



Aus dem Institut für Tierernährung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

## Entwicklung eines praxistauglichen, indirekten Markers für die Methanemission von Milchkühen anhand des Fettsäuremusters in der Milch

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Stefanie Wanda Engelke**  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2019  
Journal-Nr.: 4155







Aus dem Institut für Tierernährung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Entwicklung eines praxistauglichen, indirekten Markers für die Methanemission von  
Milchkühen anhand des Fettsäuremusters in der Milch**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Stefanie Wanda Engelke**

Tierärztin aus Berlin

Berlin 2019

**Journal-Nr.: 4155**

**Gedruckt mit Genehmigung**  
**des Fachbereichs Veterinärmedizin**  
**der Freien Universität Berlin**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
**Erster Gutachter:** Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
**Zweiter Gutachter:** Prof. Dr. Cornelia C. Metges  
**Dritter Gutachter:** Univ.-Prof. Dr. Rudolf Staufenbiel

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dairy cows, methane production, prediction, markers, milk composition, fatty acids, infrared spectroscopy, diet, dietary carbohydrate, dietary fat, linseed

**Tag der Promotion: 23.12.2019**

Coverbild:

Milchkühe nach dem Melken am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)  
von Stefanie W. Engelke

*»Die Leute haben Sterne, aber es sind nicht die gleichen. Für die einen, die reisen, sind die Sterne Führer. Für andere sind sie nichts als kleine Lichter. Für wieder andere, die Gelehrten, sind sie Probleme. Für meinen Geschäftsmann waren sie Gold. Aber all diese Sterne schweigen. Du, du wirst Sterne haben wie sie niemand hat... [...] Du allein wirst Sterne haben, die Lachen können!«*

Antoine de Saint-Exupéry aus »Der kleine Prinz«

INHALTSVERZEICHNIS

**Tabellenverzeichnis ..... VI**  
**Abbildungsverzeichnis ..... IX**  
**Abkürzungsverzeichnis..... XI**

**1. Allgemeine Einführung..... 1**

**2. Literaturüberblick ..... 3**

**2.1 Die Methanemission des Rindes ..... 3**

2.1.1 Die Kohlenhydratfermentation im Pansen ..... 3

2.1.2 Der Einfluss der Rationsgestaltung auf die Methanogenese ..... 5

2.1.3 Gegenwärtige Methoden zur Quantifizierung der CH<sub>4</sub>-Emission..... 9

**2.2 Das Fettsäuremuster im Milchfett des Rindes..... 11**

2.2.1 Die Milchfettsäurebildung ..... 11

2.2.2 Einflussfaktoren auf das Fettsäuremuster und die Bedeutung der Fütterung ... 13

2.2.3 Grundprinzip zweier Methoden zur Quantifizierung der Milchfettsäuren ..... 17

**2.3 Milchfettsäuren als CH<sub>4</sub>-Indikator für Milchrinder..... 20**

**3. Milk fatty acids estimated by mid-infrared spectroscopy and milk yield can predict methane emissions in dairy cows ..... 29**

**3.1 Abstract ..... 30**

**3.2 Introduction ..... 31**

**3.3 Materials and methods ..... 33**

3.3.1 Animals, experimental design and diets ..... 33

3.3.2 Determination of methane production, feed and milk composition ..... 33

3.3.3 Statistical analyses ..... 35

3.3.3.1 Development of prediction equations and computing of correlations.... 35

3.3.3.2 Cross-validation of prediction equations ..... 36

**3.4 Results and discussion..... 37**

3.4.1 Methane emission and milk fatty acid composition ..... 37

3.4.2 Predicting methane emission ..... 38

**3.5 Conclusion ..... 43**

**3.6 Acknowledgments ..... 44**

**3.7 Autorenbeiträge ..... 45**



<b>4. Methane prediction based on individual or groups of milk fatty acids for dairy cows fed rations with or without linseed .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Abstract .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Introduction .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3 Materials and methods .....</b>	<b>50</b>
4.3.1 Animals, Experimental Design and Diets .....	50
4.3.2 Feed Sampling and Analyses .....	52
4.3.3 Methane Measurements .....	52
4.3.4 Milk Sampling and Analyses .....	53
4.3.5 Calculations and Statistical Analysis .....	54
4.3.5.1 ANOVA .....	54
4.3.5.2 Regression Models and Validation .....	56
<b>4.4 Results .....</b>	<b>58</b>
4.4.1 Animal Performance and Methane Production .....	58
4.4.2 MFA Composition and Correlations with Methane Production .....	58
4.4.3 Methane Prediction Models Using the Complete Set of MFA Variables .....	61
4.4.4 Methane Prediction Models Using a Reduced Number of MFA Variables .....	61
<b>4.5 Discussion .....</b>	<b>63</b>
4.5.1 Animal Performance, Methane Production Parameters and MFA Composition ..	63
4.5.2 Diet effects on the Relationship between MFA and CH <sub>4</sub> Production, and CH <sub>4</sub> Prediction .....	65
4.5.3 Methane Prediction Models using Full and Reduced Datasets for MFA Variables .....	66
4.5.4 Additional Inclusion of ECM and DMI in Prediction Models .....	67
<b>4.6 Conclusions.....</b>	<b>69</b>
<b>4.7 Acknowledgments .....</b>	<b>70</b>
<b>4.8 Autorenbeiträge .....</b>	<b>71</b>
<b>4.9 Supporting information .....</b>	<b>72</b>
<b>5. Allgemeine Diskussion .....</b>	<b>81</b>
<b>Zusammenfassung der Dissertation/Summary of the Doctoral Thesis .....</b>	<b>86</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>Anhang</b>	
<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>107</b>
<b>Selbständigkeitserklärung .....</b>	<b>108</b>

## Tabellenverzeichnis

### ***Kapitel 2: Literaturüberblick***

Tabelle 2.1. Proportionaler Anteil der gebildeten Fettsäuren aus der Kohlenhydratfermentation in Abhängigkeit der Rationszusammensetzung (adaptiert nach Bannink et al., 2008)

Tabelle 2.2. Prozentuale Anteile von Milchfettsäuren (MFA) und Gruppen von MFA mit den Angaben von Mittelwert ( $M$ ) und Standardabweichung (SD) von Holstein Kühen (adaptiert nach Bobe et al., 2008 und Meignan et al., 2017) unter Berücksichtigung des Ursprungs der Fettsäuren (adaptiert nach Gierus et al., 2009)

Tabelle 2.3. Übersicht der in der Literatur beschriebenen Beziehungen zwischen verschiedenen  $\text{CH}_4$ -Parametern ( $\text{CH}_4$  pro Tag, g/d; pro Trockensubstanzaufnahme [DMI], g/kg; pro fett- und proteinkorrigierte Milch [FPCM], g/kg und pro Milch, g/kg) und individuellen Milchfettsäuren. Symbole in Klammer () kennzeichnen eine Tendenz ( $0,05 < P < 0,1$ ). *Cis* und *trans*-Konfigurationen der Milchfettsäuren sind mit 'c' und 't' abgekürzt.

Tabelle 2.4. Übersicht über publizierte  $\text{CH}_4$ -Vorhersagegleichungen, die Milchfettsäuren (MFA) als Variablen verwendeten. Die Parameter  $\text{CH}_4$  pro Tag (g/d), pro Trockensubstanzaufnahme (DMI; g/kg) und pro Energie-korrigierte Milch (ECM; g/kg) wurden bestimmt

### ***Kapitel 3: Milk fatty acids estimated by mid-infrared spectroscopy and milk yield can predict methane emissions in dairy cows***

Table 3.1. Performance data and milk fatty acid composition of lactating cows ( $N = 20$ ) receiving rations based on grass silage or corn silage with and without linseed supplementation, and performance of milk fatty acid prediction by mid-infrared spectroscopy. Dry matter intake, energy-corrected milk yield, methane emission, and unsaturated fatty acids are abbreviated as DMI, ECM,  $\text{CH}_4$ , and UFA. Performance of mid-infrared spectroscopy equations to predict milk fatty acids: standard error of calibration ( $\text{SE}_C$ ), coefficient of determination of calibration ( $R^2_C$ ), root mean square error (RMSE) of cross-validation, and the cross-validation coefficient of determination ( $R^2_{CV}$ ) (adapted from Engelke et al., 2018)

Table 3.2. Summary of multiple regression equations predicting methane emission. Dataset 1 included milk fatty acids (saturated, unsaturated, mono- and polyunsaturated fatty acids, and *n*-3 fatty acids are abbreviated as SFA, UFA, MUFA, PUFA, and *n*3, as well as isomers of C18:1*cis* and *trans* and single fatty acids of C16:0 and C18:0), whereas datasets 2 and 3 additionally included energy-corrected milk yield (ECM) or dry matter intake (DMI) as independent variables. Equations were developed separately for experimental diets containing grass silage without or with linseed supplementation (GS-L0, GS-LS) and corn silage without or with linseed supplementation (CS-L0, CS-LS) as well as for basal rations (GS, CS), rations without or with linseed supplementation (L0, LS), and all experimental diets collectively. The  $R^2_{Model}$  and the  $P_{Model}$  value of the model, the root mean square error (RMSE) of cross-validation, and the cross-validation coefficient of determination ( $R^2_{CV}$ ) are given (adapted from Engelke et al., 2018)

***Kapitel 4: Methane prediction based on individual or groups of milk fatty acids for dairy cows fed rations with or without linseed***

Table 4.1. Ingredients and chemical composition of the experimental TMR consisting of basal rations based largely on grass silage (GS) or corn silage (CS) without (L0) and with (LS) linseed supplementation (means  $\pm$  SD; n = 5) (adapted from Engelke et al., 2019)

Table 4.2. Performance and methane emission parameters of cows fed basal rations based on grass silage (GS) or corn silage (CS) with or without linseed supplementation (LS or L0, respectively) (adapted from Engelke et al., 2019)

Table 4.3 Individual milk fatty acid (MFA) composition (% of total lipids) of cows fed basal rations based on grass silage (GS) or corn silage (CS) with (LS) or without (L0) linseed supplementation (adapted from Engelke et al., 2019)

Table 4.4. Milk fatty acid (MFA) groups (% of total lipids) as sums of concentrations of individual MFA of cows fed basal rations based on grass silage (GS) or corn silage (CS), with (LS) or without (L0) linseed supplementation (adapted from Engelke et al., 2019)

Table 4.5. Summary of quality parameters and validation results of the multiple regression equations predicting methane production (CH<sub>4</sub>, L/d) using the complete dataset of 43 milk fatty acid (MFA) variable (datasets 1-3), or a reduced number of MFA variables and groups of MFA (datasets 4-6) (adapted from Engelke et al., 2019)

Supplementary Table 4.S1. Nutrient uptake in lactating cows fed basal rations based on grass silage (GS) or corn silage (CS) with (LS) or without linseed supplementation (L0) (adapted from Engelke et al., 2019)

Supplementary Table 4.S2. Composition of milk fatty acid groups used as independent variables to predict methane production of dairy cows for datasets 4 to 6. Groups were defined according to their biochemical relationships. Concentrations of respective individual milk fatty acids (% of total lipids) which compose dataset 1 were summed (adapted from Engelke et al., 2019)

Supplementary Table 4.S3. Mean, SD, minimum as well as maximum values of methane emission parameters of cows fed basal rations based on grass silage or corn silage with or without linseed supplementation for all diets, both diets with no linseed supplementation (L0), and both diets with linseed supplementation (LS) combined (adapted from Engelke et al., 2019)

Supplementary Table 4.S4. Mean, SD, minimum as well as maximum values of milk fatty acid concentrations (% of total lipids), and correlations between MFA concentrations (% of total lipids) and methane production (L/d) (adapted from Engelke et al., 2019)

Supplementary Table 4.S5. Summary of multiple regression equations predicting methane production (CH<sub>4</sub>, L/d). Dataset 1 included 43 MFA, whereas dataset 2 additionally included ECM and dataset 3 DMI, respectively, as independent variables. Dataset 4 included MFA variables only, whereas dataset 5 and 6 additionally included ECM or DMI, respectively. Equations were developed for basal rations (GS, CS), linseed supplementation (L0, LS) and all experimental diets collectively. Validation and quality parameters for methane prediction equations are shown in Table 5 (adapted from Engelke et al., 2019)

## Abbildungsverzeichnis

### ***Kapitel 2: Literaturüberblick***

Abbildung 2.1. Übersicht des bakteriellen Kohlenhydratabbaus im Pansen mit den Hauptendprodukten Acetat, Propionat und Butyrat unter Berücksichtigung der Verwertung von Wasserstoff (adaptiert nach Kirchgeßner, 2011).

Abbildung 2.2. Übersicht der Metabolite der Fettsäurebildung aus Acetat mit den beteiligten Enzymen Acetyl-CoA Synthase (ACS), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und der Fettsäuresynthase (FAS).

Abbildung 2.3. Biohydrierung von  $\alpha$ -Linolensäure zu Stearinsäure im Pansen (adaptiert nach Buccioni et al., 2012).

Abbildung 2.4. Biohydrierung von Linolsäure und Ölsäure zu Stearinsäure im Pansen (adaptiert nach Buccioni et al., 2012).

Abbildung 2.5. Grundprinzip der Quantifizierung von Milchfettsäuren (MFA) anhand der Spektroskopie im mittleren Infrarotbereich (MIR). Zur Kalibrierung wird als Referenzmethode die Gaschromatographie (GC) verwendet. Aus der Kalibrierung resultiert die Gleichung der *Partial-Last-Square-Regression* (PLS), deren Güte über das Bestimmtheitsmaß ( $R^2_C$ ) und dem Standardfehler der Kalibrierung ( $SE_C$ ) definiert wird. Die Korrektheit der PLS-Gleichung wird per Kreuzvalidierung überprüft und spiegelt sich im Bestimmtheitsmaß der Kreuzvalidierung ( $R^2_{CV}$ ) und dem mittleren quadratischen Fehler (RMSE) wieder (adaptiert nach Soyeurt et al., 2006).

### ***Kapitel 3: Milk fatty acids estimated by mid-infrared spectroscopy and milk yield can predict methane emissions in dairy cows***

Figure 3.1. The physiological relationship between feeding and methane emission and between feeding and milk fatty acid composition. Our aim was to generate regression equations to predict methane emission by using the milk fatty acid composition estimated by mid-infrared spectroscopy (adapted from Engelke et al., 2018).

Figure 3.2. Correlation of measured CH<sub>4</sub> emission in liters per day and measured CH<sub>4</sub> emission per kilogram dry matter intake between linseed supplemented and non-supplemented diets considering individual animals (A, B, C, ...), and basal ration (grass silage = green, corn silage = orange) indicating repeatable phenotypes under the effect of either diets with or without linseed. The shaded area depicts the confidence ellipse. The Spearman rank correlation coefficient ( $r$ ) and the probability ( $p$ ) are given (adapted from Engelke et al., 2018).

Figure 3.3. Measured and predicted CH<sub>4</sub> emission derived from the cross-validation of multiple regression equations across all experimental diets (grass silage without linseed, corn silage without linseed, grass silage with linseed and corn silage with linseed) based on dataset 1 (milk fatty acids only) and dataset 2 (milk fatty acids plus energy-corrected milk yield). The shaded area depicts the confidence ellipse. The cross-validation coefficient of determination ( $R^2_{Cross-validation}$ ) and the root mean square error (RMSE) of cross-validation are given (adapted from Engelke et al., 2018).

#### ***Kapitel 4: Methane prediction based on individual or groups of milk fatty acids for dairy cows fed rations with or without linseed***

Figure 4.1. Heatmap of correlations between individual and groups of milk fatty acids (% of total lipids) and methane production (L/d) calculated from data of the combined basal diets [grass silage (GS), corn silage (CS)], each basal diet with (LS) or without (L0) linseed supplementation, and all diets collectively (adapted from Engelke et al., 2019).

**Abkürzungsverzeichnis**

ACC	Acetyl- Coenzym A-Carboxylase ( <i>acetyl coenzym A carboxylase</i> )
ADF	Saure-Detergenzien-Faser ( <i>acid detergent fiber</i> )
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
BW	Körpergewicht ( <i>body weight</i> )
CCC	Konkordanz-Korrelationskoeffizient ( <i>concordance correlation coefficient</i> )
CLA	Konjugierte Linolsäure ( <i>conjugated linoleic acid</i> )
CoA	Coenzym A ( <i>coenzym A</i> )
CP	Rohprotein ( <i>crude protein</i> )
Cp	Konzeptionelles Vorhersagekriterium ( <i>conceptual predictive criterion</i> )
CS	Maissilagebetonte Versuchsration ( <i>experimental total mixed ration containing predominantly corn silage</i> )
DIM	Tage in Milch ( <i>days in milk</i> )
DM	Trockensubstanz ( <i>dry matter</i> )
DMI	Trockensubstanzaufnahme ( <i>dry matter intake</i> )
ECM	Energie-korrigierte Milch ( <i>energy-corrected milk</i> )
EW	Versuchswoche ( <i>experimental week</i> )
FA	Fettsäuren ( <i>fatty acids</i> )
FAME	Fettsäuremethylester ( <i>fatty acid methyl ester</i> )
FAS	Fettsäure-Synthase ( <i>fatty acid synthase</i> )
GC	Gaschromatographie ( <i>gas chromatography</i> )
GS	Grassilagebetonte Versuchsration ( <i>experimental total mixed ration containing predominantly grass silage</i> )
L0	Versuchsration ohne Leinsamen ( <i>experimental ration without linseed</i> )
LS	Versuchsration mit Leinsamen ( <i>experimental ration with linseed</i> )
LSM	Mittelwert der kleinsten Quadrate ( <i>last square mean</i> )
MIRS	Infrarotspektroskopie im mittleren Infrarotbereich ( <i>mid-infrared spectroscopy</i> )
MFA	Milchfettsäuren ( <i>milk fatty acids</i> )
MUFA	Einfach ungesättigte Fettsäuren ( <i>monounsaturated fatty acids</i> )
NDF	Neutral-Detergenzien-Faser ( <i>neutral detergent fiber</i> )
NEFA	Unveresterte Fettsäuren ( <i>non-esterfied fatty acids</i> )
NE <sub>L</sub>	Netto-Energie-Laktation ( <i>net energy for lactation</i> )
NSC	Nichtstruktur-Kohlenhydrate ( <i>non-structural carbohydrates</i> )

$P$	Signifikanzwert ( <i>probability-value</i> )
PLS	Regression-der-partiellen-kleinsten-Quadrate ( <i>partial-least-square regression</i> )
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren ( <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
$r$	Korrelationskoeffizient ( <i>correlation coefficient</i> )
$R^2_{Adj}$	angepasstes Bestimmtheitsmaß der Regressionsgleichung ( <i>adjusted coefficient of determination of the regression model</i> )
$R^2_C$	Bestimmtheitsmaß der Kalibrierung ( <i>coefficient of determination of calibration</i> )
$R^2_{CV}$	Bestimmtheitsmaß der Kreuzvalidierung ( <i>coefficient of determination of cross-validation</i> )
$R^2_{Model}$	Bestimmtheitsmaß der Regressionsgleichung ( <i>coefficient of determination of the regression model</i> )
$R^2_{Validation}$	Bestimmtheitsmaß der Validierung [andere Verfahren als die Kreuzvalidierung] ( <i>coefficient of determination of validation</i> )
RMSE	Mittlerer quadratischer Fehler ( <i>root mean square error</i> )
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SE	Standardfehler ( <i>standard error</i> )
$SE_C$	Standardfehler der Kalibrierung ( <i>standard error of calibration</i> )
SFA	Gesättigte Fettsäuren ( <i>saturated fatty acids</i> )
TMR	Totale Mischration ( <i>total mixed ration</i> )
UFA	Ungesättigte Fettsäuren ( <i>unsaturated fatty acids</i> )
wk	Woche ( <i>week</i> )



## 1. Allgemeine Einführung

Methan (CH<sub>4</sub>) ist eines der bedeutendsten Klimagase in der Atmosphäre und der Weltklimarat bewertet das Treibhausgaspotential von CH<sub>4</sub> 28-mal höher als das von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) (IPCC, 2014). Aktuell finden deutliche Klimaveränderungen statt, von denen ein Großteil auf den Menschen zurückzuführen sind (IPCC, 2013, Fischer and Knutti, 2015). In dem „Aktionsprogramm Klimaschutz 2020“ setzt sich Deutschland das Ziel, die Treibhausgasemissionen bis 2020 um mindestens 40% gegenüber denen von 1990 zu senken. Die Nutztierhaltung spielt eine wesentliche Rolle, da sie mit 7-18% an den von Menschen verursachten Treibhausgasen beteiligt ist (Hristov et al., 2013b). In der Milchwirtschaft ist CH<sub>4</sub> mit einem Anteil von 46% der Hauptverursacher von Emissionen und entsteht zu 80% während der Verdauung bei Rindern (Opio et al., 2013, Jayasundara et al., 2016). Die Voraussetzung für die Umsetzung von CH<sub>4</sub>-Minderungsstrategien in der Milchviehwirtschaft ist die Möglichkeit der Quantifizierung und Bewertung der CH<sub>4</sub>-Emission einzelner Tiere und Betriebe. Eine akkurate Quantifizierung der CH<sub>4</sub>-Emission für eine große Anzahl von Tieren ist unter Praxisbedingungen derzeit nicht möglich (Hammond et al., 2016a, Hill et al., 2016, Patra, 2016). Die indirekte Schätzung der CH<sub>4</sub>-Emission anhand von Milchfettsäuren (MFA; *milk fatty acids*) gilt derzeit als besonders vielversprechendes Verfahren (Rico et al., 2016, Negussie et al., 2017, van Gastelen et al., 2017). Die präzise Standardanalyse individueller MFA-Konzentrationen ist die Gaschromatographie (GC; *gas chromatography*), die jedoch teuer und aufwändig und damit wenig praktikabel für ein sehr großes Probenaufkommen ist (van Gastelen and Dijkstra, 2016). Dagegen ist die Infrarotspektroskopie im mittleren Infrarotbereich (MIRS; *mid-infrared spectroscopy*) ein schnelles und einfaches Verfahren, das vor allem Konzentrationen von Major-MFA und MFA-Gruppen sicher vorhersagt (Soyeurt et al., 2011, De Marchi et al., 2014, Eskildsen et al., 2014). Die Methode MIRS wird bereits flächendeckend von den Milchkontrollverbänden eingesetzt, um Qualitätsparameter zu bestimmen (De Marchi et al., 2014). Eine MFA-Analyse würde sich daher leicht in die Untersuchungen der Kontrollverbände implementieren lassen. In Untersuchungen wurde MIRS bereits verwendet, um die Höhe der CH<sub>4</sub>-Emission von Rindern direkt aus dem globalen Infrarotspektrum der Milch abzuleiten (Dehareng et al., 2012, Vanlierde et al., 2016, Shetty et al., 2017). Bisher lag jedoch noch keine Studie vor, in der konkrete MFA-Konzentrationen mit der MIRS-Methode bestimmt wurden, und als Variablen zur Ableitung einer CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen verwendet wurden. Überdies gilt die aufgenommene Futtermenge als wichtigster Faktor für die Höhe der produzierten CH<sub>4</sub>-

Emission im Pansen (Knapp et al., 2014) und ist ferner maßgeblich für die Milchleistung des Tieres verantwortlich (Negussie et al., 2017). Daher soll in dieser Arbeit ein praxistauglicher CH<sub>4</sub>-Marker für Rinder abgeleitet werden, der auf MIRS-vorhergesagten MFA beruht und die zusätzliche Berücksichtigung der Parameter Futteraufnahme oder Milchleistung untersucht. Weiterhin werden rationspezifische und rationsgepoolte Vorhersagegleichungen abgeleitet. In den experimentellen totalen Mischrationen (TMR; *total mixed ration*) kommen zwei in der Praxis gefütterte Grundfuttermittel (Gras- und Maissilage) zum Einsatz, die mit oder ohne der Supplementierung von extrudierten Leinsamen als methanreduzierende Komponente gefüttert wurden.

Die vorliegende Arbeit gibt in Kapitel 2 zunächst einen Überblick über den Wissensstand zur Entstehung von CH<sub>4</sub> im Pansen und über die Bildung der MFA und stellt ferner Zusammenhänge zur Fütterung vor. Zudem werden die aktuellen Möglichkeiten der CH<sub>4</sub>-Messung beim Rind beschrieben sowie die Methoden GC und MIRS zur Bestimmung der MFA-Konzentrationen erläutert. Darauffolgend wird der aktuelle Kenntnisstand zur indirekten Quantifizierung der CH<sub>4</sub>-Emission anhand von MFA vorgestellt. Kapitel 3 konzentriert sich auf die Entwicklung eines praxistauglichen CH<sub>4</sub>-Indikators für Milchrinder anhand von MFA, die mit der Methode MIRS analysiert wurden. Kapitel 4 vergleicht verschiedene CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen, die sich in der Anzahl und Auswahl individueller, mittels GC analysierter MFA oder Gruppen von MFA unterscheiden. In einer abschließenden allgemeinen Diskussion (Kapitel 5) werden die wichtigsten Ergebnisse kritisch beleuchtet und Möglichkeiten und Grenzen der indirekten CH<sub>4</sub>-Quantifizierung anhand des MFA-Musters erörtert.

## 2. Literaturüberblick

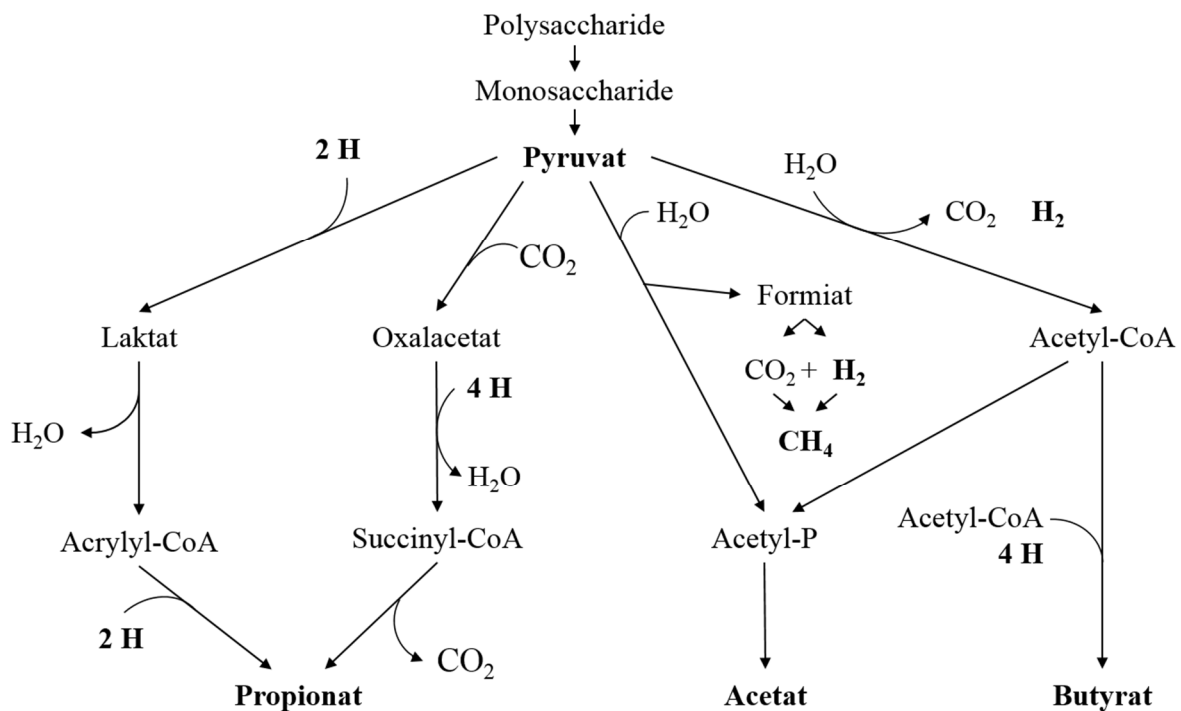
### 2.1 Die Methanemission des Rindes

#### 2.1.1 Die Kohlenhydratfermentation im Pansen

Die Verdauung in den Vormägen steht in enger Beziehung zur mikrobiellen Besiedlung. Der Pansen beinhaltet ein komplexes anaerobes Ökosystem aus Bakterien, Protozoen, Pilzen und Archaeen, die in Symbiose mit dem Rind als Wirt leben (Morgavi et al., 2010, Enjalbert et al., 2017). Die Besiedlung durch die Mikroorganismen ermöglicht den Wiederkäuern den Aufschluss und die energetische Verwendung von Strukturkohlenhydraten der Pflanzenzellwände, die nicht durch die körpereigenen Enzyme abgebaut werden können (Morgavi et al., 2013). Während die freiwerdende Energie aus den Abbauprozessen von den Mikroben selbst genutzt wird, stellen die Mikroben dem Wirt im Gegenzug die Fermentationssäuren sowie das hochwertige Mikrobenprotein zur Verfügung. Die aus dem Kohlenhydratabbau resultierenden Monosaccharide werden zu Pyruvat abgebaut. Nachfolgend werden auf verschiedenen Stoffwechselwegen die drei kurzkettigen Fettsäuren (FA; *fatty acids*) Acetat, Propionat und Butyrat gebildet, währenddessen in unterschiedlichem Umfang die Pansengase CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub> anfallen (Kirchgeßner, 2011). Die kurzkettigen FA dienen als Hauptenergiequelle für den Wiederkäuer, da auch die Glucose im Pansen größtenteils zu Pyruvat fermentiert wird. Die Menge und das Verhältnis von den gebildeten kurzkettigen FA sind abhängig von der Fütterung. Dennoch überwiegt stets die Bildung von Acetat, gefolgt von Propionat und Butyrat. Diese drei Repräsentanten machen 95% der gebildeten FA im Pansen aus (Bannink et al., 2006). Acetat kann auf zwei Wegen entstehen (Abbildung 2.1). Bevorzugt läuft der Pyruvat-Formiatlyase-Weg ab, bei dem aus Pyruvat die Produkte Formiat und Acetat gebildet werden. Alternativ steht der Pyruvat-Ferridoxin-Oxireduktase-Weg zur Verfügung, bei dem aus Pyruvat das Produkt Acetyl-Coenzym A (CoA; *coenzym A*) und anschließend Acetat entsteht. Bei diesem Stoffwechselweg wird Wasserstoff (H<sub>2</sub>) frei, der nachfolgend als Reduktionsmittel von Archaeen genutzt wird, um CH<sub>4</sub> aus dem Substrat CO<sub>2</sub> zu bilden. Neben CO<sub>2</sub> dienen auch Acetat, Formiat, Methylamin und Methanol als Substrat der Methanogenese (Hook et al., 2010, Morgavi et al., 2010, Brade and Distl, 2015). Die vorherrschende Archaeengattung im Pansen der Rinder ist die Gruppe der *Methanobrevibacter* (Leahy et al., 2013, Henderson et al., 2015, Danielsson et al., 2017), die die Carbonatmung als Hauptweg der Methanogenese verwenden (Martin et al., 2010):

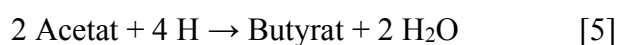
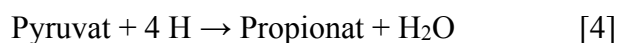
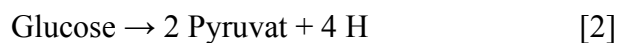


Die Bildung von Butyrat ist über Acetyl-CoA an die Acetatbildung gekoppelt. Während im ersten Schritt bei der Bildung von Pyruvat zu Acetyl-CoA  $H_2$  freigesetzt wird, werden im nächsten Schritt zwei  $H_2$  benötigt um aus zwei Molekülen Acetyl-CoA die FA Butyrat zu bilden. Die kurzkettige FA Propionat kann ebenfalls auf zwei verschiedenen Wegen aus Pyruvat entstehen. Es ist zum einen der Acrylyl-CoA-Weg zu nennen, der über Laktat verläuft sowie der Succinatweg, der über Oxalacetat verläuft. Beiden Wegen ist gemein, dass sie  $H_2$  verbrauchen (Kirchgeßner, 2011).



**Abbildung 2.1.** Übersicht des bakteriellen Kohlenhydratabbaus im Pansen mit den Hauptendprodukten Acetat, Propionat und Butyrat unter Berücksichtigung der Verwertung von Wasserstoff (adaptiert nach Kirchgeßner, 2011).

Die Kohlenhydratfermentation im Pansen kann folgendermaßen zusammengefasst werden (Knapp et al., 2014):



Aufgrund der jeweiligen Stoffwechselwege kann man also sagen, dass die Bildung von Acetat die Methanogenese und die Höhe der CH<sub>4</sub>-Produktion durch freiwerdende H<sub>2</sub>-Moleküle fördert,

während die Bildung von Propionat  $H_2$ -Moleküle benötigt und die Bildung von Butyrat eine ausgeglichene  $H_2$ -Bilanz aufweist. Im Pansen fallen 90% der gesamten produzierten  $CH_4$ -Menge an und werden über den Ruktus abgegeben. Der übrige  $CH_4$ -Anteil wird im Darm gebildet und davon werden wiederum bis zu 89% vom Blut absorbiert und abgeatmet, sodass nur ein sehr geringer Anteil über den Darm selbst ausgeschieden wird (Hammond et al., 2016a). Die Höhe der  $CH_4$ -Produktion variiert je nach Fütterung, Gewicht, Milchleistung und Trockensubstanzaufnahme (DMI; *dry matter intake*) des Tieres (Martin et al., 2010). Während die tägliche  $CH_4$ -Emission ( $CH_4/d$ , L/d) von Johnson and Johnson (1995) noch mit 250 bis 500 L angegeben wurde, fanden Boadi et al. (2004) bereits bis zu 640 L pro Tag. Mit dem gebildeten  $CH_4$  geht ein beträchtlicher Teil von 2 bis 12% der aufgenommenen Bruttoenergie über den Ruktus verloren (Johnson and Johnson, 1995). Die Bildung von  $CH_4$  ist dennoch eine physiologische Notwendigkeit, da das anfallende Stoffwechselprodukt  $H_2$  andernfalls im Pansen akkumulieren und sich negativ auf die Mikroorganismen und ihre Stoffwechselprozesse auswirken würde (McAllister and Newbold, 2008, Cottle et al., 2011).

