ovid), AGRIS (Ovid), BIOSIS (Ovid), Ovid MEDLINE(R) (Ovid), Google Scholar, Pubmed, og REX. Søgeord: Cattle OR cow* OR bovine OR ruminant*, seaweed OR macroalgae, enteric methane OR CH₄, brown algae, red algae, green algae, bioactive compound*, sustainability, fermentation stoichiometry, bromoform, bromochloroform, Phlorotannin, terpen*, rumen microbes, in vitro, in vivo, Asparagopsis taxiformis.

1.3 Forkortelsesliste

A.armata	Asparagopsis armata
A.nodosum	Ascophyllum nodosum
aNDF	Neutral detergent fiber med alfa-amylase
AS	Aminosyrer
A.taxiformis	Asparagopsis taxiformis
BA	Brunalge
BCM	Bromochlorometan
BF	Bromoforn
CoM	Coenzym M
CoB	Coenzym B
DCS	Afkortet bomuldsfrø
diBCM	Dibromchlorometan
FF	Furcellaria
HK	Høj kvalitet
IM	Chodrus chrispus
MF	Methanofuran
MP	Metanoopterin
MS	Majs ensilage
NDF	Cellulose, hemicellulose og lignin
OFS	Oceanfeed™ Swine
OM	Organisk stof
PEG	Polyethylene glycol
PT	Phlorotanniner
PUFA	Flerumættede fedtsyrer
SBP	Sukkerroe pulp
SCFA	Kortkædede fedtsyrer
TGP	Total gasproduktion
VFA	Kortkædede Flygtige fedtyrer

2 Fermenteringsprocesser i vommen

Der sker mange forskellige processer i vommen, som er koblet sammen i et ekstremt komplekst system af indbyrdes interaktioner imellem de forskellige mikroorganismer (Owens & Basalan, 2016). Derfor har vi valgt, at vi i dette afsnit kort vil beskrive de 4 grupper af mikroorganismer, der er fundet i vommen hos kvæg. Herefter vil vi komme ind på den mikrobielle omsætning af næringsstoffer, hvor vi vil have fokus på nedbrydning af kulhydrater, da det primært er denne fraktion, som bidrager til metandannelse (McDonald *et al.*, 2011). Derudover vil vi kort beskrive omsætningen af fedt i vommen. Slutteligt vil vi komme med en definition af, hvad en effektiv ko er i forhold til at udlede mindst mulig metan samtidig med at have så høj en mælkeydelse som mulig.

2.1 Mikroorganismer

Vommen fungerer som et stort forgæringskammer for de forskellige mikroorganismer, og den kan hos en ko indeholde mellem 100-150 liter. Den har en temperatur på ca. 39 grader, og pH'en varierer typisk mellem 5,5 -7 afhængig af foderrationen (Madigan *et al.*, 2014a). Mikroorganismene i vommen lever i et strikt anaerobt miljø og består af mange forskellige klasser af mikroorganismer. S sammensætningen af mikroorganismene afhænger af foderrationens sammensætning både kemisk og fysisk, og derudover har det omgivende miljø også en betydning for dette (Kristensen *et al.*, 2003). Vi vil nu beskrive de 4 overordnede klasser af mikroorganismer, som findes i vommen

2.1.1 Bakterier

En stor del af vommens mikrobielle biomasse (ca. 40-50%) består af bakterier, som er encellede organismer uden en cellekerne (Puniya *et al.*, 2015). Der findes en stor diversitet af bakterier i vommen, som kan klassificeres på baggrund af de næringsstoffer, de metaboliserer, og de metabolitter der dannes. De kaldes hhv. amylolytiske-, cellulolytiske- og proteolytiske bakterier (Hungate, 1966). De amylolytiske bakterier er karakteriseret ved at metabolisere stivelse i foder, samt at formere sig hurtigt, hvis der er indtaget meget stivelse, og dermed produceres der meget syre, så pH falder. De cellulolytiske bakterier nedbryder de kulhydrater, som er en del af cellevæggene hos planter, som eksempelvis cellulose, hemicellulose, fruktaner og pektiner. Nedbrydning af cellulose og hemicellulose foregår meget langsommere end nedbrydning af stivelse

og er mere sensitiv over for ændringer i pH. Hvis pH falder til under 6, vil nedbrydningen af cellulose og hemicellulose reduceres drastisk. De proteolytiske bakterier er proteinnedbrydende. Protein nedbrydes til aminosyrer (AS) eller ammoniak, hvor ammoniak er en vigtig nitrogenkilde for proteinsyntese af bakterier i formaverne eller til mikroorganismer, der fermenterer kulhydrater (Hungate, 1966).

2.1.2 Protozoer

Vommens mikrobielle biomasse indeholder samme mængde protozoer som bakterier, hvilket er 40-50% (Puniya *et al.*, 2015). Kalve bliver fauneret med protozoer, når moderen slikker og plejer kalven, og de sluger noget af spyttet. Herudover bidrager drøvtygning også til et stort antal af de protozoer, som koen får, og det kaldes transfaunation (Hungate, 1966). Protozoerne er anaerobe, og de fleste af dem er ciliater, og større end bakterier. Protozoerne har to funktioner, hvor den ene er at fermentere lignocellulose til VFA og mikrobielt protein, som koen kan bruge til energikilde og aminosyrer. Den anden funktion er at beskytte let fermenterbart kulhydrat (sukker og stivelse), som de gør ved at optage det i cellerne, og på den måde beskytter det fra de bakterier, som udnytter sukker og stivelse (Puniya *et al.*, 2015). Ved at protozoerne optager det i cellerne, er de med til at stabilisere vommens pH, når koen indtager meget stivelse og sukker. Protozoerne er også i stand til at optage store mængder af bakterier, hvor de indtagne bakterier dækker protozoernes behov for protein, og reducerer den mængde bakterieprotein, som koen har til rådighed (Demeyer, 1981).

2.1.3 Arkæer, herunder metanogener

En lille del af vommens samlede biomasse består af arkæer (2-3 %), hvoraf størstedelen af dem består af methanogener (Madigan *et al.*, 2014b). Der er fundet 120 forskellige arter i vommen (Puniya *et al.*, 2015), hvoraf de to mest dominerende er *Methanobrevibacter* og *methanospaere* (Madigan *et al.*, 2014b). Methanogenerne lever i forskellige symbioser og samarbejdsforhold med bakterier og protozoer. De forskellige arter af metanogener kan udnytte flere forskellige substrater til metan dannelsen (metanogenese), hvilket bl.a. inkluderer brint, kuldioxid, methylaminer, methanol, formate eller acetat (Puniya *et al.*, 2015). Heraf sker den største produktion af metan, ved et forbrug af brint til at reducere CO₂ til methan, og metanogenerne er på den måde også med til at lette brint trykket i vommen (Puniya *et al.*, 2015). Denne proces ser ud således:



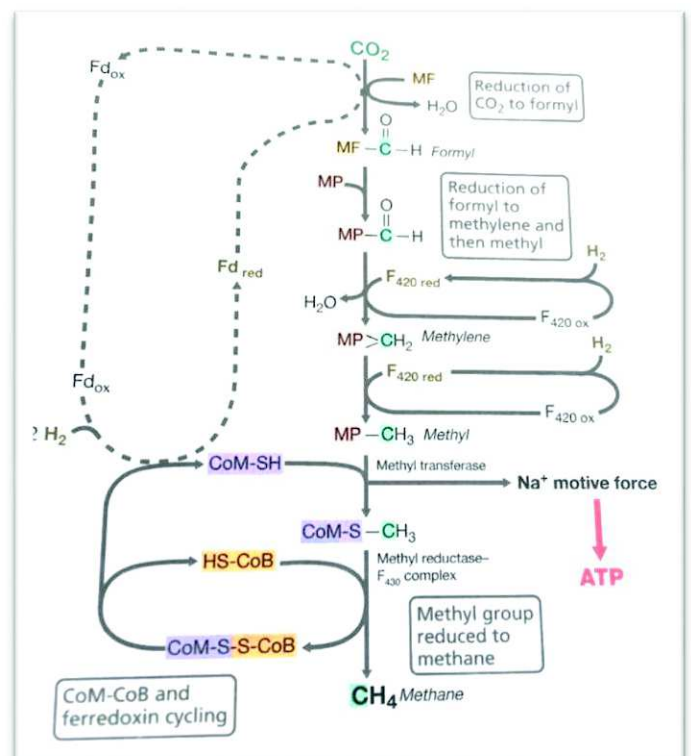
Methanogenernes vækst i vommen, og dermed metandannelse kan påvirkes med fodring ved at ændre på foderrationens sammensætning af grov- og kraftfoder, foderniveau og frekvens af fodringer (Puniya et al., 2015). På den måde kan man påvirke tilgængeligheden af substrater til methanogenese som bl.a. brint. Dette vil vi beskrive nærmere i et senere afsnit om kulhydratomsætning. Udover fodring, kan metan produktionen også påvirkes af race, genetik og produktionspotentiale (Kristensen & Lund, 2011; Puniya et al., 2015).

Udover at metan, som tidligere nævnt, bidrager til drivhusgasemissionen og dermed til den globale opvarmning, leder det også til et tab på 2-12 % af bruttoenergiindtag hos koen. Det betyder, at metan dannelsen reelt er en energiudgift for koen og dermed også for landmanden, da der skal indkøbe mere foder, for at opfylde koens energibehov (Puniya et al., 2015).

2.1.4 Metanogenesen

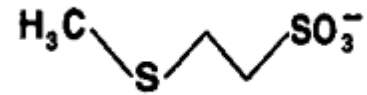
For at metanogenesen kan forekomme, er det nødvendigt, at der er H_2 , CO_2 . Derudover er der nogle afgørende trin i metanogenesen, som er afhængig af coenzym-M (CoM), og det kan kun dannes af metanogenerne. Der findes også andre substrater, herunder methylaminer, methanol, formate eller acetat, der kan bruges til dannelsen af metan, som er beskrevet i afsnit "2.1.3 Arkæer herunder metanogener", men i dette afsnit vil vi fokusere på metanogenesen ud fra CO_2 og H_2 .

CO_2 og H_2 dannes i vommen ved nedbrydning af kulhydrater, som beskrevet i afsnit "2.2 Nedbrydning af kulhydrater". CoM reductase som er involveret i det sidste trin af metanogenesen samt alfa-underenheden af CoM reductase er kodet af *mcrA*-genet, som findes i metanogenerne (Aguinaga Casañas et al., 2015).



Figur 2.1: Metanogenesen med CO_2 og H_2 (Madigan et al., 2014a)

Metanogenerne producerer metan ud fra stofferne kuldioxid CO_2 og H_2 i vommen, og denne proces kan ses i figur 2.1. Her ses, at CO_2 aktiveres af enzymet methanofuran (MF). Det aktiveres ved, at enzymet reducerer CO_2 til et aldehyd, som er formylgruppen og aktiverer den ved at binde den til methanofuran. Efterfølgende overføres formylgruppen fra MF til stoffet metanoopterin (MP), hvorefter formylgruppen reduceres yderligere først til methylen og videre til methyl. I de første to reduktionstrin, hvor der elimineres et O, sker dette i form af vand (H_2O). Trinnet fra methylen til methyl sker ved en addition af H vha. det reducerende coenzym- F_{420} , som afgiver sit H og derefter findes den som den oxiderede form. Til sidst overføres methylgruppen til CoM med enzymet metyltransferase og der fraspaltes et Na^+ . Det reducerende Coenzym- F_{430} går ind og fjerner CH_3 gruppen fra $\text{CH}_3\text{-CoM}$ og danner $\text{Ni}^{2+}\text{-CH}_3$ kompleks. Dette kompleks bliver yderligere reduceret af HS-CoB , som donerer sit H til CH_3 og der dannes metan (CH_4) samt et disulfid kompleks af CoM og coenzym-B (CoB) (CoM-S - S-CoB). De frie CoM og CoB gendannes ved reduktion af CoM-S - S-CoB med brint (H_2) (Madigan *et al.*, 2015a).



Figur 2.2: CoM's struktur
(Grabarse *et al.*, 2001)

Som beskrevet ovenfor er CoM nødvendig for, at metanogenesen kan forekomme. Det kunne derfor være interessant at kigge nærmere på, om man kunne finde et stof, som kemisk ligner CoM, og at dette stof kunne blokere for CoM's binding site i enzymet og på den måde, ville man kunne hæmme metanogenesen. Derudover kunne det også være interessant at finde et stof, som kan inhibere aktiviteten af CoM og på den måde ville man også kunne reducere metanogenesen.

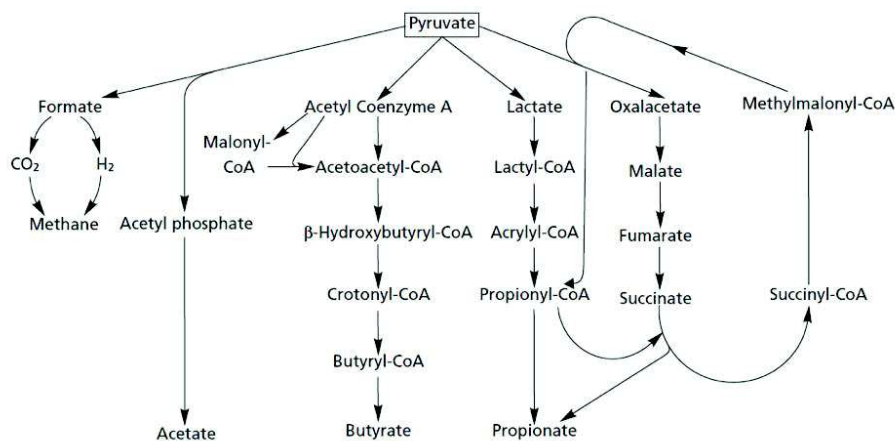
2.1.5 Svampe

Svampe udgør 5-8 % af den samlede biomasse i vommen og deltager aktivt i nedbrydningen af cellevægs kulhydrater og har enzymesystemer, som både kan nedbryde cellulose og hemicellulose (Puniya *et al.*, 2015). De er unikke, idet de kan nedbryde plantens kutikula, der ligger som et beskyttende lag på plantens overflade, og de dermed kan komme ind til plantens indre cellemasse. På den måde gør de nedbrydningen af fibre mere effektiv i vommen og betyder, at neddelingen af fibre under drøvtygning bliver mere effektiv (Kristensen *et al.*, 2003). Derudover har det vist sig, at der findes flere svampe hos de dyr, der får meget grovfoder i diæten i forhold til de køer, der får meget kraftfoder. Derfor må svampene have en betydning for nedbrydningen af fibre (McDonald *et al.*, 2011).

2.2 Nedbrydning af kulhydrater

Kulhydratsfraktionen udgør typisk omkring 75 % (Weisbjerg *et al.*, 2003) af det organiske stof i koens foderrationen, og en betydelig del af denne består af cellulose, hemicellulose, stivelse og vandopløselige kulhydrater (McDonald *et al.*, 2011). Nedbrydningen af kulhydrater kan deles op i to stadier. I det første stadie nedbrydes komplekse kulhydrater til simple sukre ved hjælp af ekstracellulære mikrobielle enzymer. Disse sukre bliver dernæst taget op og metaboliseret intracellulært af mikroorganismene via glycolyse, hvorved der bliver dannet pyruvat (McDonald *et al.*, 2011). Pyruvat kan ikke forbrændes fuldstændig til kuldioxid og vand, da der kræves ilt til denne proces. Derfor bliver pyruvat i stedet, ved en ufuldstændig forbrænding, konverteret hovedsageligt til slutprodukterne eddikesyre, propionsyre, smørsyre kuldioxid og metan. Disse 3 fedtsyrer er værtens hovedsagelige energikilde og kan optages gennem vom epitelet (McDonald *et al.*, 2011).

På figur 2.1 ses en oversigt over de forskellige veje, hvorved eddikesyre, propionsyre og smørsyre kan dannes. Man kan her se, at propionsyre dannelsen kan dannes af flere alternative veje. Laktat- og acrylate vejen er den mest dominerende vej, hvis der gives en stor andel af kraftfoder i foderrationen. Hvis der derimod gives store andele af fibre i foderrationen, vil succinat vejen være den dominerende (McDonald *et al.*, 2011; Van Soest, 1994).

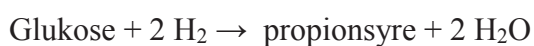


Figur 2.3: Omdannelse af pyruvat til flygtige fedtsyrer i vommen (McDonald *et al.*, 2011)

Som tidligere nævnt, kan andelen af de forskellige fedtsyrer ændre sig alt efter, hvordan foderrationen er sat sammen. Hvis man giver en foderration med meget stivelse, vil produktionen af propionsyre favoriseres, og andelen af eddikesyre vil falde. Dette skyldes bl.a., at væksten hos de

mikroorganismer, der danner propionsyre ud fra laktat, stimuleres ved øget tildeling af stivelse (McDondald *et al.*, 2011; Van Soest, 1994). Derudover vil pH i vommen falde, og den samlede produktion af SCFA vil stige (Van Soest, 1994). Omvendt vil produktionen af eddikesyre favoriseres ved en øget tildeling af fibre, og andelen af propionsyre vil falde (McDonald *et al.*, 2011). Herved vil pH i vommen stige, og der vil dannes en mindre samlede mængde af SCFA (Van Soest, 1994). Andelen af smørsyre er svær at manipulere med via fodring (McDonald *et al.*, 2011), men en høj pH og store mængder af sukker favoriserer en større produktion af smørsyre (Kristensen *et al.*, 2003; Moloney *et al.*, 1994).

Ved dannelsen af de 3 fedtsyrer (eddikesyre, propionsyre og smørsyre), vil produktionen af brint, som er en af de vigtigste kilder for metandannelse, være forskellig. Herunder ses hvordan henholdsvis eddikesyre, propionsyre og smørsyre dannes ud fra glukose (Hackmann *et al.*, 2013):



Ud fra disse processer ses, at der ved dannelse af eddikesyre og smørsyre vil ske en produktion af brint, og omvendt vil der ved dannelse af propionsyre være et forbrug af brint (Hackmann *et al.*, 2013; Kristensen *et al.*, 2003; Owens & Basalan, 2016; Van Soest, 1994). På den måde vil man kunne påvirke metandannelsen via fodring, fordi man kan påvirke dannelsen af brint, som er et vigtigt substrat for metanogenerne. Denne metode til at reducere metan er dog ikke optimal, da det kan medføre nogle sundhedsmæssige komplikationer hos dyret, som f.eks. vomacidose, som ikke er ønskeligt (Kristensen *et al.*, 2003).

Planter indeholder desuden også lignin, som er en del af fiberfraktionen og den er unedbrydelig både for dyrets egne enzymer og for mikrobielle enzymer. Fordøjeligheden af foderet falder og metanproduktionen stiger, jo højere indholdet af lignin er, som desuden er stigende med planternes alder (Van Soest, 1994).

2.3 Nedbrydning af fedt

De fedtsyrer, der indtages af koen med foderet, består af langkædede fedtsyrer, hvor fordøjelsen af dem starter i reticulorumen (Bauchart, 1993). Fedtsyrerne bliver ikke forgæret i reticulumrumen,

men der sker en omsætning af dem, hvor glyceriderne spaltes til glycerol og frie fedtsyrer ved processen lipolyse. Mange af de umættede fedtsyrer vil blive hydrogenet af mikroorganismerne i vommen, så det fedt, der kommer til tarmen, overvejende er mættet fedt og frie fedtsyrer. Hvor effektiv hydrogeneringen er, afhænger af foderrationens sammensætning, hvor en mere strukturrig og proteinrig foderration vil medføre en højere hydrogeneringsproces (Børsting *et al.*, 2003). Umættede fedtsyrer kan have en toksisk effekt på mikroorganismerne, herunder de fibrolytiske bakterier og protozoerne, hvilket kan påvirke eddike-/propionsyre forholdet i vommen, reducere dannelsen af metan og medføre en nedsat fordøjelse af cellevægskulhydrater (Børsting *et al.*, 2003; Haque *et al.*, (2014). I et forsøg fandt man ud af, at hvis man fodrer lam en med stor tildeling af fedt i form af fløde, kunne man undertrykke dannelsen af metan næsten totalt. Derudover viste forsøget også, at efter diæten var lagt om til en fiberrig diæt, blev metanproduktionen normal igen. Man kan ud fra dette konkludere, at fedt kan reducere produktionen af metan, men at effekten ikke er langvarig (Haque *et al.*, 2014).

2.4 Hvad er en effektiv ko?

En effektiv ko kan defineres ved at have en høj mælkeydelse og en høj fodereffektivitet, hvor den samtidig skal udlede så lidt metan som muligt. Men hvis vi kan optimere yderligere på produktiviteten per dyr, og samtidig opretholde den produktion, som vi har nu konstant, bare med færre dyr, vil vi kunne mindske den totale metan emission. Man vil derved få en øget udskillelse af metan per dyr, men en lavere total metan emission per enhed af produkt (mælk, ost og kød) der produceres (Aaes *et al.*, 2003).

Metan emissionen kan også ses som et vigtigt økonomisk aspekt for landmanden, da metan udslippet også kan udtrykkes som et energitab hos koen, hvilket betyder, at den skal indtage mere foder for at få nok energi, og dette vil være en udgift for landmanden, da der vil komme en større udgift på foder (Puniya *et al.*, 2015).

2.5 Delkonklusion

Der er vigtigt at vide, hvordan metan dannes i vommen for at vide, hvordan man kan reducere det. Forskellige mikroorganismer i vommen lever i tæt samarbejde og er eksperter i at nedbryde forskellige substrater. Man kan påvirke mikroorganismer til at producere mindre metan ved bl.a. en stor tildeling af fedt eller kraftfoder, men disse metoder kan gå ud over dyrets sundhed og er ikke

langvarig. Yderligere medfører metandannelse et betydeligt energitab hos koen, hvilket også er en faktor, som gør, at man ønsker at begrænse eller eliminere metan produktionen.

3. Tang og dets bioaktive stoffer

Der findes globalt omkring 10.000 forskellige tangarter (Brodie, 2010), som man opdeler i tre overordnede hovedgrupper: Grønalger, rødalger og brunalger. Tang indeholder mange forskellige bioaktive stoffer, som bl.a. er essentielle for planternes overlevelse, da de kan beskytte mod herbivore, mikroorganismer mm. (Bodas *et al.*, 2012). Vi vil i dette afsnit fokusere på de specifikke bioaktive stoffer bromoform, bromochlorometan, phlorotaninner samt terpenener, som er foreslået (jf. Tabel 1) at være involveret i tang planters effekt på metanproduktionen. Derefter vil vi give et overblik over, hvilke tangarter, der har vist sig at være særlig effektive til at reducere metan, samt om de kan dyrkes. Afslutningsvis vil vi beskrive, hvilke effekter reduktion af metan kan have på koens produktivitet, herunder mælke- og kødproduktion og evt. forhold omkring produktkvalitet til humant konsum.

3.1 Tang versus terrestriske planter

Tang adskiller sig fra terrestriske planter på en række punkter og indeholder blandt andet ikke den tungt fordøjelige fiberfraktion, lignin, da vandplanter ikke behøver at bære sig selv på samme måde som terrestriske planter har behov for (Barbot *et al.*, 2016). Derudover indeholder de heller ikke almindelig stivelse, men i stedet andre komplekse kulhydrater som alginat, laminarin og fucoidaner, som man ikke kan finde i terrestriske planter (Makkar *et al.*, 2016). En anden forskel er, at tangplanter lever i et anaerobt miljø under vandet, og dette anderledes miljø har ført til udvikling af særlige forsvarsmekanismer (Bodas *et al.*, 2012), inklusive særlige biokemiske komponenter, som er helt særegne i forhold til, hvad man finder i terrestriske planter.

Når man skal dyrke tang, skal man både tage højde for lys, temperatur, næringsalte (phosphor og Nitrat), saltholdighed og eksponeringsgrad (Wegeberg & Felby, 2010). Grundet tidsmangel samt at dette felt er ude fra vores fagområde, har valgt udelukkende at definere om, hvorvidt de forskellige tangarter kan dyrkes ud fra temperatur (klimazoner).

3.2 Grønalger

Der findes 1000 forskellige arter af grønalger (Chlorophyceae), som er karakteriseret ved deres grønne farve, som skyldes chlorophyll i deres chloroplaster (Molina-Alcaide *et al.*, 2017). Grønalger omfatter blandt andet arterne *Ulva*, *Oedogonium*, *Cladophora patentiramea*, *Caulerpa*, *Chaetomorpha* og *U.ohnoi*, og disse kan findes i tropiske områder, herunder Australien (jf. Tabel 1). Dette betyder, at vi ikke ville kunne dyrke disse tangarter i Danmark, da vi har nogle andre klimatiske betingelser (Bilag 1). Det har vist sig, at nogle grønalgearter kan reducere metanproduktionen, men der mangler viden om, hvilke bioaktive stoffer, der specifikt har denne effekt (jf. Tabel 1).

3.3 Brunalger

Der findes 2000 arter af brunalger (Ochrophyta), som varierer i deres farve fra olivengrøn til brun (Molina-Alcaide *et al.*, 2017). Brunalger er det tang, som er lettest at høste, hvilket skyldes, at det er denne tangart, som bliver størst (35-45 meter) (Makkar *et al.*, 2016). *Dictyota*, *Cystoseira* og *Sargassum* findes i tropiske områder i Australien og er derfor ikke mulige at dyrke i Danmark. *Ascophyllum nodosum* (*A.nodosum*) og *Laminaria digitata* er fundet i tempererede klimaområder i bl.a. Canada og det nordlige Atlanterhav. Disse brunalger har vist sig at kunne reducere metan (jf. Tabel 1) og indeholder bl.a. phlorotanniner, som den eneste af de 3 hovedgrupper af tang (Wang *et al.*, 2008; Belanche *et al.*, 2015). Derfor kunne man forestille sig, at disse ville være mulige at dyrke i Danmark eller omegn. Derudover kan de også indeholde terpener, alginat, fucoidaner, laminarin mm (Machado *et al.*, 2014; Makkar *et al.*, 2016).

3.4 Rødalger

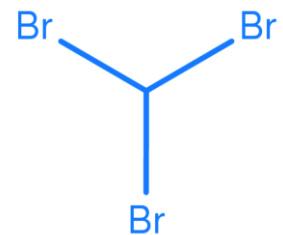
Der findes 7000 arter af rødalger (Rhodophyceae), og de er kendetegnet ved deres rødlige farve, som skyldes biloprotein pigmenter, r-phycoerythrin og r-phycoocyanin, som findes i kloroplaster hos rødalger (Molina-Alcaide *et al.*, 2017). De kan vokse sig op til en størrelse på 30-40 cm (Makkar *et al.*, 2016).

I tabel 1 har vi bl.a. rødalgerne: *A. taxiformis*, *Asparagopsis armata* og *Hypnea*, som alle er fundet i tropiske eller subtropiske klima i Australien, hvilket gør, at disse ikke er mulige at dyrke i Danmark. Derimod er *Gracilaria vermiculophylla* og *Gigartina sp.* fundet ved tempereret områder ved nordkysten af Portugal. Disse arter vil muligvis kunne dyrkes i Danmark, på trods af en lidt

lavere gennemsnitstemperatur. Dog kan lavere temperaturer hæmme tangens vækst. (Wegeberg & Felby, 2010). Rødalger og herunder *A. taxiformis* indeholder bl.a. det bioaktive stof bromoform (BF) (Li *et al.*, 2016).

3.5 Bromoform og bromochlorometan

BF, dibromchlorometan(diBCM) og bromochlorometan(BCM) er typer af bioaktive metabolitter, som indeholder halider fra den kemiske hovedgruppe 7, og de dannes naturligt og findes i biomasse fra visse rødalger, og begge er potente anti-metanogene stoffer (Masterton *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016).



Figur 3.1: Bromoforms struktur (Reaxys, 2018)

Bromoform (BF; CHBr_3) er en sekundær metabolit, som generelt findes naturlig i biomassen hos rødalger, heriblandt tangarterne *A. taxiformis* og *A. armata*, hvor den fungerer som en antibakteriel forsvarsmekanisme (Paul *et al.*, 2006). BF minder kemisk set om bromochlorometan (BCM; CH_2BrCl), som tidligere er blevet brugt som et kemisk additiv til at reducere metandannelsen. (Kinley *et al.*, 2016a; Li *et al.*, 2016). BF og BCM er begge potente metan inhibitorer. Disse reagerer med vitamin B_{12} og mindsker metandannelsen ved at inhibere det sidste skridt i den enzymatiske vej af metanogenese, som kan ses i figur 2.1 i afsnit ”2.1.4 Metanogenesen”. Metanogenerne er afhængige af syntesen af et enzym, methyl coenzym-M reductase, som anvender co-enzymet CoM som cofaktor. CoM er en cofaktor, som findes i alle metanogener, men ikke i andre bakterier eller arkæer. CoM er involveret i det sidste trin af metanogenesen, hvor en methyl gruppe båret af CoM bliver reduceret til metan af methyl-CoM reductase (Liu *et al.*, 2011).

BF og BCM inhiberer metandannelsen ved at gå ind og blokerer for aktiviteten af methyl CoM reductase (Machado, 2015). BCM inhiberer altså den enzymatiske vej frem for at have en egentlig toksisk effekt på metanogenerne (Tomkins *et al.*, 2009). Det blev eftervist i australske fodringsforsøg med stude, hvor tildeling to gange dagligt med 0,30 g BCM/100 kg levende vægt gav en signifikant reduktion af metan på 93,7% efter 28 dages behandling. Dog fandt man prøver fra muskler og fedt, som indeholdt BCM, hvilket betyder, at det kan ophobe sig i kødet ikke langt fra grænseværdier for fødevarer til humant konsum. Ovenstående betyder, at det ikke er et stof, man ønsker bruge i fremtiden i landbrugssektoren (Tomkins *et al.*, 2009). Desuden blev BCM i 2004 gjort ulovlig af den australske regering under lovgivningen *Ozone Protection and Synthetic*

Greenhouse Gas Management Act 1989, da det har en ozonnedbrydende effekt, som skyldes indholdet af halogenet chlor (Tomkins *et al.*, 2009).

3.6 Phlorotanniner

Tanniner er et naturligt forekommende polyphenolisk element, som findes både i terrestriske planter og i tangarter. Phlorotanniner (PT) derimod forekommer kun i brunalger og er strukturelt mindre komplekse end terrestriske planters tanniner (Wang *et al.*, 2008). De to brune tangarter *A.nodosum* (14%) og *Fucus* (12%) er de to arter, som er blevet undersøgt med højest indhold af PT, men indholdet kan variere med både årstid og saltindholdet i vandet (Holdt & Kraan, 2011). PT spiller muligvis en rolle i forhold til at være en kemisk forsvarsmekanisme imod planteædere og mikroorganismer (Koivikko *et al.*, 2005).

I et in vitro forsøg med vomvæske viste Vissers *et al.*, (2017), at metanproduktionen kunne reduceres med 40 % af PT ekstraheret fra *Laminara digitata*, ved en dosis på 40 g/kg⁻¹ tanninfri græsensilage. Dette var uden at hæmme OM fermentering, som var udtrykt ved total gasproduktion og total VFA produktion. Dog ændrede fedtsyreprofilen sig, så andelen af produceret eddikesyre blev reduceret og andelen af propionsyre forøget.

I et andet forsøg med Wang *et al.*, (2008), viste PT fra *A.nodosum* tilsat i samme dosis (40 g/kg⁻¹) sammen med en grovfoderblanding (bygensilage, alfalfa hø, græshø) også at kunne hæmme metan. Dog var dette ved at hæmme fermenteringen, også indikeret ved total gasproduktion og VFA produktion. Dette er modstridende med, hvad de skriver i artiklen med Visser *et al.*,(2017), hvor de henviser til, at i forsøget med Wang *et al.*, (2008), blev fermenteringen, ligesom hos dem selv, ikke reduceret, men forbedret ved en dosis på 40 g/kg⁻¹. Denne konklusion fra Visser *et al.*, (2017) er derfor ikke rigtig. I begge forsøg brugte de en grovfoder baseret diæt, men PT blev ekstraheret fra forskellige tangarter, henholdsvis *A. nodosum* og *Laminara digitata*, hvilket måske kunne medføre denne forskel. Derudover kan det evt. også skyldes forskellige oprensningmetoder af PT.

Udover dette, observerede man også i forsøget med Wang *et al.*, (2008), at effekten var større, når fermenteringen foregik på basis af grovfoder (bygensilage, alfalfa hø, græshø) i forhold til kraftfoder (bygkorn), hvilket indikerer, at de cellulolytiske bakterier er mere sensitive over for PT end de amolytiske er (Wang *et al.*, 2008).