### **2.1.2 Der Einfluss der Rationsgestaltung auf die Methanogenese**

Die Höhe der Futteraufnahme, die Zusammensetzung des Futters, die Verweildauer und die Umsatzrate der Fermentation und Methanogenese haben einen Einfluss auf die  $CH_4$ -Produktion im Pansen (Johnson and Johnson, 1995, Beauchemin et al., 2009). In einem Übersichtartikel von Knapp et al. (2014) wurde festgehalten, dass die DMI für 52 bis 64% der Schwankungen verantwortlich ist und damit entscheidend für die tägliche  $CH_4$ -Emission. Die DMI ist darüber hinaus substanziell für die verfügbare Energie und für die Produktionsleistung des Tieres. Bezieht man die Produktebene bei der  $CH_4$ -Emission mit ein, für Milchrinder ist das die Energie-korrigierte Milch (ECM; *energy-corrected milk*), sinkt die  $CH_4$ -Emission/kg ECM ( $CH_4/ECM$ , L/kg) bei steigender DMI und Milchleistung. Das erklärt sich zum einen dadurch, dass die erhöhte Futteraufnahme zu einer reduzierten Verweildauer und Fermentationsleistung im Pansen führt (Kumar et al., 2014) und mit einer verminderten  $CH_4$ -Produktion einhergeht. Zum anderen wird die Produktionsleistung pro Tier durch die erhöhte Energieaufnahme gesteigert, sodass anteilig die benötigte Energie und der verbundene  $CH_4$ -Ausstoß für den Erhaltungsbedarf reduziert wird (Yan et al., 2010, Bannink et al., 2011). Die Zusammensetzung des Futters ist ein weiterer entscheidender Einflussfaktor der  $CH_4$ -Emission (Cottle et al., 2011, Jiao et al., 2014, Hart et al., 2015). Der größte Teil der Futtermittel für Wiederkäuer besteht aus Kohlenhydraten; ihr Anteil sowie ihre Qualität beeinflussen die  $CH_4$ -Produktion im Pansen. Kohlenhydrate werden in Strukturkohlenhydrate der Zellwände und Nichtstruktur-

Kohlenhydrate (NSC; *non-structural carbohydrates*) des Zellinhaltes eingeteilt. Die Summe der Gerüstsubstanzen der Zellwand wird aufgrund des chemischen Analyseverfahrens als Neutral-Detergenzien-Faser (NDF; *neutral detergent fiber*) zusammengefasst und beinhaltet die Hauptkomponenten Hemicellulose, Cellulose und Lignin. Cellulose und Lignin können weiter durch die Saure-Detergenzien-Faser (ADF; *acid detergent fiber*) charakterisiert werden, die ferner auch säureunlöslichen Stickstoff, Asche und Silikat enthält (van Soest et al., 1991, Kamphues, 2014). Futtermittel mit einem hohen Anteil an Strukturkohlenhydraten, werden im Pansen proportional zugunsten von Acetat fermentiert (Tabelle 2.1) und steigern entsprechend die CH<sub>4</sub>-Produktion durch freiwerdende H<sub>2</sub>-Moleküle. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf dem Anteil der verdaulichen NDF gegenüber dem Gesamt-NDF, da NDF auch verdaut werden muss, um an der CH<sub>4</sub>-Produktion beteiligt zu sein (Knapp et al., 2014, Appuhamy et al., 2016). Im Zellinhalt finden sich hochverdauliche NSC wie Stärke, Zucker, Fruktane, Galaktane, Pektine und β-Glukane. Futtermittel, die reich an NSC sind, verschieben die Proportionen der kurzkettigen FA in Richtung von Propionat auf Kosten von Acetat und stellen einen CH<sub>4</sub>-ärmeren Stoffwechselweg dar (Ellis et al., 2008, Hook et al., 2010, Grainger and Beauchemin, 2011). Es sei darauf hingewiesen, dass die vorherrschenden Mikroorganismenspezies im Pansen ausschlaggebend für den Fermentationsweg der Kohlenhydrate ist und nicht die chemische Struktur der Kohlenhydrate selbst (Bannink et al., 2008, Gomez et al., 2016).

**Tabelle 2.1.** Proportionaler Anteil der gebildeten Fettsäuren aus der Kohlenhydratfermentation in Abhängigkeit der Rationszusammensetzung (adaptiert nach Bannink et al., 2008)

Fettsäure (%)	Cellulosereich	Stärkereich
Acetat	56 – 66	40 - 49
Propionat	1 – 20	30 - 31
Butyrat	17 - 23	15 - 20

Bei einem Austausch von Luzernen-, Gersten- und Grassilage mit Maissilage in der Ration wurde ein Rückgang der CH<sub>4</sub>-Emission pro DMI (CH<sub>4</sub>/DMI, g/kg) von 11 bis 14% beobachtet (Hassanat et al., 2013, Benchaar et al., 2014, van Gastelen et al., 2015). In einer weiteren Studie wurde kein Unterschied von CH<sub>4</sub>/DMI bei steigendem Gehalt an Stärke in der Ration festgestellt (Hatew et al., 2015), während gesteigerte NDF-Gehalte in Kombination mit Mais-, aber nicht mit Grassilage zu einer Zunahme von CH<sub>4</sub>/DMI führten (Hammond et al., 2016b). Damit ein CH<sub>4</sub>-mindernder Effekt durch Stärke in der Ration eintritt, muss der

Konzentratgehalt über 400 g/kg Trockensubstanz (DM; *dry matter*) erreichen (Hristov et al., 2013a).

Wissenschaftliche Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Supplementierung von fettreichen Futtermitteln und insbesondere die Zufuhr von ungesättigten FA (UFA; *unsaturated fatty acids*) die CH<sub>4</sub>-Emission um bis zu ≥ 40% senken kann, wobei durch eine moderate Fettsupplementierung etwa 10 bis 15% Reduktion erreicht werden können (Beauchemin et al., 2008, Hook et al., 2010, Hristov et al., 2013b). Mit einer Supplementierung je 1% Fett (pro kg DM) in der Gesamtration, können 4 bis 6,5% Reduktion der CH<sub>4</sub>-Emission erreicht werden (Clark, 2013, Guyader et al., 2015). Die CH<sub>4</sub>-hemmende Wirkung der Fette hängt von ihrer Konzentration, der FA-Zusammensetzung und von der Rationszusammensetzung ab (Eugène et al., 2008, Patra, 2013) und gründet sich vor allem auf das Herabsetzen der Aktivität cellulolytischen Bakterien und Protozoen (Maia et al., 2007, Ivan et al., 2013, Guyader et al., 2014). Protozoen sind durch die Bereitstellung von Hemicellulasen am Zellwandabbau beteiligt und dienen darüber hinaus als Wirt für die methanogenen Archaeen (Beauchemin et al., 2008, Guyader et al., 2014). Die Protozoen ermöglichen einen Interspezies-Wasserstoff-Transfer als Voraussetzung für die Methanogenese der Archaeen (Hook et al., 2011, Guyader et al., 2014). Die  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3*cis*9, *cis*12, *cis*15 kurz C18:3*n*-3) hat einen besonders hemmenden Effekt auf die Methanogenese, während die Gruppe der gesättigten FA (SFA; *saturated fatty acids*) keinen Einfluss auf die CH<sub>4</sub>-Produktion hat (Patra, 2013). Die UFA aus dem Futter dienen während der Biohydrierung im Pansen als H<sub>2</sub>-Akzeptor und senken die H<sub>2</sub>-Verfügbarkeit. Der Beitrag der Biohydrierung zur Verwertung von metabolischen H<sub>2</sub> ist mit 1 bis 2% als klein zu bewerten (Lourenco et al., 2010, Martin et al., 2010). Fütterungsfette gelten unter den Futteradditiven als am besten geeignet, um die CH<sub>4</sub>-Emission in kommerziellen Betrieben zu senken (Doreau and Ferlay, 2015, Caro et al., 2016, Martin et al., 2016). Leinsamen sind besonders reich an C18:3*n*-3 und zählen damit zu den effektivsten CH<sub>4</sub>-reduzierenden Ölsaaten (Martin et al., 2010, Benchaar et al., 2015). Vorteile in der Fütterung von UFA ergeben sich zudem aus kalorischen und nonkalorischen Gründen (Jenkins and Harvatine, 2014). Aus der gesteigerten Energiedichte in der Ration und durch die gesteigerte Verfügbarkeit von essentiellen FA ergibt sich zusätzlich eine mögliche Verbesserung der Reproduktionsleistung (Rabiee et al., 2012, Leroy et al., 2014, Jahani-Moghadam et al., 2015). Die Ergänzung von extrudierten Leinsamen (5% pro kg DM) oder Leinöl (4% pro kg DM) zur Fütterungsration führte zu einer Reduktion der CH<sub>4</sub>-Emission (L/d) von 6 bis 21% (Martin et al., 2016, Bayat et al., 2018) und von 10 bis 36% (Benchaar et al., 2015, Guyader et al., 2015). Demgegenüber konnte bei einer Supplementierung von 4% Leinöl keine (Veneman et al., 2015)

und bei einer Supplementierung von 5% gemahlene Leinsamen nur eine Reduktion in Kombination mit Gerstensilage-basierender Diäten, aber nicht mit Heu-basierten Diäten, erreicht werden (Chung et al., 2011).

Auch die Verweildauer (Passagerate) beeinflusst die Verwertung der Futtermittel im Pansen. Die Passagerate wird größtenteils durch die Futteraufnahme und Größe des Pansens bestimmt, während die Abbaurate von der Art der verabreichten Futtermittel abhängt (von Engelhardt and Breves, 2005, Goopy et al., 2014, Weld and Armentano, 2017). Eine erhöhte Futteraufnahme steigert die Passagerate und verringert somit die Zeit für die Fermentation, Nährstoffverdauung und CH<sub>4</sub>-Produktion (Yan et al., 2010, Aluwong et al., 2011, Cabezas-Garcia et al., 2017). Cellulosereiche Futtermittel werden gegenüber stärkereichen Futtermitteln langsamer abgebaut und wirken sich begünstigend auf die Methanproduktion aus (Dewhurst, 2013, Hristov et al., 2013a). Die mechanische Bearbeitung (Vermahlen und Pelletieren) von Futtermitteln steigert die Fermentationsrate und verschiebt das Verhältnis von den kurzkettigen FA in Richtung von Propionat. Zusätzlich wird die Gesamtkonzentration der kurzkettigen FA gesteigert (Boadi et al., 2004, Bannink et al., 2008).

Ferner wurde entdeckt, dass die CH<sub>4</sub>-Emission bei gleicher Futteraufnahme und Milchleistung variieren kann, was auf die unterschiedliche Spezieszugehörigkeit der Archaeen zurückgeführt wurde (Danielsson et al., 2017). Eine Archaeenspezies (AbM4) wurde mit einer effizienten Futtermittelverwertung von Kühen und einer geringeren CH<sub>4</sub>/DMI (g/kg) assoziiert (Arndt et al., 2015). Zudem wurde ein signifikanter Unterschied in der Archaeenaktivität zwischen viel und wenig CH<sub>4</sub>-emittierenden Tieren unabhängig von der verabreichten Diät gefunden (Roehe et al., 2016).

Die Höhe der CH<sub>4</sub>-Emission kann über die Rationsgestaltung beeinflusst werden. Grundsätzlich kann die CH<sub>4</sub>-Emission reduziert werden, wenn die Verdaulichkeit der Diät steigt (Yan et al., 2010, Warner et al., 2017). Die gewählten Grund- und Kraftfuttermittel wirken auf die Pansenflüssigkeit, das Epithel und das Mikrobiom im Pansen. Es gilt jedoch zu bedenken, dass eine futterinduzierte CH<sub>4</sub>-Reduktion durch eine ausgeprägte stärkereiche Fütterung das Risiko von Stoffwechselerkrankungen, wie der Acidose, steigert (Plaizier et al., 2008, Zebeli et al., 2012, Gomez et al., 2016). Um das Gleichgewicht von Stoffwechselprodukten, pH und Mikroflora im Pansen in einem physiologischen Bereich zu halten, sollte der Anteil von NSC 25 bis 30% pro DM in der Gesamtration nicht überschreiten sowie eine ausreichende Strukturversorgung von mindestens 16% Rohfaser in der Gesamt-DM garantiert sein (Kamphues, 2014). Eine ausgeprägte Anreicherung mit Fetten (> 6% pro DM) sollte ebenfalls vermieden werden, um negative Effekte auf den Pansenstoffwechsel und die Futteraufnahme



zu vermeiden sowie das Risiko einer Milchfettdepression zu senken (Grainger and Beauchemin, 2011, Jayasundara et al., 2016, Kliem et al., 2017). Besonders stärkereiche Rationen in Kombination mit hohen Anteilen an Futterfetten neigen dazu, negative Effekte auszulösen (Benchaar et al., 2015).

In der modernen Milchwirtschaft werden bereits explizit energiereiche Futtermittel angebaut und eingesetzt, um den Bedürfnissen der Hochleistungsmilchkuh gerecht zu werden. Diese leistungs- und CH<sub>4</sub>-effizienten Futterkomponenten müssen bereitgestellt werden und stehen in Konkurrenz mit Ackerflächen und Ressourcen für die humane Ernährung (Beauchemin et al., 2009, Caro et al., 2016). Daher sollte für jede Reduktionsstrategie eine Bilanz der gesamten Produktionskette untersucht werden (Eckard et al., 2010, Eshel et al., 2014, O'Brien et al., 2014).

### **2.1.3 Gegenwärtige Methoden zur Quantifizierung der CH<sub>4</sub>-Emission**

Es sind diverse Strategien zur Reduktion der CH<sub>4</sub>-Emission von Wiederkäuern bekannt, darunter das Fütterungsmanagement und die Steigerung der Produktivität (Grainger and Beauchemin, 2011, Hristov et al., 2013b, Knapp et al., 2014), aber auch die genetische Selektion auf wenig CH<sub>4</sub>-produzierende Tiere (Pinares-Patino et al., 2013, Bell et al., 2014, Pickering et al., 2015). Reduktionsstrategien setzen jedoch die Möglichkeit der Quantifizierung der kuhindividuellen CH<sub>4</sub>-Emission voraus. Die Messmethode muss ein großes Probenaufkommen bewältigen können sowie akkurat, kostengünstig und wiederholbar sein (Patra, 2016, Negussie et al., 2017). Respirationskammern gelten als Goldstandard zur kontinuierlichen Messung von enterischem CH<sub>4</sub> über 24 bis 48 h (Hammond et al., 2016a). In den nach außen abgeschlossenen Respirationskammern wird aus der Differenz der angesaugten Frischluft und der abgeführten Luft aus der Kammer die von dem Tier emittierten Gase bestimmt (Derno et al., 2009). Die CH<sub>4</sub>-Messung mit Respirationskammern ist sehr kostenintensiv, arbeitsaufwendig und erfordert ein hohes Maß an technischer Expertise, was die Tierkapazität des Systems stark begrenzt (Hill et al., 2016, Patra, 2016). Eine Alternative ist die Schwefelhexafluorid Tracermessung (SF<sub>6</sub>-Methode), die ebenfalls über einen längeren Zeitraum und für eine größere Gruppe von Tieren eingesetzt werden kann. Ein Bolus mit Spurengas (SF<sub>6</sub>) wird im Pansen platziert und die ausgestoßene Menge an CH<sub>4</sub> und SF<sub>6</sub> wird in einem Behältnis am Kopf des Tieres gesammelt. Im Labor werden die Konzentrationen der Gase analysiert und aus der bekannten Freisetzungsrate des SF<sub>6</sub> wird die CH<sub>4</sub>-Emission berechnet (McGinn et al., 2006, Grainger et al., 2007). Die Methode kann unter Weidebedingungen angewendet werden, benötigt jedoch die entsprechende Ausstattung und

Expertise sowie einen hohen Arbeitsaufwand. Sie unterliegt zudem Schwankungen in der Messung von Tag zu Tag und von Tier zu Tier und berücksichtigt nicht die im Darm produzierte Menge an CH<sub>4</sub> (Patra, 2016). Eine Messmethode, die auch im Stall oder auf der Weide eingesetzt werden kann, ist das GreenFeed System, welches an eine Kraftfutterabrufstation gekoppelt ist und vom Grundprinzip ähnlich wie die Respirationenkammer funktioniert. Diese Messmethode ist im Gegensatz zur Respirationenkammer eine punktuelle Kurzzeitmessung und setzt regelmäßige Besuche der Tiere voraus, um präzise Kalkulationen der produzierten Tagesmenge an CH<sub>4</sub> zu erhalten (Hammond et al., 2016c). Wenig zufriedenstellend sind die Ergebnisse von Gasprobenmessungen aus der Ausatemluft im Futtertrog (Sniffer-Methode) (Madsen et al., 2010, Huhtanen et al., 2015), die beispielsweise während des Melkvorganges in der Melkanlage erfolgen kann. In den letzten Jahren wurden einige weitere Methoden (Lasergun, Berechnung aus CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub>-Verhältnis, mikrometeorologischen Verfahren) zur CH<sub>4</sub>-Messung entwickelt (Hill et al., 2016, Larios et al., 2016, Patra, 2016), aber keine Methode erfüllt die Voraussetzungen für den routinemäßigen Einsatz auf Betrieben. Indirekte Marker, die einen physiologischen Zusammenhang zur CH<sub>4</sub>-Emission aufweisen, gelten als vielversprechende CH<sub>4</sub>-Indikatoren. Es ist ohne Zweifel, dass die DMI und die Zusammensetzung der Diät den größten Einfluss auf die Höhe der CH<sub>4</sub>-Emission haben (Cottle et al., 2011, Moraes et al., 2014, Jaurena et al., 2015). Die Präzision von Vorhersagegleichungen auf der Basis von DMI und chemischer Zusammensetzung, wie sie auch in den Schätzgleichungen des IPCC (2006) und von Ramin and Huhtanen (2013) verwendet werden, hängen dennoch von der Verfügbarkeit oder Schätzgenauigkeit dieser Informationen ab (Bannink et al., 2011, Moraes et al., 2014, Appuhamy et al., 2016). Große Aufmerksamkeit wird daher der Milch und insbesondere den MFA geschenkt, da diese mit der mikrobiellen Verdauung im Pansen verbunden sind und Milch als Probenmaterial leicht zu gewinnen ist (Gengler et al., 2016).

## 2.2 Das Fettsäuremuster im Milchfett des Rindes

### 2.2.1 Die Milchfettsäurebildung

Das Fett hat einen Anteil von 3 bis 5% und ist in Form von Fettglobuli in der Milch enthalten (Jensen, 2002). Mehr als 95% des Milchfetts besteht aus Triazylglyzeriden (Shingfield et al., 2010), die jeweils aus Glycerin und drei veresterten FA gebildet werden. Die Triazylglyceride im Milchfett enthalten über 400 verschiedene MFA (Palmquist, 2006, Kliem and Shingfield, 2016). Die Repräsentanten der SFA, mit einer Kettenlänge von C4:0 bis C18:0, sowie die MFA C16:1*cis*9 (Palmitoleinsäure), C18:1*cis*9 (Ölsäure), diverse C18:1*trans* Isomere und C18:2*n*-6 (Linolsäure, C18:2*cis*9, *cis*12) sind regelmäßig vertreten (Shingfield et al., 2013). In Tabelle 2.2 sind die prozentualen Anteile der häufigsten MFA dargestellt.

**Tabelle 2.2.** Prozentuale Anteile von Milchfettsäuren (MFA) und Gruppen von MFA mit den Angaben von Mittelwert (*M*) und Standardabweichung (*SD*) von Holstein Kühen (adaptiert nach Bobe et al., 2008 und Meignan et al, 2017) unter Berücksichtigung des Ursprungs der Fettsäuren (adaptiert nach Gierus et al., 2009)

MFA (%)	Anteil im Milchfett		Ursprung		
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>De novo</i>		Plasma
			Milchdrüse	Leber	
Gesättigte MFA	67.18	4.20			
Einfachungesättigte MFA	29.67	3.96			
Mehrfachungesättigte MFA	2.95	0.50			
C4:0	3.98	0.95	x	x	
C6:0	2.03	0.40	x	x	
C8:0	1.14	0.24	x	x	
C10:0	2.65	0.65	x	x	
C12:0	2.84	0.72	x	x	
C14:0	10.43	1.67	x	x	
C16:0	29.01	2.76	x	x	x
C16:1 <i>cis</i> 9	1.41	0.42			x
C18:0	12.24	2.48			x
C18:1 <i>cis</i> 9	26.44	4.00			x
C18:2 <i>n</i> -6	2.76	0.47			x
C18:3 <i>n</i> -3	0.54	0.21			x

Die Milchfettbildung erfolgt zu 40% über die *de novo* Synthese in der Milchdrüse und zu 60% über die Aufnahme von zirkulierenden FA aus dem Blut (Chilliard et al., 2000, Bauman et al., 2011, Kliem and Shingfield, 2016). Das Hauptausgangssubstrat in der *de novo* Synthese ist das Acetyl-CoA. Acetyl-CoA wird durch die Acetyl-CoA Synthase aus Acetat gebildet (Abbildung

2.2). Der erste Schritt zur MFA wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC; *acetyl coenzym A carboxylase*) katalysiert, aus dem Malonyl-CoA entsteht. Anschließend überträgt die FA-Synthase (FAS) das erste Malonyl auf ein Trägerprotein für die neu zu bildende MFA. Jedes weitere übertragene Malonyl verlängert die MFA. Das Ende der Kettenverlängerung wird über das Enzym Thioesterase I bestimmt, das in der FAS integriert ist (Chilliard et al., 2000, Palmquist, 2006). Während der *de novo* Synthese entstehen geradzahlige MFA mit einer Kettenlänge von C4:0 bis C16:0 (Bauman and Griinari, 2003). Der Anteil an *de novo* synthetisierter C16:0 (Palmitinsäure) liegt bei etwa 50% (Shingfield et al., 2013) und sinkt mit steigender Futterfettmenge (Palmquist, 2006).



**Abbildung 2.2.** Übersicht der Metabolite der Fettsäurebildung aus Acetat mit den beteiligten Enzymen Acetyl-CoA Synthase (ACS), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und der Fettsäuresynthase (FAS).

Für die MFA C4:0 (Buttersäure) kann die *de novo* Synthese weiterhin aus Butyryl-CoA anstelle von Acetyl-CoA erfolgen. Butyryl-CoA wird aus  $\beta$ -Hydroxybutyrat gebildet, dessen Vorstufe wiederum Butyrat aus der Vormagenverdauung ist (Barber et al., 1997, Brade and Nürnberg, 2016). Die MFA C15:0 und C17:0 können darüber hinaus aus Propionat synthetisiert werden (Vlaeminck et al., 2015), welches nicht von der Leber aufgenommen wurde und zur MFA-Vorstufe Propionyl-CoA umgewandelt wurde (Vlaeminck et al., 2006, French et al., 2012).

Die FA aus dem Blut stammen von zirkulierenden Lipoproteinen (Chylomykrone und Lipoproteine sehr geringer Dichte, VLDL; *very low density lipoproteins*), die Triacylglyceride im Blut transportieren. Die Triacylglyceride werden durch die Lipoproteinlipase hydrolysiert, damit die FA aus dem Blut der Milchdrüse zur Verfügung stehen (Barber et al., 1997, Lanier and Corl, 2015). Aufgenommene FA aus dem Blut verfügen zu 95% über C18 oder mehr Kohlenstoffatomen (Palmquist, 2006, Brade and Nürnberg, 2016) und werden zu einem Großteil von der Fütterung bestimmt (Chilliard et al., 2007, Shingfield et al., 2013). Es kann ferner eine Aufnahme von unveresterten FA (NEFA; *non-esterfied fatty acids*) aus dem Blut erfolgen (Chilliard et al., 2000, Brade and Nürnberg, 2016). Die Konzentration an NEFA im Blut steht in direktem Zusammenhang zur Körperfettmobilisation bei negativer Energiebilanz (Ingvarsen and Moyes, 2013, Kliem and Shingfield, 2016), wie sie in den ersten 50 bis 100 Laktationstagen durch die hohe Milchleistung von Kühen regelmäßig vorkommt (Roche et al.,

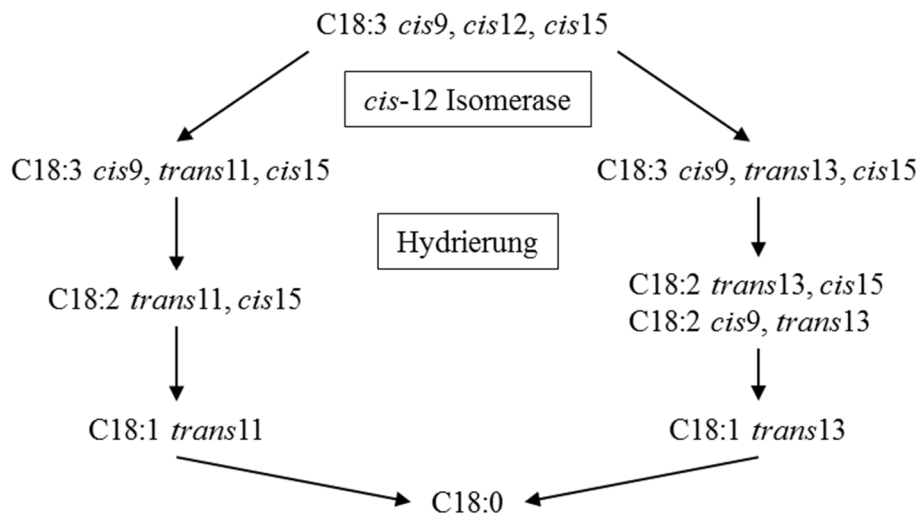
2009). Die FA, die in Form von Triacylglyceriden im Fettgewebe gespeichert sind, bestehen hauptsächlich aus C16:0, C18:0 (Stearinsäure) und C18:1*cis*9 sowie C14:0 (Myristinsäure), C16:1*cis*9, C17:0 und C18:1*trans*11 (Vaccensäure). In der mittleren und späten Laktation sinkt der Anteil von MFA aus NEFA im Milchfett unter 15% (Palmquist, 2006, Harvatine et al., 2009). Die ungeradzahligen und verzweigt-kettigen MFA stammen überwiegend von bakteriellen Membranlipiden, die vorrangig aus *iso*C14:0, C15:0, *iso*C15:0, *anteiso*C15:0, *iso*C16:0, C17:0, *iso*C17:0 und *anteiso*C17:0 bestehen (Vlaeminck et al., 2006).

Darüber hinaus weist die Milchdrüse eine hohe Aktivität der Delta-9 Desaturase auf. Diese besitzt eine ausgeprägte Affinität zur C18:0 und konvertiert etwa 40% der von der Milchdrüse aufgenommenen C18:0 zu C18:1*cis*9. Damit stellt die Delta-9 Desaturase 50 bis 60% der gesamten Ölsäure im Milchfett bereit. Die konjugierte Linolsäure (CLA; *conjugated linoleic acid*) C18:2*cis*9, *trans*11 hat ihren Ursprung zu 70 bis 95% aus der desaturierten C18:1*trans*11. Ein kleiner Anteil von C14:0 und C16:0 wird zu C14:1*cis*9 und C16:1*cis*9 umgewandelt, ist damit aber für 90 und 55% dieser MFA-Konzentrationen verantwortlich (Jacobs et al., 2011, Shingfield et al., 2013). Weiterhin kann auch C17:0 zu C17:1*cis*9 umgewandelt werden (Vlaeminck et al., 2006).

### **2.2.2 Einflussfaktoren auf das Fettsäuremuster und die Bedeutung der Fütterung**

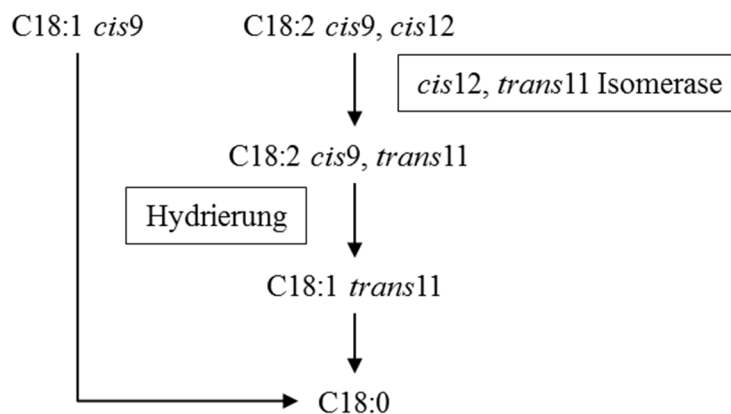
Fett ist die variabelste Komponente in der Milch. Das gilt sowohl für die Konzentration als auch für die Zusammensetzung des Fetts (Bauman et al., 2006, Harvatine et al., 2009). So ist seit langem bekannt, dass der Milchfettgehalt zwischen verschiedenen Rassen Unterschiede aufweist (Palmquist, 2006, Shingfield et al., 2013) und auch innerhalb einer Rasse variieren kann (Palmquist et al., 1993, Bobe et al., 2008). Zudem spielt das Laktationsstadium eine Rolle, wobei vor allem die Früh-laktation zu nennen ist, wie im Kapitel 2.2.1 bereits beschrieben. Überdies ist die Anzahl der Laktationen zu berücksichtigen, da erstlaktierende im Vergleich zu pluriparen Tieren häufig abweichende Milchleistungen und Inhaltsstoffe aufweisen (Wathes et al., 2007, Roche et al., 2009). Die Milchfettkonzentration und –zusammensetzung werden ferner von der Fütterung bestimmt und können moduliert werden (Lanier and Corl, 2015, Livingstone et al., 2015, Kliem and Shingfield, 2016). Futtermittel mit einem hohen Strukturanteil werden vermehrt zu Acetat abgebaut und liefern das Ausgangssubstrat der *de novo* Milchfettsynthese. Daraus ergibt sich zum einen ein erhöhter Milchfettgehalt und zum anderen ein erhöhter Konzentrationsanteil an SFA < C16. Dagegen werden stärkerbetonte Rationen vermehrt zu Propionat fermentiert und es steht weniger Acetat zur MFA-Bildung zur Verfügung. Somit werden vermehrt Fütterungs-FA zur Milchfettbildung herangezogen

(Chilliard et al., 2007, Kliem et al., 2008, Kirchgeßner, 2011). Eine strukturbetonte Fütterung begünstigt weiterhin die Aktivität und die Anzahl von Faserbakterien, während stärkebetonte Rationen einen positiven Einfluss auf amylolytische Bakterien haben. Die Membranlipide von Faserbakterien sind mit *iso* FA angereichert, während die Membranlipide amylolytische Bakterien nur geringe Konzentrationen an FA mit Verzweigungen besitzen (Fievez et al., 2012). Bei deren Verwertung finden die entsprechenden FA ihren Weg in die MFA-Bildung. Obwohl der Fettgehalt in Pflanzen mit 1 bis 5% der DM als gering zu bewerten ist, hat die Auswahl der Futterpflanzen einen Einfluss auf das MFA-Muster (Lourenco et al., 2008, Enjalbert et al., 2017). Futterpflanzen weisen einen hohen Anteil an UFA auf, wobei C18:3 $n$ -3 etwa 50 bis 75% und 18:2 $n$ -6 etwa 16% der gesamten Fettfraktion ausmachen. Palmitinsäure ist die häufigste SFA und mit 16% ebenfalls in größeren Anteilen im Pflanzenfett enthalten (Clapham et al., 2005). Maissilage weicht dagegen von diesen Werten ab. Diese ist mit 47% und 19% reich an C18:2 $n$ -6 und C18:1 $cis$ 9 und enthält weniger C18:3 $n$ -3 (etwa 5%) (Chilliard et al., 2007, Kliem et al., 2008, Gierus et al., 2009). Die Fettverdauung von Wiederkäuern unterliegt einigen Besonderheiten. Nahezu alle UFA werden im Pansen während der Biohydrierung zu SFA umgewandelt, wodurch sich der hohe Anteil an SFA in der Milch erklären lässt (Lourenco et al., 2010). Der Umfang der Biohydrierung von C18:3 $n$ -3, C18:2 $n$ -6 und C18:1 $cis$ 9 wird mit 85 bis 100%, 70 bis 95% und 58 bis 87% angegeben (Shingfield et al., 2013). Die Beseitigung von einfach (MUFA; *monounsaturated fatty acids*) und mehrfach ungesättigten FA (PUFA; *polyunsaturated fatty acids*) aus dem Futter dient dem Selbstschutz der Mikroorganismen, da diese FA toxisch für die Faserbakterien und Protozoen im Pansen sind (Maia et al., 2007, Enjalbert et al., 2017). Die aus der Biohydrierung resultierenden Intermediate und Endprodukte variieren je nach Ausgangssubstrat und Situation im Pansen. Da die Biohydrierung nur an freien FA erfolgen kann, werden Triacylglyceride zunächst der Lipolyse unterzogen. Der erste Schritt des Hauptweges der Biohydrierung von C18:3 $n$ -3, ist die Isomerisation an der Stelle des 12 C-Atoms mit der Entstehung von zwei möglichen Zwischenprodukten (Abbildung 2.3) und der nachfolgenden Biohydrierung zu CLA- und C18:1 $trans$ -Isomeren und schließlich zu C18:0 (Shingfield et al., 2010, Saliba et al., 2014).



**Abbildung 2.3.** Biohydrierung von  $\alpha$ -Linolensäure zu Stearinsäure im Pansen (adaptiert nach Buccioni et al., 2012).

Bei dem Hauptweg der Biohydrierung von  $18:2n-6$  wird der initiale Schritt durch die *cis12, trans11*-Isomerase eingeleitet, bei dem die CLA  $C18:2cis9, trans11$  gebildet wird (Abbildung 2.4). Diese wird nachfolgend zu  $C18:1trans11$  und  $C18:0$  hydrolisiert. Die FA  $C18:1cis9$  wird direkt zu  $C18:0$  hydrolisiert (Buccioni et al., 2012).



**Abbildung 2.4.** Biohydrierung von Linolsäure und Ölsäure zu Stearinsäure im Pansen (adaptiert nach Buccioni et al., 2012).

Werden die Konditionen für die mikrobielle Aktivität im Pansen modifiziert, kommt es zu abweichenden Stoffwechselwegen, bei denen verschiedenartige *trans* FA, CLA-Isomeren (z.B.  $C18:2trans10, cis12$ ;  $C18:2trans9, trans11$ ;  $C18:1trans6+7+8$ ) und deren Produkte aus der Hydrierung und Isomerisierung entstehen (Kliem et al., 2008, Shingfield et al., 2010, Enjalbert et al., 2017). Bei einem pH unter 6, erfolgt die Umwandlung von  $C18:2n-6$  zu

CLA $_{trans10}$ ,  $cis12$  und die nachfolgende Hydrolyse zu C18:1 $_{trans10}$  und C18:0. Die CLA $_{trans10}$ ,  $cis12$  und C18:1 $_{trans10}$  spielen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Milchfettdepression (Bauman et al., 2008, Lanier and Corl, 2015). Bei steigendem Mais- und sinkendem Grassilagegehalt in der Ration erhöhten sich die MFA-Konzentrationen von C4:0,  $isoC16:0$ , C18:1 $_{trans}$  MFA, C18:1 $_{cis12}$ , C18:1 $_{cis13}$ , CLA und C18:2 $n-6$  während die Konzentrationen von C15:0,  $isoC15:0$ , C17:0 und C18:3 $n-3$  abnahmen (van Gastelen et al., 2015).

Fettsupplementierungen können die Stoffwechselwege der Biohydrierung im Pansen zusätzlich beeinflussen und hängen von der Höhe, der FA-Zusammensetzung und der Darreichungsform ab (Neveu et al., 2014). Leinsamen sind beispielsweise besonders reich an C18:3 $n-3$  (> 50%) und anderen C18 FA. Diese FA werden hydrogeniert und fördern die Produktion von CLA- und C18:1 $_{trans}$ -Isomeren im Pansen (Ferlay et al., 2013, Suksombat et al., 2016, Meignan et al., 2017). Leinsamen unterliegen im Gegensatz zu Leinöl einem natürlichen Schutz, da die FA in Pflanzenzellen eingelagert sind und im Pansen nur langsam freigesetzt werden. Durch Hitzebehandlungen, wie Extrudieren, wird die Proteinmatrix um die Fetttropfen denaturiert und die Fettfreisetzung wird gegenüber einer Ölsupplementierung verlangsamt (Gonthier et al., 2005, Neveu et al., 2014). Allein aufgrund der Darreichungsform der Leinsamen ergeben sich Abweichungen in der Vormagenverdauung und spezifische Profile der MFA im Milchfett (Chilliard et al., 2009, Doreau et al., 2009). Des Weiteren sind langkettige FA Inhibitoren der ACC in der Milchdrüse und somit der *de novo* Synthese von MFA < C16:0. Besonders PUFA, die zusätzlich auch die Delta-9 Desaturase hemmen können, sind starke Inhibitoren der ACC (Barber et al., 1997, Chilliard et al., 2000). In einer Studie wurde die Expression der Delta-9 Desaturase im Eutergewebe durch Sojaöl (reich an C18:2 $n-6$ ) herabgesetzt, jedoch nicht durch Lein- (reich an C18:3 $n-3$ ) oder Rapsöl (reich an C18:1 $_{cis9}$ ) (Jacobs et al., 2011). Zusammengefasst entsteht bei einer mit Leinsamen zugesetzten Diät ein reziprokes Verhältnis zwischen MFA, die *de novo* synthetisiert wurden und MFA, die von zirkulierenden FA aus dem Blut stammen (Glasser et al., 2008b, Kliem et al., 2017, Meignan et al., 2017). Das MFA-Muster wird von der Futterpflanze, dem Verhältnis von Faser- zu Stärkegehalt sowie der Fettsupplementierung bestimmt, die sich zudem auch gegenseitig beeinflussen. Bei einer fettreichen Diät und ansteigenden Stärke-Fermentationsraten wurde von sinkenden C18:1 $_{trans11}$  sowie von steigenden C18:2 $n-6$  Konzentration in der Milch berichtet, die sich auf eine reduzierte Aktivität der Biohydrierung bei zunehmender Stärkeverfügbarkeit zurückführen lassen (Lascano et al., 2016). Korrespondierende Ergebnisse wurden bei steigendem Konzentratgehalt und C18:3 $n-3$  reichen Rationen beobachtet (Saliba et al., 2014).