3.7 Isoprenioler/ Terpenoler/ Terpenoiler.

Terpenoler er en del af planteressentielle olier (Gupta *et al.*, 2015), og de har vist sig at kunne have mange forskellige helbredsmæssige fordele, herunder antimikrobiel aktivitet (Gupta *et al.*, 2015; Soltan *et al.*, 2018). Der er bl.a. fundet isoprenioler (terpenoler) i brunalgerne *Dictyota* og *Cystoseria* (Machado *et al.*, 2014; Dubois *et al.*, 2013). Der er endnu ikke lavet nogle forsøg med terpenoler ekstraheret fra tang, og vi vil derfor kigge på, hvordan terpenoler fra terrestriske planter har vist sig at påvirke metanproduktionen.

I et *in vivo* forsøg med får, viste Soltan *et al.*, (2018), at kunne reducere metanproduktionen 35,9% med 400 mg af et kommercielt produkt af forskellige essentielle olier: Cinnamaldehyd, eugenol, carvacrol, and capsicum oleoresin. I denne blanding var eugenol og carvacrol terpenoler (Benchaar & Greathead, 2011). Reduktionen af metan påvirkede hverken foderindtag eller fordøjeligheden i vommen. Derimod forøgede olierne mængden af produceret VFA i vomvæske opsamlet fra de behandlede får og ændrede samtidig eddikesyre: propionsyre forholdet, så andelen af propionsyre blev større i forhold til eddikesyre. Man kan dog ikke være sikker på, at dette resultat kun afspejler en effekt fra terpenolerne. De andre essentielle olier kunne også individuelt eller i sammenspil give denne effekt. Men det kunne tyde på, at noget i denne blanding af essentielle olier kunne have en direkte effekt på metanogenerne, da fermenteringen i vommen ikke ser ud til at hæmmes. I følgende *in vitro* forsøg, som gik ud på at undersøge forskellige essentielle olier og deres påvirkning på den metanogene aktivitet, viste to typer af terpenoler samme mønster, da de kunne hæmme metanproduktionen uden nogen markant effekt på VFA produktionen.

I et 6 timers *in vitro* forsøg med vomvæske fra køer viste Chaves *et al.*, (2008), at monoterpenet p-chymene i en dosis på 20 mg L⁻¹ opløseligt stivelse kunne reducere metanproduktionen ved forgæring af 20 mg opløseligt stivelse med 30 %. Der var ingen effekt på den totale VFA produktion under forgæring eller andelen af de dannede forskellige kortkædede fedtsyrer.

Chaves *et al.*, (2008) viste i samme forsøg også, at olier fra kanelblade, som indeholdt 76 % eugenol, som er et phenolisk monoterpen, kunne reducere metanproduktionen 71 % ved en dosis på 250 mg L⁻¹. Her blev den totale VFA produktion dog reduceret 16 %, men man kunne forestille sig at ved en lidt lavere dosering, vil man kunne reducere metanproduktionen uden at reducere den totale VFA produktion.

Det kunne derfor tyde på, at disse terpenener har en direkte effekt på metanogenerne i vommen, og det ville derfor være interessant at ekstrahere terpenener fra brunalgerne *Dictyota* og *Cystoseria* og *Anodossum* for at se, om nogle af disse kunne have lignende effekt på metanproduktionen.

3.8 Tungmetaller

Tang kan også indeholde forskellige mineraler og tungmetaller mm., som de kan optage fra omgivelserne. Nogle af disse stoffer inkluderer bl.a. arsen, zink, mangan, kviksølv, bly, jod og brom (Holdt & Kraan, 2011; Machado *et al.*, 2016). Disse ønsker man ikke i for høje koncentrationer i humane fødevarer, og det er derfor vigtigt at være opmærksom på hvilke tungmetaller og mineraler der findes i de områder, man høster sin tang. Der er derfor også lavet nogle grænseværdier i EU for hvor store koncentrationer må være i den tang man anvender til foder (Makkar *et al.*, 2016).

over in vitro og in vivo forsøg lavet verden over

	Type tang	Område	Bioaktive stoffer	Metode (alle forsøg er med vomsaft fra køer eller får medmindre andet er angivet)	Resultat og effekt af bioaktive stoffer	% Metan reduceret	Årstal	Kilde
(alien)								
	Rhodophyta (rød)	Australien	Organiske syrer, tanniner, phlorotanniner, polyphenoler, aminoglykaner	In vitro forsøg i 72 timer med dosis på 2 % OM substrat sammen med 1 g rhodes græs. Kontrol gruppe = 1 g rhodes græs. Vomvæske var opsamlet fra stude.	Det øger proption-andelen og mindsker eddikesyreandelen. Total produktion af VFA blev reduceret 22 %, dog ikke signifikant. Der var derudover en signifikant reduktion af TGP på 29 % i forhold til kontrollen.	96 %	2016	(Kinley et al)
	Rhodophyta (rød)	Nordlige Australien	Brominated og chlorinated haloformer	In vitro forsøg 72 timer sammen 0,2 g OM tang med 1 g flinders grass. Kontrolgruppe indeholdt 1 g OM flinders grass + 0,2 afskallet bomuldsfrø (DCS). Vomsaften var opsamlet fra stude.	61,8 % mindre TGP i forhold til kontrol efter 72 timer. Mindre VFA produktion, hvilket skyldes inhibering af eddikesyre. Der var en mindre produktion af eddikesyre i forhold til propionsyre. <i>A.taxiformis</i> har en lignede kemisk form med DCS på nær dets høje indhold af zink og lavere indhold af flerumættede fedtsyrer (PUFA), hvilket kunne tyde på at der kunne være en smule evidens for at zink kan have indflydelse på redueringen af metan eller at zink har en synergieffekt sammen med nogle af de sekundære metabolitter i <i>A.taxiformis</i> som hæmmer metan. <i>A. taxiformis</i> inhiberede også protozoer.	98,90 %	2014	(Machado et al)
	Rhodophyta (rød)	Australien	Bromoform (CHBr ₃)	In vitro 72 timer med <i>A.taxiformis</i> i doser fra 0,5 % - 10 % OM af 1 g rhodes græs i høj kvalitet (HK) kontrolgruppe = 1 g rhodes græs HK. Vomvæsken var opsamlet fra stude.	Dosis lig 1 % eller mindre var der ingen effekt. Ved dosis på 2% OM medførte reduceret TGP på 30 % og eliminerede metan produktionen. Reduktionen af metan afhænger både af dosis og tid. Efter 48 timer var der ingen effekt på dosis 0,5 % og 1 % Det vil sige effekten faldt med tiden. Der var ingen negativ effekt på in vitro substrat fordøjelighed, når der blev tilsat 5 % eller mindre af tangen. En signifikant reduktion af in vitro fordøjeligheden skete, når der var 10 % eller mere af tangen tilsat. Produktionen af VFA blev ikke reduceret, når doserne var under 2 % og eddikesyre produktionen blev reduceret, samtidig med at propionat produktionen steg i takt med stigende dosering af tangen. Smørsyre steg også, men i en mindre grad.	100 %	2016	(Kinley et al)
	Rhodophyta (rød)	Australien	Bromoform, dibromochloromethane, bromochloroacetic acid og dibromoacetic acid	In vitro forsøg på 72 timer hvor <i>A.taxiformis</i> blev testet med 10 forskellige doser fra 0 -16,7 % OM sammen med rhodes græs hø som basalsubstrat, så der i alt blev inkuberet 1g OM. Vomvæsken var indsamlet fra Braham stude	Dosis på 2 % OM reducerede metan 99 % og total VFA produktionen 25 %. Ved dosis = 0,5 eller højere blev total VFA produktionen signifikant reduceret. In vitro fordøjeligheden blev større op til dosis på 5 % og fordøjeligheden faldt signifikant ved dosis = 10 % eller mere. Ved dosis på 2 % OM var molar massen af propionsyre, smørsyre og valerate og isovalerate stigende og faldende for molar massen af eddikesyre og isobutyrat. Derudover viste produktionen af metan signifikant reduceret med 84,7 % ved en dosis på 1 % OM <i>A.taxiformis</i> .	99 %	2015	(Machado et al)

					alger med mangel bromerede metaboliter. Dette forsøg viste at <i>A.armata</i> var aktive imod <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> og 2 marine vibrio spp.			
	Rhodophyta (rød)	Nordlige Australien		In vitro forsøg 72 timer sammen 0,2 g OM tang med 1 g flinders grass. Kontrolgruppe indeholdt 1 g OM flinders grass + 0,2 afskallet DCS. Vomsaften var opsamlet fra stude.	Inhibere TGP 19 % i forhold til DCS efter 72 timer. Øgede produktionen af total VFA 2,3 %	42 %	2014	(Machado et al.)
ada								
	Rhodophyta (rød)	Nordkysten af Portugal		In vitro 24 timer hvor <i>Gracilaria vermiculophylla</i> var tilsat ved en dosis på 0 % (kontrol) eller en dosis på 25 % af inkuberet DM sammen med enten eng hø eller majs ensilage, så der i alt var 250 mg DM. Vovæsken var indsamlet fra Holstein køer der ikke var drægtige.	Reducerede metanproduktion uafhængigt af tilsat substrat. Med majs ensilage blev metan reduceret 38,8 Gas produktionen blev reduceret 17 % og total VFA produktionen blev reduceret 5,3 %	38,20 %	2016	(Maia et al.)
	Rhodophyta (rød)	Nordkysten af Portugal		In vitro 24 timer hvor <i>Gigartina Sp.</i> var tilsat ved en dosis på 0 % (kontrol) eller en dosis på 25 % af inkuberet DM sammen med enten eng hø eller majs ensilage, så der i alt var 250 mg DM. Vovæsken var indsamlet fra Holstein køer der ikke var drægtige.	Reducerede metanproduktion, men kun når den inkuberes med majsensilage. Gas produktionen blev reduceret med 32 % og den totale VFA produktion blev reduceret 5 %	35,80 %	2016	(Maia et al.)
alien)								
	Chlorophyceae (grøn)	Nordlige Australien		In vitro forsøg 72 timer sammen 0,2 g OM tang med 1 g flinders grass. Kontrolgruppe indeholdt 1 g OM flinders grass + 0,2 afskallet DCS. Vomsaften var opsamlet fra stude.	Reducerede TGP med 20,3 % efter 72 timer. Den total VFA produktion blev forøget 16 %	30,30 %	2014	(Machado et al.)
	Chlorophyceae (grøn)	Australien		In vitro 72 timer, hvor <i>Oedogonium</i> blev tilsat i 7 doser fra 0 % til 100 % OM sammen med rhodes græs hø, så der samlet var 1 g OM. Vovæsken var indsamlet fra Braham stude	Med dosis på 50 % eller mere blev TGP signifikant reduceret med mindst 20%. Dosis 50 % eller mere reducerede signifikant metan produktionen. Når dosis = 75 % eller mere blev metan produktionen reduceret 50 % eller mere i forhold til kontrollen. Med en dosis på 100% blev metan produktionen reduceret med 61,6%. Fordøjelighed og total VFA produktion faldt med stigenden dosering med 11,3 % for in vitro fordøjelighed og 17,4 % for VFA produktion ved en dosis = 25 % i forhold til kontrolgruppen. Men først ved doseringer på 50 % eller mere var reduktionen af fordøjelighed og produktionen af VFA faldet signifikant. Doseringer på 25 % eller over forøgede signifikant pH værdien i forhold til kontrol. 100 % dosis af tangarten gave en reduktion på 61 %	50 %	2015	(Machado et al.)
	Chlorophyceae (grøn)	Australien		In vitro forsøg 72 timer sammen 0,2 g OM tang med 1 g flinders grass. Kontrolgruppe indeholdt 1 g OM flinders græs+ 0,2 afskallet DCS. Vomsaften var opsamlet fra stude.	Inhiberede TGP 68,9 % i forhold til DCS. Den totale VFA produktion blev reduceret 12 % i forhold til DCS	66 %	2014	(Machado et al.)
	Chlorophyceae (grøn)	Nordlige Australien		In vitro forsøg 72 timer sammen 0,2 g OM tang med 1 g flinders grass. Kontrolgruppe indeholdt 1 g OM flinders græs + 0,2 afskallet DCS. Vomsaften var opsamlet fra	Inhibere TGP 21,9 % i forhold til DCS efter 72 timer. Total VFA blev øget 2,8 %	50,20 %	2014	(Machado et al.)

	Chlorophyceae (grøn)	Nordlige Australien		In vitro forsøg 72 timer sammen 0,2 g OM tang med 1 g flinders grass. Kontrolgruppe indeholdt 1 g OM flinders græs + 0,2 afskallet DCS. Vomsaften var opsamlet fra stude.	Inhibere TGP 21 % i forhold til DCS efter 72 timer	39 %	2014	(Machado
	Chlorophyceae (grøn)	Nordlige Australien		In vitro forsøg 72 timer sammen 0,2 g OM af tang med 1 g flinders græs Kontrolgruppe indeholdt 1 g OM flinders grass + 0,2 afskallet DCS. Vomsaften var opsamlet fra stude.	Inhibere TGP 29,8 % i forhold til DCS efter 72 timer og reducerede total VFA produktion 6%	45 %	2014	(Machado
alien)								
	Ochrophyta (brun)	Australien	Isoprenoïder(terpenes)	In vitro forsøg 72 timer sammen 0,2 g OM tang med 1 g flinders græs. Kontrolgruppe indeholdt 1 g OM flinders græs + 0,2 afskallet DCS. Vomsaften var opsamlet fra stude.	Inhibere TGP 53, 2 % (Effekt endnu mere signifikant efter 24 timer, hvor den var på 76,7%) og metan 92,2 % efter 72 timer i forhold til DCS. Mindre VFA produktion og mindre eddikesyre i forhold til propionsyre.	92,20 %	2014	(Machado
	Ochrophyta (brun)	Nordlige Australien		In vitro forsøg 72 timer sammen 0,2 g OM tang med 1 g flinders græs. Kontrolgruppe indeholdt 1 g OM flinders græs + 0,2 afskallet DCS. Vomsaften var opsamlet fra stude.	Inhibere TGP 23,7 % i forhold til DCS efter 72 timer	45 %	2014	(Machado
	Ochrophyta (brun)	Australien	Phlorotanniner	In vitro 48 timer (exp 1), 72 timer (exp 2) ved doserne: 0, 20, 40, 80, 160 mg tang var tilføjet til 1 g substrate OM. Rhodes græs var brugt som basalfoder. Kontrolgruppen var samme basalfoder (kun rhodes græs) uden tilføjet makroalge. Vomsaften kom fra stude. Det var ikke klart præcist hvilken dosis respons der gav en denne reduktion i metan, og det skyldes at alle prøverne i dette eksperiment ikke blev indsamlet succesfuldt fra alle inkubationer. Dog var det generelt sådan at jo højere dosis jo bedre effekt på reduktion af metan.	Det reducerede in vitro totalgasproduktion med en dosisresponsvirkning samt reducerede metanproduktionen signifikant.	80 %	2013	(Dubois <i>et</i>
	Ochrophyta (brun)	Nordlige Australien		In vitro forsøg 72 timer sammen 0,2 g OM tang med 1 g flinders græs. Kontrolgruppe indeholdt 1 g OM flinders græs + 0,2 afskallet DCS. Vomsaften var opsamlet fra stude.	Inhibere TGP 10,4 % i forhold til DCS efter 72 timer	34 %	2014	(Machado

	Ochrophyta (brun)	Canada - den atlatiske kystlinje ved Nova scotia	Phlorotanniner	In vitro 24 timer (exp 2) eller 48 timer (exp 1) med bygkorn (300 mg) eller et mix af grovfoder(500 mg) sammen med rå tang ekstrakter i forskellige doser. Vomsaften kom fra jersey stude. Efter 0, 12, 24 og 48 timer blev 6 hætteglas / PT doseringsniveau (3 med polyethylene glycol (PEG) og 3 uden) fjernet, og delprøver fra hver blev undersøgt for ammoniak og flygtige fedtsyrer (VFA) samt aNDF	PT alene reducerede fordøjeligheden af aNDF i både grovfoder og kraftfoder diæten. Reduktion af fordøjeligheden for aNDF var større med grovfoder i forhold til faldet i fordøjelighed af stivelse. Gasproduktionen efter 48 timer blev reduceret ved en mindre koncentration med grovfoder end med kraftfoder. Der skal mindre koncentration til for at påvirke grovfoder. Total VFA blev reduceret over tid ved tilsætning af PT. Metan og total gasproduktion var også faldet signifikant efter 24 timer. Vom fermentering og protein fordøjelighed var også faldende ved øget koncentration af PT. Der var ikke et stort skift i eddikesyre: propionsyre forholdet. Phlorotanninkoncentrationer helt op til 500 microgram/ ml blev TGP reduceret lineært. Koncentrationen af ammoniak blev også reduceret		2007	(Wang et al)
	Ochrophyta (brun)	Aberystwyth, UK		2 in vitro forsøg. Første in vitro forsøg varede 96 timer med vomsaft hentet fra 4 Holstein–Friesian køer. Et forsøg hvor der blev tilsat 500 mg DM af en basal diæt mix, som bestod af alfalfa (300 g/ kg ⁻¹), græshø (200 g/ kg ⁻¹), byg(300g/ kg ⁻¹), majs(120 g/ kg ⁻¹), sojabønne mel(77 g/ kg ⁻¹) og mineral. Vitamin præ mix (3 g/ kg ⁻¹). <i>A.nodosum</i> blev tilsat som additiv i doserne 0 (kontrol), 0.5, 1 og 2 g/L ⁻¹ . Det andet forsøg blev der tilsat forskellige bakterier i vomvæsken, hvor indholdet af protozoer blev målt før og efter forsøget.	Det første forsøg viste at kunne reducere GP 11% og metanogenesisen 15% per mg fermenteret OM. Forsøg 2 viste at protozo aktiviteten blev reduceret ved en minimums dosis på 1 g/L ⁻¹ af <i>A.nodosum</i> . Ved en dosis på 2 g / L ⁻¹ , blev protozoer aktiviteten reduceret 23 %.	15 %	2015	(Belanche et al)
	Ochrophyta (brun)	Portugal		In vitro 24 timer med <i>Laminaria Ochroleuca</i> tilsat ved en dosis på 0 % (kontrol) eller en dosis på 25 % af inkuberet DM sammen med enten eng hø eller majs ensilage, så der i alt var 250 mg DM. Vomvæsken var indsamlet fra 2 holstein køer der ikke var drægtige.	Med majsensilage forøgede denne tangart metan produktionen. Sammen med enghø var der ingen ændring af metan produktionen. Den totale VFA produktion blev reduceret 10 %, og gas produktionen ændrede sig ikke med majsensilage som basalsubstrat.	øgede 14 %	2016	(Maia et al)
	Ochrophyta (brun)	Aberystwyth, UK	Phlorotanniner	In vitro forsøg, hvor vomsaft var hentet fra 4 Holstein–Friesian køer. Et forsøg hvor der blev tilsat 500 mg DM af en basal diæt mix, som bestod af alfalfa (300 g/kg ⁻¹), græshø (200 g/kg ⁻¹), byg (300g/ kg ⁻¹), majs (120 g/kg ⁻¹), sojabønne mel (77 g/kg ⁻¹) og mineral. Vitamin præ mix (3 g/ kg ⁻¹). <i>A.nodosum</i> blev tilsat som additiv i doserne 0 (Kontrol), 0.5, 1 og 2 g/L ⁻¹ . Det andet forsøg blev der tilsat forskellige bakterier i vomvæsken, hvor indholdet af protozoer blev målt før og efter forsøget.	Har ikke nogen antimikrobiel virkning i vommen, får pH til at falde og koncentrationen af forgenende VFA til at falde. Derudover påvirkede den ikke protozoernes aktivitet	5,50 %	2015	(Belanche et al)
	Ochrophyta (brun)	Nordlige breddergrader		In vitro-gasproduktionsteknikken med sukkerroemasse (SBP) eller majs silage (MS) som basalfoder. SBP og MS og BA blev blandet i et forhold på 4: 1 eller 5: 1. Forsøget varede 48 timer	Reduktion af metan på 32 % når <i>EP900</i> var inkluderet med majsensilage. Reduktion af TGP med 18 % når <i>EP900</i> var inkuberet med SBP og 18 % når den var inkuberet med MS.	32 %	2017	(Satessa et al)

Oedogonium		Australien		In vitro 72 timer, hvor vomsaft var indsamlet fra nogle stude. Der var brugt rhodes græs som basalfoder. Derudover blev kombinationerne af <i>A.taxiformis</i> (0 % eller 2 %) og <i>Oedogonium</i> [(0%, Lav (25 % OM) og Høj (50 % OM)] og udgjorde dermed 6 forskellige behandlinger. Rhodes græs udgjorde den resterende % OM der kræves for at opnå 1g OM inkuberet.	2 % <i>A.taxiformis</i> og 25 % eller 50 % af <i>Oedogonium</i> var TGP reduceret 42 % og 59 % i forhold til kontrol. Med 2% dosis af <i>A.taxiformis</i> og 25% eller 50 % <i>Oedogonium</i> blev den totale VFA produktion reduceret henholdsvis 19,6 % og 40 % i forhold til kontrollen. Ingen signifikant interaktion/vekselvirkning mellem dosis af <i>Oedogonium</i> og tilsætning af <i>A.taxiformis</i> i forhold til fordøjelighed eller VFA produktion. Tilsætningen af 2 % <i>A.taxiformis</i> individuelt eller i kombination med <i>Oedogonium</i> reducerede produktionen af metan signifikant med over 99 % uafhængigt af <i>Oedogonium</i>	99 %	2015	(Machado & ...)
Breddegrader								
Chondrus ochraceus		Canada - Prince Edward Island		In vitro med kontinuerlig kultur fermentation, hvor den totale mix af foderration blev tilført to gange dagligt i et interval på 12 timer. Vomsaften blev hentet fra fem lakterende Holstein køer. Fermenteringen varede 5 dage. Der blev undersøgt hvad der skete, når der blev givet <i>Chondrus crispus</i> (IM) og <i>Furcellaria</i> (FF) hver for sig og når mixet sammen med <i>Laminaria longicruris</i> til en blanding kaldet <i>shoreweed</i> (SHW). Der er en lige stor andel af de 3 forskellige tangarter i <i>shoreweed</i> . Med med 0,28 g d ⁻¹ blev metan reduceret med 16 %	Der var ingen forskel på produktionen af metan, når IM og FF var givet individuelt. pH var den samme for alle behandlinger. Der var ingen signifikant forskel på produktionen af VFA i forhold til kontrolgruppen. Der var ingen effekt på fordøjeligheden eller passage hastighed for hverken FF, IM eller SHW eller imellem disse. Konklusion: Der er ingen negativ effekt ved at fodre med North Atlantic SHW	16 %	2015	(Kinley & ...)
Udvalgte kaldet		Nordlige breddegrader		In vitro-gasproduktionsteknikken med SBP eller MS som basalfoder. SBP eller MS og OFS blev blandet i et forhold på 4: 1 eller 5: 1. Forsøget varede 48 timer	Viste ikke så stor reduktion af metan eller TGP som <i>EP900</i> gjorde		2017	(Satessa et al.)
	Type tang	Område	Bioaktive stoffer	Metode (alle forsøg er med vomsaft fra køer eller får medmindre andet er angivet)	Resultat og effekt af bioaktivt stof.	% metan reduceret	Årstal	Kilde
	Rhodophyta (rød)	Australien	Bromoform og dibromochloromethane	In vivo forsøg med får. Fårene fik tilfældigt tildelt 1 af 5 behandlinger, hvor der er 5 får per <i>A.taxiformis</i> inklusion og 4 får fodres med kontrol diæt (n = 29). Forsøglængden er 72 dage. Metan produktionen blev målt i et respirationskammer hver 21 dag. Basalfoderet bestod af en kommerciel pelleteret ration (16 % lupinfrø, 8 % havrekorn, 8 % bygkorn, 8 % hvedekorn, 17 % havreskrog, 40 % kornstrå, 1,4 % calciumhydroxid, 1 % CSIRO-pellet- blanding, 0,3 % salt og 0,3 % gips). Der blev også indsamlet vomsaft, vævsprøver og blodprøver fra hvert dyr 3 timer efter fodring	Fårene der blev fodret med 2 % eller 3 % <i>A.taxiformis</i> kunne ikke altid optage det hele, men får der fik under 1 % <i>A.taxiformis</i> fik optaget det hele. Inklusioner af <i>A.taxiformis</i> resulterede i et fald i eddikesyre andelen og fald i total VFA-koncentration samt en stigning i propionat koncentration sammenlignet med kontroldyr. Der blev observeret nogle uønskede forandringer i slimhinden i vommen, netmaven og bladmaven: Hydropisk degeneration	50-80 %	2018	(Li et al., 2018)

Forsøgene i tabellen er næsten alle udført som in vitro forsøg, hvor den overordnede fremgangsmåde har været den samme. Man har indsamlet vomvæske for at simulere dyrets fordøjelseskanaal, og herefter tilføjet forskellige substrater, for at undersøge deres gas- og metanproduktion. Dette overordnede princip gjorde sig også gældende for det forsøg, vi observerede på Københavns Universitet (Nielsen *et al.*, 2017), og er uddybet i bilag 2.

Vi har også et enkelt in vivo forsøg med i tabel 1. Dette in vivo forsøg gik ud på, at man testede et tangpræparat af, hvor man bestemte dets effekt på metanproduktion i levende dyr.

Der kan være forskellige fordele og ulemper ved at bruge henholdsvis in vivo og in vitro metoder. In vitro metoden har den fordel, at den er billigere at lave end in vivo metoden, og at det er en god metode at starte ud med som indikator for, om produktet overhovedet virker. Derudover kan man ved denne metode også teste stoffer, som man ikke har fået tilladelse til at teste på levende dyr. En ulempe, der kan være ved in vitro metoden, er, at det er et lukket system uden nogen passage af foder ud af flaskerne, imens der i in vivo forsøg er en kontinuerlig passage ud af vommen. In vitro metoden tager derfor heller ikke hensyn til fodermidlernes varierende passagehastighed igennem vommen, hvilket kan være med til påvirke nogle afvigelser mellem in vivo og in vitro forsøg med samme behandling (Chwaligbog, 2006a).

Når man finder en markant reduktion af metan i et in vitro forsøg, så vil det være et tegn på, at der kan være noget interessant at hente i den tangart, og som kan berettige til, at man forsøger sig med at lave et in vivo forsøg. Selvom man får et godt resultat i forhold til at reducere metan i et in vitro forsøg med vomvæske, garanterer det dog ikke, at de samme behandlinger vil have samme effekter in vivo. Ved in vivo forsøg er fordelene, at man kan få noget mere kvalitativt data, som dog er lidt dyrt at udføre. Dette er dog nødvendigt for at se, om produktet har samme effekt i in vivo som i in vitro. Derudover kan man samtidig undersøge, hvordan produktet kan påvirke dyrets sundhed og produktivitet (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016.).

Resultaterne for vores in vitro forsøg i tabel 1 er svære at sammenligne pga. forskellige doseringer, forskellig kemiske sammensætninger af test substans, basis diæt eller kombination af forskellige

foderstoffer (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016). Metanproduktionen kan også afhænge af, hvilke donordyr der bruges til at opsamle vomvæske, og derudover kan tilpasning af mikroorganismer, når de skal introduceres til systemet, også have en betydning for den endelige metanproduktion (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016).

Som man kan se i tabel 1, har vi resultater fra 29 forskellige forsøg, som er lavet i forskellige laboratorier verden over.

I tabel 1 kan man se, at tangarterne *A. taxiformis* og *Dictyota* er fundet i tropiske og subtropiske områder i Australien. De er nogle af de tangarter, der har vist de bedste resultater i forhold til at reducere metanogenesisen (jf. tabel 1). Her viste rødalgen *A. taxiformis* sig til at være særlig effektiv til reducere metan ved meget lave doseringer. Flere af forsøgene viste, at ved en dosis på 2 % organisk stof (OM) af foderet kunne metanproduktionen reduceres mellem 96 % - 100 % (Kinley *et al* 2016a; Kinley *et al* 2016b; Machado *et al.* 2015). Her blev der i alle forsøg brugt rhodes græs som basal substrat.

I forsøget med Machado *et al.* (2015) var der dog allerede en stor reduktion af metan ved 1 % OM af foderet på 84,7%, hvor der i forsøget med Kinley *et al.*, (2016a) var en minimal effekt på metanproduktionen ved en dosis på 1 % OM af foderet. Dette kan skyldes, at der i forsøget med Kinley *et al.*, (2016a) blev brugt en højere kvalitet af rhodes græs, end der blev brugt i Machado *et al.*, 2016.

Grovfoder af høj kvalitet har et lavere indhold af cellulose, hemicellulose og lignin (NDF) end grovfoder af lav kvalitet. Forsøg har vist at grovfoder af lav kvalitet producere mere metan end det af høj kvalitet (Knapp *er al.*, 2014). Det kunne derfor tyde på, at kvaliteten af foderet kan påvirke fermenterings responsen af *A. taxiformis*.

Udover at denne tangart viste gode resultater i forhold til at reducere metanogenesisen i in vitro forsøg, har den også i et in vivo forsøg med får vist at kunne reducere metanogenesisen op til 80 % ved en dosis på 2 % - 3 % OM (Li *et al.*, 2016). Det var forskelligt, hvor gode fårene var til at optage den dosis af *A. taxiformis*, de fik med foderet. Dette betyder, at det kan variere, hvilken dosis, som var optimal for det individuelle dyr. Derudover har det vist sig, at køer kan producere mere metan per nedbrudt OM sammenlignet med får (Bueno *et al.*, 2015), hvilket også kan være en

forklaring på in vivo og in vitro forsøgets forskellige resultater. In vitro forsøget viste, som tidligere nævnt, et lukket system, uden passage af fodermidler, hvilket ikke gør sig gældende i in vivo forsøget, og dette kan også have haft en betydning for de forskellige resultater.

Som tidligere nævnt i afsnit "3.5 Bromoform og bromochlorometan", viste BF og diBCM, i *A. taxiformis* at kunne påvirke slimhinderne i vommen og ophobe sig i kødet. Derfor er denne tangart ikke relevant at kigge nærmere, bl.a. fordi vokser i Australien, og derfor ikke er mulig at dyrke i Danmark. Derudover indeholder den BF og diBCM, som man ikke ønsker i humant konsum. Det kunne dog være interessant at finde en anden tangart med et bioaktivt stof, der minder om BCM, BF eller diBCM i dens måde at inhibere den enzymatiske vej i metanogenesen.

Brunalgen *Dictyota* viste sig at kunne reducere metanproduktionen med 92,2 %, hvor der var 1 g flinders græs og 0,2 g tang (Machado *et al.*, 2014). Denne blev målt op imod en kontrolgruppe med 1 g flindersgræs og 0,2 g afskallet bomuldsfrø. Tangarten kan producere en bred vifte af sekundære metabolitter, men producerer især store mængder af de bioaktive stoffer isoprenoïder (terpener) (Machado *et al.*, 2014). Det tyder på, at dette bioaktive stof også i høj grad var effektivt til at reducere metan, men kan ikke dyrkes i Danmark, da de vokser naturligt i de tropiske og subtropiske egne i Australien (jf. Tabel 1).

Ud fra tabel 1 har in vitro forsøg med tangarter fra de tropiske og subtropiske egne i Australien generelt vist sig at være de mest effektive tangarter til at reducere metan. Det kunne derfor tyde på, at klimaet kunne have en betydning for, hvor stor en effekt de har på inhibering af metanogenesen, og for hvilke typer af bioaktive stoffer tangarterne indeholder. Ud fra tabel 1 er der kun fundet det bioaktive stof BCM i rødalgerne *A. taxiformis* og *A. armata*, som findes i det tropiske og subtropiske klima i Australien.

De tangarterter, der vokser i tempereret områder, har ikke vist sig at være lige så effektive til at reducere metan, som dem i tropiske og subtropiske områder som ses i tabel 1. De har vist at kunne reducere metan mellem 5,5 % (*Laminaria digitata*) og 38,20 % (*Gracilaria vermiculophylla*).

Tabel 1 viser, at brunalgen *A. nodosum* viste sig at kunne reducere metanproduktionen 15 % per mg fermenteret OM med en dosis på 2 g/L⁻¹ (Belanche *et al.*, 2015). Denne reduktion kan skyldes nogle af de bioaktive stoffer, der blev fundet i denne tangart, som bl.a. kan inkludere phlorotanniner,

alginate, mannitol, laminarin og fucoidan (Wang *et al.*, 2008; Makkar *et al.*, 2016). *A.nodosum* kunne derfor være interessant at kigge nærmere på, da denne vil være mulig at dyrke i tempereret områder, herunder Danmark.