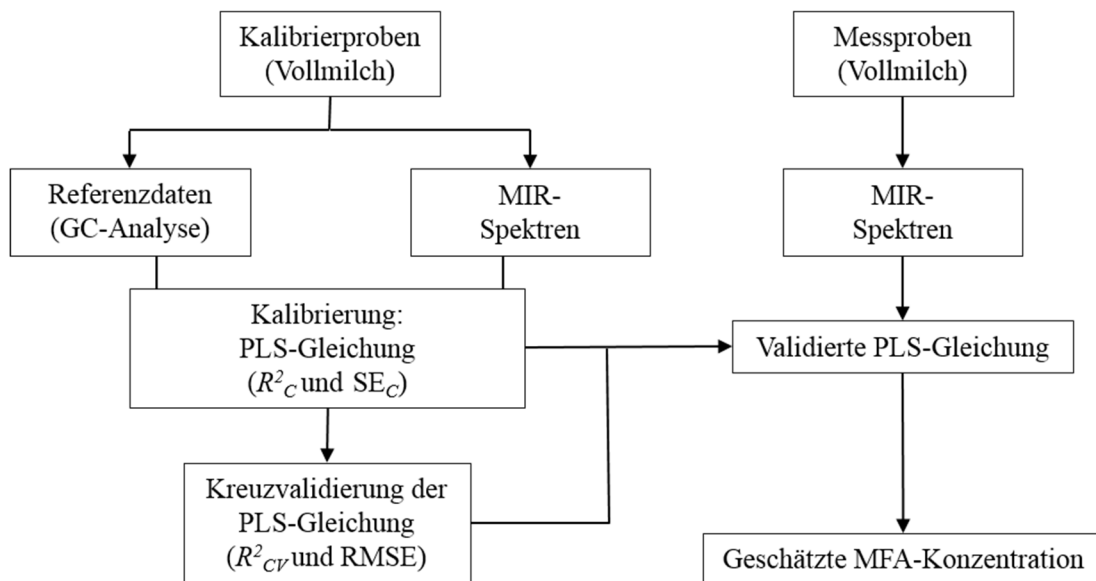


Dagegen wurden keine nennenswerten Unterschiede bei der Fütterung von extrudierten Leinsamen und Maissilage gegenüber extrudierten Leinsamen und Gerstensilage auf das MFA-Muster gefunden (Neveu et al., 2014). Bei steigendem Gehalt an extrudierten Leinsamen in einer Heu- als auch in einer Maissilage-basierten Ration wurde ein verminderter Gehalt an SFA und ein gesteigerter Gehalt an MUFA, PUFA und *trans* MFA erkannt. Die Produktion von einigen Intermediaten aus der Biohydrierung wurden in Abhängigkeit von der Grundration verschoben, sodass das MFA-Profil der C18:1 Isomere spezifisch für die jeweilige Grundration war (Ferlay et al., 2013).

### **2.2.3 Grundprinzip zweier Methoden zur Quantifizierung der Milchfettsäuren**

Die klassische Methode zur Analyse von MFA ist die GC-Analyse. Diese Methode erlaubt präzise und wiederholbare Messungen und ermöglicht eine Separation von vielen verschiedenen MFA. Hierfür wird das Milchlipoextrakt extrahiert und die FA in den Esterbindungen der Tri-, Di- und Monoglyceride sowie der Phospholipide werden hydrolysiert. Die FA werden anschließend zu Fettsäuremethylestern (FAME; *fatty acid methyl ester*) derivatisiert, damit die FA flüchtig werden und der Separierung in der GC zugänglich gemacht werden. Die FAME werden in den GC-Apparat eingespritzt und dort erhitzt und verdampft. Ein Trägergas transportiert die Analyten zur GC-Säule, in der die FAME nach Siedepunkt und Polarität getrennt werden. Mithilfe eines Flammenionisationsdetektors werden die individuellen FAME detektiert. Dafür werden sie in die Flamme transportiert und ionisiert. Freiwerdende Elektronen werden aufgefangen und im Chromatogramm als Peaks aufgezeichnet. Bei einem Vergleich der jeweiligen Retentionszeit sowie der Peakhöhe mit einer Standardsubstanz und bekannten FAME, kann die jeweilige Substanz bestimmt und quantitativ erfasst werden (Firl et al., 2014, Werteker et al., 2017). Etwa 50 bis 65 MFA können mit der GC Methode sicher bestimmt werden (Firl et al., 2014, Werteker et al., 2017). Derzeit gibt es keine weitere Methode, mit der MFA analysiert und solch hohe Identifizierungsraten erreicht werden. Dennoch ist die GC-Analyse teuer und zeitaufwendig und daher nicht für die Routineanalyse und für die Bewältigung hoher Probenzahlen geeignet (van Gastelen and Dijkstra, 2016). Daher rückt die MIRS-Methode zur Routineanalyse von MFA in den Fokus. Diese Methode ist schnell und erlaubt hohe Durchsatzraten (Ferrand et al., 2011, Soyeurt et al., 2011, Coppa et al., 2014). Für die individuellen MFA C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C14:1*cis*9, C16:0, C16:1*cis*9, C18:0, C18:1*trans*11, C18:1*cis*9 sowie die MFA-Gruppen SFA und MUFA konnten gute Ergebnisse in der Quantifizierung aus der Vollmilch erzielt werden. Die Bestimmtheitsmaße der Kreuzvalidierung ( $R^2_{CV}$ ; *coefficient of determination of cross-validation*) variieren jedoch ( $R^2_{CV}$  zwischen 0,07 und 0,96) (De Marchi et al., 2014).

Bei der MIRS-Analyse wird die Vollmilch elektromagnetischen Wellen in einem Frequenzbereich von 1000 bis 5000  $\text{cm}^{-1}$  ausgesetzt. Mithilfe der Fourier-Transformations-Spektrometrie können alle Frequenzen des mittleren Infrarots simultan auf die Probe gegeben werden. Es werden Molekülschwingungen von C-H- und O-H-Bindungen angeregt und vom Detektor im Spektrum erfasst. Es gibt keine Wellenzahl, bei der nur eine einzelne Komponente (z.B. MFA) eines Substanzgemisches (z.B. Milch) die Infrarotstrahlung absorbiert. Daher kommt es zu Überlappungen von Absorptionsbanden im Spektrum. Das macht den Einsatz von Chemometrie nötig, um einzelne Komponente (MFA) zu quantifizieren. Aus dem Infrarotspektrum der Vollmilch werden die Konzentrationen von MFA mit Hilfe der Regression-der-partiellen-kleinsten-Quadrate (PLS; *partial-least-square regression*) mathematisch geschätzt (Soyeurt et al., 2006). Daher muss das Spektroskopiegerät mit der zugehörigen Recheneinheit vor dem ersten Einsatz auf die PLS-Gleichung für den jeweiligen Analyten kalibriert und validiert werden (Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.5.** Grundprinzip der Quantifizierung von Milchfettsäuren (MFA) anhand der Spektroskopie im mittleren Infrarotbereich (MIR). Zur Kalibrierung wird als Referenzmethode die Gaschromatographie (GC) verwendet. Aus der Kalibrierung resultiert die Gleichung der *Partial-Last-Square-Regression* (PLS), deren Güte über das Bestimmtheitsmaß ( $R^2_c$ ) und dem Standardfehler der Kalibrierung ( $SE_c$ ) definiert wird. Die Korrektheit der PLS-Gleichung wird per Kreuzvalidierung überprüft und spiegelt sich im Bestimmtheitsmaß der Kreuzvalidierung ( $R^2_{cv}$ ) und dem mittleren quadratischen Fehler (RMSE) wieder (adaptiert nach Soyeurt et al., 2006).

Zur Kalibrierung der PLS-Gleichung werden Infrarotspektren von Proben mit bekannter Analytkonzentration angefertigt. Als Referenzmethode für MFA wird die GC-Analyse herangezogen. Aus den Spektraldaten und den bekannten Konzentrationsdaten werden mathematische Verknüpfungen erstellt, woraus die kalibrierte PLS-Gleichung hervorgeht. Die Güte der PLS-Gleichung wird mit dem Bestimmtheitsmaß der Kalibrierung ( $R^2_C$ ; *coefficient of determination of calibration*) und dem Standardfehler der Kalibrierung ( $SE_C$ ; *standard error of calibration*) angegeben. Die entwickelte PLS-Gleichung wird in einer anschließenden Validierung überprüft. Aus der Kreuzvalidierung ergibt sich, als Maß der Korrektheit, der  $R^2_{CV}$  und der mittlere quadratische Fehler (RMSE; *root mean square error*). Die Analytkonzentrationen aus unbekanntem Proben können nachfolgend anhand ihrer Spektraldaten und der validierten PLS-Gleichung vorhergesagt werden. (Soyeurt et al., 2011, Coppa et al., 2014, De Marchi et al., 2014).

Die MIRS-Methode erlaubt es, den vorherzusagenden Parameter in der Milch selbst zu bestimmen, sofern der Parameter in der Milch vorhanden ist oder einen physiologischen Zusammenhang zu den Milchinhaltsstoffen aufweist. So wurde das MIRS-Spektrum der Milch bereits verwendet, um die Fütterungseffizienz (McParland et al., 2012, McParland et al., 2014) oder auch die  $CH_4$ -Emission von Kühen (Dehareng et al., 2012, Vanlinder et al., 2016) vorherzusagen.

### 2.3 Milchfettsäuren als CH<sub>4</sub>-Indikator für Milchrinder

Das MFA-Muster gilt als vielversprechender indirekter Marker für die CH<sub>4</sub>-Emission des Rindes, da es an verschiedenen Stellen mit den Stoffwechselwegen der Methanogenese verknüpft ist. Die Fermentationsprodukte des Pansens, Acetat und Butyrat, dienen der *de novo* Synthese als MFA-Vorstufen. Acetat ist aufgrund der freiwerdenden H<sub>2</sub>-Moleküle während der Fermentation positiv mit der CH<sub>4</sub>-Produktion assoziiert, indessen die H<sub>2</sub>-Bilanz bei der Bildung von Butyrat ausgeglichen ist. Propionat kann ferner eine Vorstufe von C15:0 und C17:0 sein und ist negativ mit der CH<sub>4</sub>-Produktion verknüpft. Ungerade und verzweigte MFA kommen vorrangig in Membranlipiden fibrolytischer (*iso*C14:0, *iso*C15:0, *iso*C16:0) und amylolytischer (C15:0, C17:0, C17:1*cis*9) Bakterien vor und sind damit möglicherweise mit einem höherem bzw. niedrigerem CH<sub>4</sub>-Emissionslevel verknüpft (Castro-Montoya et al., 2011, Fievez et al., 2012). Im Pansen wirken sich UFA aus dem Futter hemmend auf die CH<sub>4</sub>-Produktion aus und werden als Vorstufen von MFA verwendet (Cassandro et al., 2013, van Engelen et al., 2015, Rico et al., 2016). Die Beziehungen individueller MFA zur CH<sub>4</sub>-Emission sind in wissenschaftlichen Publikationen jedoch nicht immer einheitlich (Castro-Montoya et al., 2016a, Dijkstra et al., 2016, van Gastelen et al., 2017). Eine Übersicht der in der Literatur beschriebenen Beziehungen zwischen verschiedenen CH<sub>4</sub>-Parametern und individuellen MFA ist am Ende dieses Kapitels in Tabelle 2.3 dargestellt. Unter dem Einfluss von mit Leinsamen-supplementierten Rationen wurden zwischen der täglichen CH<sub>4</sub>-Emission und *de novo* synthetisierter MFA (C4:0 bis C16:0, C15:0 und C17:0) stark positive Korrelationen (*r* von 0,71 bis 0,91) sowie für MFA aus der Biohydrierung (C18:1*trans*6+7+8, C18:1*trans*11+*cis*15, C18:1*trans*12, C18:1*trans*13+14, C18:1*trans*16+*cis*14, C18:1*cis*13, C18:1*cis*15+*trans*17, C18:2*cis*9, *trans*13, C18:2*trans*11, *cis*15) stark negative Korrelationen (*r* von -0,75 bis -0,90) gefunden. Eine Korrelation zwischen CH<sub>4</sub> (g/d) und C18:3*n*-3 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es wurde eine Regressionsgleichung zur CH<sub>4</sub>-Vorhersage (g/d) anhand von MFA-Variablen mit einem Bestimmtheitsmaß ( $R^2_{Model}$ ; *coefficient of determination of the regression model*) von 0,95 abgeleitet (Chilliard et al., 2009). Eine Übersicht über die publizierten CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen anhand von MFA als *erklärende* Variablen<sup>1</sup> ist ebenfalls am Ende dieses Kapitels in Tabelle 2.4 dargestellt. In weiteren Studien wurde unter dem Einfluss verschiedener Futteradditiven (überwiegend aus Fettquellen) die Beziehung zwischen CH<sub>4</sub>/DMI (g/kg) (Dijkstra et al., 2011) bzw. CH<sub>4</sub>/d (g/d) (Mohammed et al., 2011)

---

<sup>1</sup> *Erklärende* Variablen sind Variablen, die im statistisch besten Regressionsmodell Berücksichtigung finden und aus allen *potentiellen* Variablen des Datensatzes ausgewählt wurden.

und MFA untersucht sowie CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen abgeleitet. Es wurden positive Korrelationen für C8:0, C10:0, C11:0, *iso*C14:0, *iso*C15:0, C16:0, *iso*C16:0, C17:0, *anteiso*C17:0 beschrieben und negative Korrelationen für C15:0, C16:1*trans*6+7+8, *iso*C17:0, 17:1*cis*9 sowie für diverse C18 MFA gefunden. Für die MFA C18:1*cis*13 wurde innerhalb dieser beiden Studien divergente Ergebnisse erzielt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie von Chilliard et al. (2009) wurde für C4:0 (Dijkstra et al., 2011) und C15:0 (Mohammed et al., 2011) von negativen Korrelationen berichtet. In einer Metaanalyse wurde ein breites Spektrum an experimentellen Diäten abgedeckt (30 Versuchsrationen, davon 10 mit Fettsupplementierung). Die erhaltenen Korrelationen von MFA und den Parametern CH<sub>4</sub>/DMI (g/kg) oder CH<sub>4</sub>/ECM (g/kg) waren insgesamt schwach ( $r < 0,3$ ) bis moderat ( $r$  von 0,3 bis 0,7), fanden jedoch überwiegend Übereinstimmung mit den bisherigen Erkenntnissen, dass diverse *trans* und C18-MFA negativ und C6:0 bis C16:0 MFA positiv korrelieren. Gegensätzliche Ergebnisse zeigten sich bei der MFA C4:0, die nicht (CH<sub>4</sub>/DMI) oder negativ (CH<sub>4</sub>/ECM) korrelierte sowie bei C15:0, die nicht (CH<sub>4</sub>/DMI) oder positiv korrelierte (CH<sub>4</sub>/ECM). Die beste Vorhersagegleichung für CH<sub>4</sub>/DMI ( $R^2_{Model} = 0,54$ ) beinhaltete *iso*C16:0, C18:1*trans*10+11 und C18:2*n*-6 als *erklärende* Variablen. Die beste Vorhersagegleichung für CH<sub>4</sub>/ECM ( $R^2_{Model} = 0,47$ ) enthielt C4:0, *iso*C16:0, C18:1*cis*9, C18:1*trans*10+11 als *erklärende* Variablen (van Lingen et al., 2014). Eine weitere Metaanalyse belegte positive Beziehungen für die MFA  $\leq$  C18:0 (außer C14:0 und C14:1*cis*9) und C20:0 sowie negative Beziehungen für *trans* und C18 MFA (außer C18:0, C18:1*cis*11) zu drei verschiedenen CH<sub>4</sub>-Parametern (CH<sub>4</sub>/d, g/d; CH<sub>4</sub>/DMI, g/kg; CH<sub>4</sub>/Milchleistung, g/kg) (Castro-Montoya et al., 2016a). Untersuchungen zu CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen für die CH<sub>4</sub>-Parameter CH<sub>4</sub>/d (g/d), CH<sub>4</sub>/DMI (g/kg) und CH<sub>4</sub>/Milchleistung (g/kg) ergaben Ergebnisse von  $R^2_{Model}$  zwischen 0,42 und 0,64 und Bestimmtheitsmaße der Validierung ( $R^2_{Validation}$ ; *coefficient of determination of validation*) zwischen 0,18 und 0,41. Die Autoren schlussfolgerten, dass MFA allein kein ausreichendes Potential zur Prädiktion der CH<sub>4</sub>-Emission haben (Castro-Montoya et al., 2016b). Es sei darauf hingewiesen, dass die bisher vorgestellten Untersuchungen ausschließlich oder überwiegend Fettsupplementierungen in den experimentellen Diäten verwendeten. Die stark proklamierten Beziehungen der C8:0 und C18 MFA, die bei Leinsamen-supplementierter Fütterung von Chilliard et al. (2009) abgeleitet wurden, konnten nicht verwendet werden, um die CH<sub>4</sub>-Emission (CH<sub>4</sub>/d, g/d), von Kühen bei verschiedenartiger Fütterung korrekt zu bestimmen (Williams et al., 2014). Auch die Isomere von C18:1*trans* erwiesen sich nicht als zuverlässige Prädiktoren der CH<sub>4</sub>-Emission (CH<sub>4</sub>/d, g/d; CH<sub>4</sub>/DMI, g/kg; CH<sub>4</sub>/ECM, g/kg) (Moate et al., 2017). Bei der Fütterung von verschiedenen Silagetypen (Mais-, Luzernen-, Gerste- und

Grassilage) ohne Fettsupplementierung wurden zwischen CH<sub>4</sub> (g/d) und MFA < C16 positive Korrelationen sowie negative Korrelationen zu C15:0, C17:0, C17:1*cis*9, C18:1*trans*10 und *n*-3 PUFA gefunden. Eine Vorhersagegleichung, die im Datensatz des statistischen Modells MFA und Fütterungsbestandteile als *potentielle* Variablen<sup>2</sup> enthielt, erbrachte ausschließlich MFA als *erklärende* Variablen in der besten Regressionsgleichung ( $R^2_{Model} = 0,80$ ). Die statistische Überprüfung bei der Erstellung des Regressionsmodells erbrachte demnach keine Verbesserung der Güte, wenn die Fütterungsbestandteile als *erklärende* Variable ausgesucht wurden (Rico et al., 2016). Bei der Fütterung von Grünfutter und Grassilage wurden positive Korrelationen zwischen CH<sub>4</sub>-Parametern (CH<sub>4</sub>/DMI, g/kg und CH<sub>4</sub>/ECM, g/kg) und gesättigten MFA von C10:0 bis C17:0 (außer C11:0), C20:0 bis C24:0, *iso*-MFA, den MFA *anteiso*C15:0 und *anteiso*C17:0 sowie langkettige *n*-6 MFA gefunden. Negative Korrelationen konnten für C4:0, C16:1*cis*9, C17:1*cis*9, diverse C18-MFA, C20:1*cis*11 und C20:4*n*-3 gezeigt werden. Divergente Ergebnisse wurden für C20:3*n*-3 sowie für C22:5*n*-3 erhalten (Dijkstra et al., 2016). Dagegen konnten bei der Fütterung von Grass- und/oder Maissilage keine Korrelationen für kurz- und mittelkettige SFA zu CH<sub>4</sub> (CH<sub>4</sub>/d, g/d; CH<sub>4</sub>/DMI, g/kg; CH<sub>4</sub>/ECM, g/kg) gefunden werden. Eine Ausnahme bildeten die MFA C14:1*cis*9 (CH<sub>4</sub>/d, CH<sub>4</sub>/ECM), C15:0 (CH<sub>4</sub>/ECM), *iso*C15:0 (CH<sub>4</sub>/ECM), C17:0 (CH<sub>4</sub>/DMI) (positive Korrelationen) sowie die MFA *iso*C14:0 (CH<sub>4</sub>/DMI) und C16:1*trans* (CH<sub>4</sub>/ECM) (negative Korrelation). Weitere negative Korrelationen konnten für diverse C18-MFA (außer C18:3*n*-3), C20:3*n*-6 und C20:4*n*-6 zu CH<sub>4</sub> (CH<sub>4</sub>/d, CH<sub>4</sub>/DMI, CH<sub>4</sub>/ECM) gefunden werden und weitere positive Korrelationen wurden für individuelle *n*-3 MFA (CH<sub>4</sub>/DMI), C20:0 (CH<sub>4</sub>/DMI, CH<sub>4</sub>/ECM), C22:0 (CH<sub>4</sub>/DMI, CH<sub>4</sub>/ECM) und C24:0 (CH<sub>4</sub>/DMI, CH<sub>4</sub>/ECM) ermittelt. Endgültige Vorhersagegleichungen für CH<sub>4</sub>/d, CH<sub>4</sub>/DMI und CH<sub>4</sub>/ECM, die ausschließlich MFA im statistischen Modell enthielten, erzielten ein Gütemaß von 0,47 bis 0,63 (van Gastelen et al., 2017). In einem Übersichtsartikel wird zusammengefasst, dass *de novo* synthetisierte MFA positiv, *iso* MFA überwiegend positiv, lineare, ungeradzahlige und *anteiso* MFA überwiegend negativ und Intermediate aus der Biohydrierung negativ mit der CH<sub>4</sub>-Emission korrelieren (van Gastelen and Dijkstra, 2016). Mit Ausnahme der Studie von Chilliard et al. (2009) waren die Korrelationen zwischen der CH<sub>4</sub>-Emission und individuellen MFA moderat (*r* von 0,3 bis 0,7). Deutlich unterschiedliche Ergebnisse wurden für C4:0, C15:0 und C17:0 erzielt. Da *de novo* synthetisierte MFA positiv mit CH<sub>4</sub> assoziiert sind, wurde ein Patent beantragt, das anhand von MFA <C16 die CH<sub>4</sub>-Emission pro L Milch vorhersagen soll (Weill et al., 2009). Dennoch

---

<sup>2</sup> *Potentielle* Variablen sind Variablen, die im gesamten Datensatz vorhanden sind. Wohingegen die *erklärenden* Variablen zusätzlich im statistisch besten Regressionsmodell berücksichtigt werden.

konnte bisher keine MFA mit dem größten Vorhersagepotential für die CH<sub>4</sub>-Emission identifiziert werden. Darüber hinaus unterscheiden sich die MFA, die als *erklärende* Variablen in die Vorhersagegleichungen eingehen. Nur C17:1*cis*9 und C18:1*cis*11 sowie diverse C18:1*trans* MFA scheinen häufiger in Gleichungen vertreten zu sein. Die vorherzusagenden CH<sub>4</sub>-Parameter (CH<sub>4</sub>/d, CH<sub>4</sub>/DMI, CH<sub>4</sub>/ECM oder Milch) variieren zwischen den Studien und könnten die *erklärenden* MFA-Variablen beeinflussen (van Gastelen et al., 2017). Die Vorhersagegleichung von Chilliard et al. (2009), Dijkstra et al. (2011) und van Lingen et al. (2014) wurden einer Überprüfung unterzogen und resultierten entweder in Über- (Mohammed et al., 2011) oder Unterschätzung (Dijkstra et al., 2016). Alle bisher bekannten CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen sind anhand von MFA erstellt, die mit der GC-Methode analysiert wurden. Obwohl im Milchfett mehr als 400 MFA vorkommen, kann auch mit der GC-Analyse nur eine kleine Fraktion abgebildet werden (Rico et al., 2016). So variieren die analysierten individuellen MFA innerhalb der Studien; besonders bei den C18:1 und C18:2 Isomeren (van Engelen et al., 2015, Castro-Montoya et al., 2016a).

Es wurde gezeigt, dass das MFA-Muster mit der MIRS-Methode vorhergesagt werden kann (Soyeurt et al., 2011). Da ferner Beziehungen von MFA zur CH<sub>4</sub>-Emission des Rindes belegt wurden, wurde darüber hinaus untersucht, ob die CH<sub>4</sub>-Emission auch direkt aus dem globalen Spektrum der Milch vorhergesagt werden kann ohne den Umweg über die Bestimmung der MFA-Konzentrationen zu gehen (Dehareng et al., 2012, Vanlierde et al., 2015, Shetty et al., 2017). Eine erste Studie, die Vorhersagen der CH<sub>4</sub>-Emission aus dem globalen Milchspektrum ableitete, publizierte Werte von  $R^2_{CV} = 0,73$  (CH<sub>4</sub>/d, g/kg) und  $R^2_{CV} = 0,79$  (CH<sub>4</sub>/Milch, g/kg) (Dehareng et al., 2012). Da sich das MFA-Muster innerhalb der Laktation verändern kann (Vanrobays et al., 2016), wurde die beste Kalibrierung um die Anzahl der Tage in Milch (DIM; *days in milk*) der Kuh erweitert, um eine Laktationsstadium-unabhängige Gleichung verwenden zu können (Vanlierde et al., 2015, Vanlierde et al., 2016). Eine Studie, die ebenfalls die CH<sub>4</sub>-Emission (L/d) anhand des MIRS-Spektrums der Milch geschätzt hat, erzielte demgegenüber nur eine geringe Genauigkeit für die CH<sub>4</sub>-Emission ( $R^2_{Validierung} = 0,13$ ). Eine Erweiterung der Kalibrierung um das Laktationsstadium erbrachte keine nennenswerte Verbesserung (Shetty et al., 2017). Im Gegensatz zu den vorigen genannten Studien, in denen zur Erhebung der CH<sub>4</sub>-Emission die SF<sub>6</sub>-Methode Verwendung fand (Dehareng et al., 2012, Vanlierde et al., 2015), wurde in der letztgenannten Studie die Sniffer-Methode angewendet (Shetty et al., 2017). In einer jüngeren Studie wurde das CH<sub>4</sub>-Vorhersagepotential des MIRS-Spektrums der Milch mit dem von GC-analysierten MFA als Vorhersagevariablen verglichen. Für die Modelle der MIRS-Spektren wurden Ergebnisse von  $R^2_{CV} = 0,30$  (CH<sub>4</sub>/d, g/d),

0,19 (CH<sub>4</sub>/DMI, g/kg) und 0,49 (CH<sub>4</sub>/ECM, g/kg) erzielt und für die Modelle basierend auf GC-analysierten MFA  $R^2_{CV}$ -Werte von 0,47 (CH<sub>4</sub>/d, g/d), 0,38 (CH<sub>4</sub>/DMI, g/kg) und 0,63 (CH<sub>4</sub>/ECM, g/kg). Die Rohdaten der CH<sub>4</sub>-Emissionen wurden in Respirationsskammern erhoben (van Gastelen et al., 2018).



**Tabelle 2.3.** Übersicht der in der Literatur beschriebenen Beziehungen zwischen verschiedenen CH<sub>4</sub>-Parametern (CH<sub>4</sub> pro Tag, g/d; pro Trockensubstanzaufnahme [DMI], g/kg; pro fett- und proteinkorrigierte Milch [FPCM], g/kg und pro Milch, g/kg) und individuellen Milchsäuren. Symbole in Klammer () kennzeichnen eine Tendenz (0,05 < P < 0,1). *Cis* und *trans*-Konfigurationen der Milchsäuren sind mit 'c' und 't' abgekürzt.

Publikation	Chilliard et al. (2009)	Dijkstra et al. (2011)	Mohammed et al. (2011)	Van Lingen et al. (2014)	Rico et al. (2016)	Castro-Montoya et al. (2016a)	Dijkstra et al. (2016)	Castro-Montoya et al. (2016b)	Van Gastelen et al. (2017)								
Untersuchtes Futtermittel	Leinsamen	Fett-supplemente	Ölsaaten	Diverse Futteradditive	Silagen	Fette und andere Futteradditive	Gras und Grassilage	Fette und andere Futteradditive	Gras- und Maissilage								
CH <sub>4</sub> -Parameter	g/d	g/kg DMI	g/d	g/kg DMI	g/kg FPCM	g/d	g/d	g/kg DMI	g/kg Milch	g/kg DMI	g/kg FPCM	g/d	g/kg DMI	g/kg Milch	g/d	g/kg DMI	g/kg FPCM
C4:0	+	(-)		-			+			-	-						
C6:0	+			(+)			+	+									
C8:0	+	+	+	(+)		(+)	+	+	+								
C9:0	+											+					
C10:0	+	+		(+)	+	+	(+)	+	+		+						
C10:1	+																
C11:0	+	+						+	+								
C12:0	+				+	+					+						
C12:1	+											+					
C13:0							(+)		+		+						
C13:0 <i>anteiso</i>						-											
C14:0	+			+	+	+		(-)			+						
C14:0 <i>iso</i>		+		(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+					-	
C14:1 <i>c9</i>				+	-	-		(-)	-	+	+				+		+
C14:1 <i>c11</i>						+											
C15:0	+		(-)	+	-	-	+	+	+	+	+						+
C15:0 <i>iso</i>		+					+	+	+	+	+					+	+
C15:0 <i>anteiso</i>							+	+	+	+	+						
C16:0	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
C16:0 <i>iso</i>			+	(+)		+	+	+	+		+						
C16:1 <i>c9</i>						-					-	+	+				
C16:1 <i>c11</i>						-		(+)	+								
C16:1 <i>t6+7+8</i>			-														
C16:1 <i>t9</i>																	-
C16:1 <i>t11</i>	-																
C16:1 <i>t14</i>													+				

Fortsetzung

**Tabelle 2.3 (Fortsetzung).** Übersicht der in der Literatur beschriebenen Beziehungen zwischen verschiedenen CH<sub>4</sub>-Parametern (CH<sub>4</sub> pro Tag, g/d; pro Trockensubstanzaufnahme [DMI], g/kg; pro fett- und proteinkorrigierte Milch [FPCM], g/kg und pro Milch, g/kg) und individuellen Milchsäuren. Symbole in Klammer ( ) kennzeichnen eine Tendenz (0,05 < P < 0,1). *Cis* und *trans*-Konfigurationen der Milchsäuren sind mit 'c' und 't' abgekürzt.

Publikation	Chilliard	Dijkstra	Mohammed	Van Lingen		Rico	Castro-Montoya			Dijkstra		Castro-Montoya			Van Gastelen		
	et al. (2009)	et al. (2011)	et al. (2011)	et al. (2014)	et al. (2014)	et al. (2016)	et al. (2016a)	et al. (2016a)	et al. (2016a)	et al. (2016)	et al. (2016)	et al. (2016b)	et al. (2016b)	et al. (2016b)	et al. (2017)	et al. (2017)	et al. (2017)
CH <sub>4</sub> -Parameter	g/d	g/kg DMI	g/d	g/kg DMI	g/kg FPCM	g/d	g/d	g/kg DMI	g/kg Milch	g/kg DMI	g/kg FPCM	g/d	g/kg DMI	g/kg Milch	g/d	g/kg DMI	g/kg FPCM
C17:0	+	(+)				-	+	(+)	+	+	+		-			+	
C17:0 <sub>iso</sub>		-	-			-											
C17:0 <sub>anteiso</sub>		+					+	+	+		+			-			
C17:1 <sub>c9</sub>		-	-			-						-					
C18:0					-		(+)		(+)								
C18:0 <sub>iso</sub>												-					
C18:1 <sub>c9</sub>	-	-			-					(-)	-						
C18:1 <sub>c10</sub>	-																
C18:1 <sub>c11</sub>		-	-	-	-				(+)								
C18:1 <sub>c12</sub>		-		-	-					-	-				-	-	(-)
C18:1 <sub>c13</sub>	-	(+)	-	(-)		-	-	-	-		-			-			
C18:1 <sub>c15</sub>												+					
C18:1 <sub>c15+t17</sub>	-																
C18:1 <sub>c16</sub>			-														
C18:1 <sub>t4</sub>						-											
C18:1 <sub>t5</sub>						-											
C18:1 <sub>t6</sub>															-	-	(-)
C18:1 <sub>t6+7+8</sub>	-		-			-				-							
C18:1 <sub>t6+7+8+9</sub>		(-)		-													
C18:1 <sub>t9</sub>						(-)				-	-				-	-	
C18:1 <sub>t10</sub>	-		-			-				-					-	-	(-)
C18:1 <sub>t11</sub>										(-)					-	-	
C18:1 <sub>t10+11</sub>		-		-	(-)												
C18:1 <sub>t12</sub>	-	(-)				-	-		-								
C18:1 <sub>t13</sub>												-	-				
C18:1 <sub>t13+14</sub>	-					-	-	-	-								
C18:1 <sub>t15</sub>												+					
C18:1 <sub>t15+c11</sub>										-	-				-	(-)	-
C18:1 <sub>t16+c14</sub>	-	-	(-)	(-)													

Fortsetzung

**Tabelle 2.3 (Fortsetzung).** Übersicht der in der Literatur beschriebenen Beziehungen zwischen verschiedenen CH<sub>4</sub>-Parametern (CH<sub>4</sub> pro Tag, g/d; pro Trockensubstanzaufnahme [DMI], g/kg; pro fett- und proteinkorrigierte Milch [FPCM], g/kg und pro Milch, g/kg) und individuellen Milchsäuren. Symbole in Klammer ( ) kennzeichnen eine Tendenz (0,05 < P < 0,1). *Cis* und *trans*-Konfigurationen der Milchsäuren sind mit 'c' und 't' abgekürzt.

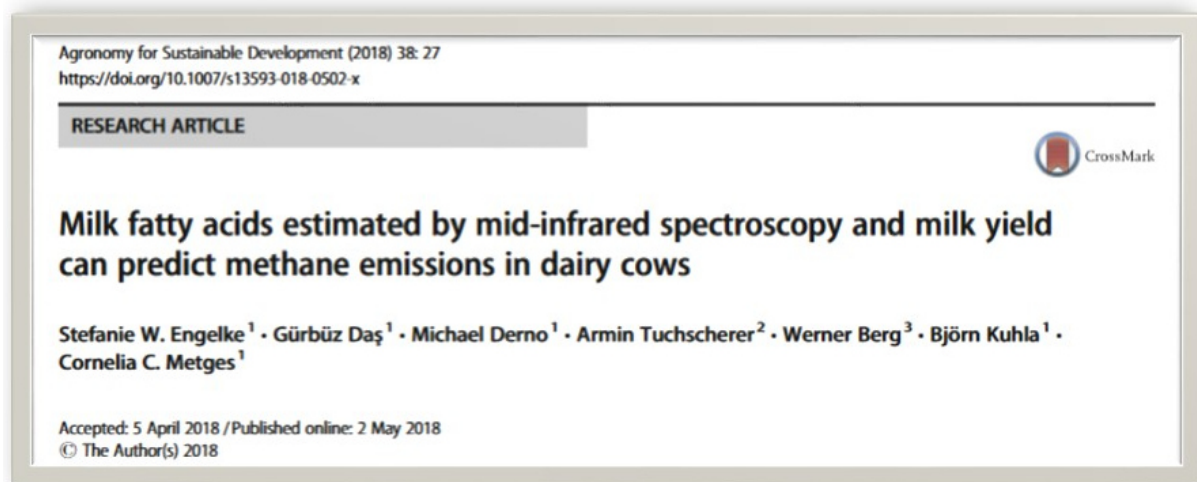
Publikation	Chilliard	Dijkstra	Mohammed	Van Lingen		Rico	Castro-Montoya			Dijkstra		Castro-Montoya			Van Gastelen		
	et al. (2009)	et al. (2011)	et al. (2011)	et al. (2014)	et al. (2014)	et al. (2016)	et al. (2016a)	et al. (2016a)	et al. (2016a)	et al. (2016)	et al. (2016)	et al. (2016b)	et al. (2016b)	et al. (2016b)	et al. (2017)	et al. (2017)	et al. (2017)
CH <sub>4</sub> -Parameter	g/d	g/kg DMI	g/d	g/kg DMI	g/kg FPCM	g/d	g/d	g/kg DMI	g/kg Milch	g/kg DMI	g/kg FPCM	g/d	g/kg DMI	g/kg Milch	g/d	g/kg DMI	g/kg FPCM
C18:2n-6			-	(-)	-					-	-				-	-	
C18:2c9, t11		-													-	-	
C18:2c9, t12						-											
C18:2c9, t13	-		-														
C18:2t8, c12			-			-											
C18:2t8, c13						-											
C18:2t10, c12						-											
C18:2t11, c15	-	(-)				(-)											
C18:3n-6						(+)				-					-	-	
C18:3n-6 + 20:0												-	-				
C18:3n-3			-			-				-	-						+
C18:4n-3						-											
C20:0							+	+	+	+	+						+
C20:1c9						-											
C20:1c11						(+)				-	-						
C20:2n-6										+	+						
C20:3n-3						-											
C20:3n-6											+				-		
C20:4n-3										-					+		
C20:4n-6	+										+				-	-	
C20:5n-3										-	+						(+)
C21:0																	
C22:0										+	+						+
C22:3n-3						-											
C22:5n-3						-				(-)	+						+
C22:5n-6						-											
C22:6n-3						-											
C24:0										+	+						+

**Tabelle 2.4.** Übersicht über publizierte CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen, die MilCHFettsäuren (MFA) als Variablen verwendeten. Die Parameter CH<sub>4</sub> pro Tag (g/d), pro Trockensubstanzaufnahme (DMI; g/kg) und pro Energie-korrigierte Milch (ECM; g/kg) wurden bestimmt

Publikation	Parameter	Beste Vorhersagegleichung	R <sup>2</sup> <sub>Model</sub>
Chilliard et al. (2009)	CH <sub>4</sub> (g/d)	$-21,2 + 9,46 \times C16:0 - 97,6 \times C18:1cis14 + trans16 + 13,3 \times \text{Grundfutter-DMI}^1 - 78,3 \times C14:1cis9 + 77,4 \times C18:2n-6$	0,95
Weill et al. (2009)	CH <sub>4</sub> /Milch (g/kg)	$(MFA < C16 / \text{Total MFA}) \times 11,37 \times (\text{Milch/Jahr})^{-0,43}$	
Dijkstra et al. (2011)	CH <sub>4</sub> /DMI (g/kg)	$24,6 + 8,74 \times anteisoC17:0 - 1,97 \times C18:1trans10+11 - 9,09 \times C18:1cis11 + 5,07 \times C18:1cis13$	0,73
Mohammed et al. (2011)	CH <sub>4</sub> (g/d)	$272 - 486 \times C17:1cis9 - 123 \times C18:1cis11 + 2220 \times CLA_{trans,trans} - 11,8 \times \Sigma_{trans}C18:1 + 260 \times anteisoC15:0$	0,74
Van Lingen et al. (2014)	CH <sub>4</sub> /DMI (g/kg)	$23,4 + 9,74 \times isoC16:0 - 1,06 \times C18:1trans10+11 - 1,75 \times C18:2n-6$	0,54
	CH <sub>4</sub> /ECM (g/kg)	$21,1 - 1,38 \times C4:0 + 8,53 \times isoC16:0 - 0,22 \times C18:1cis9 - 0,59 \times C18:1trans10+11$	0,47
Rico et al. (2016)	CH <sub>4</sub> (g/d)	$669 + 839 \times C14:1cis11 - 493 \times C17:1cis9 - 44,2 \times C18:1cis11 - 964 \times C18:2trans8, cis13$	0,80
Castro-Montoya et al. (2016b)	CH <sub>4</sub> (g/d)	$471 - 137 \times C16:1cis13 - 824 \times C16:1trans14 + 138 \times C18:1trans10 - 280 \times C18:1trans12 - 325 \times C18:2trans11, cis15$	0,42
	CH <sub>4</sub> /DMI (g/kg)	$-5,37 - 151 \times C7:0 + 1,21 \times C12:0 + 0,56 \times C16:0 + 13,1 \times C16:1cis7$	0,64
	CH <sub>4</sub> /Milch (g/kg)	$-122 + 20,1 \times C4:0 + 2355 \times C7:0 + 4,74 \times C16:0 + 64,9 \times C17:1cis9 - 53,8 \times C18:1cis13 + 19,4 \times C22:6n-3 + 435 \times C4:0 \times C7:0 - 0,91 \times C4:0 \times C16:0 - 87,0 \times C7:0 \times C16:0 - 3349 \times C7:0 \times C17:1cis9$	0,50
Van Gastelen et al. (2017)	CH <sub>4</sub> (g/d)	$211 + 50,4 \times C4:0 + 77,7 \times C14:1cis9 - 82 \times C18:1trans11$	0,63
	CH <sub>4</sub> /DMI (g/kg)	$27,2 - 7,0 \times C18:2cis9, trans11$	0,54
	CH <sub>4</sub> /ECM (g/kg)	$16,5 + 24,6 \times isoC15:0 - 15,5 \times C17:0 + 52,4 \times C22:0$	0,47

<sup>1</sup>Grundfutter-DMI von Heu und Grassilage

### **3. Milk fatty acids estimated by mid-infrared spectroscopy and milk yield can predict methane emissions in dairy cows**



Stefanie W. Engelke<sup>1</sup>, Gürbüz Daş<sup>1</sup>, Michael Derno<sup>1</sup>, Armin Tuchscherer<sup>2</sup>, Werner Berg<sup>3</sup>, Björn Kuhla<sup>1</sup>, and Cornelia C. Metges\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Nutritional Physiology “Oskar Kellner”, and

<sup>2</sup>Institute of Genetics and Biometry, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany

<sup>3</sup>Department of Technology Assessment and Substance Cycles, Leibniz Institute for Agricultural Engineering and Bioeconomy, Potsdam, Germany

Manuscript received: August, 31, 2017

Revision received: March, 1, 2018

Revision accepted: April 4, 2018

First published online: May 02, 2018

\*Corresponding author: metges@fbn-dummerstorf.de

**Dieses Kapitel wurde veröffentlicht in:**

*Agronomy for Sustainable Development* (2018; 38:27)

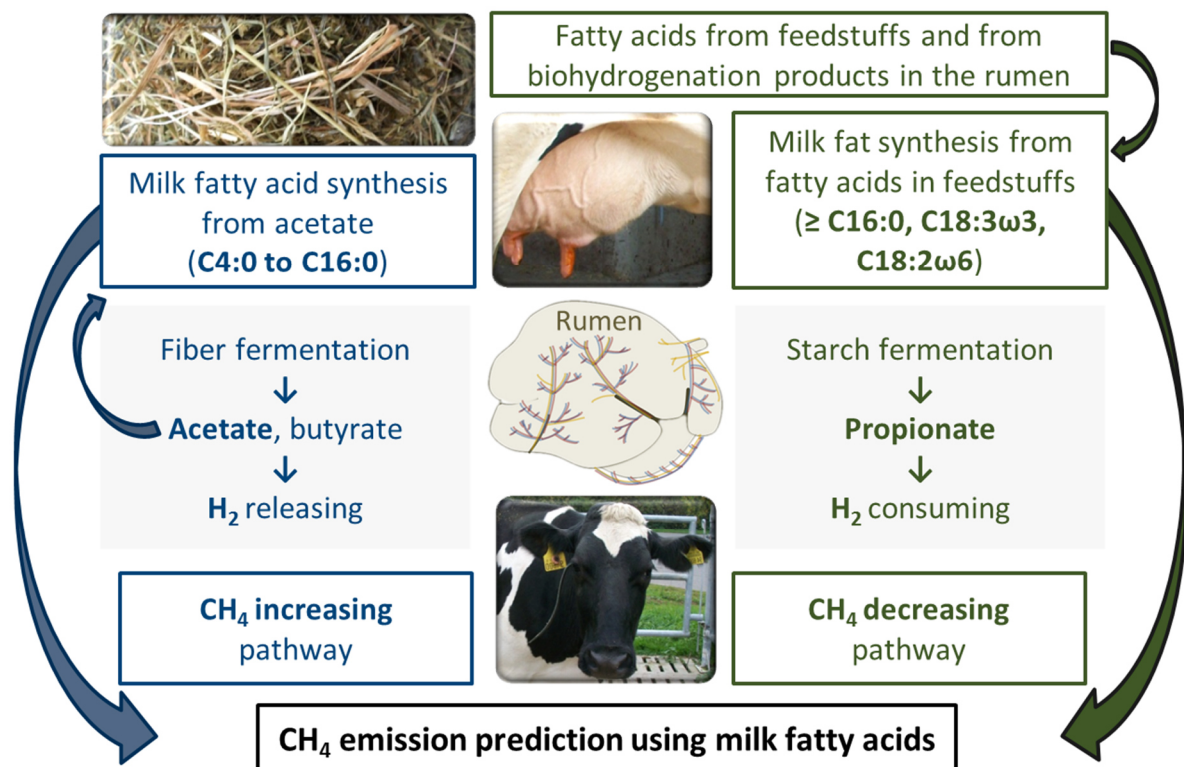
doi: 10.1007/s13593-018-0502-x

### **3.1 Abstract**

Ruminant enteric methane emission contributes to global warming. Although breeding low methane-emitting cows appears to be possible through genetic selection, doing so requires methane emission quantification by using elaborate instrumentation (respiration chambers, SF<sub>6</sub> technique, GreenFeed) not feasible on a large scale. It has been suggested that milk fatty acids are promising markers of methane production. We hypothesized that methane emission can be predicted from the milk fatty acid concentrations determined by mid-infrared spectroscopy, and the integration of energy-corrected milk yield would improve the prediction. Therefore, we examined relationships between methane emission of cows measured in respiration chambers and milk fatty acids, predicted by mid-infrared spectroscopy, to derive diet-specific and general prediction equations based on milk fatty acid concentrations alone and with the additional consideration of energy-corrected milk yield. Cows were fed diets differing in forage type and linseed supplementation to generate a large variation in both CH<sub>4</sub> emission and milk fatty acids. Depending on the diet, equations derived from regression analysis explained 61 to 96% of variation of methane emission, implying the potential of milk fatty acid data predicted by mid-infrared spectroscopy as novel proxy for direct methane emission measurements. When data from all diets were analyzed collectively, the equation with energy-corrected milk yield (CH<sub>4</sub> (L/day) = -1364 + 9.58 × energy-corrected milk yield + 18.5 × saturated fatty acids + 32.4 × C18:0) showed an improved coefficient of determination of cross-validation  $R^2_{CV} = 0.72$  compared to an equation without energy-corrected milk yield ( $R^2_{CV} = 0.61$ ). Equations developed for diets supplemented by linseed showed a lower  $R^2_{CV}$  as compared to diets without linseed (0.39 to 0.58 vs. 0.50 to 0.91). We demonstrate for the first time that milk fatty acid concentrations predicted by mid-infrared spectroscopy together with energy-corrected milk yield can be used to estimate enteric methane emission in dairy cows.

### 3.2 Introduction

Livestock contributes approximately 18% to the global anthropogenic greenhouse gas emission (Hristov et al., 2013b). Methane (CH<sub>4</sub>) mitigation through feeding and genetic selection has been reported to range from 2.5 to 19% in cattle (Knapp et al., 2014, Pickering et al., 2015). Genetic selection of low-emitting cows requires quantifying individual methane emission in large populations. However, *in vivo* methane quantification via respiration chambers, the SF<sub>6</sub> technique and the GreenFeed system, are not feasible on a large scale (Hammond et al., 2016a). Biochemical relationships among rumen fermentation pathways, CH<sub>4</sub> production, and milk fatty acid composition suggest the usefulness of milk fatty acid profiles to predict methane emission (L/day) (Knapp et al., 2014, van Lingen et al., 2014) (Figure 3.1).



**Figure 3.1.** The physiological relationship between feeding and methane emission and between feeding and milk fatty acid composition. Our aim was to generate regression equations to predict methane emission by using the milk fatty acid composition estimated by mid-infrared spectroscopy (adapted from Engelke et al., 2018).

There have been several reports on the relationship between milk fatty acids and methane emission as well as on equations predicting methane yield defined as L of CH<sub>4</sub> per kg dry matter intake and methane intensity defined as L of CH<sub>4</sub> per kg energy-corrected milk yield (van Lingen et al., 2014, Castro-Montoya et al., 2017). Besides dry matter intake, the dietary

composition, especially forage type and fat supplements affects milk fatty acid profile and influences methane prediction equations (van Lingen et al., 2014, Dijkstra et al., 2016, Rico et al., 2016). Thus, diet-specific and general equations for estimation of methane emission are important for different farming conditions. Although gas chromatography is the reference technique to measure milk fatty acids, it is unsuitable for routine milk fatty acid determination. In contrast to gas chromatography, mid-infrared spectroscopy can inexpensively predict major milk fatty acids and groups of fatty acids but prediction quality differs among fatty acids (Soyeurt et al., 2011, De Marchi et al., 2014). A Belgian group predicted CH<sub>4</sub> emission by directly using the global milk mid-infrared spectra with partial least square regression and compared results with multiple correlations between milk fatty acids and CH<sub>4</sub> (Dehareng et al., 2012). These authors concluded that global milk mid-infrared spectra could be more feasible than predicted milk fatty acids to estimate CH<sub>4</sub> emission (Dehareng et al., 2012). The methane prediction derived from global mid-infrared milk spectra by Dehareng et al. (2012) was further improved by including information on lactation stage (Vanlierde et al., 2015, Vanlierde et al., 2016). Dry matter intake is the main determinant for CH<sub>4</sub> emission (Hristov et al., 2013b, Knapp et al., 2014), but individual cow intake information is not available on farms. In contrast, individual records of energy-corrected milk yield, which is highly related to dry matter intake (Hristov et al., 2013b), can readily be calculated from milk testing data. Thus, we hypothesized that CH<sub>4</sub> emission can be predicted from milk fatty acid concentrations determined by mid-infrared spectroscopy, and that the integration of energy-corrected milk yield improves prediction. Our objective was to develop equations that predict CH<sub>4</sub> emission on the basis of milk fatty acid composition estimated by mid-infrared spectroscopy. We further investigated whether inclusion of energy-corrected milk yield, compared with dry matter intake, could improve the prediction. The datasets were based on CH<sub>4</sub> emission of dairy cows measured in respiration chambers fed diets differing in forage type and linseed supplementation to generate a larger variation in both CH<sub>4</sub> emission and milk fatty acids.



### **3.3 Materials and methods**

#### ***3.3.1 Animals, experimental design and diets***

Ethical approval for the study was obtained (permission no. 7221.3-1-014/14). Twenty half-sib German Holstein cows ( $106 \pm 28$  days in milk,  $580 \pm 57$  kg bodyweight, mean  $\pm$  standard deviation) in second (15 cows) or third lactation (5 cows) were used. The required number of cows for this study was determined through a power test for crossover experimental designs as described (Rasch et al., 1998) using the CADEMO software (Windows ANOV-Version 4.03 (2000); BioMath GmbH, Rostock, Germany). Cows were kept in tie-stalls and provided with water and total mixed rations for ad libitum intake. Two isoenergetic total mixed rations, in which the major forage component was either corn silage or grass silage both with or without linseed supplementation were used ( $7 \text{ MJ NE}_L^3/\text{kg}$  dry matter) to generate a wide range of variation in both methane emissions and milk fatty acid profiles. Diets contained grass and corn silage at dry matter levels of 130 and 450 g/kg (corn silage-based diets), and 360 and 190 g/kg (grass silage-based diets), respectively. Linseed supplemented diets contained 60 g of fat/kg dry matter compared to 30 g of fat in diets without supplementation. The target nutrient content of the diets was according to recommendations of the German Society of Nutritional Physiology (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 2001). Randomly selected cows ( $n = 10$ ) were fed corn silage-based diets for 5 weeks without linseed supplementation and subsequently for another 5 weeks with linseed supplementation with one week in-between for a stepwise change of diets (11 experimental weeks per cow in total) in a randomized order (5 cows started with corn silage without linseed). The other 10 cows were allocated randomly to grass silage diets without or with linseed supplementation for 5 weeks each (5 cows started with grass silage without linseed). Feed intake was recorded daily. Residual feed was removed from the trough before cows were offered fresh feed at 0730 and 1730 h. Cows were milked at 0630 and 1630 h. Three cows feeding on the grass silage-based diet supplemented with linseed had to be excluded from analysis because of illness or feed refusal.

#### ***3.3.2 Determination of methane production, feed and milk composition***

Methane emission of each cow was quantified in separate respiration chambers in experimental weeks 5 and 11. Cows entered the chambers 15 h before starting two subsequent 24-h  $\text{CH}_4$ -measurements (0700 to 0700 h). The average 24-h  $\text{CH}_4$  emission was calculated for

---

<sup>3</sup>  $\text{NE}_L$ : Netto-Energie-Laktation (*net energy for lactation*).

each cow (Table 3.1). In the chambers, the temperature and relative humidity were 15 °C and 60%, respectively, and the light was on from 0600 to 1900 h (Derno et al., 2009). The CH<sub>4</sub> recovery in the chambers was 99.9%. Analyses of feed were performed according to the Weender standard analysis (Naumann et al., 1976) with modifications by van Soest et al. (1991) by the accredited feed laboratory Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt der LMS Agrarberatung GmbH (LUFÄ, Rostock, Germany). The energy content was calculated as recommended (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 2001).

**Table 3.1.** Performance data and milk fatty acid composition of lactating cows ( $N = 20$ ) receiving rations based on grass silage or corn silage with and without linseed supplementation, and performance of milk fatty acid prediction by mid-infrared spectroscopy. Dry matter intake, energy-corrected milk yield, methane emission, and unsaturated fatty acids are abbreviated as DMI, ECM, CH<sub>4</sub>, and UFA. Performance of mid-infrared spectroscopy equations to predict milk fatty acids: standard error of calibration ( $SE_C$ ), coefficient of determination of calibration ( $R^2_C$ ), root mean square error (RMSE) of cross-validation, and the cross-validation coefficient of determination ( $R^2_{CV}$ ) (adapted from Engelke et al., 2018)

Variable	Mean	SD	Min.	Max.	$SE_C$	$R^2_C$	RMSE	$R^2_{CV}$
DMI (kg/day)	17.4	3.13	9.3	22.3	-	-	-	-
ECM (kg/day)	26.3	5.36	12.6	36.1	-	-	-	-
Milk fat (g/L)	42.8	6.10	32.1	56.7	-	-	-	-
Methane production								
CH <sub>4</sub> (L/day)	525	108	324	729	-	-	-	-
CH <sub>4</sub> /ECM (L/kg)	20.3	3.66	14.7	34.3	-	-	-	-
CH <sub>4</sub> /DMI (L/kg)	30.5	4.73	20.7	50.4	-	-	-	-
Fatty acid (% of total fat)								
Saturated	66.6	6.69	54.6	78.4	0.06	0.10	0.07	0.99
Unsaturated	33.4	6.69	21.6	45.4	0.05	0.99	0.05	0.99
Mono- (% UFA)	86.8	1.06	84.2	88.9	0.06	0.98	0.06	0.98
Poly- (% UFA)	13.2	1.06	11.1	15.8	0.02	0.83	0.03	0.81
C16:0	28.2	5.03	18.7	37.2	0.09	0.95	0.10	0.94
C18:0	12.5	2.43	8.8	16.7	0.06	0.91	0.06	0.90
C18:1 <sub>cis</sub>	22.2	4.51	13.9	31.0	0.06	0.97	0.07	0.96
C18:1 <sub>trans</sub>	3.81	1.39	1.9	6.9	0.03	0.86	0.03	0.85
<i>n</i> -3 FA	0.80	0.13	0.57	1.05	0.01	0.76	0.01	0.74

During the respiration measurements, milk aliquots of one evening and the following morning milking were pooled (0.25% of milk yield per milking). Milk fat and protein content was analysed using mid-infrared spectroscopy (MilkoScan FT6000 and MilkoScan FT+; Foss, Hilleroed, Denmark) by the state control association Mecklenburg-Western Pomerania (Landeskontrollverband für Leistungs- und Qualitätsprüfung Mecklenburg-Vorpommern e.V., Güstrow, Germany).

Energy-corrected milk yield (kg/d) was calculated as  $[(0.38 \times \text{milk fat \%} + 0.21 \times \text{milk protein \%} + 1.05) / 3.28 \times \text{milk yield kg/d}]$  (Spiekers et al., 2009). Milk fat and fatty acid composition were analyzed using mid-infrared spectroscopy (MilkoScan FT6000) by a commercial laboratory (Comité du Lait, Battice, Belgium). Multivariate calibration equations using partial least squares regression were used to derive milk fatty acid concentrations. One milk sample (grass silage without linseed group) produced invalid results which were not used in the statistical analysis. Contents of saturated and unsaturated fatty acids, as well as isomers of C18:1*cis* and *trans* and *n*-3 fatty acids, were predicted as groups and were expressed as the percentage of total milk fat. Mono- and polyunsaturated fatty acids were expressed as the percentage of unsaturated fatty acids in milk fat. Milk palmitic (C16:0) and stearic acids (C18:0) were estimated individually. Performance data of milk fatty acid prediction are given in Table 3.1.

### **3.3.3 Statistical analyses**

**3.3.3.1 Development of prediction equations and computing of correlations.** Methane emission and CH<sub>4</sub> intensity were estimated using multiple linear regression analysis with the stepwise explanatory-independent variable selection method for each diet separately. Methane emission was also predicted based on combined data categorized by basal diet or linseed supplementation, as well as for all available data across four diets to explore diet dependency of methane prediction equations. This was done to test different feeding scenarios and to explore how explanatory milk fatty acids differ in prediction models for various diets. For the regression analysis, three datasets with different independent explanatory variables were made available. The first dataset included only the milk fatty acid concentrations (nine items: groups or individual milk fatty acids; Table 3.1), whereas the second set additionally included the energy-corrected milk yield, and the third set included dry matter intake instead of energy-corrected milk yield. Prediction models for CH<sub>4</sub> intensity were generated with datasets 1 and 3. The entry and stay levels of explanatory variables for the stepwise (forward) variable selection method were set at  $P \leq 0.15$ . Selection of best models was based on improvement in the multiple fit parameters as described by Kaps and Lamberson (2004). According to this, we selected best models that simultaneously maximized the coefficient of determination ( $R^2_{Model}$ ) and minimized the conceptual predictive criterion ( $C_p$ ), implying that the lowest number of variables that could explain the highest variation was allowed to enter the equations. In a separate crosscheck, it was also ensured that best model selection based on the two fit parameters ( $R^2_{Model}$  and  $C_p$ ) also corresponded to the lowest Akaike's Information Criteria and residual sum of squares, two other

commonly used fit parameters. For the sake of clarity, we however report only  $R^2_{Model}$  as a fit parameter because it is most commonly used, and corresponds to the proportion of variation explained. Using the predicted milk fatty acid and measured methane emission data, Pearson correlations were computed. A Spearman rank correlation analysis was also performed to quantify whether the cow rankings for CH<sub>4</sub> emission levels were consistent between consecutive periods, when cows were fed diets with or without linseed in two different periods.

**3.3.3.2 Cross-validation of prediction equations.** To assess the predictive ability of the developed methane prediction models, an internal cross-validation was performed using the SAS software (SAS Institute Inc., 2017). The cross-validation was based on the above-described datasets and run through a stepwise approach. Data sub-sets were generated by omitting data of one animal at a step, and the emission of the omitted animal was predicted using the regression function with the data from remaining animals as described (Moraes et al., 2014). Thus, methane prediction for specific animals was generated using models fitted without the observation of these specific animals. The root mean square error of cross-validation (RMSE) and the cross-validation coefficient of determination ( $R^2_{CV}$ ) were then estimated to evaluate the goodness of model fit for the cross-validation.

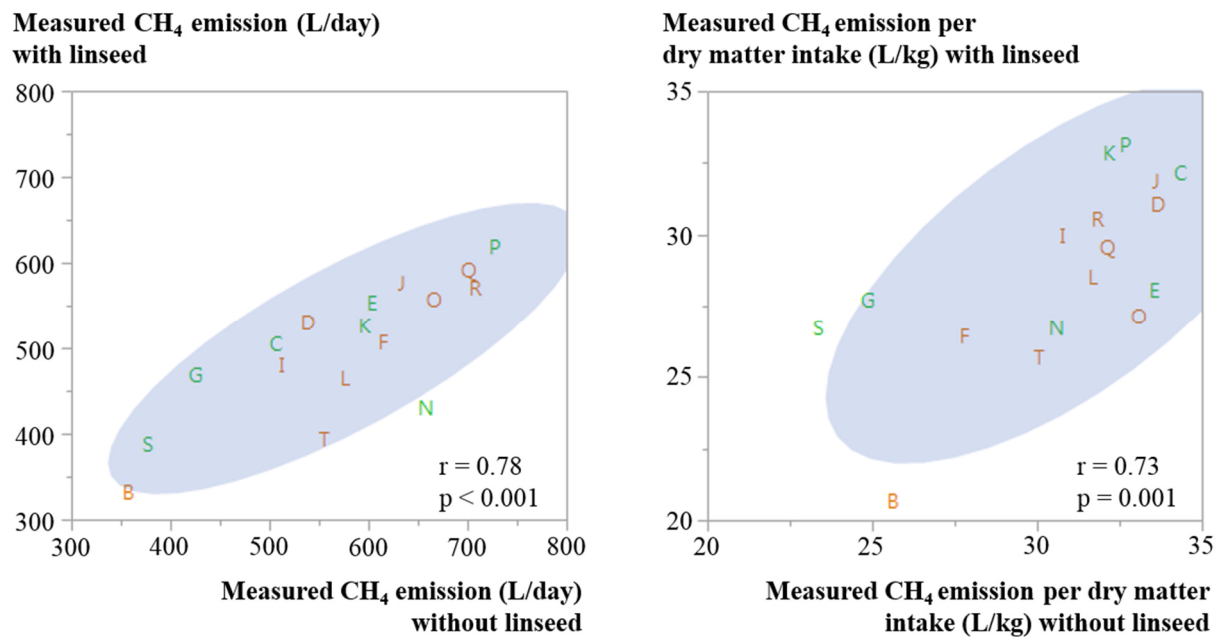
### 3.4 Results and discussion

#### 3.4.1 Methane emission and milk fatty acid composition

The dataset included a total of 36 observations from 20 cows to develop methane prediction equations feeding four different diets varying in basal rations (grass silage or corn silage) with or without linseed supplementation. The diets provoked a wide range of methane yield with a minimum of 21 and a maximum of 50 L/kg dry matter intake, and milk fatty acid composition ranged from 55 to 78% saturated fatty acids of total fat (Table 3.1). Results of studies in which 30 different diets with and without lipid supplements were fed were used in a meta-analysis (van Lingen et al., 2014); the methane yield ( $21.5 \pm 2.46$  g/kg of dry matter intake; mean  $\pm$  SD) was lower than observed in our study but milk fat levels of C16:0 ( $31.3 \pm 4.91$  g/100 g of total milk fat) and C18:0 ( $9.8 \pm 2.41$  g/100 g of total milk fat) were comparable (Table 3.1). When diets based on grass and corn silage were fed mean methane yields ( $24.1 \pm 1.87$  g/kg of dry matter intake) and milk fat levels of C16:0 ( $35.4 \pm 2.72$  g/100 g of total fatty acids) and C18:0 ( $7.5 \pm 1.03$  g/100 g of total fatty acids) were reported (van Gastelen et al., 2017) but variability was smaller than in our and the van Lingen et al. (2014) study.

Our results for milk fatty acid composition were largely in line with an earlier study where milk fatty acid contents were also determined by mid-infrared spectroscopy-based predictions (Soyeurt et al., 2011). It has been shown that milk fatty acid composition analysed by mid-infrared spectroscopy as compared to gas chromatography corresponded well (Soyeurt et al., 2011). Predictions of milk fatty acid contents by mid-infrared spectroscopy validated by gas chromatography showed high accuracies ( $R^2_{CV} \geq 0.88$ ) for individual saturated fatty acids, C16:0, C18:0, C18:1*trans*, C18:1*cis*, groups of saturated, unsaturated and monounsaturated fatty acids, whereas accuracy was  $R^2_{CV} = 0.75$  for *n*-3 fatty acids. This agreement between mid-infrared spectroscopy and gas chromatography is the prerequisite to use mid-infrared spectroscopy for routine milk fatty acid recordings.

Furthermore, we calculated rank correlation coefficients of  $r = 0.78$  and  $r = 0.73$  ( $P = 0.001$ ) for CH<sub>4</sub> emission and CH<sub>4</sub> yield, respectively (Figure 3.2). These results indicate replicable responses under the effects of either diet with or without linseed, representing different environmental conditions, and suggested the existence of a genetic component responsible for the individual methane production level.



**Figure 3.2.** Correlation of measured CH<sub>4</sub> emission in liters per day and measured CH<sub>4</sub> emission per kilogram dry matter intake between linseed supplemented and non-supplemented diets considering individual animals (A, B, C, ...), and basal ration (grass silage = green, corn silage = orange) indicating repeatable phenotypes under the effect of either diets with or without linseed. The shaded area depicts the confidence ellipse. The Spearman rank correlation coefficient ( $r$ ) and the probability ( $p$ ) are given (adapted from Engelke et al., 2018).

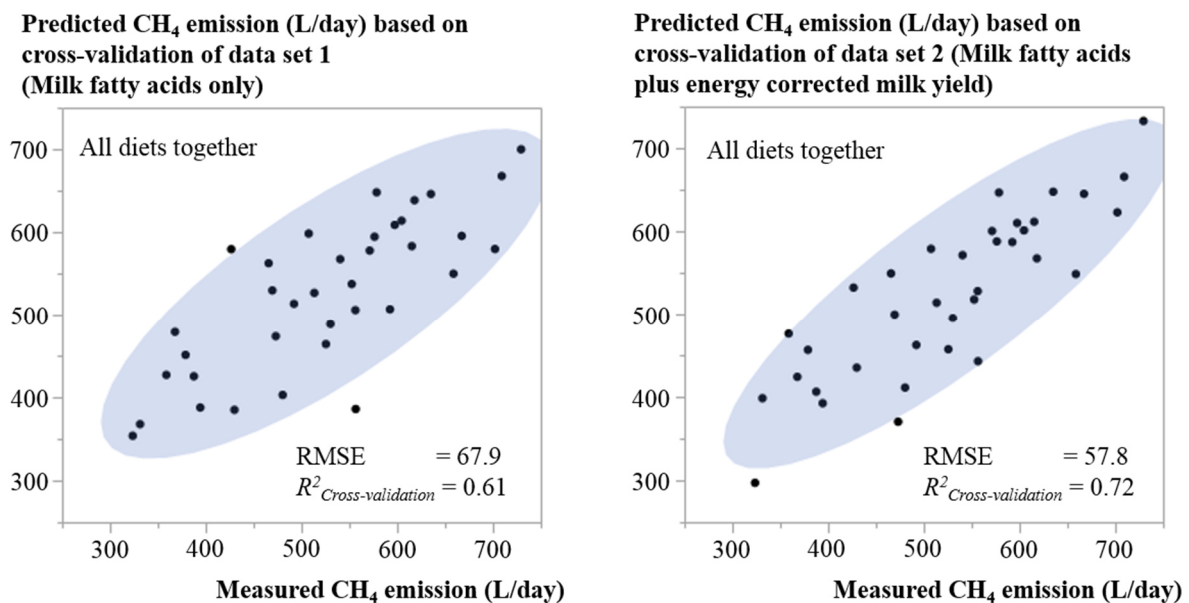
### 3.4.2 Predicting methane emission

Most studies reporting prediction equations have been based on milk fatty acid concentrations analyzed by gas chromatography (van Lingen et al., 2014, Rico et al., 2016, Castro-Montoya et al., 2017). Published prediction models based on global infrared milk spectra have used the model of Dehareng et al. (2012) or further improvement of the model by integrating the lactation stage (Vanlierde et al., 2015, Vanlierde et al., 2016). Dehareng et al. (2012) included methane production data of 11 cows and have reported  $R^2_{CV}$  between 0.68 and 0.79 for g of CH<sub>4</sub> per day and g of CH<sub>4</sub> per kg of milk, respectively. Shetty et al. (2017) developed methane prediction models based on global infrared milk spectra with  $R^2_{Validation} = 0.13$  and concluded that it is not feasible to predict methane emission (L/d) based on mid-infrared spectra alone. Upon integrating milk yield the prediction accuracy was improved ( $R^2_{Validation} = 0.35$ ) (Shetty et al., 2017). In the present study, three datasets were used to develop multiple regression equations. When energy-corrected milk yield was additionally included (dataset 2), the goodness of fit was improved by up to 25% relative to the equations based on dataset 1 (Table 3.2). When energy-corrected milk yield was replaced by dry matter intake in the model (dataset 3; Table 3.2), the goodness of fit was improved by up to 41% relative to equations derived from dataset 1.