Tabel 1 viser et forsøg på Københavns Universitet af Satessa *et al.*, (2017), hvor 3 ukendte produkter med tang arter fra de nordlige breddegrader blev undersøgt. Disse inkluderer en specifik brunalge (BA) og et blandingsprodukt bestående af forskellige ukendte tangarter fra Oceanfeed™ Swine (OFS). Heraf viste BA det bedste resultat, da den viste sig at kunne reducere metanproduktionen med op til 32 % i kombination med majsensilage (MS), samt TGP blev reduceret med 21 % og 18 % i kombination med sukkerroe pulp (SBP) og MS. Derudover blev tørstof nedbrydningen ikke påvirket. Dette tangprodukt viser derfor godt potentiale, da den både vil kunne dyrkes i Danmark og derudover vil kunne reducere metanproduktionen med næsten $\frac{1}{3}$, hvilket kan være et godt skridt på vejen til at opfylde EU's målsætninger, herunder Danmarks forpligtelser om at reducere udslippet af drivhusgasser med 40% inden 2030 i forhold til 1990 niveauerne (Kristensen & Lund., 2011). Men da in vitro forsøg, som tidligere nævnt, mere bruges som en screening af, hvilke tangarter der har potentiale til at reducere metan og ikke er et direkte resultat af, hvordan disse produkter præcis vil virke inde i vommen på en ko, vil der være brug for at lave nogle in vivo forsøg, hvor produktet kan afprøves.

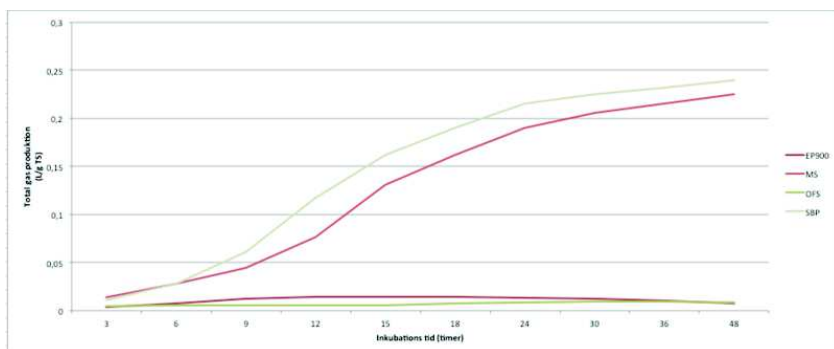
3.10 Resultater over TGP produktion med tempererede algearter (*EP900* og *OFS*)

Vi har fået nogle nyere resultater over samme forsøg, der blev udført af Satessa *et al.*, (2017), da vi fik muligheden til at være med til at observere et opfølgende forsøg. Forsøget undersøgte, hvordan bl.a. brunalgen *EP900* og den kommercielle blanding af tang *OFS* påvirkede TGP og herunder metandannelsen ved fermentering af sukkerroe pulp (SBP) og majsensilage (MS) over 48 timer (Nielsen *et al.*, 2017). For at finde ud af om, der forekommer en reduktion i TGP produktionen under forsøget har vi opstillet en nulhypotese, som er : *Der er ingen forskel i TGP produktionen ved inkubation af EP900 og MS*. Alternativhypotesen siger: *Der er forskel i TGP produktionen ved inkubation af EP900 og MS*. Satessa *et al.*, (2017) fandt med *EP900* en reduktion af TGP på 21 % og 18 % med inddragelse af tangprodukterne i hhv. SBP og MS. Ud fra den data vi har fået fra Københavns Universitet, opstiller vi en T-test mellem *EP900* og MS, og dette giver en p-værdi på 0,0276, hvilket betyder, at nulhypotesen kan afvises på et 5 % signifikansniveau, og alternativ

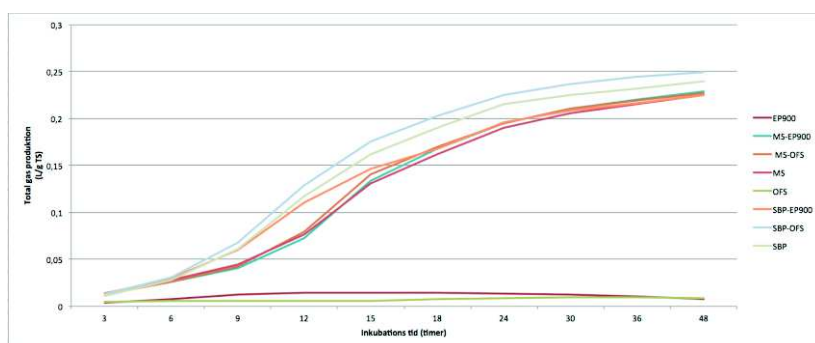
hypotesen må godtages. Herefter lavede vi en T-test mellem MS-EP900 og MS, og dette gav en p-værdi på 0,7997, hvilket betyder, at vi ikke kan afvise vores nulhypotesen. Dette resultat giver ikke samme resultat som det tidligere forsøg med brunalgen *EP900*, der viste en TGP reduktion på 18 % (Satessa *et al.*, 2017). Som ses ud fra figur 3.3, er kurven for SBP-OFS over det rene produkt SBP. Dette betyder altså, at TGP er steget med inklusion af OFS i SBP.

Afslutningsvist kan det konkluderes, at de rene tangarter viser en signifikant reduktion i TGP under forgæring.

Ydermere kan man se, at *EP900* nedsatte TGP produktionen ved inklusion i SBP, mens der ikke var nogen signifikant effekt af tilsætning til MS. I det tidligere forsøg blev det dog påvist, at der var en reduktion i TGP med netop disse kombinationer, hvilket leder op til, at det ville være en god ide at undersøge med flere in vitro forsøg, da der er mulighed for forskellige fejlkilder under forsøget (Satessa *et al.*, 2017). Dog skal der tages højde for, at disse resultater er over TGP og ikke reduktion i metandannelsen.



Figur 3.2: TGP produktion af rene produkter



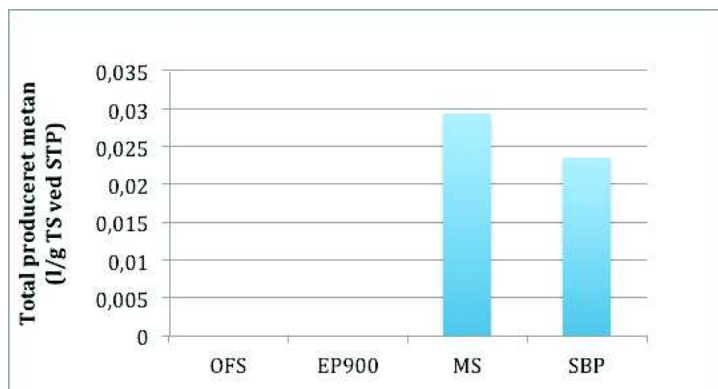
Figur 3.3: TGP produktion af rene produkter samt inddragelse af tangprodukter i SBP og MS

3.11 Resultater over metanproduktion med tempererede algearter (EP900 og OFS)

Tabel 2: Procentvis ændring af metanproduktionen ved tilsætning

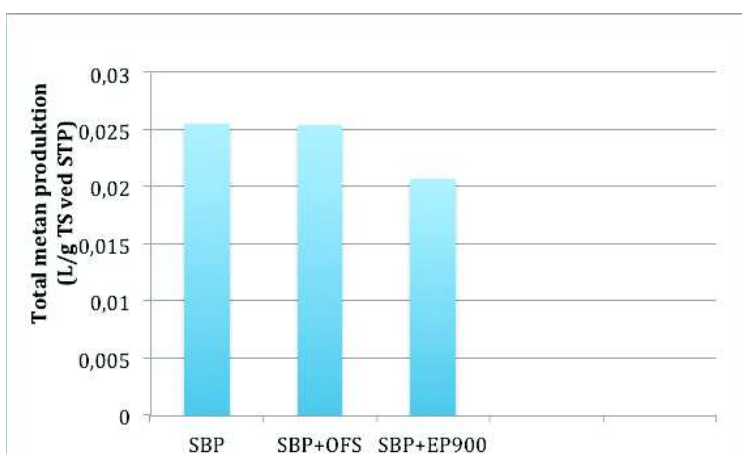
	MS	SBP
OFS	5,8%	-0,5 %
EP900	13,7 %	-21,5 %

Ud fra figur 3.3 kan man se, at *OFS* og *EP900* ikke producerer metan. Dette er i overensstemmelse med vores forventninger, da det også er påvist i et tidligere in vitro forsøg (Satessa *et al.*, 2017). Det ses derimod, at fodermidlerne MS og SBP producerer metan, også som forventet. Ydermere ses det, at SBP producerer en smule mindre metan end MS.

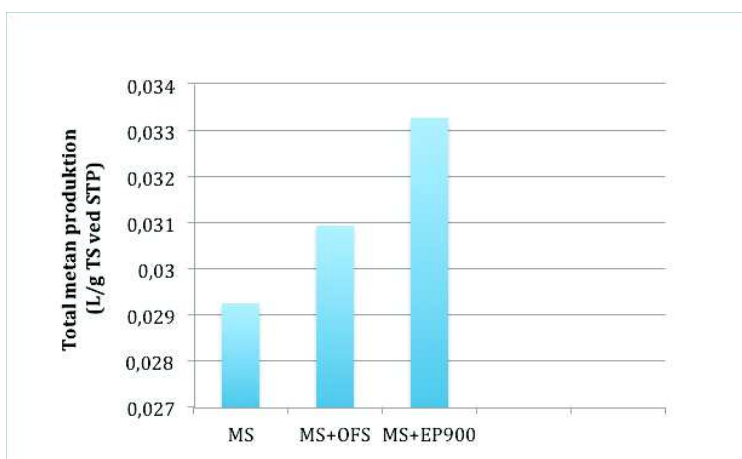


Figur 3.3: Total metanproduktion af rene tangarter og fodermidler

I et tidligere forsøg af Satessa *et al.*, (2017) viste *EP900* at kunne reducere metan med 32 %, når den var inkuberet med MS. Figur 3.5 viser derfor et bemærkelsesværdigt resultat, da man forventer, at *EP900* skulle nedsætte produktionen af metan ved fermenteringen af MS og ikke stimulere dannelsen af metan. Derudover kan man se, ud fra figur 3.3, at *EP900* ikke producerer metan som rent produkt, og MS producerer mest metan. Derfor giver det ikke umiddelbart logisk mening, at resultatet i figur 3.5 viser, at MS+*EP900* har stimuleret metanproduktionen. Det leder derfor op til en overvejelse omkring hvorvidt, der skulle været sket en ombytning på flaskerne for MS og MS+*EP900*. Det kunne også forklare, hvorfor der i tabel 2 er en stigning i metandannelsen ved inkubering af *OFS* og *EP900* i MS. På baggrund af disse forsøgsresultater må man konkludere, at det er nødvendigt at køre forsøget flere gange for klargøre, hvilken effekt *EP900* og *OFS* har på fermenteringen af fodermidlet MS.



Figur 3.4: Total metanproduktion af SBP samt SBP med inkubering af *OFS* og *EP900*



Figur 3.5: Total metanproduktion af MS samt MS med inkubering af *OFS* og *EP900*

De eneste resultater, som vi vurderer, har en kvalitet, der gør dem brugbare, er resultaterne fra figur 3.4. Her ses det, at når *EP900* er inkuberet med SBP, reducerer det metan. Det ses ydermere, at når *OFS* er inkuberet i SBP er der ikke sket en signifikant ændring. Begge disse resultater var i overensstemmelse med vores forventninger, da det er samme tendenser som i tidligere forsøg (Satessa *et al.*, 2017). Det er derfor særligt vigtigt at være opmærksom på, at *EP900* ved fermenteringen af SBP nedsætter produktionen af metan, hvor det samme ikke kan konkluderes lige så entydigt for benyttelsen af *OFS*. Disse konklusioner kan også drages fra tabel 2.

3.12 Hvordan påvirker reduktion af metan koens produktivitet?

A. nodosum er, som tidligere beskrevet i afsnit “3.9, resultater fra in vitro og in vivo forsøg verden over” haft en reducerende effekt på dannelsen af TGP og metan i in vitro fermenteringsforsøg med vomvæske efter 24 timers inkubation (Wang *et al.*, 2008). Ydermere kan *A. nodosum* dyrkes i tempereret områder, hvilket gør denne tangart ekstra interessant at kigge nærmere på, eftersom vores hypotese er netop at eftersøge en tangart, der kan dyrkes på de nordlige breddegrader.

Forsøg, hvor der er inkluderet *A. nodosum* i foderrationen til forskellige drøvtyggere, har påvist nogle forskellige resultater. Disse resultater er relevante i vurderingen omkring, hvorvidt der skal bruges den respektive tangart til at reducere den enteriske metandannelse. Disse resultater vil nedenfor blive belyst.

Chaves Lopez *et al.*, (2016) udførte et forsøg med køer, der blev fodret med *A. nodosum*. *A. Nodosum* blev i dette forsøg brugt som erstatning for de normale energi- og proteinkilder. Dette blev derfor givet i større doser (100 g. *A. nodosum* om dagen) end dem, som blev givet i in vitro forsøgene, da formålet her var at bruge det som fodertilskud frem for at reducere metandannelsen. *A. nodosum* viste sig i dette forsøg at kunne have nogle positive effekter på mælkeproduktionen, idet benyttelsen af *A. nodosum*, som foder gav en bedre mælkehygiejne og bidrog til et højere indhold af jod i mælken. Det højere jodindhold kunne være fordelagtig i problematikken omkring, at jodmangel er et folkesundhedsproblem i flere forskellige lande (Chaves Lopez *et al.*, 2016). Afslutningsvist er det værd at bemærke, at hvis der reduceres metan med *A. nodosum*, som Belanche *et al.*, (2015) viste, vil man samtidig kunne påvirke mælkehygiejne og jodindholdet positivt, hvilket alt andet end lige vil være fordelagtigt.

Det viste sig dog i et andet forsøg med køer, at jodindholdet i mælken kunne blive så høj, at det kunne tilnærme sig grænseværdierne for en toksisk effekt på mennesker og særligt børn (Antaya *et al.*, 2015). Dette forekom ved, en tildelingen af *A. nodosum*, i doserne 57 g/dag, 114 g/dag og 170 g/dag. Hverken mælkeydelsen eller mælkens sammensætning (fedt, protein, laktose og urea) blev ændret ved at tilføre *A. nodosum* i dette forsøg (Antaya *et al.*, 2015).

Forsøget med Caroprese *et al.*, (2016) viste også, at *A. nodosum*, med en dosis på 25 g/dag, ikke havde nogen effekt på mælkeydelsen, og desuden heller ikke på fedtindholdet i mælken.

Braden *et al.*, (2007) udførte et forsøg med køer, hvor 2 % af foderets DM bestod af *A. nodosum*, og basis foderet bestod af en majsbase diæt med 78 % dampvalset majs, 5 % bomuldsfrøskrog, 6 % lucernehø, 2 % oksekøds talg, 4 % melasse og 5 % tørstof tilskud. Forsøget viste, at køer fodret med *A. nodosum* havde en højere marbling score. Derudover var der en højere grad af frisk "rød oksekødsfarve", som er i overensstemmelse med forbrugernes efterspørgsel, samt at kødet havde en bedre holdbarhed. Ovenstående bivirkninger blev også fundet i Montgomery *et al.*, (2001), hvor køer gik på græs, der var drysset med *A. nodosum* 3,4 kg per hektar.

Derudover kunne det også tyde på, at *A. nodosum* kan øge fødevarerikkerheden, da den i flere forsøg med køer, som blev tildelt *A. nodosum* som 2 % af foderet mindst to uger før slagting, viste sig at kunne hæmme *E. coli* hos køer (Bach *et al.*, 2008; Braden *et al.*, 2004).

A. taxiformis viste sig, som nævnt i "3.9 Resultater fra in vitro og in vivo forsøg verden over" at være effektiv til at reducere metan, men den har vist sig at have forskellige komplikationer i forhold til at skulle bruge denne til humant konsum. De bioaktive stoffer BF og BCM, som findes i denne tangart, viste sig at kunne ophobe sig i kød og er nu blev forbudt at bruge i Australien og viste sig derudover også at kunne skade vomepitemet hos lam. Derfor må vi, selvom denne tangart viste stort potentiale, afskrive at bruge denne tangart som additiv til at reducere metan.