**Table 3.2.** Summary of multiple regression equations predicting methane emission. Dataset 1 included milk fatty acids (saturated, unsaturated, mono- and polyunsaturated fatty acids, and *n-3* fatty acids are abbreviated as SFA, UFA, MUFA, PUFA, and *n3*, as well as isomers of C18:1*cis* and *trans* and single fatty acids of C16:0 and C18:0), whereas datasets 2 and 3 additionally included energy-corrected milk yield (ECM) or dry matter intake (DMI) as independent variables. Equations were developed separately for experimental diets containing grass silage without or with linseed supplementation (GS-L0, GS-LS) and corn silage without or with linseed supplementation (CS-L0, CS-LS) as well as for basal rations (GS, CS), rations without or with linseed supplementation (L0, LS), and all experimental diets collectively. The  $R^2_{Model}$  and the  $P_{Model \leq}$  value of the model, the root mean square error (RMSE) of cross-validation, and the cross-validation coefficient of determination ( $R^2_{CV}$ ) are given (adapted from Engelke et al., 2018)

CH <sub>4</sub> (L/d)	N	Equation derived from the models ( $Y = a + b_1x_1 + \dots + b_nx_n$ )	$R^2_{Model}$	$P_{Model \leq}$	RMSE	$R^2_{CV}$
<b>Dataset 1</b>						
GS-L0	9	$(-979.3) + 46.2 \times C16:0$	0.94	0.001	41.91	0.91
GS-LS	7	$1002 + (-19.6) \times C18:1cis$	0.70	0.019	59.52	0.41
CS-L0	10	$(-702.6) + 40.4 \times C16:0$	0.68	0.004	71.58	0.51
CS-LS	10	$1233 + (-27.9) \times C18:1cis$	0.61	0.008	65.69	0.39
GS	16	$(-2217) + 39.7 \times PUFA + 46.9 \times C16:0 + 70.8 \times C18:0$	0.82	0.001	65.41	0.68
CS	20	$2351 + (-24.8) \times C16:0 + 71.7 \times C18:0 + (-50.8) \times C18:1cis + (-1093) \times n3$	0.75	0.001	74.08	0.50
L0	19	$(-2595) + 22.5 \times SFA + 27.4 \times C16:0 + 61.5 \times C18:0$	0.86	0.001	146.9	0.50
LS	17	$1099 + (-23.0) \times C18:1cis$	0.61	0.001	54.78	0.50
All diets	36	$(-2534) + 33.8 \times SFA + 55.0 \times C18:0 + 30.9 \times C18:1trans$	0.70	0.001	67.94	0.61
<b>Dataset 2</b>						
GS-L0	9	$(-979.3) + 46.2 \times C16:0$	0.94	0.001	41.91	0.91
GS-LS	7	$1002 + (-19.6) \times C18:1cis$	0.70	0.019	59.52	0.41
CS-L0	10	$(-604.9) + 18.2 \times ECM + 20.8 \times C16:0$	0.85	0.001	57.39	0.67
CS-LS	10	$27.42 + 16.7 \times ECM$	0.66	0.004	59.53	0.47
GS	16	$(-1020) + 10.6 \times ECM + 27.8 \times C16:0 + 38.8 \times C18:0$	0.82	0.001	64.67	0.69
CS	20	$284.1 + 16.8 \times ECM + (-6.58) \times UFA$	0.77	0.001	59.31	0.66
L0	19	$(-558.4) + 10.0 \times ECM + 24.3 \times C16:0 + 47.9 \times C18:0 + (-617) \times n3$	0.91	0.001	49.96	0.84
LS	17	$721.3 + 7.97 \times ECM + (-16.8) \times C18:1cis$	0.71	0.001	50.24	0.58
All diets	36	$(-1364) + 9.58 \times ECM + 18.5 \times SFA + 32.4 \times C18:0$	0.79	0.001	57.75	0.72
<b>Dataset 3</b>						
GS-L0	9	$(-979.3) + 46.2 \times C16:0$	0.94	0.001	41.91	0.91
GS-LS	7	$1002 + (-19.6) \times C18:1cis$	0.70	0.019	59.52	0.41
CS-L0	10	$153.0 + 33.3 \times DMI + (-23.1) \times C18:1cis + 90.3 \times C18:1trans$	0.96	0.001	34.46	0.88
CS-LS	10	$1233 + (-27.9) \times C18:1cis$	0.61	0.008	65.69	0.39
GS	16	$(-2217) + 39.7 \times PUFA + 46.9 \times C16:0 + 70.8 \times C18:0$	0.82	0.001	65.41	0.68
CS	20	$211.0 + 26.9 \times DMI + 29.8 \times C18:0 + (-24.1) \times C18:1cis$	0.90	0.001	40.27	0.84
L0	19	$(-1286) + 12.1 \times DMI + 37.4 \times C16:0 + 40.4 \times C18:0$	0.87	0.001	58.13	0.79
LS	17	$292.2 + 21.2 \times DMI + 25.8 \times C18:0 + (-20.9) \times C18:1cis$	0.78	0.001	50.95	0.58
All diets	36	$361.4 + 18.9 \times DMI + 28.5 \times C18:0 + (-23.6) \times C18:1cis$	0.82	0.001	53.85	0.75

Although dry matter intake explains a large part of the variation observed in methane emissions (Knapp et al., 2014), this information is not available on farms. Thus, it cannot be considered as a variable to be implemented in methane prediction equations for on-farm applications. In contrast, energy-corrected milk yield is a readily available cow-individual measure reflecting the dry matter intake (Hristov et al., 2013b) and consequently can be used as a surrogate for dry matter intake. Using the first dataset, the goodness of the regression fit for CH<sub>4</sub> emission for individual diets ranged from  $R^2_{Model} = 0.61$  to 0.94 (Table 3.2). Using data from all four diets collectively, a coefficient of determination of  $R^2_{Model} = 0.70$  was obtained.



**Figure 3.3.** Measured and predicted CH<sub>4</sub> emission derived from the cross-validation of multiple regression equations across all experimental diets (grass silage without linseed, corn silage without linseed, grass silage with linseed and corn silage with linseed) based on dataset 1 (milk fatty acids only) and dataset 2 (milk fatty acids plus energy-corrected milk yield). The shaded area depicts the confidence ellipse. The cross-validation coefficient of determination ( $R^2_{Cross-validation}$ ) and the root mean square error (RMSE) of cross-validation are given (adapted from Engelke et al., 2018).

The equations based on datasets 1 to 3 were validated by an internal cross-validation (Table 3.2). The  $R^2_{CV}$  ranged between 0.39 and 0.91 with a RMSE between 147 and 35 L/day and the  $R^2_{CV}$  was lowest for linseed-supplemented diets. If linseed-supplemented diets were not considered, the  $R^2_{CV}$  was never lower than 0.50. When coefficients of determination were compared between dataset 1 and datasets 2 and 3 for all four diets collectively, the  $R^2_{CV}$  was improved from 0.61 to 0.72 by the integration of energy-corrected milk yield (Figure 3.3), and to  $R^2_{CV} = 0.75$  by the integration of dry matter intake as explanatory variables.



In previous studies predicting CH<sub>4</sub> emission (g/day) using gas chromatography to determine milk fatty acid concentrations, improvements of goodness of fit values by 5 to 12% were achieved when dry matter intake was considered in the model (Mohammed et al., 2011, Rico et al., 2016). In a meta-analysis, improved indices of predictive ability were observed when dry matter intake was included (Castro-Montoya et al., 2017). Nevertheless, a further cross-validation of our prediction equation using an independent validation set of cows fed different diets is desirable.

A further factor which might be important for methane prediction is stage of lactation, because in early lactation fatty acids entering milk fat are derived to a larger degree from lipolysis of lipid resources of cows, which can affect explanatory fatty acids in methane prediction models (Vanlierde et al., 2015). The patterns of fatty acids from endogenous lipid depots differ from fatty acids in plant oils (Bayat et al., 2018). Vanlierde et al. (2015) tested the effect of inclusion of days in milk in the prediction model based on milk mid-infrared spectra, and showed that lactation stage-dependent prediction is more meaningful compared to lactation stage-independent prediction of methane emission although coefficient of determination did not improve. In a recent study, integrating lactation stage in the model did not improve methane predictive ability ( $R^2_{Validation} = 0.14$  vs. 0.13) (Shetty et al., 2017). In our study, all cows were in the same lactation stage which might be limiting the validity of our equation to cows in established lactation. This suggests that further research is required on the effect of lactation stage for milk fatty acid-based methane prediction.

Dietary intake of *n*-3 fatty acids with linseed reduces methane emissions and increases the proportion of polyunsaturated fatty acids in milk whereas it can inhibit mammary lipid synthesis by fatty acid intermediates produced during ruminal bio-hydrogenation (Bauman et al., 2011, Bayat et al., 2018). This complex relationship might play a role in the variability of methane production and milk fatty acid contents. Notably, the predictions obtained in this study with linseed-supplemented diets showed smaller goodness of fit values and cross-validation coefficient of determination values (Table 3.2) although the RMSE was highest for diets without linseed in dataset 1. However, when energy-corrected milk yield or dry matter intake was considered as additional explanatory variable (datasets 2 and 3), also in diets with linseed a larger part of variation could be explained. This implies that inclusion of other parameters explaining additional variation of methane emission should also be considered.

Prediction of CH<sub>4</sub> intensity would be desirable because it considers the product level. However, in our study, CH<sub>4</sub> intensity was not a robust parameter; prediction equations using the first dataset produced largely insignificant weak to moderate fit values. The use of dataset 3 did not

generate considerable improvements when compared to dataset 1. In line with this, others found moderate to low  $R^2_{Model}$  of 0.47 and  $R^2_{Validation}$  of 0.18 (van Lingen et al., 2014, Castro-Montoya et al., 2017) for predicted CH<sub>4</sub> emission per kg milk based on milk fatty acids data only.

The explanatory fatty acids in published prediction equations for methane emission differ considerably between studies (van Lingen et al., 2014, Castro-Montoya et al., 2017). The milk fatty acids C16:0 and C18:1*cis* and *trans* isomers are frequently found in prediction models for CH<sub>4</sub> emission (Chilliard et al., 2009, Rico et al., 2016, Castro-Montoya et al., 2017). A positive relationship with methane emission was found for C16:0 in this ( $r = 0.57, P < 0.001$ ) and other studies (Chilliard et al., 2009, van Lingen et al., 2014, Castro-Montoya et al., 2017). Palmitic acid is the saturated fatty acid with the highest concentration in plant feed and is also synthesized *de novo* from acetate in animal tissues, and acetate concentration in the rumen is directly associated with methane production (van Lingen et al., 2014). In contrast, C18:0 ( $r = -0.34, P = 0.044$ ) and C18:1*cis* isomers ( $r = -0.61, P < 0.001$ ) were negatively related to methane emission in our study. Vanrobays et al. (2016) have found weak negative relations for C18:0 and C18:1*cis*9 analyzed with mid-infrared spectroscopy, whereas studies using gas chromatography have reported no correlation for C18:0, but various C18:1*cis* isomers, and the sum of C18 fatty acids was negatively related to methane production (Chilliard et al., 2009, Mohammed et al., 2011, Rico et al., 2016). Stearic acid is an end product of C18:3*n-3* bio-hydrogenation and C18:3*n-3* is particularly abundant in linseed. Products of bio-hydrogenation and intermediates were negatively related to CH<sub>4</sub> emission (van Gastelen and Dijkstra, 2016). In our study, C18:1*trans* isomers were a factor in the model for CH<sub>4</sub> emission in the equation of dataset 1 for all diets. They tended to be negatively related to methane emission ( $r = -0.31, P = 0.066$ ), in line with findings from other studies (Mohammed et al., 2011, Rico et al., 2016). Groups of fatty acids appeared to play a minor role as prediction variables in our models, but the group of saturated fatty acids was positively associated with methane emission ( $r = 0.60, P < 0.001$ ) as was also found by others (van Gastelen and Dijkstra, 2016, Vanrobays et al., 2016). No specific pattern for milk fatty acids as explanatory variables could be identified in the equations. However, it appears that among the milk fatty acids considered in the datasets, C16:0 plays a dominant role in the prediction of methane emission by milk fatty acids.

### **3.5 Conclusion**

The prediction of methane emission using data of all four diets collectively showed moderate predictive accuracies ( $R^2_{CV}$  between 0.61 and 0.75). When energy-corrected milk yield or dry matter intake was additionally considered in the models, prediction accuracy improved by 18 and 23%, respectively. Thus, energy-corrected milk yield in prediction equations is a useful replacement for dry matter intake which cannot be determined on farm. Models developed for diets including linseed seem to be lower in prediction accuracy which deserves further research. We conclude that methane prediction equations based on milk fatty acids estimated by mid-infrared spectroscopy and energy-corrected milk yield could be used as screening method for individual methane emission of cows.

### **3.6 Acknowledgments**

The authors express their gratitude to the teams at the ‘Tiertechnikum’ and ‘EAR’ of the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN) for excellent technical assistance. The selection of cows by F. Schultz (RinderAllianz GmbH, Woldegk, Germany) is gratefully acknowledged. We thank DANONE GmbH, Haar, Germany, for providing milk composition data, and Ms. Krüger and Ms. Göschl of DANONE GmbH for fruitful discussions.

#### ***Funding information***

This work is part of the project “Innovation potential to reduce greenhouse gas emissions in the dairy supply chain” (INNO MilCH4) and was supported by funds from the Federal Ministry of Food and Agriculture based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food under the innovation support program (grant no. 2817501011). The publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany.

#### ***Compliance with ethical standards***

The procedures performed in this study were in accordance with the German Animal Welfare Act. Ethic approval for the study was obtained from the relevant authority (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischereiwesen Mecklenburg-Vorpommern, Germany; permission no. 7221.3-1-014/14).

#### ***Open Access***

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

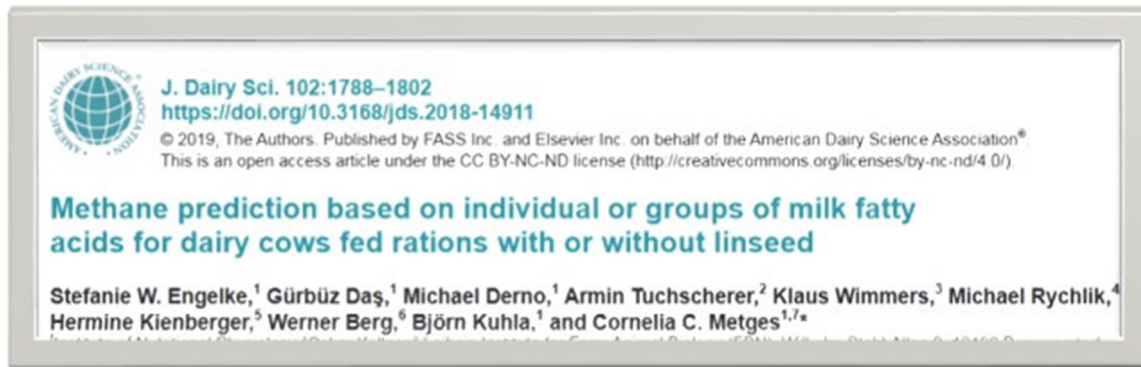
#### ***Patent***

A request for grant of a European patent was submitted (application no. EP17189083.3).

### **3.7 Autorenbeiträge**

C.C.M. entwarf das experimentelle Design der Studie und trug die Gesamtverantwortung für das Projekt. M.D. und S.W.E. führten das Tierexperiment durch. S.W.E. sammelte und führte die einzelnen Daten für die Auswertung zusammen. A.T. und G.D. entwarfen die Modelle für die statistischen Analysen, die von S.W.E. durchgeführt wurden. S.W.E. schrieb gemeinsam mit C.C.M., B.K. und G.D. das Manuskript. W.B. lieferte Beiträge zur Diskussion. C.C.M. hat die Hauptverantwortung für den finalen Inhalt des Manuskripts.

#### **4. Methane prediction based on individual or groups of milk fatty acids for dairy cows fed rations with or without linseed**



Stefanie W. Engelke<sup>1</sup>, Gürbüz Daş<sup>1</sup>, Michael Derno<sup>1</sup>, Armin Tuchscherer<sup>2</sup>, Klaus Wimmers<sup>3</sup>, Michael Rychlik<sup>4</sup>, Hermine Kienberger<sup>5</sup>, Werner Berg<sup>6</sup>, Björn Kuhla<sup>1</sup> and Cornelia C. Metges<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Nutritional Physiology “Oskar Kellner”, <sup>2</sup>Institute of Genetics and Biometry and <sup>3</sup>Institute of Genome Biology, all of Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany

<sup>4</sup>Analytical Food Chemistry, Technical University of Munich, Maximus-von-Imhof-Forum, and <sup>5</sup>Bavarian Center for Biomolecular Mass Spectrometry, Gregor-Mendel-Strasse 4, 85354 Freising, Germany

<sup>6</sup>Department of Technology Assessment and Substance Cycles, Leibniz Institute for Agricultural Engineering and Bioeconomy (ATB), Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam, Germany

<sup>7</sup>Nutritional Physiology and Animal Nutrition, Faculty of Agriculture and Environmental Sciences, University of Rostock, 18059 Rostock

Manuscript received: April, 11, 2018

Final revision received: October, 18, 2018

Revision accepted: October, 25, 2018

First published online: December, 26, 2018

\*Corresponding author: metges@fbn-dummerstorf.de

**Dieses Kapitel wurde veröffentlicht in:**

*Journal of Dairy Science* (2019; 102: 1788-1802)

doi: 10.3168/jds.2018-14911

#### 4.1 Abstract

Milk fatty acids (MFA) are a proxy for the prediction of CH<sub>4</sub> emission from cows, and prediction differs with diet. Our objectives were (1) to compare the effect of diets on the relation between MFA profile and measured CH<sub>4</sub> production, (2) to predict CH<sub>4</sub> production based on 6 datasets differing in the number and type of MFA, and (3) to test whether additional inclusion of energy-corrected milk (ECM) yield or dry matter intake (DMI) as explanatory variables improves predictions. Twenty dairy cows were used. Four diets were used based on corn silage (CS) or grass silage (GS) without (L0) or with linseed (LS) supplementation. Ten cows were fed CS-L0 and CS-LS, and the other 10 cows GS-L0 and GS-LS in random order. In feeding wk<sup>4</sup> 5 of each diet, CH<sub>4</sub> production (L/d) was measured in respiration chambers for 48 h and milk was analysed for MFA concentrations by gas chromatography. Specific CH<sub>4</sub> prediction equations were obtained for L0-, LS-, GS-, and CS-based diets and for all 4 diets collectively and validated by an internal cross-validation. Models were developed containing either 43 identified MFA or a reduced set of 7 groups of biochemically related MFA plus C16:0 and C18:0. The CS and LS diets reduced CH<sub>4</sub> production compared with GS and L0 diets, respectively. Methane yield (L/kg of DMI) reduction by LS was higher with CS than GS diets. The concentrations of C18:1*trans* and *n*-3 MFA differed among GS and CS diets. The LS diets resulted in a higher proportion of unsaturated MFA at the expense of saturated MFA. When using the dataset of 43 individual MFA to predict CH<sub>4</sub> production (L/d), the cross-validation coefficient of determination ( $R^2_{CV}$ ) ranged from 0.47 to 0.92. When using groups of MFA variables, the  $R^2_{CV}$  ranged from 0.31 to 0.84. The fit parameters of the latter models were improved by inclusion of ECM or DMI, but not when added to the dataset of 43 MFA for all diets pooled. Models based on GS diets always had a lower prediction potential ( $R^2_{CV}$  0.31 to 0.71) compared to data from CS diets ( $R^2_{CV}$  0.56 to 0.92). Models based on LS diets produced lower prediction with datasets with reduced MFA variables ( $R^2_{CV}$  0.62 to 0.68) compared with L0 diets ( $R^2_{CV}$  0.67 to 0.80). The MFA C18:1*cis*9 and C24:0, and the monounsaturated FA occurred most often in models. In conclusion, models with a reduced number of MFA variables and ECM or DMI are suitable for CH<sub>4</sub> prediction, and CH<sub>4</sub> prediction equations based on diets containing linseed resulted in lower prediction accuracy.

#### Key words:

Dairy cow, methane emission prediction, methane mitigation, methane proxy, milk fatty acids

---

<sup>4</sup> wk: Woche (*week*) ist im *Journal of Dairy Science* eine festgelegte Abkürzung und ohne Definition zu verwenden (Journal of Dairy Science®, 2016).

## **4.2 Introduction**

Methane (CH<sub>4</sub>) is a greenhouse gas and a product of rumen fermentation (Hristov et al., 2013b). Methane production (L/d) is a heritable trait, and genetic selection for low-emitting cows is a promising mitigation option (Pickering et al., 2015, Negussie et al., 2017). Methane emission quantification in respiration chambers is considered as the gold standard but unsuitable for large-scale individual animal measurements (Hammond et al., 2016a, Patra, 2016). One promising proxy for the prediction of CH<sub>4</sub> production is the concentration of milk fatty acids (MFA) (van Gastelen and Dijkstra, 2016, Negussie et al., 2017). Dietary composition affects the relation between MFA and CH<sub>4</sub> emission parameters (Mohammed et al., 2011, Dijkstra et al., 2016, Rico et al., 2016). Milk fatty acids synthesized *de novo* are predominantly generated from rumen acetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate (Shingfield et al., 2013) which are derived from fiber fermentation, and they are positively associated with ruminal CH<sub>4</sub> production (Shingfield et al., 2013, Castro-Montoya et al., 2016a). Forage type in ruminant diets can affect CH<sub>4</sub> production as well as on MFA pattern (Beauchemin et al., 2008, Hart et al., 2015, van Gastelen et al., 2015). Likewise, a high starch content favors propionate synthesis, which consumes fermentative hydrogen and can thus reduce CH<sub>4</sub> production (Hook et al., 2010, Knapp et al., 2014). The MFA groups of long-chain MUFA and PUFA, and the individual C18:0 originate from plant fat-derived UFA (Ferlay et al., 2013, Kliem and Shingfield, 2016, Meignan et al., 2017) are either directly transferred into milk fat (e.g. C18:3 $n$ -3) or influence rumen fermentation, thereby altering the pattern and level of precursors for MFA synthesis and affect the postabsorptive lipid metabolism (*de novo* MFA synthesis, saturation or desaturation rates, or FA elongation) (Angulo et al., 2012, Lanier and Corl, 2015, Meignan et al., 2017). In addition, dietary fat-associated decreases of fiber degradability and toxic effects of PUFA on archaea reduce CH<sub>4</sub> production (Maia et al., 2007, Benchaar et al., 2015). Furthermore, fat supplements can also affect DMI and, thus net production of short-chain fatty acids.

Several authors have used MFA concentrations to develop CH<sub>4</sub> prediction equations that differ in type and numbers of explanatory MFA (e.g. van Lingen et al., 2014, Castro-Montoya et al., 2016b, Rico et al., 2016). For example, van Lingen et al. (2014) developed CH<sub>4</sub> predictions based on 21 individual and 3 groups of MFA concentrations whereas Rico et al. (2016) included 83 individual MFA and sums of different MFA proportions. Van Gastelen and Dijkstra (2016) pointed out that only C17:1 $cis$ 9 and C18:1 $cis$ 11 appeared in two or more of the prediction equations published, indicating that explanatory MFA are extremely diverse, which likely is a consequence of differences in diet composition (Dijkstra et al., 2011, Mohammed et al., 2011,



Rico et al., 2016). We were interested to know how prediction equations change when the MFA data changes in the number of variables and whether individual MFA or groups of related MFA are used.

It has been also discussed whether the combination of MFA concentrations with additional explanatory parameters would improve prediction (Castro-Montoya et al., 2016b, Negussie et al., 2017, van Gastelen et al., 2017). The DMI of cows is known as the main determinant for CH<sub>4</sub> production (Knapp et al., 2014), and DMI is associated with milk yield (Hristov et al., 2013b). Consequently, milk yield could be a potential alternative for DMI as a variable in prediction equations (Hristov et al., 2013b, Negussie et al., 2017). We have reported that a prediction equation based on MFA, determined by mid-infrared spectroscopy, which contained DMI as an additional explanatory variable showed a similar coefficient of determination when DMI was replaced by ECM (Engelke et al., 2018).

Thus, our hypothesis was that CH<sub>4</sub> prediction equations based on MFA depend on the number of MFA or MFA groups variables, and that inclusion of DMI or ECM together with MFA improves prediction equations. Hence, the objectives of this study were (1) to determine the effect of dietary composition on the relationship between MFA concentrations and CH<sub>4</sub> production, with special emphasis on the effect of linseed supplementation; (2) to compare CH<sub>4</sub> prediction models based on differently sized and composed MFA datasets; and (3) to test whether the inclusion of DMI or ECM in addition to MFA concentrations as variable improves prediction.

## **4.3 Materials and methods**

### **4.3.1 Animals, Experimental Design and Diets**

The procedures performed in our study were in agreement with the German Animal protection law and approved by the relevant authority (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischereiwesen Mecklenburg-Vorpommern, Germany; permission no. 7221.3-1-014/14). Twenty lactating German Holstein cows ( $106 \pm 28$  DIM,  $29.5 \pm 7.7$  kg ECM/d,  $580 \pm 57$  kg BW<sup>5</sup>; mean  $\pm$  SD<sup>6</sup>) of which 15 cows were in second and 5 cows were in third lactation, were purchased from a dairy farm located in the region of Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. All cows were sired by 1 bull (Omega 802670; Rinderzucht Mecklenburg-Vorpommern GmbH, Woldegk, Germany). Cows were kept in tiestalls, had free access to water, and were offered a TMR for ad libitum intake. Milking occurred at 0630 and 1630 h. To produce a wide range of CH<sub>4</sub> production values, we used 2 basal TMR, which were composed close to what is commonly used in German dairy farming. The major forage component was either corn silage (CS) or grass silage (GS), supplemented with (LS) or without linseed (L0; Table 4.1). Diets contained grass silage and corn silage at DM levels of 130 and 450 g/kg (CS) or 360 and 190 g/kg (GS), respectively. The LS diets contained 60 g of fat/kg DM whereas the L0 diets had 30 g of fat/kg of DM. The diets had the same target energy level of 7 MJ NE<sub>L</sub>/kg<sup>7</sup> of DM, which was achieved by replacing the linseed product with an isoenergetic amount of starch in the TMR. Forage-to-concentrate ratio differed as follows: 66:34 (GS-L0), 73:27 (GS-LS), 65:35 (CS-L0), to 68:32 (CS-LS). We randomly selected 5 of the 20 cows to be fed the CS-L0 diet in the first 5-wk period (period A) and the CS-LS diet in the second 5-wk period (period B), whereas we randomly selected 5 other cows to be fed the CS-LS diet during the first 5-wk period and CS-L0 diet during the second 5-wk period. Another 5 cows were fed GS-L0 diet first and GS-LS diet second, whereas the remaining 5 cows were given the opposite treatments. The transition from the standard diet to an experimental diet or from one experimental diet to the other was made over 5 d in experimental week (EW) 0 and 6, respectively, in a step-wise fashion by replacing 20, 40, 60, 80, and 100% of DM of the standard diet by the experimental diet. The study was conducted in 5 experimental blocks. Each block ran over a total of 12 EW and included 4 cows, all 4 diets, and 2 periods (A and B). That means 2 cows per each diet were measured within each block. Cows assigned to the CS and GS

---

<sup>5</sup> BW: Körpergewicht (*body weight*) (Journal of Dairy Science®, 2016).

<sup>6</sup> SD: Standardabweichung (*standard deviation*) (Journal of Dairy Science®, 2016).

<sup>7</sup> NE<sub>L</sub>: Netto-Energie-Laktation (*net energy for lactation*) (Journal of Dairy Science®, 2016).

diets did not differ in their mean baseline CH<sub>4</sub> production (506 and 477 L/d, respectively;  $P = 0.441$ ).

**Table 4.1.** Ingredients and chemical composition of the experimental TMR consisting of basal rations based largely on grass silage (GS) or corn silage (CS) without (L0) and with (LS) linseed supplementation (means  $\pm$  SD;  $n = 5$ ) (adapted from Engelke et al., 2019)

Item	GS		CS	
	L0	LS	L0	LS
Ingredient (g/kg of DM)				
Grass silage	343 $\pm$ 31.0	380 $\pm$ 15.0	122 $\pm$ 21.5	142 $\pm$ 34.3
Corn silage	181 $\pm$ 33.2	195 $\pm$ 37.9	445 $\pm$ 46.7	452 $\pm$ 44.0
Straw, barley	52.1 $\pm$ 7.0	60.8 $\pm$ 23.2	39.8 $\pm$ 7.2	34.0 $\pm$ 10.3
Grass hay	80.8 $\pm$ 12.0	93.5 $\pm$ 22.0	43.2 $\pm$ 3.1	43.5 $\pm$ 3.0
Corn, ground	-	-	92.7 $\pm$ 9.2	25.4 $\pm$ 27.2
Soy extract meal	25.4 $\pm$ 26.8	40.1 $\pm$ 19.2	114 $\pm$ 14.2	87.1 $\pm$ 9.2
Barley, ground	99.5 $\pm$ 17.9	-	-	-
Wheat, ground	101 $\pm$ 9.8	-	-	-
Linseed product <sup>1</sup>	-	143 $\pm$ 11.4	-	137 $\pm$ 9.9
Concentrate <sup>2</sup>	109 $\pm$ 19.7	78.4 $\pm$ 13.0	129 $\pm$ 7.3	65.0 $\pm$ 32.6
Mineral/vitamin mix <sup>3</sup>	9.1 $\pm$ 0.5	9.5 $\pm$ 0.6	10.1 $\pm$ 0.6	10.1 $\pm$ 0.6
Calcium carbonate <sup>4</sup>	-	-	4.1 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.3
Grass to corn silage ratio	1.90	1.95	0.27	0.31
Forage:concentrate ratio	66:34	73:27	65:35	68:32
DM (g/kg of FM <sup>5</sup> )	468 $\pm$ 33.0	452 $\pm$ 45.0	446 $\pm$ 32.0	439 $\pm$ 33.0
Nutrients (g/kg of DM)				
Crude ash	69.9 $\pm$ 2.8	75.8 $\pm$ 2.5	66.1 $\pm$ 3.0	65.7 $\pm$ 4.2
Crude protein	161 $\pm$ 9.0	173 $\pm$ 14.4	169 $\pm$ 11.7	163 $\pm$ 11.1
Crude fiber	166 $\pm$ 7.9	186 $\pm$ 7.1	155 $\pm$ 3.3	161 $\pm$ 4.5
Crude fat	28.1 $\pm$ 1.7	58.3 $\pm$ 7.8	29.8 $\pm$ 2.4	56.4 $\pm$ 6.5
Sugar	51.3 $\pm$ 15.7	50.1 $\pm$ 16.2	31.4 $\pm$ 7.9	30.3 $\pm$ 11.1
Starch	218 $\pm$ 12.0	110 $\pm$ 18.7	261 $\pm$ 25.4	216 $\pm$ 34.5
aNDF <sup>6</sup>	371 $\pm$ 18.1	410 $\pm$ 12.9	330 $\pm$ 10.9	352 $\pm$ 9.2
ADF	198 $\pm$ 9.8	224 $\pm$ 7.9	186 $\pm$ 5.4	194 $\pm$ 5.0
NE <sub>L</sub> (MJ/kg of DM)	6.9 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.1	7.0 $\pm$ 0.1	7.1 $\pm$ 0.1

<sup>1</sup>Omegalin 60 (Spezialfutter Neuruppin GmbH und Co.KG, Neuruppin, Germany) (per kg feed; 88% DM): 60% extruded linseed Tradilin® and 40% bran. Composition: 19.5% crude protein, 25% crude fat, 8.5% crude fiber; fatty acids (% of fat): 6% palmitic acid (C16:0), 18.4% oleic acid (C18:1; 9c), 18.5% linoleic acid (C18:2; 9c, 12c), 55% linolenic acid (C18:3; 9c, 12c, 15c) and 12.8 MJ of NE<sub>L</sub>/kg of DM.

<sup>2</sup>Concentrate MF 2000 (Vollkraft Mischfutterwerke GmbH, Güstrow, Germany) (per kg feed; 88% DM): 33% extracted soy meal, 20% corn, 17% wheat gluten, 8% extracted rapeseed meal, 5% sugar beet pulp, 2% sodium hydrogen carbonate, 1.3% calcium carbonate, 0.2% sodium chloride. Composition: 24% crude protein, 3.3% crude fat, 6.2% crude fiber, 8.4% crude ash, 0.7% calcium, 0.5% phosphorus, 0.65% sodium and 7.1 MJ of NE<sub>L</sub>/kg of DM.

<sup>3</sup>Rinderstolz 9522 Salvana (Tierernährung, Kl.-O. Sparrieshoop, Germany) (per kg feed; 88% DM): 39.3% calcium carbonate, 21.7% monocalcium phosphate, 21% sodium chloride, 11.9% magnesium oxide, 2% sugar beet molasses. Composition: 92% crude ash, 20% calcium, 8% sodium, 6% magnesium, 5% phosphorus, 1.000.000 IU of vitamin A, 200.000 IU of vitamin D<sub>3</sub>, and 4500 mg vitamin E.

<sup>4</sup>Kreidekalk (Spezialfutter Neuruppin GmbH und Co.KG, Neuruppin, Germany): calcium carbonate; 37% calcium.

<sup>5</sup>Fresh matter.

<sup>6</sup>aNDF = (amylase) neutral detergent fiber

To keep feed composition as constant as possible over time, experimental diets were mixed once a week, conserved with 1% granulated propionic acid (BERGO TMR-stabil G, Bergophor Futtermittelfabrik Dr. Berger GmbH & Co.KG, Kulmbach, Germany), and vacuum-packaged in thirty 40-kg plastic bags (NeuRo Planen GmbH, Neuendorf, Germany). Cows were fed ad libitum from these bags twice daily at 0730 and 1730 h. Feed intake was recorded daily. Three cows had to be removed in the GS-LS period because of illness or feed refusal. The diet composition was calculated in accordance to recommendations of the German Society of Nutritional Physiology (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 2001).

#### **4.3.2 Feed Sampling and Analyses**

Feed samples were collected during TMR mixing and stored at -20 °C. At the end of each experimental block feed samples were pooled to determine DM. The DM content was determined by drying at 60 °C for 24 h and then at 103 °C for 4 h (Naumann et al., 1976). Analyses of nutrient composition in feedstuffs (Table 4.1) were performed according to the Weender standard analysis (Naumann et al., 1976), with modifications by van Soest et al. (1991), by the accredited feed laboratory of Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt der LMS Agrarberatung GmbH (LUFÄ, Rostock, Germany). The energy content (NE<sub>L</sub>) was calculated according to the German Society of Nutritional Physiology (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 2001) except for the linseed product Omegalin 60 (Spezialfutter Neuruppin GmbH und Co.KG, Neuruppin, Germany) and concentrate MF 2000 (Vollkraft Mischfutterwerke GmbH, Güstrow, Germany), which were analyzed according to German feed regulations (Futtermittelverordnung, 1981) §13 by LUFÄ. Nutrient intake of cows was calculated from the DMI and analyzed nutrient contents in feedstuffs (Supplementary Table 4S.1).

#### **4.3.3 Methane Measurements**

Methane production (L/d) was recorded in EW 5 and 11 for two subsequent 24-h periods, each using 4 open-circuit respiration chambers as described by Derno et al. (2009) and Bielak et al. (2016). Cows were fed with respective TMR diets at 0730 and 1730 h and feed intake was recorded continuously by feed troughs placed on balances and summarized over 24 h. Milking occurred at 0630 and 1630 h. Drinking water was freely available. The concentrations of CH<sub>4</sub> were measured at 6-min intervals throughout 23.9 h; the data were normalized to 24 h. The temperature and relative humidity in the chambers were 15 °C and 65%. The mean recovery rate of the chambers was 99.9 ± 0.96%. Methane production parameters were calculated as CH<sub>4</sub>

production (L/d), CH<sub>4</sub> yield defined as liters of CH<sub>4</sub> per kilogram of DMI, and CH<sub>4</sub> intensity defined as liters of CH<sub>4</sub> per kilogram of ECM (Table 4.2), where ECM (kg/d) = [1.05 + 0.38 × milk fat (%) + 0.21 × milk protein (%)] / 3.28 × milk yield (kg/d) (Spiekers et al., 2009).

**Table 4.2.** Performance and methane emission parameters of cows fed basal rations based on grass silage (GS) or corn silage (CS) with or without linseed supplementation (LS or L0, respectively) (adapted from Engelke et al., 2019)

Item	GS <sup>1</sup>		CS		SE	P-value <sup>2</sup>		
	L0	LS	L0	LS		B	L	B × L
DMI (kg/d)	15.94	14.80	18.91	17.76	0.985	0.024	0.061	0.990
ECM (kg/d)	22.61	22.01	29.04	28.28	1.359	0.002	0.334	0.910
Milk fat (%)	4.48	4.50	4.08	3.83	0.202	0.035	0.364	0.292
CH <sub>4</sub> emission parameters								
CH <sub>4</sub> production (L/d)	506.8	453.0	587.7	500.6	30.40	0.089	0.002	0.373
CH <sub>4</sub> intensity (L/kg ECM)	23.3	21.3	20.2	17.7	1.27	0.050	0.006	0.750
CH <sub>4</sub> yield (L/kg DMI)	32.7	31.9	31.1	28.2	1.84	0.289	0.011	0.138

<sup>1</sup>LSM.

<sup>2</sup>ANOVA *F*-test for the effects of basal ration (B), linseed supplementation (L), or their interaction (B × L).

#### 4.3.4 Milk Sampling and Analyses

During the CH<sub>4</sub> measurements, aliquots of milk from the evening of the first and the morning of the second 24-h period were pooled proportionally according to milk yield at each milking (0.25% of milk yield). Proximate milk composition was analysed by the state control association Mecklenburg-Western Pomerania (Landeskontrollverband für Leistungs- und Qualitätsprüfung Mecklenburg-Vorpommern e.V., Güstrow, Germany) for milk fat and protein content using mid-infrared spectroscopy (MilkoScan FT6000 and MilkoScan FT+, Foss, Hillerød, Denmark). Aliquots of the pooled milk samples were stored at -20 °C until MFA analysis using GC (Firl et al., 2014) performed by the Bavarian Biomolecular Mass Spectrometry Center (Freising, Germany). Milk lipid was extracted by a 1:1 chloroform:methanol mixture and esterified with trimethylsulfonium hydroxide to form FAME. A GC-flame ionization detector instrument (Hewlett Packard 6890, Palo Alto, CA) with a 7683 autosampler was equipped with a 100 m x 0.25 mm column (CP 7420; 0.25 µm film thickness; Agilent Technologies, Böblingen, Germany) (Firl et al., 2014). Identifications of peaks were made by comparison with known FAME standards. The GC analyses resulted in the separation and quantification (% of total lipids) of 46 individual MFA. Because not all individual MFA

were detected in all milk samples, we excluded those which occurred in less than 85% of the milk samples (C18:1*trans*10, C18:2*trans*10, *cis*12, and C21:0), which resulted in a total of 43 individual MFA (Table 4.3). Because SFA have been shown to be positively associated and UFA, MUFA, PUFA, C18:1*cis* and *trans* isomers and *n*-3 MFA have been shown to be negatively associated with CH<sub>4</sub> emission (Chilliard et al., 2009, Castro-Montoya et al., 2016a, van Gastelen and Dijkstra, 2016), we were interested to know the predictive power of equations containing groups of biochemically related MFA instead of individual MFA. Thus, MFA concentrations were summed as groups of SFA, UFA, MUFA, PUFA, C18:1*cis* and *trans* isomers and *n*-3 MFA (Supplementary Table 4.S2) according to our previous study in which MFA were predicted by infrared spectroscopy (Engelke et al., 2018).

#### **4.3.5 Calculations and Statistical Analysis**

**4.3.5.1 ANOVA<sup>8</sup>.** The dependent variables CH<sub>4</sub> production, DMI and ECM yield were measured on two consecutive days in EW 5 and 11 and were averaged per day in each EW. Data were analysed with repeated measures ANOVA using PROC MIXED (SAS/STAT 9.3; SAS Institute Inc. 2011, Cary, NC). The model contained the fixed effects of basal ration (CS, GS), linseed supplementation (LS, L0), the interaction effect between basal ration and linseed supplementation, as well as effects of experimental blocks (1-5), periods (A or B) and the order (LS in period A or B first). The covariance structure was set to be compound symmetry. Effects were considered significant at  $P < 0.05$  and least squares means were compared using the Tukey test with the SLICE statement for performing a partitioned analysis of the least squares means for the interaction. Data are presented as least squares means (LSM)  $\pm$  standard error (SE) if not given otherwise.

---

<sup>8</sup> ANOVA: Varianzanalyse (*analysis of variance*) (Journal of Dairy Science®, 2016).

**Table 4.3** Individual milk fatty acid (MFA) composition (% of total lipids) of cows fed basal rations based on grass silage (GS) or corn silage (CS) with (LS) or without (L0) linseed supplementation (adapted from Engelke et al., 2019)

MFA (% of total lipids)	GS <sup>1</sup>		CS <sup>1</sup>		SE	<i>P</i> -value <sup>2</sup>		
	L0	LS	L0	LS		B	L	B × L
C4:0	3.81	3.86	3.78	4.14	0.173	0.467	0.123	0.248
C6:0	2.46	2.11	2.50	2.22	0.094	0.472	0.001	0.577
C8:0	1.45	1.08	1.17	1.48	0.056	0.368	0.001	0.410
C10:0	3.25	2.04	3.34	2.32	0.122	0.165	0.001	0.265
C10:1	0.41	0.25	0.39	0.24	0.019	0.681	0.001	0.734
C11:0	0.13	0.03	0.10	0.05	0.016	0.869	0.001	0.125
C12:0	3.92	2.20	3.97	2.57	0.147	0.184	0.001	0.135
C12:1	0.12	0.06	0.11	0.06	0.008	0.885	0.001	0.651
C13:0	0.16	0.06	0.15	0.09	0.015	0.728	0.001	0.069
C14:0	11.13	8.79	11.55	9.45	0.239	0.038	0.001	0.510
C14:0 <i>iso</i>	0.10	0.09	0.12	0.09	0.013	0.398	0.019	0.128
C14:1 <i>cis</i> 9	1.36	0.91	1.32	0.91	0.068	0.791	0.001	0.637
C15:0	1.37	0.80	1.25	0.89	0.095	0.851	0.001	0.142
C15:0 <i>iso</i>	0.19	0.17	0.24	0.18	0.015	0.082	0.012	0.165
C15:0 <i>anteiso</i>	0.42	0.38	0.44	0.44	0.036	0.269	0.473	0.518
C16:0	34.40	24.05	33.07	22.93	1.007	0.312	0.001	0.860
C16:0 <i>iso</i>	0.25	0.21	0.28	0.24	0.030	0.430	0.031	0.936
C16:1 <i>cis</i> 9	2.06	1.39	1.89	1.11	0.137	0.120	0.001	0.593
C16:1 <i>trans</i> 9	0.03	0.03	0.03	0.04	0.004	0.090	0.058	0.558
C17:0	0.58 <sup>a</sup>	0.45 <sup>c</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.51 <sup>b</sup>	0.020	0.306	0.001	0.015
C17:0 <i>iso</i>	0.28	0.26	0.30	0.27	0.021	0.420	0.132	0.747
C17:0 <i>anteiso</i>	0.45	0.36	0.40	0.47	0.028	0.363	0.001	0.547
C17:1 <i>cis</i> 9	0.26	0.17	0.23	0.16	0.017	0.244	0.001	0.373
C18:0	7.50	12.81	8.52	14.22	0.495	0.022	0.001	0.632
C18:0 <i>iso</i>	0.05	0.03	0.05	0.04	0.004	0.127	0.010	0.338
C18:1 <i>cis</i> 9	17.33 <sup>b</sup>	26.20 <sup>a*</sup>	17.21 <sup>b</sup>	23.91 <sup>a*</sup>	0.889	0.306	0.001	0.013
C18:1 <i>cis</i> 11	0.61	0.58	0.48	0.62	0.095	0.585	0.588	0.377
C18:1 <i>cis</i> 12	0.23	0.63	0.29	0.74	0.034	0.017	0.001	0.455
C18:1 <i>trans</i> 9	0.37	1.06	0.57	1.29	0.125	0.014	0.001	0.936
C18:1 <i>trans</i> 11	0.97	2.80	1.05	3.02	0.162	0.283	0.001	0.640
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12	2.15	2.92	2.24	1.87	0.576	0.396	0.666	0.219
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11	0.52	1.21	0.52	1.18	0.073	0.828	0.001	0.836
C18:3 <i>n</i> -6	0.03	0.03	0.03	0.03	0.002	0.655	0.309	0.843
C18:3 <i>n</i> -3	0.62	1.15	0.38	1.12	0.068	0.021	0.001	0.120
C20:0	0.11	0.14	0.13	0.15	0.007	0.126	0.001	0.429
C20:1 <i>cis</i> 11	0.08	0.11	0.05	0.06	0.023	0.117	0.175	0.474
C20:2 <i>n</i> -6	0.02	0.02	0.03	0.02	0.006	0.944	0.652	0.764
C20:3 <i>n</i> -6	0.07 <sup>b</sup>	0.04 <sup>c</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.05 <sup>c</sup>	0.006	0.016	0.001	0.003
C20:4 <i>n</i> -6	0.07	0.07	0.07	0.06	0.008	0.822	0.385	0.416
C20:5 <i>n</i> -3	0.05	0.07	0.04	0.05	0.012	0.082	0.055	0.819
C22:0	0.03	0.02	0.02	0.02	0.003	0.100	0.495	0.784
C22:5 <i>n</i> -3	0.08 <sup>a</sup>	0.06 <sup>b</sup>	0.07 <sup>a</sup>	0.08 <sup>ab</sup>	0.007	0.642	0.168	0.043
C24:0	0.03	0.03	0.03	0.03	0.003	0.251	0.916	0.077

<sup>a-c</sup>Values within a row with differing superscripts denote B × L interactions (*P* < 0.05).

<sup>1</sup>LSM.

<sup>2</sup>ANOVA *F*-test for the effects of basal ration (B), linseed supplementation (L), or their interaction (B × L).

\* *P* < 0.10.

**4.3.5.2 Regression Models and Validation.** Correlations were calculated between CH<sub>4</sub> production (L/d) values and concentrations of individual MFA and MFA groups using PROC CORR of SAS. Regression equations for the dependent variable CH<sub>4</sub> production (L/d) were constructed from MFA data of each diet separately using PROC REG of SAS with the STEPWISE variable selection method. Regression models for MFA data from combined data categorized by basal diets or linseed supplementation, as well as for data from all 4 diets collectively, were also estimated. Six datasets of variables were used for the stepwise variable selection to enter in the regression equations. Datasets 1 to 3 included 43 different individual MFA, whereas datasets 4 to 6 were generated according to the MFA grouping of Engelke et al. (2018) and contained 7 groups of MFA (SFA, UFA, MUFA and PUFA, C18:1*trans*, C18:1*cis*, and *n*-3 MFA) as summed concentrations plus the individual MFA C16:0 and C18:0 as key MFA in milk fat metabolism (Supplemental Table 4.S2). Dataset 1 included the 43 individual MFA only and dataset 2 included 43 individual MFA and ECM data, whereas dataset 3 included 43 individual MFA and DMI data. Dataset 4 included the reduced dataset of 7 groups of MFA and the 2 individual MFA only. Dataset 5 included the same reduced dataset of MFA variables as well as ECM, whereas dataset 6 included the same reduced dataset of MFA as well as DMI. To have the most relevant explanatory variables in the regression equations and to avoid over-fitted regression models, we preselected candidate explanatory variables through their correlation coefficients with the dependent variable (i.e., CH<sub>4</sub> production). For this purpose, only variables that had a significant correlation ( $P < 0.05$ ) with CH<sub>4</sub> production were allowed to potentially enter in the models. Thereafter, the preselected variables were allowed to enter and remain in the regression equations with a significance threshold of  $P \leq 0.05$  (i.e., entry and stay levels of the stepwise variable selection method). Subsequently, explanatory variables in the final regression equations derived from dataset 1 and 4 were made available to potentially enter in the regression models for datasets 2 and 5 together with ECM or 3 and 6 together with DMI, respectively. In this way, ECM or DMI was used to additionally improve regression models derived from datasets 1 and 4 or could replace 1 or more of the explanatory variables in the final regression models. In the final regression models of each dataset, multicollinearity was assessed through variation inflation factor, and explanatory variables were allowed to have a variation inflation factor  $< 10$  as suggested by Kaps and Lamberson (2004). As cows were used rotationally with 2 different diets (L0 and LS) at 2 different periods, the regression equations based on data specific to basal ration and all diets included pooled data of periods (e.g., EW 5 and 11). This was possible because period did not affect CH<sub>4</sub> production and MFA profiles. The regression equations based on data specific to linseed supplementation



were not concerned with pooled data due to the experimental setup. The performance of the developed CH<sub>4</sub> prediction equations was assessed by an internal cross-validation with the existing dataset. A cross-validation was performed by leaving each 1 animal out at a time and performing a calibration with the remaining animals per model (each diet separately, basal diets, linseed supplementation or not, all diets collectively) (Moraes et al., 2014). The root mean square error of cross-validation and the cross-validation coefficient of determination ( $R^2_{CV}$ ) were estimated (Moraes et al., 2014). In addition, we report adjusted coefficient of determination ( $R^2_{Adj}$ ) to account for the number of variables in the final models. We further evaluated the models using the concordance correlation coefficient ( $CCC$ ) as reported earlier (Dijkstra et al., 2016, van Gastelen et al., 2017). Due to the low number of observations ( $n = 7 - 10$ ) and variables with multicollinearity, we refrained from reporting predictions for individual diets.

## 4.4 Results

### 4.4.1 Animal Performance and Methane Production

Cows fed the CS rations had a higher DMI ( $P = 0.024$ ) and ECM yield ( $P = 0.002$ ) than those fed GS rations (Table 4.2). Accordingly, CP<sup>9</sup>, crude fat, starch and NE<sub>L</sub> intakes ( $P < 0.05$ ) were higher with CS than with GS rations (Supplementary Table 4.S1). The intake of sugar was higher ( $P = 0.005$ ) with GS rations but fiber intake was similar with both basal diets. The percentage of milk fat was higher ( $P = 0.035$ ) with GS compared to CS feeding (Table 4.2). Linseed supplementation had no effect on ECM and milk fat ( $P > 0.3$ ), but we noted a tendency towards a lower DMI ( $P = 0.061$ ) with LS compared to L0 diets (Table 4.2). Feeding LS rations resulted in twice the crude fat intake ( $P = 0.001$ ) as with L0 rations (Supplementary Table 4.S1). Cows fed the CS basal diets tended to have higher CH<sub>4</sub> production compared with those cows fed the GS rations ( $P = 0.089$ ; Table 4.2). The CH<sub>4</sub> yield ranged from a maximum 50 L/kg of DMI in cows fed the GS-L0 ration to a minimum of 21 L/kg of DMI with the CS-LS diet (Supplementary Table 4.S3). Basal diet had no effect on CH<sub>4</sub> yield ( $P = 0.289$ ), but CH<sub>4</sub> intensity was lower ( $P = 0.050$ ) by about 15% with CS than with GS rations. Furthermore, LS decreased the level of all CH<sub>4</sub> emission parameters as compared to cows fed L0. The reduction of enteric CH<sub>4</sub> emission levels due to LS amounted to 10 and 13% for CH<sub>4</sub> intensity and production, respectively ( $P < 0.01$ ). Methane yield (L/kg of DMI) was reduced ( $P = 0.011$ ) by approximately 6% when diets with LS were fed.

### 4.4.2 MFA Composition and Correlations with Methane Production

With CS compared with GS diets, C14:0, C18:0, C18:1*cis*12, C18:1*trans*9, C20:3*n*-6 and the sum of C18:1*trans* MFA concentrations were higher whereas C18:3*n*-3 and the sum of *n*-3 MFA were lower (Tables 4.3 and 4.4;  $P < 0.04$ ). The LS diets resulted in lower concentrations of individual even-chain SFA from C6:0 to C16:0, the group of SFA ( $P < 0.001$ ), the off-chain SFA from C11:0 to C17:0 ( $P < 0.001$ ), and the individual MUFA C10:1, C12:1, C14:1*cis*9, C16:1*cis*9, C17:1*cis*9, as well as *iso*C18:0, and C20:3*n*-6 ( $P < 0.05$ ; Table 4.3). Most of C18 PUFA and C20:0 MFA concentrations were higher with LS-containing diets ( $P < 0.05$ ; Table 4.3). A basal ration × linseed interaction was found for 4 of the 43 individual MFA ( $P < 0.05$ ; C17:0, C18:1*cis*9, C20:3*n*-6 and C22:5*n*-3; Table 4.3). The concentrations of the MFA groups

---

<sup>9</sup> CP: Rohprotein (*crude protein*) (Journal of Dairy Science®, 2016).

UFA, MUFA, PUFA, sums of C18:1 *cis* or *trans* isomers, and the sum of *n*-3 FA were higher with LS compared to L0 diets ( $P < 0.01$ ; Table 4.4).

**Table 4.4.** Milk fatty acid (MFA) groups (% of total lipids) as sums of concentrations of individual MFA of cows fed basal rations based on grass silage (GS) or corn silage (CS), with (LS) or without (L0) linseed supplementation (adapted from Engelke et al., 2019)

MFA (% of total lipids)	GS <sup>1</sup>		CS <sup>1</sup>		SE	<i>P</i> -value <sup>2</sup>		
	L0	LS	L0	LS		B	L	B × L
∑ SFA <sup>3</sup>	72.06	60.32	72.32	62.41	1.453	0.457	0.001	0.369
∑ UFA <sup>4</sup>	27.43	39.09	27.10	36.60	1.440	0.377	0.001	0.279
∑ MUFA	23.81	33.88	23.63	32.15	1.044	0.470	0.001	0.153
∑ PUFA	3.62	5.55	3.47	4.45	0.652	0.332	0.011	0.357
∑ C18:1 <i>cis</i> <sup>5</sup>	18.17	27.32	17.99	25.26	0.948	0.362	0.001	0.053
∑ C18:1 <i>trans</i> <sup>6</sup>	1.33	3.72	1.62	4.31	0.193	0.014	0.001	0.395
∑ <i>n</i> -3 FA <sup>7</sup>	0.76	1.29	0.49	1.25	0.079	0.031	0.001	0.128
∑ <i>n</i> -6 FA <sup>8</sup>	2.34	3.07	2.47	2.02	0.585	0.098	0.001	0.092

<sup>1</sup>LSM.

<sup>2</sup>ANOVA *F*-test for the effects of basal ration (B), linseed supplementation (L), or their interaction (B × L).

<sup>3</sup>Sum of C4:0, C6:0; C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, *iso*C14:0, C15:0, *iso*C15:0, *anteiso*C15:0, C16:0, *iso*C16:0, C17:0, *iso*C17:0, *anteiso*C17:0, C18:0, *iso*C18:0, C20:0, C22:0, C24:0.

<sup>4</sup>Unsaturated fatty acids (FA) represent the sum of MUFA (C10:1, C12:1, C14:1*cis*9, C16:1*cis*9, C16:1*trans*9, C17:1*cis*9, C18:1*cis*9, C18:1*cis*11, C18:1*cis*12, C18:1*trans*9, C18:1*trans*11, C20:1*cis*11) and PUFA (C18:2*cis*9, *trans*11, C18:2*cis*9, *cis*12, C18:3*cis*6, *cis*9, *cis*12, C18:3*cis*9, *cis*12, *cis*15, C20:2*n*-6, C20:3*n*-6, C20:4*n*-6, C20:5*n*-3, C22:5*n*-3).

<sup>5</sup>Sum of C18:1*cis*9, *cis*11 and *cis*12.

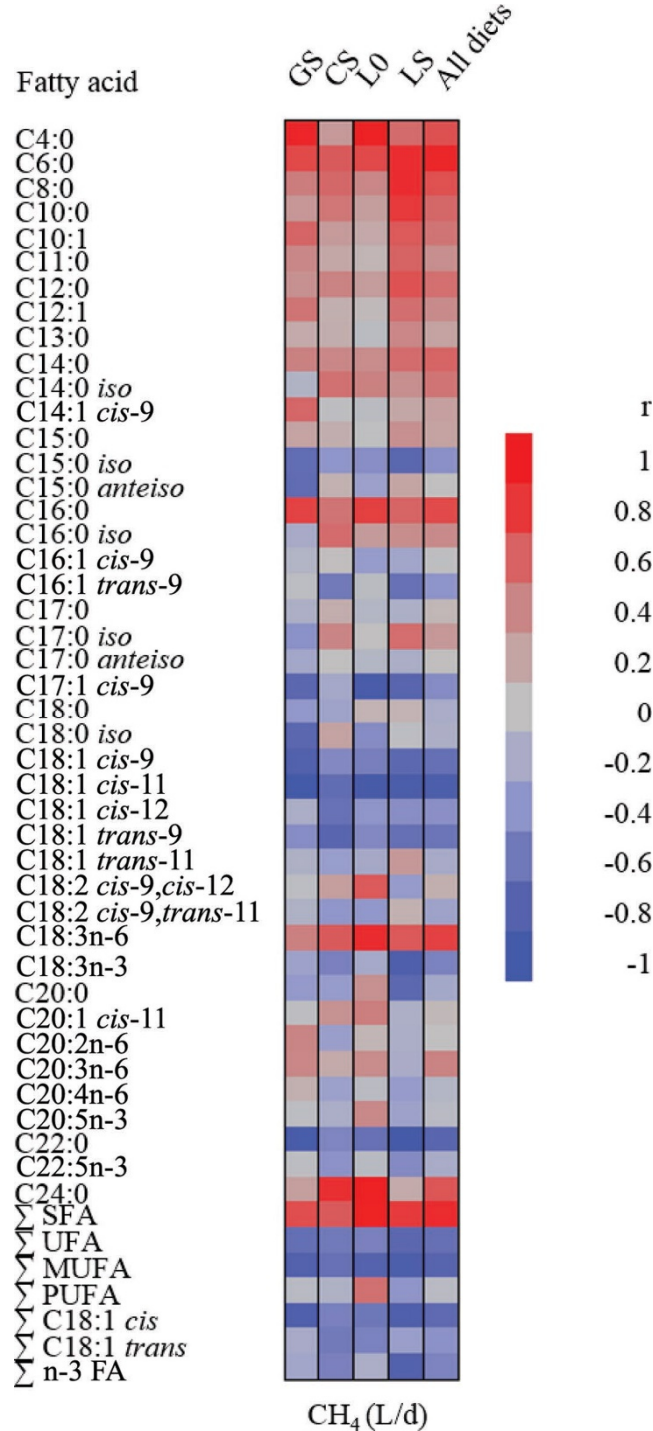
<sup>6</sup>Sum of C18:1*trans*9 and *trans*11.

<sup>7</sup>Sum of C18:3*n*-3, C20:5*n*-3, C22:5*n*-3.

<sup>8</sup>Sum of C18:2*n*-6, C18:3*n*-6, C20:2*n*-6, C20:3*n*-6, C20:4*n*-6.

For combined data of all diets collectively, positive correlations were found between CH<sub>4</sub> production and concentrations of selected individual SFA, the sum of all SFA, as well as C18:3*n*-6 ( $P \leq 0.05$ ; Figure 4.1 and Supplementary Table 4.S4). We observed negative correlations between CH<sub>4</sub> production and the levels of individual MFA of *iso*C15:0, C17:1*cis*9, C18:1*cis*9, C18:1*cis*11, C18:1*cis*12, C18:1*trans*9, C18:3*n*-3 and C22:0, and groups of UFA, MUFA, C18:1*cis* and *trans* isomers, and *n*-3 MFA ( $P \leq 0.05$ ). Correlations of CH<sub>4</sub> production with the levels of individual MFA differed for data of the various pooled diets (Figure 4.1 and Supplementary Table 4.S4). For example, correlations between C10:0 and CH<sub>4</sub> production

ranged from 0.07 ( $P = 0.76$ ) for the L0 diets to 0.63 ( $P = 0.006$ ) for the LS diets, and for C18:3n-3 from -0.17 ( $P = 0.509$ ) for the GS diets to -0.70 ( $P = 0.002$ ) for the LS diets; correlations for C24:0 ranged from 0.14 ( $P = 0.605$ ) for the LS diets to 0.83 ( $P = 0.001$ ) for the CS diets.



**Figure 4.1.** Heatmap of correlations between individual and groups of milk fatty acids (% of total lipids) and methane production (L/d) calculated from data of the combined basal diets [grass silage (GS), corn silage (CS)], each basal diet with (LS) or without (L0) linseed supplementation, and all diets collectively (adapted from Engelke et al., 2019).

#### 4.4.3 Methane Prediction Models Using the Complete Set of MFA Variables

The prediction of CH<sub>4</sub> production based on datasets 1 to 3 resulted in coefficients of determination of the models ( $R^2_{Model}$ ) between 0.36 and 0.91 ( $P < 0.01$ ),  $R^2_{Adj}$  between 0.32 and 0.89,  $R^2_{CV}$  between 0.47 and 0.92, and root mean square error between 38.78 and 97.41, whereas  $CCC$  was between 0.53 and 0.95 (Table 4.5). The  $R^2_{Adj}$  values were slightly but systematically lower than that for  $R^2_{Model}$ . The additional inclusion of ECM (dataset 2) resulted in higher  $R^2_{Model}$  values ranging from 0.61 to 0.91, and  $R^2_{CV}$  from 0.71 to 0.92 as compared to dataset 1. Nevertheless, for all diets combined, the  $R^2_{Model}$  (0.69) and  $R^2_{CV}$  (0.74) of the equations for dataset 2 were lower compared with that of dataset 1 ( $R^2_{Model} = 0.81$  and  $R^2_{CV} = 0.85$ ). The inclusion of DMI (dataset 3) instead of ECM (dataset 2) resulted in comparable prediction values, with an  $R^2_{Model}$  range from 0.62 to 0.91, and  $R^2_{CV}$  from 0.70 to 0.92 (Table 4.5). With the exception of the GS diets, the  $R^2_{CV}$  and  $CCC$  values based on datasets 1 to 3 were at least 0.74 and 0.82, respectively, or higher. The  $R^2_{CV}$  based on GS diets was always lower compared to that of CS diets ( $R^2_{CV}$  from 0.47 to 0.71 vs. 0.89 to 0.92). We found no discernible pattern of predictive MFA as explanatory variables in the prediction equations. However, the MFA C18:1*cis*9 and C24:0 appeared more often in the prediction equations than others (Supplementary Table 4.S5).

#### 4.4.4 Methane Prediction Models Using a Reduced Number of MFA Variables

Three datasets (datasets 4 to 6) comprising the concentrations of a reduced number of MFA and biochemically related groups of summed MFA (Supplementary Table 4.S2) were used to develop multiple regression equations. Using dataset 4, prediction of CH<sub>4</sub> production resulted in  $R^2_{Model}$  between 0.26 and 0.57,  $R^2_{Adj}$  between 0.21 and 0.52,  $CCC$  between 0.42 and 0.72, and a  $R^2_{CV}$  between 0.31 and 0.67 (Table 4.5). The additional inclusion of ECM (dataset 5) or DMI (dataset 6) increased the  $R^2_{Model}$  and  $R^2_{CV}$  values, respectively, compared with dataset 4. The  $R^2_{Adj}$  values were similar to  $R^2_{Model}$  but systematically lower. Models for CS diets always resulted in a higher prediction ( $R^2_{CV}$  from 0.56 to 0.84) and higher  $CCC$  values (from 0.59 to 0.89) compared with GS diets. Similarly, models of data from L0 diets ( $R^2_{CV}$  from 0.67 to 0.80,  $CCC$  from 0.72 to 0.85) gave higher predictions as compared with LS diets (Table 4.5). However, for the LS diets the inclusion of ECM (dataset 5) did not improve the model. Predictions based on data from all 4 diets collectively including ECM as an explanatory variable in the model enhanced the predictive power by 130% ( $R^2_{Model} = 0.69$ ) and 69% ( $R^2_{CV} = 0.80$ ) compared with dataset 4 ( $R^2_{Model} = 0.30$  and  $R^2_{CV} = 0.48$ ). The dominant predictive MFA variable in the regression equations of dataset 4 to 6 was the MFA group MUFA (Supplementary Table 4.S5).

**Table 4.5.** Summary of quality parameters and validation results of the multiple regression equations predicting methane production (CH<sub>4</sub>, L/d) using the complete dataset of 43 milk fatty acid (MFA) variable (datasets 1-3), or a reduced number of MFA variables and groups of MFA (datasets 4-6)<sup>1</sup> (adapted from Engelke et al., 2019)

<b>Pooled diets</b>	<b>N</b>	$R^2_{Model}$	$P_{Model}$	$R^2_{Adj}$	$CCC$	RMSE	$R^2_{CV}$	$R^2_{Model}$	$P_{Model}$	$R^2_{Adj}$	$CCC$	RMSE	$R^2_{CV}$
<b>Dataset 1</b>							<b>Dataset 4</b>						
GS	17	0.36	0.011	0.32	0.53	97.41	0.47	0.26	0.035	0.21	0.42	106.50	0.31
CS	20	0.86	0.001	0.84	0.93	45.54	0.89	0.42	0.002	0.39	0.59	83.24	0.56
L0	20	0.85	0.001	0.83	0.92	60.74	0.87	0.57	0.001	0.52	0.72	93.39	0.67
LS	17	0.78	0.001	0.75	0.88	41.77	0.84	0.49	0.002	0.46	0.66	60.61	0.62
All diets	37	0.81	0.001	0.78	0.90	56.38	0.85	0.30	0.001	0.28	0.46	93.75	0.48
<b>Dataset 2</b>							<b>Dataset 5</b>						
GS	17	0.61	0.001	0.58	0.75	77.84	0.71	0.61	0.001	0.58	0.75	77.67	0.71
CS	20	0.91	0.001	0.89	0.95	41.79	0.91	0.74	0.001	0.71	0.85	61.84	0.79
L0	20	0.91	0.001	0.89	0.95	48.25	0.92	0.70	0.001	0.69	0.82	74.30	0.80
LS	17	0.78	0.001	0.75	0.88	41.77	0.84	0.49	0.002	0.46	0.66	60.61	0.62
All diets	37	0.69	0.001	0.67	0.82	75.28	0.74	0.69	0.001	0.67	0.82	64.57	0.80
<b>Dataset 3</b>							<b>Dataset 6</b>						
GS	17	0.62	0.001	0.60	0.77	79.74	0.70	0.62	0.001	0.60	0.77	79.56	0.70
CS	20	0.91	0.001	0.89	0.95	39.55	0.92	0.80	0.001	0.78	0.89	54.31	0.84
L0	20	0.90	0.001	0.88	0.95	50.25	0.91	0.73	0.001	0.72	0.85	73.34	0.80
LS	17	0.81	0.001	0.79	0.90	38.78	0.87	0.56	0.001	0.53	0.72	57.01	0.68
All diets	37	0.74	0.001	0.73	0.85	66.86	0.80	0.73	0.001	0.71	0.84	62.45	0.81

<sup>1</sup>Each row summarizes validation results for a regression equation specific to data of diets based on combinations of basal ration [grass silage (GS), corn silage (CS)] and linseed supplementation [without (L0), with (LS)] or all diets collectively. Dataset 1 included MFA only. Datasets 2 and 3 included individual MFA and ECM or DMI, respectively, as independent variable. Dataset 4 included MFA variables (reduced number of variables) only, whereas datasets 5 and 6 additionally included ECM or DMI, respectively. The  $R^2_{Model}$  and  $P_{Model}$  values, the adjusted  $R^2_{Adj}$ , the concordance correlation coefficient ( $CCC$ ) of the model, the root mean square error (RMSE) of cross-validation as well as the cross-validation coefficient of determination ( $R^2_{CV}$ ) are given

## **4.5 Discussion**

### ***4.5.1 Animal Performance, Methane Production Parameters and MFA Composition***

The CS diets resulted in a higher DMI and ECM yield than the GS diets, which was comparable to what was reported previously for diets with higher proportions of corn silage than grass silage (Kliem et al., 2008, Sterk et al., 2011, Livingstone et al., 2015). In contrast to earlier studies, the type of the basal ration did not affect CH<sub>4</sub> yield (L/kg of DMI) of cows (Beauchemin et al., 2008, Hart et al., 2015, van Gastelen et al., 2015). This was likely due to similar crude fiber, ADF and NDF intakes with grass- and corn silage-based diets. To make the diets isoenergetic, wheat and barley were added to the GS-L0 diet, and this added starch, diluted the fiber content and aligned the fiber intake of the two basal diets. Furthermore, effects of starch and sugar in the GS-L0 diets might have reduced CH<sub>4</sub> production, which otherwise was expected to be higher with diets containing higher proportions of grass silage (van Gastelen et al., 2015). Although the NDF/DMI value was still higher in GS-based diets, the DMI and energy intake of cows fed GS diets was, on average 3 kg and 17% MJ of NE<sub>L</sub> less per day, respectively, as compared to the CS-based diets. This is a limitation of our study and possibly affected the width of range of CH<sub>4</sub> production. Methane production (L/d) tended to be higher with CS compared to GS diets due to the higher DMI, which is known to explain 52 to 64% of CH<sub>4</sub> production (Knapp et al., 2014). In contrast, CH<sub>4</sub> intensity tended to be lower in the CS than in the GS group due to higher ECM yield, which illustrates the importance of a high milk performance to mitigate CH<sub>4</sub> intensity (Yan et al., 2010, Zehetmeier et al., 2012, Gerber et al., 2013).

We observed only few differences in MFA concentrations between basal rations although others reported more diverse MFA patterns with different silage types (Kliem et al., 2008, Livingstone et al., 2015, van Gastelen et al., 2015). For example, diets with different proportions of grass and corn silage differed in the MFA concentrations of C18:1 isomers, total CLA, C18:2 $n$ -6 and C18:3 $n$ -3 (Kliem et al., 2008, van Gastelen et al., 2015). The small differences in concentrations of only a few MFA among basal diets found here were due to similar crude fiber, ADF and NDF intakes with the basal diets, as discussed above. This can limit the range of MFA concentrations, and thus may affect CH<sub>4</sub> prediction.

In the present study, dietary supplementation of linseed decreased the level of all CH<sub>4</sub> emission parameters by 6, 10 and 13% for CH<sub>4</sub> yield, intensity, and production, although the reductive effects were greater with CS diets, as was observed earlier (Benchaar et al., 2015, Martin et al., 2016). Others found reductions in CH<sub>4</sub> yield between 8 and 20% by feeding various diets

supplemented with extruded linseed (5 to 10% of dietary DM) or linseed oil (4% of dietary DM) (Benchaar et al., 2015, Martin et al., 2016, Bayat et al., 2018). A 10 g/kg of DM increase in dietary fat resulted in a lower CH<sub>4</sub> yield by 1 g/kg of DMI in cattle (Grainger and Beauchemin, 2011). An increase of 1% in dietary lipid content led to a 4 to 5% reduction of CH<sub>4</sub> production (Clark, 2013). In our study, the LS diets contained 28 g/kg of DM more crude fat than the L0 diets, which corresponds to a lower CH<sub>4</sub> yield by 2.8 g/kg of DM or 12 to 15%, respectively. The actual reduction of CH<sub>4</sub> yield by LS supplementation of GS and CS diets was 0.7 and 2.1 g/kg of DM or 2.7 and 9.4%, respectively. Thus, in our study the linseed supplementation reduced CH<sub>4</sub> yield less than predicted by Grainger and Beauchemin (2011) or Clark (2013), but the reduction was larger with the corn silage-based diet. The lesser mitigation observed in our study compared to Grainger and Beauchemin (2011) might be due to the fact that we did not add linseed oil but linseeds to the diets. This might reduce or slow down the release of linseed oil in the rumen and is thus less suppressive to methanogens. As argued by Benchaar et al. (2015), the type of basal diet might influence the effect of linseed oil on CH<sub>4</sub> mitigation. For example, Chung et al. (2011) observed a mitigation effect of linseed only in combination with feeding barley silage (33% of CH<sub>4</sub> yield) but not with grass hay. This is similar to what was found in our study, which might be due to the opposite effect of linseed and grass/ grass hay/ grass silage on CH<sub>4</sub> production.