Det har derudover i et forsøg med geder vist sig, at mikroorganismene kan tilpasse sig en diæt med tang (Makkar *et al.*, 2016). Derfor kunne man forestille sig, at hvis man kan finde en tangart, der er god til at reducere metan, kan dyret over tid tilpasse sig til en bedre foderudnyttelse og dermed øge produktiviteten. Hvis mikroorganismene kan tilpasse sig den kontinuerlige fodring med tang, kan

dette influere på vommikrofloraen, hvilket har en endnu uklar virkning på antimetanogenernes aktivitet af det pågældende tang eller bioaktive stoffer. Dette kunne derfor være interessant at studere nærmere, da ønskescenariet ville være, at effekten blev større og større, og der dermed kommer mindre metan. Der skal naturligvis også tages højde for, at reaktionen kan gå den modsatte vej, og de vænner sig til foderet og producerer samme mængde metan som ved en normal fodersammensætning efter noget tid.

Tang kan, som nævnt tidligere i afsnit ” 3.8 Tungmetaller” også indeholde forskellige mineraler og tungmetaller, som f.eks. arsen, zink, mangan, kviksølv bly, jod og brom (Holdt & Kraan, 2011; Machado *et al.*, 2016). Disse kan optages fra havet eller spildevand og dermed være med til at rense vandet for disse stoffer (Holdt & Kraan, 2011). Dette skal man tage højde for, hvis man skal bruge disse tangarter i fødevarerindustrien, da nogle af disse stoffer kan være toksiske i for store mængder og dermed have den effekt, at de kan ophobe sig i produkter, som. BCM f.eks. har vist sig at gøre i kød, som er uddybet i afsnit “3.5 Bromoform og bromochlorometan” .

3.13 Delkonklusion

Både BF, BCM, PT og terpenener har vist sig at være mulige kilder til at hæmme metanproduktionen markant. I *A.taxiformis* findes der BF, hvor man observerede nogle uønskede forandringer i vomvæggen hos får (Li *et al.*, 2016) samt det ozonnedbrydende effekt, og det er derfor blevet forbudt at bruge *A.taxiformis* i Australien (Tomkins *et al.*, 2009). Der mangler in vivo forsøg med flere tangarter for at se, om der er andre bioaktive stoffer, der har en negativ effekt på dyrets sundhed. Derudover virker det til, at de klimatiske betingelser kan have en betydning for, hvor effektive tangarterne er til at reducere TGP, metan og dets indhold af bioaktive stoffer. Forsøgsresultaterne fra Københavns Universitet viser ikke de resultater, vi forventede, hvilket gør, at man burde køre forsøget flere gange for at kunne konkludere noget endeligt om *EP900* og *OFS*.

4. Bæredygtighed

Der er en stigende efterspørgsel på afgrøde jord ville en produktion af tang i havet til kvæg kunne medføre et mere bæredygtigt husdyrproduktion. I følgende afsnit vil vi have fokus på, hvilke fordele og ulemper der vil være ved at dyrke tang i havet og hvilke problemer der kan opstå i forbindelse med dette.

4.1 Fordele og ulemper ved at dyrke tang i havet

71% af jordens overflade er dækket med vand, og hvis vi kunne bruge nogle af havets uudnyttede ressourcer, som eksempelvis tang, ville vi kunne spare plads på noget af den afgrøde jord der i forvejen er stor efterspørgsel på (Det Europæiske Miljøagentur, 2018). Derudover er det danske havareal 2,5 gange større end det danske landareal, hvilket potentielt vil kunne betyde, at hvis vi formår at udnytte dette område til at dyrke afgrøder, vil vores areal til dette kunne udvides markant (Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, 2010).

Ydermere vil det "vægtløse" tang kunne vokse i flere meters højde, hvorimod afgrøder på jorden gennemsnitligt bliver under 1 meter høje (Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, 2010). Dette vil betyde at man vil kunne få et større udbytte per hektar, sammenlignet med det udbytte man kan få på per hektar på afgrøde jord. På den måde vil man kunne udnytte Danmarks areal bedre. Yderligere bidrager transportsektoren med 22 % af Danmarks drivhusgasudledning (Illerup *et al.*, 2007) og vi ville kunne spare på havtransporten langvejs fra, hvis man kan dyrke afgrøder til foder og humant konsum inden for eget nærområde. Hvis vi kan spare på importen af afgrøder fra andre dele af verden, vil dyrkning af tang kunne medføre en mere bæredygtig produktion.

Derudover er nogle af fordelene ved at dyrke tang er, at man ikke behøver at bruge vand til kunstvanding og algerne kan udnytte solens energi bedre end landplanter og giver derfor et større udbytte per areal (Bruhn *et al.*, 2010).

Tang kan også bruges som et slags rensningsanlæg af havet. Ved produktion af fisk i havbrug går der en masse næringssalte tabt, som stammer fra fiskenes ekskretionsprodukter, fordi fiskene ikke har kunne absorbere alle næringsstoffer fra foderet. Disse ekskretionsprodukter kan man ikke opsamle direkte med rensningsforanstaltninger eller filtre. I den forbindelse har man brugt blandt andet tang, som skal virke som filtrator til at opsamle overskydende opløste næringssalte og det indbygges i deres væv efterhånden som de vokser (Nielsen *et al.*, 2015). Når man så høster tangen kan man på den måde genbruge næringssaltene og recirkulere det som foder additiv til eksempelvis kvægproduktion. En ulempe ved dette kan være at tang kan optage eventuelle medicinrester som er anvendt i fiskeproduktionen og det kan medfører nogle restriktioner for den efterfølgende anvendelse af tangen (Nielsen *et al.*, 2015).

Der kan muligvis også være nogle negative effekter ved at dyrke tang. Herunder kan nævnes, at der kan blive skabt nærings begrænsninger i det område tangen dyrkes, som kan have konsekvenser

dels produktionen og kvaliteten af tangen, men også for balancen i det naturlige økosystem i området (Bruhn et al., 2010). Derudover kan løsevrene algefraktement, samle sig på bunden og lave iltsvind, eller skygge for den naturlige flora på havbunden. Sidst men ikke mindst kan de muligvis også skabe gene for forskellige havpattedyr, skibstrafik og fiskeri (Bruhn et al., 2010).

4.2 Delkonklusion

Hvis vi dyrker tang i havet vil det kunne gøre konkurrencen om afgrødejord mellem kvæg og mennesker mindre. Derudover er det en miljøvenlig afgrøde, da den er mulig at bruge til at filtrere næringsstoffer fra f.eks. produktion af fisk i havbrug. En negativ ved effekt ved at dyrke tang, er at de muligvis kan ødelægge nogle af de naturlige økosystemer, og skabe gene for havpattedyr, skibstrafik og fiskeri

5. Diskussion

Formålet med projektet er at gennemgå det eksisterende viden der er omkring forskellige tangarter og deres evne til muligvis at kunne reducere den enteriske dannelse af metan. I denne kontekst er hypotesen: *“Bioaktive stoffer i tang, som kan dyrkes på nordlige breddegrader, kan reducere den enteriske dannelse af metan hos kvæg”* testet. De forrige kapitler var med til at beskrive, hvordan metan dannes i vommen. Muligheden i at anvende tang blev undersøgt på baggrund af den tidligere opnåede viden om, at det indeholder nogle særlige bioaktive stoffer, som kan reducere metan dannelsen. Det følgende kapitel vil derfor være en diskussion af de resultater, som er opnået fra dette litteraturstudie.

5.1 Reduktion af den enteriske dannelse af metan

Gennem et litteraturstudium har vi fundet ud af, at andelen af grovfoder og kraftfoder i foderrationen kan influere, hvor meget enterisk metan der dannes, hvilket er uddybet i kapitel “2. Fermenteringsprocesser i vommen”. Ved en stor tildeling af grovfoder, vil der dannes en større andel af eddikesyre, som medfører dannelse af brint, der kan bruges som substrat for metanogenerne, hvilket medfører mere metan. Omvendt vil en større tildeling af kraftfoder, medføre en større produktion af propionsyre, hvilket medfører et forbrug af brint.

I vores studie er der fokus på anvendelse tang, da nogle tangarter har særlige bioaktive stoffer, som viser sig at kunne reducere den enteriske dannelse af metan, uden at det nødvendigvis påvirker

foderudnyttelsen (Belanche *et al.*, 2015; Kinley *et al.*, 2016a, Satessa *et al.*, 2017). Ud fra tabel 1 fandt vi ud af, at det bioaktive stof BF kan findes i rødalgen *A. taxiformis*, og phlorotanniner samt terpenener, kan findes i brunalger. Det at tang indeholder nogle bioaktive stoffer, som kan reducere metan dannelsen er en interessant faktor, da vi har forpligtet os til at reducere emissionen af drivhusgasser med 40% inden 2030 i forhold til 1990 niveauerne (Kristensen & Lund., 2011). Det er dog værd at tage med, at nogle af disse bioaktive stoffer også kan have en negativ effekt på bl.a. vomepitelet samt medføre uønskede koncentrationer af tungmetaller i produkter til humant konsum, hvilket er uddybet i kapitel “3. Tang og dets bioaktive stoffer”.

Der er endnu ikke fundet nogen tangart på de nordlige breddegrader, som kan reducere metan 100% uden at påvirke foderudnyttelsen. Mindre reduktioner af metan er dog også ønskeligt at finde, herunder kunne tangarterne: *A.nodosum*, *Gracilaria vermiculophylla*, *Gigartina sp* samt brunalgen *EP900* være særlige interessante at kigge yderligere på, da disse også vil kunne dyrkes på vores breddegrader.

Yderligere har man fundet ud af i et forsøg, hvor man fodrede geder med tang, at mikroorganismene i vommen kan tilpasse sig den kontinuerlige fodring med tang. Man kunne forestille sig, at hvis man finder en tangart, der kan reducere metan dannelsen, vil foderudnyttelsen blive bedre med tiden, men dette kan muligvis også kan have en negativ effekt på antimetanogenernes aktivitet (Makkar *et al.*, 2016).

Diæten er ikke den eneste parameter, som er mulig at ændre på for at reducere metan emissionen. Som tidligere nævnt i kapitel “2. Fermenteringsprocesser i vommen” vil man kunne reducere den samlede emission af metan ved at gøre mælkeproduktionen mere effektiv med færre dyr (Aaes *et al.*, 2003).

5.2 Tangarter

I dette litteraturstudie har vi ud fra tabel 1 i kapitlet “3. Tang og dets bioaktive stoffer “ fundet ud af at tangarter i tropiske egne har vist sig at være særlig effektive til at reducere metan. Det kunne derfor være interessant at undersøge om klimaet kunne have en betydning for, hvor effektive de forskellige tangarter er til at reducere den enteriske metandannelse. Visse tropiske arter, herunder *A. taxiformis* og *Dictyota*, viste sig næsten at kunne eliminere metan dannelse in vitro (Machado *et al.*,

2014; Machado *et al.*, 2015; Maia *et al.*, 2016; Paul *et al* 2006; Kinley *et al.*, 2016a; Kinley *et al.*, 2016b) fuldstændig. Dette tyder derfor på, at tang og dets bioaktive stoffer kunne være en mulig løsning til at eliminere metan. Dog har *A.taxiformis* vist være at have nogle negative effekter på dyret, som betyder, at det ikke kan bruges til humant konsum, som er beskrevet yderligere i kapitel “3. Tang og dets bioaktive stoffer “.

Tangarter fra tempererede områder har i nogle in vitro forsøg vist sig også at kunne reducere metan, men dog ikke i lige så høj grad som dem fundet i tropiske områder. De tempereret tangarter, som kan reducere metan, ville være særligt interessante at undersøge nærmere, da vi vil kunne dyrke disse arter på de nordlige breddegrader. Brunalgen *EP900*, *OFS*, *Gracilaria vermiculophylla*, *Gigartina sp* og *A. nodosum* er herunder særlig interessante, da vi både ved, at de kan dyrkes på de nordlige breddegrader og har derudover vist sig at reducere metan mellem 15-38 % (Satessa *et al.*, 2017; Maia *et al.*, 2016; Belanche *et al.*, 2015). Disse tangarter kunne være interessante at undersøge nærmere med nogle in vivo forsøg. Her ville man kunne undersøge, om disse tangarter giver samme resultater in vivo, som de gør in vitro, hvilket ikke altid er tilfældet (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016). Derudover ville det være interessant at undersøge, hvilke bioaktive stoffer der findes i denne tang, som præcist kan have denne antimetanogene effekt, eller om dette kan være et multikausalt sammenspil mellem flere forskellige stoffer, som medfører denne effekt. Ud fra vores viden er det kun BF, som er blevet undersøgt i dybden i forhold til at reducere metan, både in vivo og in vitro. Der begrænset viden om PT, da der ud fra vores viden kun er udarbejdet to in vitro forsøg, der omhandler denne tangart.

Der er endnu ikke lavet nogle forsøg med isoprenoider eller terpenier ekstraheret fra tang i forhold til at reducere enterisk metandannelse. Derfor har vi baseret vores viden om terpenier ud fra terrestriske planter, da vi formoder, at disse må have nogle af de samme egenskaber, som dem man finder i tang. Dette kan dog medføre komplikationer, da deres effekt muligvis kan være anderledes, da disse planter lever under nogle helt anderledes betingelser end terrestriske planter gør. Derfor bør disse stoffer, ekstraheret fra tang, undersøges i nogle in vitro forsøg med vomvæske, før man kan konkludere noget endeligt om deres antimetanogene potens.

En anden fordel ved at anvende nogle af disse tangarter til at reducere metan er, at vi samtidig ville kunne være selvforsynende og ikke behøvede at bruge brændstof på at importere tang langvejs fra

(Illerup *et al.*, 2007). Dette vil kunne bidrage til en langt mere bæredygtig husdyrproduktion og ville potentielt medføre en afkriminalisering af kvæg. Derudover ville en produktion af afgrøder i havet frem for på jorden medføre en mindsket konkurrence mellem dyr og mennesker om afgrøde jord. Der kan dog også være nogle ulemper ved at masseproducere tang. Herunder kan nævnes lokalt iltsvind, skygge for naturlig flora på havbunden, nærings begrænsninger, der kan medføre ubalance i naturlige økosystemer og til sidst kan det muligvis også skabe gene for forskellige havpattedyr, skibstrafik og fiskeri (Bruhn *et al.*, 2010). Dette er uddybet i “4. Bæredygtighed”.

5.3 Forsøgsresultater

I forsøget med Satessa *et al.*,(2017) viste *EP900* at kunne reducere metan 32 % ved fermentering af MS. Derimod viste resultatet fra de data, vi fik udleveret med samme forsøg i 2018, at MS+*EP900* stimulerede metanproduktionen med 13,7 %, som kan ses i tabel 2 i afsnit “3.11 Resultater over metanproduktion med tempererede algearter (*EP900* og *OFS*)”. Derudover viste MS+*OFS* også at stimulere til en øget metandannelse sammenlignet med MS. Da vi testede *OFS* og *EP900* sammen med SBP, så vi ingen signifikant ændring ved tilføjelse af *OFS*. Ved tilsætning af *EP900* blev metanproduktionen reduceret ved fermentering af SBP med 21,5 %.

Da begge forsøg burde være udført fuldstændigt identisk, og vi antager, at alle substrater har identisk opbygning, må de forskellige resultater skyldes, at der er gået noget galt under selve forsøget. Ud fra figur 3.5 afsnit “3.11 Resultater over metanproduktion med tempererede algearter (*EP900* og *OFS*)” kunne godt tyde på, at der var byttet rundt på flaskerne MS og MS+*EP900*. En anden mulighed er, at der kan være fejl i måleinstrumenterne, herunder kan batterierne have en signifikant indflydelse på resultaterne. En vigtig faktor for at forsøgets resultater bliver præcise er, at låget på flaskerne er skruet helt tæt, da vi har med gasarter at gøre, som nemt vil kunne slippe ud. Dermed sagt er det også vigtigt, at gasposerne er helt tætte.

Hvis de tilførte substrater derimod ikke er homogene, og evt. har en forskellig koncentration/sammensætning af de forskellige bioaktive stoffer, kan dette også have medført de forskellige reduktioner af metan. Derudover kan høsttidspunkt også have en betydning for indholdet af de forskellige komponenter i tangen og kan på den måde også have en betydning for, hvor effektiv reduktionen af metan er (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016).