Linseed supplementation tended to reduce DMI. Others observed no decrease of DMI when linseed supplementation was moderate ( $\leq 60$  g of fat/kg of DM) as compared to a control diet (Ferlay et al., 2013, Kliem et al., 2017, Meignan et al., 2017). In the present study, the higher concentrate content in L0 diets was used to compensate for the higher energy density of linseed, which might have led to a slightly higher DMI because concentrate is known as a favored feedstuff of cows when forage is provided *ad libitum* (Reynolds, 2006, Allen, 2014). The LS-supplemented diets contained twice the amount of fat than the nonsupplemented diets, which affected the concentrations of the majority of MFA. Almost all SFA were decreased with linseed supplementation through the direct inhibitory effect of long-chain SFA and UFA on fiber digestibility and *de novo* synthesis of MFA (Maia et al., 2007, Glasser et al., 2008a, Shingfield et al., 2013). In contrast, C4:0 in milk fat was not affected by LS-containing diets. Effects of linseed on C4:0 concentrations are inconsistent in the literature (Ferlay et al., 2013, van Lingen et al., 2014, Kliem et al., 2017). Concentrations of off- and branched-chain MFA, which are derived from microbial synthesis (Vlaeminck et al., 2015), decreased when diets were supplemented by linseed. Lower levels of off- and branched-chain MFA are presumably related to the toxic effects of dietary PUFA on rumen microbiota (Enjalbert et al., 2017). The intake of



increased levels of C18:3 $n$ -3 MFA with LS-supplemented diets increased the proportion of C18 MFA in milk fat due to biohydrogenation (Buccioni et al., 2012, Meignan et al., 2017). Diets containing linseed decreased SFA and increased UFA, *trans* MFA,  $n$ -3 MFA and C18:0 (Chilliard et al., 2009, Ferlay et al., 2013, Meignan et al., 2017); the magnitude of changes in MFA pattern depended on the amount and form of linseed supply (Chilliard et al., 2009, Shingfield et al., 2013). Ferlay et al. (2013) showed that the C18:1 $cis/trans$  isomer profile was specific for the forage type. This was similar to our study, where the C18:1 $trans$  isomers were forage type-dependent, whereas the addition of linseed increased both C18:1 $cis$  and  $trans$  isomers.

#### **4.5.2 Diet effects on the Relationship between MFA and CH<sub>4</sub> Production, and CH<sub>4</sub> Prediction**

Each diet produces a characteristic MFA pattern (Kliem et al., 2008, Ferlay et al., 2013, Shingfield et al., 2013). We compared the correlations of individual MFA with CH<sub>4</sub> production among pooled diets (GS, CS, L0, LS, all diets) and found - depending on the dietary group – positive, negative or no correlations. When using MFA data of all 4 diets collectively, we observed moderate correlations between CH<sub>4</sub> production and individual MFA (maximum  $r$  values 0.52 vs. -0.62). In a meta-analysis, combining data from studies with a variety of different diets, weak to moderate correlations between CH<sub>4</sub> yield and intensity and MFA were detected (maximum  $r$  values 0.36 vs. -0.56) (van Lingen et al., 2014). This suggests that direction and strength of correlations between individual MFA and CH<sub>4</sub> emission parameters can be explained by the interaction of different dietary constituents on MFA patterns and CH<sub>4</sub> production. Thus, when MFA data derived from different diets were combined to determine the overall relationship between individual MFA and CH<sub>4</sub> production, the average correlation was weak to moderate. In general, our results confirm earlier observations that correlations between CH<sub>4</sub> production and some of the *de novo*-synthesized MFA and groups of SFA are positive, but negative for C18:1 $cis$  isomers, UFA, MUFA and  $n$ -3 FA (Chilliard et al., 2009, Mohammed et al., 2011, van Lingen et al., 2014).

When comparing CH<sub>4</sub> prediction among the tested diets, the coefficients of determination were lower for GS diets compared with CS diets. The effect of basal diet (GS and CS) on the CH<sub>4</sub> prediction potential was likely limited in our study because of few differences in MFA concentrations between basal rations, as discussed above. The prediction equations based on MFA data of diets containing linseed (LS vs. L0) produced 15 to 23% lower  $R^2_{CV}$  values compared to data from diets with no linseed, irrespective of the dataset used. That linseed supplementation deteriorates CH<sub>4</sub> prediction confirms earlier observations (Williams et al.,

2014, Dijkstra et al., 2016, Rico et al., 2016). Williams et al. (2014) concluded that the CH<sub>4</sub> prediction model by Chilliard et al. (2009) is a result of linseed oil supplementation and cannot accurately predict CH<sub>4</sub> when cows are fed other diets. Furthermore, Dijkstra et al. (2016) adopted the CH<sub>4</sub> prediction equations by van Lingen et al. (2014) and concluded that MFA profile and CH<sub>4</sub> yield of cows fed grass- or grass silage-based diets differ from those fed other diet types, especially for diets containing fat additives. In this context, Rico et al. (2016) pointed out that interaction effects of basal ration and linseed supplementation may influence prediction equations. Thus, as outlined above, we concluded that the high intake of *n*-3 FA affected interrelated biochemical pathways on several tissue and metabolic levels but in opposite directions for CH<sub>4</sub> production and MFA concentrations. Furthermore, we cannot exclude that tissue FA synthesis, desaturation and elongation which are unrelated to changes in rumen fermentation and thus CH<sub>4</sub> production, play a more dominant role when higher amounts of *n*-3 FA were fed.

#### ***4.5.3 Methane Prediction Models using Full and Reduced Datasets for MFA Variables***

Our second objective was to compare CH<sub>4</sub> prediction models based on differently sized and composed datasets of MFA. Therefore, we compared CH<sub>4</sub> prediction equations based on all 43 quantified MFA (full set; datasets 1 to 3) to equations constructed from a reduced number of MFA variables containing groups of biochemically related MFA (datasets 4 to 6). In previous studies it has been shown that the selected MFA groups as well as the individual MFA are positively (SFA, C16:0) or negatively (UFA, MUFA, PUFA, *n*-3 MFA, C18:0) associated with CH<sub>4</sub> emission (Castro-Montoya et al., 2016a, van Gastelen and Dijkstra, 2016). Models based on all 43 MFA showed a better prediction than those based on the reduced number of MFA group variables. In other studies, the prediction for CH<sub>4</sub> emission based on 24 to 83 MFA variables ranged between coefficients of determination of 0.47 and 0.95 (Chilliard et al., 2009, van Lingen et al., 2014, Rico et al., 2016), which is in the same range as with our equations, except for the GS diets in datasets 1 and 4.

The MFA entered in the equations as explanatory variables using datasets 1 to 3 differed within the datasets. Explanatory individual MFA frequently (4 to 7 times) occurring in our prediction equations were also found in other CH<sub>4</sub> prediction equations [i.e. C17:1*cis*9 (Mohammed et al., 2011, Castro-Montoya et al., 2016b, Rico et al., 2016), C18:1*cis*9 (van Lingen et al., 2014), and C24:0 (van Gastelen et al., 2017)]. Van Gastelen and Dijkstra (2016) pointed out that only C17:1*cis*9 and C18:1*cis*11 appeared in several published equations, but in our study C18:1*cis*11 did not play a major role. When ECM or DMI were additionally included, C18:1*cis*11 was not

considered. The explanatory MFA variable C17:1*cis*9 is derived from rumen microbial membrane lipids or from propionate (Vlaeminck et al., 2006) and is negatively associated with CH<sub>4</sub> production (g/d) (Mohammed et al., 2011, Castro-Montoya et al., 2016b, Rico et al., 2016). In contrast, C18:1*cis*9 is derived directly from plant feed or is a desaturation product of C18:0, one of the major products when diets rich in forage and plant oils are fed (Alves et al., 2013, Meignan et al., 2017). Long-chain MFA ( $\geq$  C20) are scarcely reported because they seem to be less frequently analyzed in CH<sub>4</sub>-prediction studies (Dijkstra et al., 2011, van Lingen et al., 2014). Only a few publications reported long-chain MFA (C20:1*cis*9, C20:1*cis*11, C20:4*n*-3, C22:0, C22:6*n*-3, C24:0) as explanatory variables for CH<sub>4</sub> prediction (Mohammed et al., 2011, Castro-Montoya et al., 2016b, van Gastelen et al., 2017). Models based on a reduced number of MFA variables using concentration sums of groups of biochemically related MFA showed MUFA as dominating explanatory variable. The group of MUFA includes biohydrogenation intermediates and was therefore reported to be negatively associated with CH<sub>4</sub> production (Mohammed et al., 2011, Castro-Montoya et al., 2016a, Vanrobays et al., 2016). Although SFA could not be identified as important explanatory variable for CH<sub>4</sub> production in our study, Weill et al. (2009) proposed SFA < C16 as predictors for CH<sub>4</sub> intensity.

#### ***4.5.4 Additional Inclusion of ECM and DMI in Prediction Models***

Recently, it was suggested that the combination of MFA datasets with other CH<sub>4</sub> proxies could improve CH<sub>4</sub> prediction (van Gastelen and Dijkstra, 2016, Negussie et al., 2017). Rico et al. (2016) predicted CH<sub>4</sub> production (g/d) for cows with models including diet components, MFA and DMI as variables in the datasets, but it turned out that in the best-fit model diet components as explanatory variables did not play a role; this indicates that the inclusion of DMI or ECM could be more meaningful as explanatory variables for the prediction models than dietary composition. The best equation reported by Chilliard et al. (2009) also included forage DMI as a parameter, indicating its potential importance. Thus, our third objective was to test the effect of additional inclusion of ECM and DMI. Dry matter intake is the major determinant for CH<sub>4</sub> production (Knapp et al., 2014) and ECM can reflect DMI (Hristov et al., 2013b). Inclusion of ECM or DMI improved CH<sub>4</sub>-prediction equations, resulting in an increase of the  $R^2_{CV}$  by approximately 30% when based on pooled data from all diets. This was only true for the dataset 5 and 6 with a reduced number of MFA variables, showing that CH<sub>4</sub> prediction by the complete set of 43 MFA variables could explain more variability of CH<sub>4</sub> production than DMI or ECM. Van Gastelen et al. (2017) reported improved prediction of CH<sub>4</sub> production by 29% when using equations containing MFA plus volatile and nonvolatile metabolites of milk

as compared to equations based on 42 MFA variables alone, indicating that accuracy of prediction can be gained from inclusion of CH<sub>4</sub> proxies other than only MFA as explanatory variable. Interestingly, with MFA data based on the GS diet with addition of ECM (datasets 2 and 5) or DMI (datasets 3 and 6) as a variable excluded MFA as explanatory variable from the equation. This might explain why the predictions for GS diets resulted in the lowest-quality parameters, because GS diets combine feedstuffs and nutrients with opposite effects on CH<sub>4</sub> production (Maia et al., 2007, Shingfield et al., 2013, Castro-Montoya et al., 2016a). In contrast, based on data of the LS diets, inclusion of ECM (datasets 2 and 5) did not improve the prediction as compared to predictions with datasets 1 and 4, respectively, containing MFA variables only, suggesting a dominant effect of linseed, (i.e. *n*-3 MFA) on the MFA pattern and thus CH<sub>4</sub> prediction.

## **4.6 Conclusions**

Our study shows that the effect of the two basal diets containing either a large proportion of grass silage or corn silage on CH<sub>4</sub> production and MFA profile was small due to only moderate intake differences in crude fiber, ADF and NDF, nutrients known to have a large effect on both CH<sub>4</sub> production and MFA profile. However, with CS diets DMI was higher and resulted in a tendency for higher CH<sub>4</sub> production. In contrast, the supplementation of the basal diets with linseed strongly reduced CH<sub>4</sub> emission parameters, and modified the MFA profile considerably. The developed CH<sub>4</sub> prediction models for dairy cows based on a dataset of 43 individual MFA provided good prediction ( $R^2_{Adj}$  0.32 to 0.89;  $R^2_{CV}$  0.47 to 0.92), which was reduced by 10 to 15% for models based on a reduced dataset with 9 MFA parameters (biochemically related MFA groups and C16:0 and C18:0 MFA). Prediction of CH<sub>4</sub> production based on a reduced dataset can be improved when ECM or DMI are added as variables, indicating a gain of prediction accuracy when combining CH<sub>4</sub> proxies. In this study, prediction equations based on GS diets resulted in lowest prediction accuracy, which might be due to fiber and starch as TMR ingredients in our GS diets with opposite effects on methane production. Prediction equations based on diets with linseed supplements had a lower prediction accuracy compared with equations based on data from diets without linseed. Therefore, caution is needed when prediction equations are derived from datasets including fat-supplemented diets or when diet-specific prediction equations are applied to cows fed nonmatching diets.

#### **4.7 Acknowledgements**

The authors express their gratitude to K.-D. Witt, B. Stabenow, D. Oswald, T. Lenke, R. Gaeth, A. Schulz, and K. Pilz, staff members at the EAR and the Tiertechnikum of the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), for preparation of TMR, feeding and animal care as well as assistance with sample collection and indirect calorimetry measurements. The assistance of F. Schultz (RinderAllianz GmbH, Woldegk, Germany) in the selection of cows is gratefully acknowledged. We thank DANONE GmbH, Haar, Germany, for providing milk composition data and V. Krüger and B. Göschl of DANONE GmbH for their involvement and fruitful discussions. This work was part of the project “Innovation potential to reduce greenhouse gas emissions in the dairy supply chain” (INNO MilCH4) and was supported by funds of the Federal Ministry of Food, and Agriculture (BMEL, Berlin) based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food (BLE, Bonn) under the innovation support programme (grant no. 2817501011).

#### **4.8 Autorenbeiträge**

C.C.M. entwarf das experimentelle Design der Studie und trug die Gesamtverantwortung für das Projekt. M.D. und S.W.E. führten das Tierexperiment durch. M.R. und H.K. analysierten die individuellen Konzentrationen der Fettsäuren aller Milchproben mittels Gaschromatografie. S.W.E. sammelte und führte die einzelnen Daten für die Auswertung zusammen. A.T. und G.D. entwarfen die Modelle für die statistischen Analysen, die von S.W.E. durchgeführt wurden. S.W.E. schrieb gemeinsam mit C.C.M., B.K. und G.D das Manuskript. W.B. lieferte Beiträge zur Diskussion. K.W. verantwortete die Erstellung der Blutbilder der Kühe. C.C.M. hat die Hauptverantwortung für den finalen Inhalt des Manuskripts.

#### 4.9 Supporting information

**Supplementary Table 4.S1.** Nutrient uptake in lactating cows fed basal rations based on grass silage (GS) or corn silage (CS) with (LS) or without (L0) linseed supplementation (adapted from Engelke et al., 2019)

Nutrients (kg /d)	GS <sup>1</sup>		CS <sup>1</sup>		SE	P-value <sup>2</sup>		
	L0	LS	L0	LS		B	L	B × L
Crude ash	1.12	1.13	1.25	1.17	0.07	0.262	0.410	0.251
Crude protein	2.58	2.55	3.21	2.91	0.17	0.022	0.155	0.253
Crude fat	0.45	0.93	0.56	1.01	0.04	0.023	0.001	0.541
Crude fiber	2.62	2.81	2.93	2.86	0.15	0.343	0.522	0.178
ADF	3.14	3.37	3.53	3.44	0.19	0.300	0.516	0.170
NDF	5.86	6.15	6.24	6.25	0.34	0.558	0.461	0.491
NDF/DMI (kg/kg)	0.37	0.41	0.33	0.35	0.04	0.001	0.001	0.001
Sugar	0.82	0.76	0.60	0.54	0.05	0.005	0.031	0.893
Starch	3.46	1.44	4.90	3.80	0.24	0.001	0.001	0.007
NE <sub>L</sub> , MJ/d	111	102	133	126	6.95	0.014	0.055	0.748

<sup>1</sup> LSM.

<sup>2</sup> ANOVA F-test for the effects of basal ration (B), linseed supplementation (L), or their interaction (B × L).



**Supplementary Table 4.S2.** Composition of milk fatty acid groups used as independent variables to predict methane production of dairy cows for datasets 4 to 6. Groups were defined according to their biochemical relationships. Concentrations of respective individual milk fatty acids (% of total lipids) which compose dataset 1 were summed (adapted from Engelke et al., 2019)

Milk fatty acid groups	Summed milk fatty acids	
Saturated fatty acids	C4:0	
	C6:0	
	C8:0	
	C10:0	
	C11:0	
	C12:0	
	C13:0	
	C14:0	
	C14:0 <i>iso</i>	
	C15:0	
	C15:0 <i>iso</i>	
	C15:0 <i>anteiso</i>	
	C16:0	
	C16:0 <i>iso</i>	
	C17:0	
	C17:0 <i>iso</i>	
	C17:0 <i>anteiso</i>	
	C18:0	
	C18:0 <i>iso</i>	
	C20:0	
	C22:0	
	C24:0	
	Unsaturated fatty acids	C10:1
		C12:1
C14:1 <i>cis</i> 9		
C16:1 <i>cis</i> 9		
C16:1 <i>trans</i> 9		
C17:1 <i>cis</i> 9		
C18:1 <i>cis</i> 9, C18:1 <i>cis</i> 11, C18:1 <i>cis</i> 12		
C18:1 <i>trans</i> 9		
C18:1 <i>trans</i> 11		
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11		
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12		
C18:3 <i>cis</i> 6, <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12		
C18:3 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12, <i>cis</i> 15		
C20:1 <i>cis</i> 11		
C20:2 <i>n</i> -6		
C20:3 <i>n</i> -6		
C20:4 <i>n</i> -6		
C20:5 <i>n</i> -3		
C22:5 <i>n</i> -3		
Monounsaturated fatty acids		Sum of C10:1, C12:1, C14:1 <i>cis</i> 9, C16:1 <i>cis</i> 9, C16:1 <i>trans</i> 9, C17:1 <i>cis</i> 9, C18:1 <i>cis</i> 9, C18:1 <i>cis</i> 11, C18:1 <i>cis</i> 12, C18:1 <i>trans</i> 9, C18:1 <i>trans</i> 11, C20:1 <i>cis</i> 11
Polyunsaturated fatty acids		Sum of C18:2 <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11, C18:2 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12, C18:3 <i>cis</i> 6, <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12, C18:3 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12, <i>cis</i> 15, C20:2 <i>n</i> -6, C20:3 <i>n</i> -6, C20:4 <i>n</i> -6, C20:5 <i>n</i> -3, C22:5 <i>n</i> -3
C18:1 <i>cis</i>		C18:1 <i>cis</i> 9, C18:1 <i>cis</i> 11, C18:1 <i>cis</i> 12
C18:1 <i>trans</i>	C18:1 <i>trans</i> 9, C18:1 <i>trans</i> 11	
Omega-3 fatty acids	C18:3 <i>n</i> -3, C20:5 <i>n</i> -3, C22:5 <i>n</i> -3	

**Supplementary Table 4.S3.** Mean, SD, minimum as well as maximum values of methane emission parameters of cows fed basal rations based on grass silage or corn silage with or without linseed supplementation for all diets, both diets with no linseed supplementation (L0), and both diets with linseed supplementation (LS) combined (adapted from Engelke et al., 2019)

<b>All four diets combined (N=37)</b>				
<b>Methane emission parameters</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
CH <sub>4</sub> production (L/d)	525.4	108.0	323.7	729.4
CH <sub>4</sub> intensity (L/kg ECM)	20.3	3.66	14.7	34.3
CH <sub>4</sub> yield (L/kg DMI)	30.5	4.73	20.7	50.4
<b>L0 diets (n=20)</b>				
CH <sub>4</sub> production (L/d)	547.2	125.3	323.7	729.4
CH <sub>4</sub> intensity (L/kg ECM)	21.7	4.0	15.2	34.3
CH <sub>4</sub> yield (L/kg DMI)	31.9	5.4	23.4	50.4
<b>LS diets (n=17)</b>				
CH <sub>4</sub> production (L/d)	499.7	79.3	331.4	618.1
CH <sub>4</sub> intensity (L/kg ECM)	18.6	2.31	14.7	23.3
CH <sub>4</sub> yield (L/kg DMI)	28.8	3.16	20.7	33.1

**Supplementary Table 4.S4.** Mean, SD, minimum as well as maximum values of milk fatty acid concentrations (% of total lipids), and correlations between MFA concentrations (% of total lipids) and methane production (L/d) (adapted from Engelke et al., 2019)

All diets pooled <sup>1</sup>	N	Mean	SD	Min.	Max.	r with CH <sub>4</sub> (L/d)	P ≤
<b>Individual MFA</b>							
C18:1 <i>cis</i> 11	37	0.55	0.301	0.27	1.63	-0.62	0.001
C22:0	37	0.02	0.015	0	0.07	-0.54	0.001
C6:0	37	2.36	0.327	1.45	2.96	0.52	0.001
C18:1 <i>cis</i> 9	37	20.45	4.379	12.7	28.4	-0.48	0.003
C18:1 <i>trans</i> 9	37	0.74	0.579	0.23	3.41	-0.45	0.005
C18:3 n-6	37	0.03	0.013	0	0.05	0.44	0.007
C16:0	37	29.18	5.859	19.8	38.7	0.41	0.011
C18:3 n-3	37	0.78	0.365	0.31	1.6	-0.40	0.014
C8:0	37	1.32	0.248	0.72	1.89	0.40	0.015
C4:0	37	3.92	0.489	2.49	4.87	0.39	0.016
C24:0	37	0.03	0.009	0.01	0.06	0.38	0.022
C17:1 <i>cis</i> 9	37	0.20	0.063	0.11	0.39	-0.36	0.030
C18:1 <i>cis</i> 12	37	0.46	0.241	0.14	1.13	-0.34	0.043
C14:0	37	10.41	1.424	6.15	12.9	0.33	0.047
C15:0 <i>iso</i>	37	0.19	0.070	0.08	0.46	-0.33	0.048
C10:0	37	2.82	0.690	1.36	4.35	0.32	0.055
C16:1 <i>trans</i> 9	37	0.03	0.018	0.01	0.09	-0.31	0.061
C12:0	37	3.28	0.911	1.52	5.45	0.29	0.078
C10:1	37	0.33	0.096	0.15	0.59	0.27	0.101
C14:0 <i>iso</i>	37	0.10	0.038	0.05	0.19	0.27	0.104
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11	37	0.83	0.403	0.33	1.89	-0.23	0.169
C20:3 n-6	37	0.07	0.028	0.02	0.14	0.22	0.181
C20:0	37	0.13	0.025	0.07	0.19	-0.20	0.227
C12:1	37	0.09	0.038	0.04	0.2	0.19	0.261
C16:0 <i>iso</i>	37	0.24	0.078	0.13	0.54	0.19	0.262
C18:1 <i>trans</i> 11	37	1.91	1.087	0.74	4.46	-0.19	0.262
C22:5 n-3	37	0.08	0.021	0.05	0.12	-0.19	0.268
C18:0	37	10.54	3.258	5.12	16.8	-0.19	0.273
C11:0	37	0.08	0.054	0.02	0.23	0.17	0.309
C18:0 <i>iso</i>	37	0.04	0.013	0.02	0.07	-0.16	0.332
C17:0 <i>iso</i>	37	0.28	0.075	0.07	0.39	0.14	0.411
C20:4 n-6	37	0.06	0.027	0.03	0.15	-0.13	0.461
C14:1 <i>cis</i> 9	37	1.15	0.303	0.69	1.88	0.10	0.537
C20:5 n-3	37	0.05	0.035	0.02	0.24	-0.10	0.557
C13:0	37	0.12	0.051	0.06	0.29	0.10	0.575
C15:0	37	1.12	0.323	0.79	2.14	0.09	0.584
C16:1 <i>cis</i> 9	37	1.63	0.551	0.8	3.31	-0.06	0.706
C20:2 n-6	37	0.02	0.018	0	0.09	-0.05	0.758
C15:0 <i>anteiso</i>	37	0.42	0.087	0.32	0.82	-0.04	0.801
C17:0 <i>anteiso</i>	37	0.42	0.082	0.26	0.62	-0.04	0.804
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12	37	2.25	1.565	1.2	9.75	0.04	0.834
C20:1 <i>cis</i> 11	37	0.07	0.071	0.02	0.43	-0.01	0.976
C17:0	37	0.53	0.069	0.44	0.73	0.00	0.997
<b>MFA groups<sup>2</sup></b>							
∑ MUFA	37	27.62	5.173	18.1	36.8	-0.55	0.001
∑ C18:1 <i>cis</i>	37	21.45	4.636	13.3	29.7	-0.51	0.001
∑ SFA	37	67.57	6.480	49.6	79.4	0.50	0.002
∑ UFA	37	31.79	6.344	20.4	50	-0.48	0.003
∑ n-3 FA	37	0.91	0.387	0.41	1.94	-0.40	0.015
∑ C18:1 <i>trans</i>	37	2.65	1.431	0.99	5.85	-0.33	0.049
∑ PUFA	37	4.18	1.877	2.38	13.2	-0.10	0.564
∑ n-6 FA	37	2.43	1.590	1.35	10.1	0.04	0.817

<sup>1</sup>GS-L0, GS-LS, CS-L0, and CS-LS. Details on dietary composition see Table 4.1.

<sup>2</sup>MFA groups composition see Supplementary Table 4.S2.

**Supplementary Table 4.S4. (Continued)** Mean, SD, minimum as well as maximum values of milk fatty acid concentrations (% of total lipids), and correlations between MFA concentrations (% of total lipids) and methane production (L/d) (adapted from Engelke et al., 2019)

GS diets pooled <sup>1</sup>	n	Mean	SD	Min.	Max.	r with CH <sub>4</sub> /d	P ≤
<b>Individual MFA</b>							
C18:1 <i>cis</i> 11	17	0.54	0.247	0.27	1.04	-0.60	0.011
C22:0	17	0.02	0.018	0.00	0.07	-0.55	0.022
C4:0	17	3.87	0.444	2.77	4.58	0.53	0.029
C18:1 <i>cis</i> 9	17	20.33	5.111	12.71	28.39	-0.50	0.042
C16:0	17	30.57	5.762	22.10	38.44	0.45	0.071
C18:0 <i>iso</i>	17	0.04	0.018	0.02	0.07	-0.44	0.076
C17:1 <i>cis</i> 9	17	0.22	0.063	0.13	0.35	-0.44	0.076
C6:0	17	2.35	0.360	1.45	2.96	0.43	0.082
C15:0 <i>anteiso</i>	17	0.40	0.069	0.32	0.55	-0.42	0.095
C15:0 <i>iso</i>	17	0.17	0.059	0.08	0.32	-0.41	0.106
C10:1	17	0.35	0.103	0.15	0.59	0.35	0.173
C14:1 <i>cis</i> 9	17	1.20	0.279	0.82	1.88	0.34	0.180
C12:1	17	0.09	0.040	0.04	0.20	0.30	0.245
C18:1 <i>trans</i> 9	17	0.53	0.224	0.23	0.80	-0.28	0.279
C8:0	17	1.33	0.281	0.72	1.89	0.27	0.293
C18:3 <i>n</i> -6	17	0.03	0.012	0.01	0.05	0.26	0.312
C14:0	17	10.30	1.588	6.15	12.68	0.26	0.320
C17:0 <i>iso</i>	17	0.28	0.064	0.16	0.39	-0.26	0.322
C20:2 <i>n</i> -6	17	0.02	0.018	0.01	0.07	0.24	0.351
C20:3 <i>n</i> -6	17	0.06	0.019	0.04	0.09	0.24	0.364
C11:0	17	0.09	0.067	0.02	0.23	0.23	0.373
C18:0	17	9.56	3.056	5.12	14.46	-0.23	0.384
C20:0	17	0.12	0.025	0.07	0.15	-0.21	0.415
C12:0	17	3.29	1.032	1.52	5.45	0.20	0.446
C10:0	17	2.81	0.772	1.36	4.35	0.18	0.493
C18:3 <i>n</i> -3	17	0.82	0.291	0.49	1.60	-0.17	0.509
C24:0	17	0.03	0.011	0.02	0.06	0.15	0.578
C17:0 <i>anteiso</i>	17	0.41	0.090	0.26	0.59	-0.14	0.581
C16:0 <i>iso</i>	17	0.22	0.092	0.13	0.54	-0.13	0.617
C15:0	17	1.18	0.393	0.81	2.14	0.13	0.625
C18:1 <i>cis</i> 12	17	0.38	0.210	0.14	0.75	-0.12	0.658
C17:0	17	0.53	0.088	0.44	0.73	-0.10	0.691
C13:0	17	0.13	0.065	0.06	0.29	0.10	0.699
C18:1 <i>trans</i> 11	17	1.76	1.038	0.74	3.72	-0.09	0.720
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11	17	0.82	0.400	0.33	1.58	-0.09	0.737
C14:0 <i>iso</i>	17	0.09	0.037	0.05	0.19	-0.08	0.766
C20:4 <i>n</i> -6	17	0.06	0.025	0.03	0.12	0.07	0.780
C16:1 <i>cis</i> 9	17	1.78	0.465	1.05	2.48	-0.07	0.786
C16:1 <i>trans</i> 9	17	0.03	0.013	0.01	0.05	-0.02	0.931
C22:5 <i>n</i> -3	17	0.08	0.024	0.05	0.12	-0.02	0.945
C20:5 <i>n</i> -3	17	0.06	0.049	0.03	0.24	-0.02	0.945
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12	17	2.47	2.092	1.20	9.75	-0.02	0.951
C20:1 <i>cis</i> 11	17	0.09	0.099	0.02	0.43	-0.01	0.955
<b>MFA groups<sup>2</sup></b>							
∑ C18:1 <i>cis</i>	17	21.25	5.310	13.25	29.72	-0.51	0.035
∑ MUFA	17	27.30	5.648	18.05	36.82	-0.50	0.043
∑ SFA	17	67.80	7.270	49.56	79.40	0.42	0.093
∑ UFA	17	31.73	7.287	20.43	50.01	-0.40	0.113
∑ <i>n</i> -3 FA	17	0.96	0.327	0.58	1.94	-0.16	0.552
∑ C18:1 <i>trans</i>	17	2.29	1.239	0.99	4.52	-0.13	0.623
∑ PUFA	17	4.43	2.497	2.38	13.18	-0.04	0.871
∑ <i>n</i> -6 FA	17	2.65	2.133	1.35	10.05	-0.01	0.969

<sup>1</sup>GS-L0, GS-LS, CS-L0, and CS-LS. Details on dietary composition see Table 4.1.

<sup>2</sup>MFA groups composition see Supplementary Table 4.S2.

**Supplementary Table 4.S4. (Continued)** Mean, SD, minimum as well as maximum values of milk fatty acid concentrations (% of total lipids), and correlations between MFA concentrations (% of total lipids) and methane production (L/d) (adapted from Engelke et al., 2019)

CS diets pooled <sup>1</sup>	n	Mean	SD	Min.	Max.	r with CH <sub>4</sub> (L/d)	P ≤
<b>Individual MFA</b>							
C24:0	20	0.03	0.007	0.01	0.04	0.83	0.001
C18:1 <i>trans</i> 9	20	0.93	0.717	0.33	3.41	-0.76	0.001
C18:1 <i>cis</i> 11	20	0.55	0.347	0.31	1.63	-0.68	0.001
C18:1 <i>cis</i> 12	20	0.52	0.255	0.23	1.13	-0.64	0.002
C6:0	20	2.36	0.306	1.81	2.85	0.63	0.003
C18:3 <i>n</i> -6	20	0.03	0.014	0.00	0.05	0.63	0.003
C16:1 <i>trans</i> 9	20	0.03	0.020	0.01	0.09	-0.59	0.006
C8:0	20	1.32	0.224	0.91	1.72	0.56	0.010
C18:3 <i>n</i> -3	20	0.75	0.423	0.31	1.59	-0.55	0.012
C16:0 <i>iso</i>	20	0.26	0.059	0.16	0.42	0.55	0.013
C22:0	20	0.02	0.013	0.01	0.05	-0.53	0.017
C14:0 <i>iso</i>	20	0.11	0.039	0.06	0.18	0.52	0.020
C16:0	20	28.00	5.821	19.77	38.66	0.50	0.025
C18:1 <i>cis</i> 9	20	20.56	3.784	13.77	26.83	-0.49	0.027
C10:0	20	2.83	0.632	1.83	3.87	0.48	0.030
C12:0	20	3.27	0.822	2.19	4.77	0.42	0.062
C22:5 <i>n</i> -3	20	0.08	0.018	0.05	0.11	-0.42	0.065
C17:0 <i>iso</i>	20	0.28	0.086	0.07	0.39	0.41	0.075
C14:0	20	10.50	1.303	8.65	12.90	0.39	0.086
C15:0 <i>iso</i>	20	0.21	0.076	0.13	0.46	-0.39	0.093
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11	20	0.85	0.414	0.37	1.89	-0.38	0.096
C20:0	20	0.14	0.024	0.10	0.19	-0.34	0.141
C18:1 <i>trans</i> 11	20	2.04	1.138	0.84	4.46	-0.33	0.160
C20:1 <i>cis</i> 11	20	0.05	0.024	0.03	0.12	0.32	0.164
C20:2 <i>n</i> -6	20	0.02	0.019	0.00	0.09	-0.31	0.182
C20:4 <i>n</i> -6	20	0.06	0.029	0.03	0.15	-0.30	0.199
C4:0	20	3.96	0.533	2.49	4.87	0.28	0.230
C18:0	20	11.37	3.266	5.59	16.76	-0.28	0.235
C10:1	20	0.32	0.090	0.17	0.46	0.28	0.239
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12	20	2.05	0.931	1.44	5.85	0.24	0.309
C17:1 <i>cis</i> 9	20	0.19	0.061	0.11	0.39	-0.23	0.326
C18:0 <i>iso</i>	20	0.04	0.008	0.03	0.06	0.22	0.349
C20:5 <i>n</i> -3	20	0.04	0.013	0.02	0.07	-0.19	0.426
C11:0	20	0.08	0.042	0.03	0.18	0.19	0.430
C20:3 <i>n</i> -6	20	0.07	0.032	0.02	0.14	0.16	0.489
C17:0	20	0.54	0.050	0.46	0.63	0.16	0.511
C13:0	20	0.12	0.038	0.08	0.21	0.15	0.539
C15:0	20	1.07	0.249	0.79	1.77	0.14	0.560
C12:1	20	0.09	0.036	0.04	0.17	0.13	0.572
C15:0 <i>anteiso</i>	20	0.44	0.098	0.36	0.82	0.12	0.625
C16:1 <i>cis</i> 9	20	1.50	0.596	0.80	3.31	0.02	0.917
C14:1 <i>cis</i> 9	20	1.11	0.324	0.69	1.87	-0.02	0.920
C17:0 <i>anteiso</i>	20	0.43	0.075	0.34	0.62	0.01	0.970
<b>MFA groups<sup>2</sup></b>							
∑ MUFA	20	27.89	4.866	20.02	36.47	-0.65	0.002
∑ SFA	20	67.37	5.912	57.03	76.78	0.64	0.003
∑ UFA	20	31.85	5.615	22.98	41.58	-0.59	0.006
∑ C18:1 <i>trans</i>	20	2.97	1.537	1.20	5.85	-0.59	0.006
∑ <i>n</i> -3 FA	20	0.87	0.436	0.41	1.75	-0.55	0.011
∑ C18:1 <i>cis</i>	20	21.63	4.113	14.31	28.09	-0.55	0.012
∑ <i>n</i> -6 FA	20	2.25	0.940	1.57	6.07	0.24	0.315
∑ PUFA	20	3.96	1.148	2.66	7.12	-0.15	0.516

<sup>1</sup>GS-L0, GS-LS, CS-L0, and CS-LS. Details on dietary composition see Table 4.1.

<sup>2</sup>MFA groups composition see Supplementary Table 4.S2.