Vomvæsken, der er brugt til forsøget, kunne evt. også have haft en betydning pga. anderledes pH eller en anden sammensætning af de forskellige mikroorganismer. Dette kan have indflydelse for, hvor effektivt substraterne nedbrydes og dermed også for gas- og metanproduktionen (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016).

For endeligt at kunne klargøre, hvor stor disse tangarters effekt er på metan dannelsen, vil det være nødvendigt at køre forsøget adskillige gange og på den måde få mere data at konkludere ud fra. Grundet at de to forsøg viser så forskellige resultater, er det interessant at vide, om en af de to forsøg kunne være en eventuelt outlier.

Det er svært at have klare forventninger om, hvilke resultater man vil forvente i sådan forsøg. Der er endnu ikke lavet mange forsøg med tang i forhold til at reducere metan, og nogle tangarter har vist sig at kunne øge metan produktionen (Maia *et al.*, 2016) og andre kan reducere den (Machado *et al.*, 2015; Machado *et al.* 2014; Belanche *et al.*, 2016). Dog har nogle tangarter, herunder *Asparagopsis taxiformis*, vist nogle rigtig gode resultater, og man vil derfor forvente, at der vil være andre tangarter, som endnu er uopdaget, der må kunne vise lignende resultater. Dog forhåbentlig uden bioaktive stoffer, som f.eks. BF, der viste sig at have nogle forskellige negative effekter (Li *et al.*, 2016). Metoden i dette forsøg (Satessa *et al.*, 2017), var, som tidligere nævnt, et in vitro forsøg med vomvæske. Denne metode er en god måde at screene for, hvilke tangarter der kunne være interessant at kigge nærmere på. Den optimale metode ville dog være et in vivo forsøg på køer, som ville kunne give et bedre billede af, hvordan ens produkt præcist virker. Denne metode er imidlertid dyrere at udføre, og man får derfor ofte mindre data. En anden faktor er, at man først skal finde ud af, hvilket bioaktive stof eller stoffer, der har denne effekt på metanproduktionen, da man skal bruge tilladelse til, om det overhoved må afprøves på levende dyr.

5.4 Litteraturen

Dette projekt er et litteraturstudium, hvilket medfører nogle begrænsninger. Det har ikke været muligt at lave eksperimenter selv og indsamle viden fra det, og vi har derfor været afhængige af eksperimenter udført af andre. Nogle af eksperimenterne havde ikke fokus på køer, og det er derfor svært at lave en konkret konklusion, og det har derfor været nødvendigt at lave nogle antagelser.

De forskellige forsøg i tabel 1 i kapitlet “3. Tang og dets bioaktive stoffer“ er ikke alle udført på samme vis, og der kan derfor være nogle usikkerheder i, hvor sammenlignelige vores resultater er.

Der er blevet anvendt forskellige arter og racer af de forsøgsdyr, som bruges i forsøgene. Derudover er der flere parametre, der varierer. De er følgende: Forskelligt antal af dyr, om dyret er højtydende eller lavtydende, årstid for høst af tangen, forskellig diæt og forskellig længde på tilpasningsperiode til foderet. Disse faktorer er med til at gøre, at man kan opnå nogle forskellige forsøgsresultater, selvom man anvender den samme tangart (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016).

Derudover er de eksperimenter, som er lavet med tang, i forhold til at reducere metan, hovedsageligt in vitro forsøg, og de in vivo forsøg, der er lavet, er ikke lavet på køer, og det kan derfor være svært præcist at vurdere, hvor gode resultaterne vil være for køer. Li *et al.*, (2016) afprøvede f.eks. i et forsøg at tildele *A.taxiformis* til får, hvilket gav en reduktion af metan op til 80 % med dose på 2-3 % OM. In vitro forsøg med vomvæske fra køer viste ved samme dose at reducere metan produktionen 99% (Machado *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2015). Dette kan både skyldes, at forsøget blev lavet på forskellige arter af dyr, og at forsøget blev udført med forskellige metoder, henholdsvis in vivo og in vitro.

Tilgængeligheden af den litteratur, som findes omkring brugen af tang til at reducere den enteriske dannelse af metan, er stadig meget begrænset, og det er desuden udarbejdet af den samme gruppe mennesker (Machado *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2015; Kinley *et al.*, 2016a; Kinley *et al.*, 2016b; Kinley & Freeden, 2014; Dubois *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2016). Dette betyder, at konklusionerne er baseret på en begrænset mængde litteratur. Ydermere kan dette muligvis have medført, at det ofte er samme tangarter, der bliver undersøgt, og at de derudover måske har søgt efter nogle bestemte resultater, som kan gøre, at resultaterne er blev påvirket af dette.

5.5 Afgrænsning

Vi har i valgt at afgrænse vores projekt til hovedsageligt at omhandle brugen af tang i foder til at reducere den enteriske dannelse af metan. Denne afgrænsning har vi lavet, så projektet har en klar og målrettet retning og simplificere budskabet. Dette indebærer derfor, at vi har været nødsaget til at udelade den ernæringsmæssige værdi af tang. Altså vil det sige, at aspektet omkring hvorvidt tangen kan bruges som fodermiddel fra et ernæringsmæssigt perspektiv ikke er belyst. Ydermere har vi ikke inddraget overvejelser om, hvorvidt dyrkning af tang vil påvirke økosystemer i havet. Hvis dyrkningen af tang skulle have negativ påvirkning på havets økosystem, ville dette være en mulig barriere for at dyrke tang i en større produktion. Overvejelser omkring påvirkning af

fiskebestanden og dets udvikling i det nye miljø er relevante, da muligheden for udryddelser eller masseformeringer af arter kan have store konsekvenser.

Hvis der skal drages konklusioner ud fra vores projekt, er det derfor vigtigt at tage højde for de begrænsninger, vores afgrænsning har medført. Det betyder, at selvom man fandt en tangart, som kunne løse problemet med metan emission, er der stadig flere faktorer, man skal tage højde for, før man ville begynde at anvende det.

5.6 Det næste skridt i forskningen af tang

Det næste skridt man skulle gøre herfra ville være at køre nogle flere in vitro forsøg igen for at kunne validere, om der er noget at komme efter med *EP900* og *OFS*. Herefter ville det være relevant at finde ud af, hvilket stof eller stoffer, der er de bioaktive, for at kunne lave foderrationer, der effektivt reducerer metandannelsen. Man ønsker ikke at der skal tilsættes så meget ekstrakt fra tangprodukterne, da det måske kan gå ud over køernes ydelse, hvis fordøjeligheden bliver lavere. Derudover kunne det være interessant at lave eksperiment et in vivo forsøg af brunalgen *EP900*, *OFS* eller *A.nodosum*. Forsøget skulle udføres på malkekøer, som blev introduceres til forskellige doser af tangen sammen med MS og SBP. Det kunne derudover også være interessant at afprøve tangarten *A.nodosum*, *Gracilaria vermiculophylla* og *Gigartina sp*, da den også har vist at reducere metan (Belanche *et al.*, 2015; Maia *et al.*, 2016). Køerne skulle opdeles i grupper afhængigt af den dosis af brunalgen *EP900*, de var blevet tildelt og alle fodres med den samme basisfoder i 72 dage, ligesom Li *et al.*,(2016) gjorde med får. På den måde kan køerne vænne sig til den nye diæt og på den måde give de bedst mulige betingelser for at evaluere effekten af *EP900*, *OFS* eller *A.nodosum* på metandannelsen. Det individuelle dyr skal jævnligt i respirationskammer for at måle metan produktionen, og dette holdes op mod en kontrolgruppe, som får samme basalfoder uden inklusion af tang.

Derudover bør man lave et in vivo fordøjelighedsforsøg for at finde fordøjeligheden af tangen. Dette vil man gøre ved at finde differencen mellem indtaget bruttoenergi i det indtagende foder og den bruttoenergi, der udskilles med fæces. På den måde ville man kunne måle, om fordøjeligheden ville blive påvirket. Dette skal holdes op mod en kontrolgruppe, der får samme basal foder, men uden tang (Chwalibog, 2006a). Dette eksperiment ville beskrive, hvor meget metan der bliver produceret ved de forskellige doser med *EP900*, *OFS* eller *A.nodosum* i et respirationskammer, samt bestemme fordøjeligheden af tangen med fæcesprøver. Respirationskammeret analyserer den udgående luft for kuldioxid, oxygen og metan. Ud fra den pågældende data kan man beregne, hvor

meget oxygen der er brugt samt den producerede mængde af kuldioxid og metan (Chwalibog, 2006b). Dette er blot en idé til et eksperiment, som kunne udarbejdes for at afklare, hvor effektiv *EP900*, *OFS* eller *A.nodosum* ville være i forhold til at reducere metan dannelsen uden at påvirke fordøjeligheden. Yderligere eksperimenter kunne inkludere en undersøgelse af vævsprøver (fra muskler og fedt) for at undersøge, om slagtekropskvalitet eller kødkvalitet påvirkes, samt om *EP900*, *OFS* eller *A.nodosum* kan medføre uønskede forandringer i vomvæggen hos køer.

6. Konklusion

Vores hypotese: “*Bioaktive stoffer i tang, som kan dyrkes på nordlige breddegrader, kan reducere den enteriske dannelse af metan hos kvæg*” kan ikke afvises på baggrund af dette litteraturstudie. Tang indeholder nogle bioaktive stoffer, som kan hæmme metanogenesen. Forsøgsresultaterne med *EP900* og *OFS*, som kan dyrkes på de nordlige breddegrader, giver nogle tvetydige resultater, hvilket betyder, at det vil være nødvendigt at lave nogle flere forsøg for at konkludere noget endeligt for disse. Derudover ville det være interessant at kigge nærmere på *Gracilaria vermiculophylla*, *Gigartina sp* og *A. nodosum*, da de kan vokse på tempererede områder og har vist sig at kunne reducere metandannelsen.

Afslutningsvis har vi fundet ud af, at det er muligt at anvende tang til at reducere den enteriske dannelse af metan. Dette litteraturstudie viser, at der er behov for mere forskning omkring området og vores viden omkring tang stadig er meget mangelfuld. Konklusionen om, at det er muligt at reducere metan med tang, er lavet af ud fra nogle antagelser og anmoder derfor om flere undersøgelser og forsøg for at nedbringe den videnskabelige usikkerhed.

7. Perspektivering

I videre undersøgelser ville det være interessant at kigge på, om årstiden kunne have en betydning for tangens indhold af bioaktive stoffer, og hvilken årstid der vil være optimal at høste tangen.

Produktionen af tang skal også undersøges yderligere for at kunne finde de bedste produktionsmetoder, som giver det størst mulige output. Hermed er det interessant at kigge på fremstillingen og finde en god måde at tørre og lagre det hurtigt til masseproduktion.

Dette projekt har undersøgt tangarter fra tempererede, subtropiske og tropiske klimaområder, men det kunne også være interessant at kigge på tangarter, der har tilpasset sig mere ekstreme klimaområder. Dette kan eksempelvis være tangarter fra boblerev, Grønland, varmekilder, basiske eller sure miljøer (Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, 2010).). Det er en mulighed, at tangarter, der har tilpasset sig ekstreme miljøer, kan have nogle andre bioaktive stoffer, som kan have en positiv effekt på reduktionen af metanogenesisen.

Man kunne forestille sig, at hvis en tangart i tropiske egne viser gode resultater både in vivo og in vitro, kunne man evt. begynde at selektere dem ud fra ønskede egenskaber som f.eks. at kunne tolerere koldere klima, højt indhold af bioaktive stoffer mm.

Generelt er vores viden omkring tang stadig meget mangelfuld. Ikke kun i forhold til om det kan bruges til at reducere metan dannelsen, men også generelt brugen af tang.

8. Litteraturliste

- Aguinaga Casañas, M.A., N. Rangkasenee, N. Krattenmacher, G. Thaller, C.C. Metges et al. (2015): Methyl-coenzyme M reductase A as an indicator to estimate methane production from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Elsevier, Vol. 98:6, pp. 4074–4083.
- Antaya, N.T., K.J. Soder, J. Kraft, N.L. Whitehouse, N.E. Guindon et al. (2015): Incremental amounts of *Ascophyllum nodosum* meal do not improve animal performance but do increase milk iodine output in early lactation dairy cows fed high-forage diets¹. *Journal of Dairy Science*, Elsevier, Vol. 98:3, pp. 1991–2004.
- Bach, S.J., Y. Wang & T.A. McAllister (2008): Effect of feeding sun-dried seaweed (*Ascophyllum nodosum*) on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by feedlot cattle and on growth performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 142:1–2, pp. 17–32.
- Barbot, Y.N., H. Al-Ghaili & R. Benz (2016): A review on the valorization of macroalgal wastes for biomethane production. *Marine Drugs*, Vol. 14:6, available at:<http://doi.org/10.3390/md14060120>.
- Bauchart, D. (1993): Lipid Absorption and Transport in Ruminants. *Journal of Dairy Science*, Vol. 76:12, pp. 3864–3881.
- Belanche, A., E. Ramos-Morales & C.J. Newbold (2015): In vitro screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 96:9, pp. 3069–3078.
- Benchaar, C. & H. Greathead (2011): Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, Elsevier B.V., Vol. 166–167:, pp. 338–355.
- Bodas, R., N. Prieto, R. García-González, S. Andrés, F.J. Giráldez et al. (2012): Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, Elsevier B.V., Vol. 176:1–4, pp. 78–93.
- Braden, K.W., J.R. Blanton, V.G. Allen, K.R. Pond & M.F. Miller (2004): *Ascophyllum nodosum* supplementation: a preharvest intervention for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in feedlot steers. *Journal of Food Protection*, Vol. 67:9, pp. 1824–8.

- Braden, K.W., J.R. Blanton, J.L. Montgomery, E. Van Santen, V.G. Allen et al. (2007): Tasco supplementation: Effects on carcass characteristics, sensory attributes, and retail display shelf-life. *Journal of Animal Science*, Vol. 85:3, pp. 754–768.
- Brodie, J. (2010): *Global Seaweed Network*, available at: <http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/our-work/biodiversity/global-seaweed-network-document-june-2010.pdf>.
- Bruhn, A. , Rasmussen, M.B. & Bech, K.S. (2010): Den blå biomasse – potentialet i danske farvande. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. pp. 28.
- Bueno, I.C.S., R.A. Brandi, R. Franzolin, G. Benetel, G.M. Fagundes et al. (2015): In vitro methane production and tolerance to condensed tannins in five ruminant species. *Animal Feed Science and Technology*, Elsevier B.V., Vol. 205:, pp. 1–9.
- Børsting, F., M.R. Weisbjerg & E. Hermansen (2003): Fedtomsætningen i mave-tarmkanalen. *Kvægets Ernæring Og Fysiologi Bind 1 - Næringsstof Omsætning Og Fodervurdering*, pp. 314–330.
- Caroprese, M., M.G. Ciliberti, R. Marino, A. Santillo, A. Sevi et al. (2016): Polyunsaturated fatty acid supplementation: Effects of seaweed *Ascophyllum nodosum* and flaxseed on milk production and fatty acid profile of lactating ewes during summer. *Journal of Dairy Research*, Vol. 83:3, pp. 289–297.
- Chaves, A. V., M.L. He, W.Z. Yang, A.N. Hristov, T.A. McAllister et al. (2008): Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Canadian Journal of Animal Science*, Vol. 88:1, pp. 117–122.
- Chaves Lopez, C., A. Serio, C. Rossi, G. Mazzarrino, S. Marchetti et al. (2016): Effect of diet supplementation with *Ascophyllum nodosum* on cow milk composition and microbiota. *Journal of Dairy Science*, Elsevier, Vol. 99:8, pp. 6285–6297.
- Chwalibog, A. (2006a): Fordøjelighedsbestemmelse. *Næringsværdi Og Næringsbehov*. 7th ed., pp. 16–27.
- Chwalibog, A. (2006b): Metoder til bestemmelse af den kvantitative energiomsætning i organismen. *Næringsværdi Og Næringsbehov*. 7th ed., pp. 40–58.

- Demeyer, D.I. (1981): Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agriculture and Environment*, Vol. 6:2–3, pp. 295–337.
- Dubgaard, A. (2009): Omkostningseffektiv afgiftsregulering af metan og lattergas fra husdyr, p. 5.
- Dubois, B., N.W. Tomkins, R.D. Kinley, M. Bai, S. Seymour et al. (2013): Effect of Tropical Algae as Additives on Rumen in Vitro Gas Production and Fermentation Characteristics. *American Journal of Plant Sciences*, Vol. 4:December, pp. 34–43.
- Reaxys (2018). Reaxys, available at: https://www-reaxys-com.ep.fjernadgang.kb.dk/#/results/substances/8/RX001_853287186640170492/UlgwMDE9UyNIMDA0PUMjSDAwMz1SI0gwMDZeSDAwNT1UI0gwMDI9Qg==/list/152888833337/1/desc/IDE.NUMREF// (accessed 13 June 2018).
- Det Europæiske Miljøagentur (2018): *Afbødning af klimaændringer*, København.
- Grabarse, W., F. Mahlert, E.C. Duin, M. Goubeaud, S. Shima. (2001): On the mechanism of biological methane formation: Structural evidence for conformational changes in methyl-coenzyme M reductase upon substrate binding. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 309:1, pp. 315–330.
- Gupta, V.K., M.G. Tuohy, M. Lohani & A. O'Donovan (2015): *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and applications*. *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*, available at: <http://doi.org/10.1002/9781118733103>.
- Hackmann, T.J., L.E. Diez & J.L. Firkins (2013): Quantifying the Responses of Mixed Rumen Microbes to Excess Carbohydrate. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 79:12, pp. 3786–3795.
- Haque, M.N., M. Roggenbuck, P. Khanal, M.O. Nielsen & J. Madsen (2014): Development of methane emission from lambs fed milk replacer and cream for a prolonged period. *Animal Feed Science and Technology*, Elsevier B.V., Vol. 198:, pp. 38–48.
- Holdt, S.L. & S. Kraan (2011): Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, Vol. 23:3, pp. 543–597.
- Hungate, R.E. (1966): The Rumen Bacteria. *The Rumen and Its Microbes*, pp. 8–90.

- Kinley, R.D. & A.H. Fredeen (2014): In vitro evaluation of feeding North Atlantic stormtoss seaweeds on ruminal digestion. *Journal of Applied Phycology*, Vol. 27:6, pp. 2387–2393.
- Kinley, R.D., R. De Nys, M.J. Vucko, L. MacHado & N.W. Tomkins (2016a): The red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* is a potent natural antimethanogenic that reduces methane production during in vitro fermentation with rumen fluid. *Animal Production Science*, Vol. 56, pp. 282–289.
- Kinley, R.D., M.J. Vucko, L. Machado & N.W. Tomkins (2016b): In vitro evaluation of the Antimethanogenic Potency and Effects on Fermentation of Individual and Combinations of Marine Macroalgae. *American Journal of Plant Sciences*, Vol. 07:14, pp. 2038–2054.
- Knapp, J.R., G.L. Laur, P.A. Vadas, W.P. Weiss & J.M. Tricarico (2014): Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, Elsevier, Vol. 97:6, pp. 3231–3261.
- Koivikko, R., J. Loponen, T. Honkanen & V. Jormalainen (2005): Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 31:1, pp. 195–212.
- Kristensen, N.B., T. Hvelplund, M.R. Weisbjerg & P. Nørgaard (2003): 8. Mikrobiel omsætning i formaverne. *Kvægets Ernæring Og Fysiologi Bind 1 - Næringsstof Omsætning Og Fodervurdering*, pp. 211–238.
- Kristensen, T. and Lund, P. (2011): *Kvæg Og Klima Udledning Af Klimagasser Fra Kvægbedriften Med Fokus På Metan Emissionen*. DCA - Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet
- Krog-Pedersen, S. & M.H. Nissen (2010): Klimazoner. *Experimentarium*, available at: <https://www.experimentarium.dk/klima/klimazoner>.
- Li, X., H.C. Norman, R.D. Kinley, M. Laurence, M. Wilmot et al. (2016): *Asparagopsis taxiformis* decreases enteric methane production from sheep. *Animal Production Science*, Vol. 58:4, pp. 681–688.

- Liu, H., J. Wang, A. Wang & J. Chen (2011): Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 89:5, pp. 1333–1340.
- Machado, L., M. Magnusson, N.A. Paul, R. Kinley, R. de Nys et al. (2015): Dose-response effects of *Asparagopsis taxiformis* and *Oedogonium* sp. on in vitro fermentation and methane production. *Journal of Applied Phycology*, Vol. 28:2, pp. 1443–1452.
- Machado, L., M. Magnusson, N.A. Paul, R. Kinley, R. de Nys et al. (2016): Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* that promote antimethanogenic activity in vitro. *Journal of Applied Phycology*, Vol. 28:5, pp. 3117–3126.
- Machado, L., M. Magnusson, N.A. Paul, R. De Nys & N. Tomkins (2014): Effects of marine and freshwater macroalgae on in vitro total gas and methane production, Vol. 9:1, available at:<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0085289>.
- Machado, L. (2015): Tropical macroalgae as a natural alternative for the mitigation of methane emissions in ruminant livestock systems. PhD thesis, James Cook University.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, K. Bender, D. Buckley & D.A. Stahl (2014a): *Brock Biology of Microorganisms, 14th Ed. International Microbiology*. 14th ed., Pearson Education pp. 430-445
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, K. Bender, D. Buckley & D.A. Stahl (2014b): *Brock Biology of Microorganisms, 14th Ed. International Microbiology*. 14th ed., Pearson Education, pp. 708-712.
- Maia, M.R.G., A.J.M. Fonseca, H.M. Oliveira, C. Mendonça & A.R.J. Cabrita (2016): The potential role of seaweeds in the natural manipulation of rumen fermentation and methane production. *Scientific Reports*, Vol. 6, pp. 1–10.
- Makkar, H.P.S., G. Tran, V. Heuzé, S. Giger-Reverdin, M. Lessire et al. (2016): Seaweeds for livestock diets: A review. *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 212:, pp. 1–17.
- Masterton, W.L., C.N. Hurley & E.J. Neth (2011): Atoms, Molecules, and Ions. *Chemistry Principles and Reactions*, pp. 27–40.

- McDonald, P., R. a Edwards, J.F.D. Greenhalgh, C. a Morgan, L. a Sinclair et al. (2011): Digestion. *Animal Nutrition*. 7th ed., Pearson Education, pp. 175–179.
- Mikkelsen, M.H. Albrektsen, R. & Gyldenkærne, S. 2011: *Danish emission inventories for agri- culture. Inventories 1985 - 2009*. National Environmental Research Institute, Aarhus University. NERI Technical Report No. 810. 136 pp. Available at <http://www.dmu.dk/Pub/FR810.pdf>
- Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri (2010): *Havet – en uudnyttet ressource*. Fødevareministeriet, København
- Molina-Alcaide, E., M.D. Carro, M.Y. Roleda, M.R. Weisbjerg, V. Lind et al. (2017): In vitro ruminal fermentation and methane production of different seaweed species. *Animal Feed Science and Technology*, Elsevier, Vol. 228:March, pp. 1–12.
- Moloney, A.P., A.A. Almiladi, M.J. Drennan & P.J. Caffrey (1994): Rumen and blood variables in steers fed grass silage and rolled barley or sugar cane molasses-based supplements. *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 50:1–2, pp. 37–54.
- Montgomery, J.L., V.G. Allen, K.R. Pond, M.F. Miller, D.B. Wester et al. (2001): Tasco-Forage: IV. Influence of a seaweed extract applied to tall fescue pastures on sensory characteristics, shelf-life, and vitamin E status in feedlot-finished steers. *Journal of Animal Science*, Vol. 79:4, pp. 884–894.
- Nielsen, M.O., K. Larsen, A.S. Jensen & H.H. Hansen (2017): Steam drying compared to drum drying markedly increases early phase rumen fermentability of sugar beet pulp. *ESST Conference 2017*. Vol. 142, Sugar industry, Dresden, pp. 693–698.
- Nielsen, P., C. Saurel & A.J. Tang Dalsgaard (2015): Samtidigt opdræt af blåmuslinger og tang i forbindelse med havbrug. DTU Aqua-rapport nr. 297.
- Owens, F.N. & M. Basalan (2016): Ruminant Fermentation. In: Millen, D.D., Arrigoni, M.D.B. and Pacheco, R.D.L. (Eds.), *Rumenology*, Springer, Cham, pp. 63–102.
- Paul, N.A., R. De Nys & P.D. Steinberg (2006): Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: Linking structure with function. *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 306:, pp. 87–101.

Puniya, A.K., R. Singh & D.N. Kamra (2015a): *Rumen microbiology: From evolution to revolution*.

Satessa, G.D., J. Legarth, M.O. Nielsen, R. Dhakal & H.H. Hansen (2017): Effects of seaweeds and other feed additives on in vitro rumen fermentation, methane and total gas production, pp. 1.

Soltan, Y.A., A.S. Natel, R.C. Araujo, A.S. Morsy & A.L. Abdalla (2018): Progressive adaptation of sheep to a microencapsulated blend of essential oils: Ruminal fermentation, methane emission, nutrient digestibility, and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology*, Elsevier, Vol. 237:May 2017, pp. 8–18.

Tomkins, N.W., S.M. Colegate & R.A. Hunter (2009): A bromochloromethane formulation reduces enteric methanogenesis in cattle fed grain-based diets. *Animal Production Science*, Vol. 49:12, pp. 1053–1058.

Van Soest, P.J. Van (1994): *Nutritional ecology of the ruminant*. Second edition. Cornell University Press. pp. 268-280

Vissers, A.M., W.F. Pellikaan, A. Bouwhuis, J.P. Vincken, H. Gruppen et al. (2017): Laminaria digitata phlorotannins decrease protein degradation and methanogenesis during in vitro ruminal fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, November, available at: <http://doi.org/10.1002/jsfa.8842>.

Wang, Y., Z. Xu, S.J. Bach & T.A. McAllister (2008): Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 145:1–4, pp. 375–395.

Wegeberg, S. & C. Felby (2010): *Introduktion Til Alger*, Københavns Universitet.

Weisbjerg, M.R., P. Lund & T. Hvelpelund (2003): Kulhydratomsætningen i mave-tarmkanalen. *Kvægets Ernæring Og Fysiologi Bind 1 - Nærringsstof Omsætning Og Fodervurdering*, pp. 239–280.

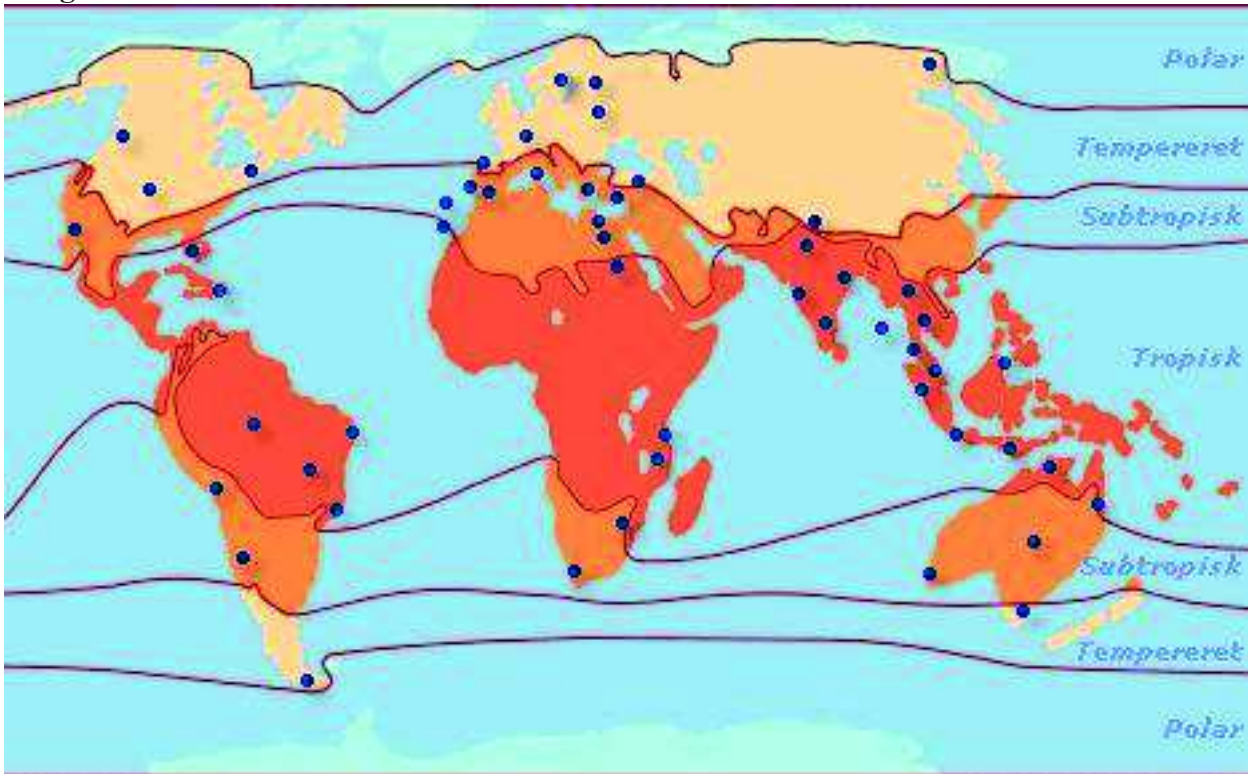
Illerup, J.B, Nielsen, O-K., Winther, M., Mikkelsen, M.H., Lyck, E., Nielsen, M., Hoffmann, L., Gyldenkerne, S. & Thomsen, M. (2007): Projection of Greenhouse Gas Emissions. 2005 to 2030. National Environmental Research Institute, Denmark. 116 pp. – Technical Report from NERI no. 611. <http://www.dmu.dk/Pub/FR611>. Reproduction

Yáñez-Ruiz, D.R., A. Bannink, J. Dijkstra, E. Kebreab, D.P. Morgavi et al. (2016): Design, implementation and interpretation of in vitro batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants-a review. *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 216:, pp. 1–18.

Aaes, O., C.F. Børsting, J. Sehested & T. Hvelplund (2003): Med Fokus På Kvælstof , Fosfor Og Metan. *Kvægets Ernæring Og Fysiologi Bind 2*, pp. 324–340.

9. Bilag

Bilag 1: Verdenskort



(Krog-Pedersen & Nissen, 2010)

Bilag 2: Beskrivelse af in vitro metoden

In vitro fermenteringen går ud på at man tidligt om morgenen indsamler vomvæske fra en ko, før den er blevet fodret og ingen adgang har haft til vand en time før indsamling. Vomvæsken transporteres hurtigt muligt til laboratoriet og holdes i termokander for at opretholde en temperatur på ca. 39 grader. Vomvæsken blev ved ankomst til laboratoriet filtreret og blandet sammen med et anaerobt medium også på 39 grader bestående af deioniseret vand, mikro mineral opløsning, buffer, macromineral opløsning, og en redox indikator. Væsken tilsættes nu til de forskellige substrater i forskellige flasker, og der bliver koblet en gaspose på hver af disse og de indsættes i inkubatoren. Inkubatorer er 39 grader varm og ryster vomvæskerne ligesom den også ville være blevet i vommen ved vom kontraktioner. Den totale gasproduktion måles gennem hele forsøget som foregik over 48 timer. Når forsøget er slut aftages gasposerne og vomvæske filtreres gennem hver deres filter så der kan måles hvor meget tørstof der er nedbrudt under forsøget. Filtrene lod vi dryppe af og de blev herefter lagt ind i en ovn så de kan tørres. Til sidst blev der lavet gaskromatografi på alle gasposerne, hvorved man kunne se mængden af de forskellige gasser herunder metan, som var blevet produceret under forsøget.

A.nodosum var også tilsat i foderet i et andet forsøg(Bach et al., 2008) med lam. Lammene blev fodret ad libitum med pelleteret foder der indeholder hele bygkorn (70%), alfalfa hø (16 %) raps(5%), sojabønner (3,4 %), sukkerroemasse(2 %) og mineraler og vitaminer mm. På dag 56 blev der drysset *A. nodosum* over basalfoderet i enten 14 dage med 10 eller 20 g/ kg foder eller i 28 dage med 10 g/kg foder eller i 7 dage med 20 g/kg foder. Efter perioden hvor der var givet supplement med *A. nodosum* fik lammene kun basalfoderet og fik lov til at vokse videre ind til de alle noget en vis vægt på 45-55 kg, hvorefter de blev slagtet. *A. nodosum* viste sig ikke at påvirke vækstraten, fodereffektiviteten eller foderindtag. Derudover blev slagtekropskvaliteten heller ikke påvirket, hvilket ikke var tilfældet med forsøget lavet i Braden et al., (2007) og Montgomery et al., (2001).