**Supplementary Table 4.S4. (Continued)** Mean, SD, minimum as well as maximum values of milk fatty acid concentrations (% of total lipids), and correlations between MFA concentrations (% of total lipids) and methane production (L/d) (adapted from Engelke et al., 2019)

L0 diets pooled <sup>1</sup>	n	Mean	SD	Min.	Max.	r with CH <sub>4</sub> (L/d)	P ≤
<b>Individual MFA</b>							
C17:1 <i>cis</i> 9	20	0.24	0.058	0.15	0.39	-0.75	0.001
C18:1 <i>cis</i> 11	20	0.55	0.201	0.31	1.04	-0.76	0.001
C24:0	20	0.03	0.009	0.01	0.04	0.56	0.011
C22:0	20	0.02	0.018	0.00	0.07	-0.55	0.011
C4:0	20	3.79	0.461	2.49	4.44	0.54	0.013
C18:3 <i>n</i> -6	20	0.03	0.015	0.00	0.05	0.49	0.027
C18:1 <i>cis</i> 9	20	17.27	2.970	12.71	25.90	-0.49	0.028
C18:1 <i>trans</i> 9	20	0.47	0.293	0.23	1.51	-0.45	0.048
C18:0 <i>iso</i>	20	0.05	0.014	0.02	0.07	-0.43	0.058
C16:0	20	33.74	3.517	25.36	38.66	0.43	0.059
C15:0 <i>iso</i>	20	0.21	0.079	0.12	0.46	-0.42	0.067
C6:0	20	2.48	0.261	2.08	2.96	0.40	0.078
C18:1 <i>cis</i> 12	20	0.26	0.067	0.14	0.41	-0.38	0.100
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11	20	0.52	0.112	0.33	0.77	-0.36	0.119
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12	20	2.20	1.157	1.21	5.85	0.35	0.133
C16:1 <i>cis</i> 9	20	1.97	0.484	1.20	3.31	-0.34	0.146
C15:0 <i>anteiso</i>	20	0.43	0.061	0.34	0.55	-0.31	0.183
C18:3 <i>n</i> -3	20	0.50	0.149	0.31	0.71	-0.26	0.276
C18:1 <i>trans</i> 11	20	1.01	0.203	0.74	1.62	-0.26	0.277
C20:1 <i>cis</i> 11	20	0.06	0.046	0.02	0.19	0.21	0.366
C14:0 <i>iso</i>	20	0.11	0.045	0.05	0.19	0.20	0.403
C17:0 <i>anteiso</i>	20	0.46	0.086	0.33	0.62	-0.18	0.446
C17:0	20	0.57	0.068	0.47	0.73	-0.18	0.450
C8:0	20	1.47	0.197	1.14	1.89	0.17	0.464
C20:5 <i>n</i> -3	20	0.04	0.019	0.02	0.10	0.17	0.486
C20:3 <i>n</i> -6	20	0.09	0.024	0.04	0.14	0.16	0.514
C14:0	20	11.34	0.970	9.58	12.90	0.15	0.517
C22:5 <i>n</i> -3	20	0.08	0.021	0.05	0.12	-0.15	0.540
C20:4 <i>n</i> -6	20	0.07	0.032	0.03	0.15	-0.14	0.554
C16:1 <i>trans</i> 9	20	0.03	0.012	0.01	0.05	-0.14	0.561
C13:0	20	0.15	0.050	0.10	0.29	-0.14	0.563
C14:1 <i>cis</i> 9	20	1.34	0.264	0.82	1.88	-0.14	0.564
C20:0	20	0.12	0.022	0.07	0.15	0.13	0.582
C15:0	20	1.31	0.334	0.82	2.14	-0.11	0.644
C17:0 <i>iso</i>	20	0.29	0.065	0.16	0.39	-0.09	0.694
C16:0 <i>iso</i>	20	0.26	0.091	0.16	0.54	0.09	0.715
C12:0	20	3.94	0.658	3.02	5.45	0.08	0.722
C10:0	20	3.29	0.511	2.55	4.35	0.07	0.756
C12:1	20	0.12	0.031	0.08	0.20	-0.06	0.795
C11:0	20	0.12	0.055	0.05	0.23	-0.04	0.866
C20:2 <i>n</i> -6	20	0.03	0.020	0.00	0.09	-0.04	0.875
C18:0	20	8.01	1.674	5.12	10.77	-0.03	0.898
C10:1	20	0.40	0.067	0.30	0.59	0.02	0.921
<b>MFA groups<sup>2</sup></b>							
∑ MUFA	20	23.72	3.126	18.05	33.04	-0.66	0.002
∑ SFA	20	72.19	3.640	63.51	79.40	0.54	0.014
∑ C18:1 <i>cis</i>	20	18.08	3.122	13.25	27.18	-0.53	0.017
∑ UFA	20	27.26	3.550	20.43	36.23	-0.49	0.029
∑ C18:1 <i>trans</i>	20	1.48	0.377	0.99	2.48	-0.48	0.032
∑ <i>n</i> -6 FA	20	2.41	1.173	1.35	6.07	0.35	0.133
∑ PUFA	20	3.54	1.251	2.38	7.12	0.26	0.263
∑ <i>n</i> -3 FA	20	0.62	0.170	0.41	0.92	-0.23	0.331

<sup>1</sup>GS-L0, GS-LS, CS-L0, and CS-LS. Details on dietary composition see Table 4.1.

<sup>2</sup>MFA groups composition see Supplementary Table 4.S2.

**Supplementary Table 4.S4. (Continued)** Mean, SD, minimum as well as maximum values of milk fatty acid concentrations (% of total lipids), and correlations between MFA concentrations (% of total lipids) and methane production (L/d) (adapted from Engelke et al., 2019)

LS diets pooled <sup>1</sup>	n	Mean	SD	Min.	Max.	r with CH <sub>4</sub> (L/d)	P ≤
<b>Individual MFA</b>							
C22:0	17	0.02	0.012	0.01	0.05	-0.78	0.001
C18:1 <i>cis</i> 11	17	0.54	0.395	0.27	1.63	-0.72	0.001
C18:3 <i>n</i> -3	17	1.11	0.239	0.79	1.60	-0.70	0.002
C8:0	17	1.16	0.193	0.72	1.44	0.68	0.003
C6:0	17	2.21	0.346	1.45	2.75	0.67	0.003
C10:0	17	2.26	0.391	1.36	2.83	0.63	0.006
C17:1 <i>cis</i> 9	17	0.16	0.025	0.11	0.20	-0.61	0.009
C15:0 <i>iso</i>	17	0.16	0.044	0.08	0.24	-0.59	0.012
C20:0	17	0.14	0.022	0.11	0.19	-0.58	0.015
C18:1 <i>cis</i> 9	17	24.19	2.271	20.76	28.39	-0.57	0.016
C12:0	17	2.50	0.404	1.52	3.26	0.54	0.024
C18:1 <i>trans</i> 9	17	1.07	0.668	0.64	3.41	-0.53	0.029
C16:1 <i>trans</i> 9	17	0.03	0.023	0.01	0.09	-0.52	0.032
C18:3 <i>n</i> -6	17	0.03	0.010	0.01	0.05	0.51	0.035
C10:1	17	0.25	0.051	0.15	0.34	0.51	0.036
C11:0	17	0.05	0.020	0.02	0.09	0.47	0.056
C16:0	17	23.82	2.453	19.77	27.37	0.47	0.059
C4:0	17	4.07	0.492	2.77	4.87	0.44	0.077
C14:0	17	9.31	1.032	6.15	11.03	0.44	0.080
C17:0 <i>iso</i>	17	0.27	0.087	0.07	0.39	0.43	0.083
C12:1	17	0.06	0.013	0.04	0.09	0.43	0.088
C22:5 <i>n</i> -3	17	0.07	0.020	0.05	0.11	-0.39	0.125
C18:1 <i>cis</i> 12	17	0.68	0.149	0.46	1.13	-0.36	0.153
C13:0	17	0.08	0.012	0.06	0.10	0.31	0.224
C16:0 <i>iso</i>	17	0.22	0.051	0.13	0.31	0.28	0.268
C20:4 <i>n</i> -6	17	0.06	0.020	0.04	0.12	-0.28	0.280
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12	17	2.31	1.978	1.20	9.75	-0.28	0.284
C14:0 <i>iso</i>	17	0.08	0.021	0.06	0.12	0.27	0.288
C15:0	17	0.90	0.071	0.79	1.01	0.27	0.289
C18:1 <i>trans</i> 11	17	2.97	0.624	2.15	4.46	0.23	0.373
C20:5 <i>n</i> -3	17	0.06	0.047	0.03	0.24	-0.23	0.373
C16:1 <i>cis</i> 9	17	1.22	0.288	0.80	1.95	-0.21	0.421
C20:3 <i>n</i> -6	17	0.05	0.011	0.02	0.07	-0.16	0.536
C15:0 <i>anteiso</i>	17	0.41	0.111	0.32	0.82	0.16	0.539
C14:1 <i>cis</i> 9	17	0.94	0.176	0.69	1.42	0.15	0.558
C17:0 <i>anteiso</i>	17	0.38	0.052	0.26	0.46	-0.15	0.561
C20:2 <i>n</i> -6	17	0.02	0.016	0.01	0.07	-0.15	0.565
C17:0	17	0.49	0.037	0.44	0.54	-0.14	0.598
C20:1 <i>cis</i> 11	17	0.08	0.092	0.04	0.43	-0.14	0.602
C24:0	17	0.03	0.010	0.02	0.06	0.14	0.605
C18:2 <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11	17	1.20	0.282	0.75	1.89	0.10	0.717
C18:0	17	13.52	1.763	9.60	16.76	0.08	0.748
C18:0 <i>iso</i>	17	0.03	0.008	0.02	0.04	-0.03	0.923
<b>MFA groups<sup>2</sup></b>							
∑ MUFA	17	32.21	2.688	27.82	36.82	-0.70	0.002
∑ C18:1 <i>cis</i>	17	25.42	2.412	21.72	29.72	-0.68	0.003
∑ <i>n</i> -3 FA	17	1.25	0.278	0.89	1.94	-0.66	0.004
∑ SFA	17	62.13	4.542	49.56	68.36	0.63	0.007
∑ UFA	17	37.13	4.438	31.27	50.01	-0.59	0.014
∑ PUFA	17	4.92	2.232	3.21	13.18	-0.32	0.216
∑ <i>n</i> -6 FA	17	2.46	2.014	1.36	10.05	-0.27	0.287
∑ C18:1 <i>trans</i>	17	4.04	0.821	2.95	5.85	-0.25	0.330

<sup>1</sup>GS-L0, GS-LS, CS-L0, and CS-LS. Details on dietary composition see Table 4.1.

<sup>2</sup>MFA groups composition see Supplementary Table 4.S2.

**Supplementary Table 4.S5.** Summary of multiple regression equations predicting methane production (CH<sub>4</sub>, L/d). Dataset 1 included 43 MFA, whereas dataset 2 additionally included ECM and dataset 3 DMI, respectively, as independent variables. Dataset 4 included MFA variables only, whereas dataset 5 and 6 additionally included ECM or DMI, respectively. Equations were developed for basal rations (GS, CS), linseed supplementation (L0, LS) and all experimental diets collectively. Validation and quality parameters for methane prediction equations are shown in Table 5 (adapted from Engelke et al., 2019)

CH <sub>4</sub> (L/d)	N	Best models of stepwise regression analysis for 43 MFA ( $Y = a + b_1x_1 + \dots + b_nx_n$ )
<b>Dataset 1</b>		
GS	17	$651.2 + (-274.4) \times 18:1cis11$
CS	20	$248.3 + 453.7 \times iso16:0 + (-121.2) \times 18:1cis12 + 8911.4 \times 24:0$
L0	20	$900.2 + (-787.6) \times 17:1cis9 + (-23.0) \times 18:1cis9 + 8129.2 \times 24:0$
LS	17	$927.7 + (-14.8) \times 18:1cis9 + (-4643.6) \times 22:0$
All diets	37	$888.3 + (-604.4) \times 17:1cis9 + (-17.9) \times 18:1cis9 + (-173.9) \times 18:1cis11 + 63.5 \times 18:1trans9 + 6076.3 \times 24:0$
<b>Dataset 2</b>		
GS	17	$149.6 + 15.0 \times ECM$
CS	20	$72.0 + 8.5 \times ECM + 411.1 \times iso16:0 + (-101.5) \times 18:1cis12 + 6504.7 \times 24:0$
L0	20	$516.1 + 7.8 \times ECM + (-577.2) \times 17:1cis9 + (-12.1) \times 18:1cis9 + 6179.8 \times 24:0$
LS	17	$927.7 + (-14.8) \times 18:1cis9 + (-4643.6) \times 22:0$
All diets	37	$201.7 + 14.2 \times ECM + (-66.9) \times 18:1trans9$
<b>Dataset 3</b>		
GS	17	$102.8 + 24.6 \times DMI$
CS	20	$87.9 + 20.4 \times DMI + (-122.2) \times 18:1cis12 + 5372.4 \times 24:0$
L0	20	$517.7 + 12.1 \times DMI + (-503.5) \times 17:1cis9 + (-14.0) \times 18:1cis9 + 6306.1 \times 24:0$
LS	17	$180.0 + 21.7 \times DMI + (-3777.4) \times 22:0$
All diets	37	$118.2 + 25.8 \times DMI + (-57.2) \times 18:1trans9$
<b>Dataset 4</b>		
GS	17	$734.9 + (-10.9) \times \sum 18:1cis$
CS	20	$927.1 + (-13.7) \times MUFA$
L0	20	$1097.4 + 38.0 \times UFA + (-66.8) \times MUFA$
LS	17	$1167.4 + (-20.7) \times MUFA$
All diets	37	$841.0 + (-11.4) \times MUFA$
<b>Dataset 5</b>		
GS	17	$149.6 + 15.0 \times ECM$
CS	20	$277.1 + 17.4 \times ECM + (-8.3) \times MUFA$
L0	20	$126.9 + 16.3 \times ECM$
LS	17	$1167.4 + (-20.7) \times MUFA$
All diets	37	$390.7 + 13.1 \times ECM + (-7.6) \times MUFA$
<b>Dataset 6</b>		
GS	17	$102.8 + 24.6 \times DMI$
CS	20	$154.8 + 31.1 \times DMI + (-6.5) \times MUFA$
L0	20	$76.4 + 27.2 \times DMI$
LS	17	$-65.7 + 32.6 \times DMI$
All diets	37	$271.8 + 24.3 \times DMI + (-6.1) \times MUFA$



## 5. Allgemeine Diskussion

Milchfettsäuren haben sich als Prädiktoren für die CH<sub>4</sub>-Emission des Rindes gezeigt (Chilliard et al., 2009, van Lingen et al., 2014, van Gastelen et al., 2017). Dennoch konnte bisher keine individuelle MFA oder MFA-Gruppe identifiziert werden, die als Variable in einer Vorhersagegleichung für die CH<sub>4</sub>-Emission als eindeutiger Indikator Verwendung finden kann (van Gastelen and Dijkstra, 2016). Die bisher publizierten CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen auf Basis von MFA-Variablen beschränken sich auf MFA, die mit der GC-Methode analysiert wurden und beruhen auf einer Vielzahl von individuellen MFA als *erklärenden* Variablen<sup>10</sup> (van Lingen et al., 2014, Castro-Montoya et al., 2016b, Rico et al., 2016). Die komplexe Physiologie der Milchfettbildung unter dem Einfluss der Fütterung auf das MFA-Muster, als auch der Einfluss der Fütterung auf die CH<sub>4</sub>-Emission könnten eine mögliche Erklärung für die vielen verschiedenen *erklärenden* MFA-Variablen sein (Mohammed et al., 2011, Dijkstra et al., 2016, Rico et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals zwei verschiedene Quantifizierungsmethoden (MIRS und GC) zur Bestimmung der MFA-Konzentrationen und zur Ableitung von CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen verwendet. Bedingt durch die zwei verschiedenen Methoden wurden unterschiedlich viele MFA-Variablen auf der Basis von individuellen bzw. Gruppen von MFA ermittelt (De Marchi et al., 2014, Firl et al., 2014) und zur Ableitung der CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen eingesetzt. Ergänzend sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden, ob die zusätzliche Integration von prädiktiven Markern der CH<sub>4</sub>-Emission (DMI oder ECM) in die Vorhersagegleichung eine verbesserte Vorhersagegüte erzielen. Ferner wurden für diese Arbeit vier verschiedene Rationen gefüttert, um die Wirkung der Basaldiät (GS/CS) und der Fettsupplementierung (L0/LS) zu untersuchen. Der überwiegende Anteil bisher publizierter CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen beruht auf dem MFA-Muster von Kühen, die mit fettsupplementierten Rationen gefüttert wurden (z.B. Mohammed et al., 2011, van Lingen et al., 2014, Castro-Montoya et al., 2016b), während nur wenige Untersuchungen vorliegen, in denen die Rationen der Kühe nicht fettsupplementiert waren (Dijkstra et al., 2016, van Gastelen et al., 2017). Diese Arbeit soll daher einen Beitrag zur Untersuchung der Qualität von CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen leisten, die eine unterschiedliche Variablenanzahl aufweisen und den Einfluss verschiedener Futterzusammensetzung berücksichtigen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden drei unterschiedlich große Datensätze von *potentiellen* MFA-Variablen<sup>10</sup> verwendet, mit deren Hilfe die Regressionsgleichungen, bestehend aus den *erklärenden* Variablen, abgeleitet wurden. Der erste

---

<sup>10</sup> *Erklärende* Variablen sind Variablen, die im statistisch besten Regressionsmodell Berücksichtigung finden und aus allen *potentiellen* Variablen des Datensatzes ausgewählt wurden.

statistische Datensatz bestand aus einer kleinen Auswahl an Variablen von MFA-Konzentrationen (**MIRS-Datensatz** aus sieben Gruppen: SFA, UFA, MUFA, PUFA, C18:1*cis* und *trans* und *n*-3 MFA, und zwei individuelle MFA: C16:0, C18:0), die mit der MIRS-Methode ermittelt wurden (Soyeurt et al., 2011, De Marchi et al., 2014). In einem zweiten Datensatz wurden 43 individuellen MFA-Variablen aus der GC-Analyse verwendet (**großer GC-Datensatz**). In einem zusätzlichen dritten Datensatz wurden die 43 MFA aus der GC-Analyse in gleicher Weise gruppiert, wie sie beim MIRS-Datensatz zur Verfügung standen (**kleiner GC-Datensatz** bestehend aus sieben MFA-Gruppen und zwei individuelle MFA-Konzentrationen). Die Vorhersagegleichungen für die individuellen Diäten (GS-L0, GS-LS, CS-L0; CS-LS) basierend auf dem kleinen und großen GC-Datensatz erfüllten aufgrund der kleinen Anzahl der Beobachtungen ( $n = 7$  bis 10) in mehreren Fällen die Anforderungen der statistischen Qualitätsüberprüfung nicht und wurden daher nicht berücksichtigt (siehe Kapitel 4). Die hohe Variablenanzahl von 43 MFA im großen GC-Datensatz führte ferner zu Multikollinearitäten *erklärender* MFA-Variablen und machte strengere Auswahlkriterien für die MFA-Variablen nötig. *Potenzielle* MFA-Variablen für den kleinen und großen GC-Datensatz wurden nur ausgewählt, wenn sie eine signifikante Korrelation zur CH<sub>4</sub>-Emission aufwiesen, während für den MIRS-Datensatz keine Vorauswahl der *potentiellen* Variablen vorgenommen wurde. Die Vorhersagegleichungen erstellt aus dem großen GC-Datensatz sind, mit Ausnahme der GS-Diäten, immer besser ( $R_{cv}$  zwischen 0,70 und 0,92) als die Vorhersagegleichungen mit dem MIRS-Datensatz ( $R_{cv}$  zwischen 0,39 und 0,91) oder überwiegend besser als mit dem kleinen GC-Datensatz ( $R_{cv}$  zwischen 0,31 und 0,81). Trotz der strengen statistischen Vorauswahl, wurde mit dem umfangreichen großen GC-Datensatz *erklärende* Variablen hervorgebracht, die die Variation der CH<sub>4</sub>-Emission am ehesten erklären können. Für die Vorauswahl der *potentiellen* MFA wurden rationsgepoolte Daten verwendet. Bestimmte individuelle MFA haben aber gezeigt, dass ihre Korrelationen zu CH<sub>4</sub>-Emission rationsabhängig sind (z.B. C10:0, C18:3*n*-3, C24:0; siehe Kapitel 4). Möglicherweise wurden auf diese Weise wichtige individuelle MFA vernachlässigt, die für die Variation der CH<sub>4</sub>-Emission spezifischer Rationen von Relevanz sind. Das verdeutlicht die statistischen Grenzen bei der Erstellung von CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen anhand vieler individueller MFA und wirft die Frage auf, ob universelle CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen anhand von MFA allein möglich sind (Mohammed et al., 2011, van Lingen et al., 2014). In dieser Arbeit zeigten die rationsgepoolten CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen moderate bis hohe Präzision ( $R^2_{CV}$  von 0,50 bis 0,92) und wären damit für den routinemäßigen Einsatz denkbar. Im Methodenvergleich war das Bestimmtheitsmaß der Regressionen überraschenderweise besser mit dem MIRS-Datensatz ( $R_{Model}$  zwischen 0,61 und 0,96) als mit dem kleinen GC-Datensatz ( $R_{Model}$  zwischen 0,26 und 0,80) wohingegen das Bestimmtheitsmaß der

Kreuzvalidierung vergleichbare Resultate erzielte (MIRS-Datensatz zwischen  $R_{CV} = 0,50$  und  $0,84$ , kleiner GC-Datensatz zwischen  $R_{CV} = 0,31$  und  $0,84$ ). Ein Grund für die besseren Ergebnisse des  $R_{Model}$  könnte sein, dass die MIRS-Bestimmung der MFA-Konzentrationen aus Regressionsgleichungen geschätzt und nicht gemessen wird. Die geschätzten MFA-Konzentrationen könnten weniger Schwankungen zwischen den verschiedenen untersuchten Milchproben aufweisen als die mittels GC akkurat analysierten MFA-Konzentrationen. Dies könnte mit dem MIRS-Datensatz zu statistisch stabileren  $CH_4$ -Vorhersagen geführt haben, die jedoch die reelle  $CH_4$ -Emission gröber abbilden (Vanrobays et al., 2016, Vanlierde et al., 2018). Aufgrund der kleineren Diskrepanz zwischen  $R_{Model}$  und  $R_{CV}$  der Modelle des kleinen GC-Datensatzes, erscheint die Vorhersage stabiler als gegenüber den Modellen des MIRS-Datensatzes. Insgesamt ist die Vorhersagegenauigkeit der Regressionsgleichungen aus dem MIRS- und dem kleinen GC-Datensatz als moderat ( $R_{CV}$  von  $0,30$  bis  $0,70$ ) bis hoch ( $R_{CV} > 0,70$ ) zu bewerten. Eine Studie, die die  $CH_4$ -Vorhersagen mithilfe des gesamten MIRS-Spektrums der Milch (RMSE =  $43,2$  g/d) mit denen von GC-analysierten MFA als Variablen (RMSE =  $35,7$  g/d) verglich, kam zu dem Schluss, dass die Vorhersagegenauigkeit beider Methoden ähnlich gut ist (van Gastelen et al., 2018). Die  $CH_4$ -Vorhersage anhand von MIRS-geschätzten MFA-Konzentrationen ist eine vielversprechende, praxistaugliche Methode, auch weil sie in die Milchleistungsprüfung integrierbar ist. Ein möglicher Nachteil dieser Methode ist die Unfähigkeit, mögliche wichtige individuelle MFA als Prädiktoren der  $CH_4$ -Emission genau zu schätzen (van Gastelen and Dijkstra, 2016). Darüber hinaus werden bei MIRS die MFA-Konzentrationen in der Vollmilch bestimmt, wohingegen die Referenzmethode GC die MFA-Konzentrationen direkt im Milchfett analysiert (De Marchi et al., 2014). Das bedeutet, dass die geschätzten MFA-Konzentrationen vom Fettgehalt abhängig sind und somit eine unabhängige Validierung der Kalibrierung zur Bestimmung der MFA-Konzentrationen zwingend erforderlich ist (van Gastelen and Dijkstra, 2016). Dennoch gibt es derzeit keine standardisierten Kalibrierungsverfahren für die MIRS-Methode. Das betrifft fehlende standardisierte Milchproben, statistische Modelle zur Entwicklung der PLS-Schätzgleichung oder mögliche Vorbehandlungen des Spektrums (De Marchi et al., 2014, Grelet et al., 2017). Vergleiche von analysierten Parametern mit Referenzmethoden oder von verschiedener MIRS-Geräten weisen jedoch eine sehr hohe Präzision der erhaltenen Messwerte auf, insbesondere innerhalb von MIRS-Geräten des gleichen Herstellers (Soyeurt et al., 2011, Grelet et al., 2015, Grelet et al., 2017). Der große Vorteil der MIRS-Methode liegt in der Wiederholbarkeit von Messungen und in der Möglichkeit eines flächendeckenden Screenings (Negussie et al., 2017). Eine einzelne *erklärende* Variable innerhalb der individuellen MFA-Variablen oder MFA-Gruppen mit einem überragenden  $CH_4$ -Vorhersagepotential konnte nicht identifiziert werden. Für die auf

MIRS-basierenden MFA abgeleiteten CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen wurden die individuellen MFA C16:0 und C18:0 sowie die Isomere der MFA C18:1*cis* als dominante, *erklärende* Variablen identifiziert. Die Vorhersagegleichungen, basierend auf dem kleinen GC-Datensatz, waren jedoch durch das Vorkommen der MFA-Gruppe MUFA als dominante, *erklärende* Variablen gekennzeichnet. Die erhobenen CH<sub>4</sub>-Daten aus der Respirationskammer als auch die verwendeten Milchproben zur MFA-Bestimmung waren für die GC- und die MIRS-Studie identisch. Neben dem strengeren statistischen Verfahren, könnte daher auch die verwendete Bestimmungsmethode der MFA-Konzentrationen einen Einfluss auf die *erklärenden* Variablen haben.

Die alleinige CH<sub>4</sub>-Vorhersage anhand von MFA wird von einigen Autoren als unzureichend betrachtet (Mohammed et al., 2011, van Lingen et al., 2014, Castro-Montoya et al., 2016b). Um die entwickelten CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen zu verbessern, wurde in dieser Arbeit die Integration der *potentiellen* Variablen ECM oder DMI untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass die CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen aus dem großen GC-Datensatz ohne die *potentiellen* Variablen ECM oder DMI für alle Diäten zusammen die besten Güteparameter ( $R^2_{Model} = 0,81$  und  $R^2_{CV} = 0,85$ ) erzielte (Engelke et al., 2019). Die zusätzliche Integration von ECM oder DMI konnte die Güte für alle Diäten zusammen nicht verbessern. Die rationspezifischen Vorhersagen (GS, CS, L0, LS) des großen GC-Datensatzes profitierten hingegen von der Integration der zusätzlichen Variablen ( $R^2_{Model}$  ohne ECM/DMI von 0,36 bis 0,86 versus  $R^2_{Model}$  mit ECM/DMI von 0,61 bis 0,91). Die CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen des kleinen GC-Datensatzes und des MIRS-Datensatzes profitierten dagegen fast immer und in ähnlichem Ausmaß von der Integration der zusätzlichen Variablen ( $R^2_{Model}$  ohne ECM/DMI von 0,26 bis 0,86 versus  $R^2_{Model}$  mit ECM/DMI von 0,49 bis 0,91). Die Ergebnisse zeigen, dass eine akkurate und präzise Vorhersage anhand von MFA allein möglich ist, dafür aber eine hohe Anzahl von *potentiellen* MFA-Variablen im statistischen Datensatz notwendig ist. Die statistische Auswahl profitiert von vielen *potentiellen* Variablen, die mit der CH<sub>4</sub>-Emission assoziiert sein können und sich als *erklärender* Variablen im Modell wiederfinden. Das gilt insbesondere, wenn die Rationszusammensetzung sehr verschiedenartig ist. Die beste Gleichung zur CH<sub>4</sub>-Vorhersage nützt jedoch nichts, wenn die notwendigen Variablen nicht verfügbar sind (Moraes et al., 2014). Für die Routineuntersuchung ist die GC-Methode zu teuer und zeitaufwändig und daher muss bei der Auswahl des besten Modells eine Balance zwischen der Vorhersagekraft sowie der Verfügbarkeit einzelner Parameter vorliegen.

Die Fütterung stellt einen der größten Einflussfaktoren auf das MFA-Muster dar und beeinflusst auch die Höhe der CH<sub>4</sub>-Produktion. Dabei spielt das Verhältnis von Faser und Stärke in der Ration eine Rolle (Kliem et al., 2008, Fievez et al., 2012) sowie die Auswahl der Futterpflanzen und mögliche Kombinationseffekte von Futtermitteln in der TMR (Lourenco et al., 2008, Enjalbert et

al., 2017). Auch die Proteinversorgung durch das Grundfutter kann einen Einfluss auf die Bakterien im Pansen und damit auf das MFA-Muster haben (Vlaeminck et al., 2015). Daher könnten rationsbezogene Vorhersagegleichungen einen Vorteil gegenüber universellen Gleichungen haben (van Lingen et al., 2014, Dijkstra et al., 2016, Rico et al., 2016). Für die Leinsamen-supplementierten Rationen wurde eine schlechtere Vorhersagegüte festgestellt ( $R^2_{Model}$  von 0,49 bis 0,81 für LS versus  $R^2_{Model}$  von 0,70 bis 0,91 für L0) ungeachtet des verwendeten Datensatzes. Dies steht im Gegensatz zu einer Studie, in der ausschließlich Leinsamen-supplementierte Rationen untersucht wurden und die im Literaturvergleich die beste Vorhersagegüte ( $R^2_{Model} = 0,95$ ) erreichte (Chilliard et al., 2009). Die Vorhersagegenauigkeit der  $CH_4$ -Emission für die GS-Diäten ( $R_{CV}$  von 0,31 bis 0,71) erwies sich sowohl mit dem kleinen als auch mit dem großen GC-Datensatz immer als schlechter als im Vergleich zu den CS-Diäten ( $R_{CV}$  von 0,51 bis 0,92). Die Güte der Gleichungen aus dem MIRS-Datensatz erzielten vergleichbare Resultate für die beiden Basaldiäten GS und CS ( $R_{CV}$  von 0,50 bis 0,84).

Abschließend kann geschlussfolgert werden, dass zur Bestimmung von MFA-Konzentrationen die MIRS-Methode die einzig praktikable Methode zum Screening der Milch einer Vielzahl von Tieren darstellt. Die  $CH_4$ -Vorhersagegleichungen aus dem MIRS-Datensatz erzielen vergleichbar gute Ergebnisse in der Güte wie diese aus dem kleinen GC-Datensatz. Die zusätzliche Variable ECM erhöhte die Vorhersagegenauigkeit und für alle Diäten zusammen ergab sich aus dem MIRS-Datensatz ein  $R_{CV}$  von 0,72 und ein  $R^2_{Model}$  von 0,79. Die  $CH_4$ -Vorhersagegleichungen aus den MFA-Konzentrationen der MIRS-Analyse plus der Variable ECM wird daher für den praktischen Einsatz favorisiert. Eine zusätzliche externe Validierung wäre noch wünschenswert. Damit die Vorhersagegleichung praktisch nutzbar sein wird, muss sie sich noch beweisen,  $CH_4$ -Minderungsstrategien sensibel und zuverlässig zu evaluieren. Dazu zählen die Identifizierung von wenig- $CH_4$ -emittierenden Tieren zu Züchtungszwecken, die Ermittlung der  $CH_4$ -Reduktion bei Rationsänderungen und der Vergleich von Emissionen verschiedener Milchviehbetriebe (van Gastelen et al., 2018). Es bleibt zu erwähnen, dass in diesen Untersuchungen Milch von Kühen mit mehr als 100 DIM verwendet wurde. Somit können die in dieser Studie entwickelten Vorhersagegleichungen streng genommen nur bei Kühen, die sich in einem Laktationsstadium nach dem Laktationspeak und mit einer neutralen oder positiven Energiebilanz befinden, angewendet werden. Die Brauchbarkeit des Markers für Tiere <100 DIM muss zukünftig überprüft werden. Die Integration des Laktationsstadiums als Faktor in die Vorhersagegleichung wäre denkbar, so wie es bei der  $CH_4$ -Vorhersage anhand von MIRS-Spektren umgesetzt wurde (Vanlierde et al., 2015).

## **Zusammenfassung der Dissertation**

### **Entwicklung eines praxistauglichen, indirekten Markers für die Methanemission von Milchkühen anhand des Fettsäuremusters in der Milch**

Methan (CH<sub>4</sub>) zählt zu den bedeutendsten Treibhausgasen in der Atmosphäre und trägt zur Klimaerwärmung bei. Emissionen, die auf den Menschen zurückzuführen sind, müssen aus Gründen des Umweltschutzes reduziert werden. Die Milchwirtschaft als Hauptemittent in der Landwirtschaft muss daher ressourcenschonend und nachhaltig produzieren. Eine akkurate individuelle Quantifizierung der CH<sub>4</sub>-Emission von Milchkühen und Betrieben zur Kontrolle der CH<sub>4</sub>-Emission und zur Umsetzung von CH<sub>4</sub>-Minderungsstrategien ist derzeit technisch nicht möglich. In dieser Arbeit wurde ein indirekter Marker zur Schätzung der tierindividuellen CH<sub>4</sub>-Emission anhand der Konzentration von Milchfettsäuren (MFA) sowie der Milchleistung entwickelt, der für eine große Anzahl von Tieren eingesetzt werden kann.

Zu diesem Zweck erhielten 20 Milchkühe der Rasse Deutsch Holstein in einer Cross-over-Studie vier verschiedene Futterrationen ( $n = 10/\text{Ration}$ ), die bekanntermaßen die CH<sub>4</sub>-Produktion nach unten oder oben beeinflussen. Dabei handelte es sich um totale Mischrationen, die überwiegend aus Gras- oder Maissilage bestanden und denen extrudierter Leinsamen beigemischt wurde oder nicht. Die Quantifizierung der CH<sub>4</sub>-Emission wurde in Respirationsskammern vorgenommen und zum selben Zeitpunkt wurden Milchproben der Tiere gewonnen. Die Milch-Fettsäuremuster (MFA) wurde mit zwei verschiedenen Methoden, der Gaschromatografie (GC) und der Infrarotspektroskopie im mittleren Wellenlängenbereich (MIRS), untersucht. Mit Hilfe der GC-Methode wurden 43 individuelle MFA quantifiziert. Mit der verwendeten MIRS-Methode konnte nur eine geringere Anzahl von MFA (7 MFA-Gruppen und 2 individuelle MFA) quantifiziert werden. Aufgrund bekannter metabolischer Zusammenhänge zwischen der CH<sub>4</sub>-Emission und den MFA sowie auf Basis der in der Studie erhaltenen Daten und berechneter signifikanter Korrelationen wurden rationsbezogene und über mehrere Rationen gepoolte CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen (L/d) anhand der gemessenen MFA abgeleitet. Mit der MIRS-Methode konnte nur eine geringere Variablenanzahl von MFA-Konzentrationen im Datensatz verwendet werden. Um die Regressionsgleichungen dennoch vergleichen zu können, wurden die 43 MFA aus der GC-Analyse in der Weise gruppiert, dass ein zusätzlicher zweiter GC-Datensatz äquivalent zu dem Datensatz mit den MIRS-analysierten MFA entstand. Ergänzend wurden Gleichungen erstellt, die zusätzlich zu den MFA die Variablen Trockensubstanzaufnahme (DMI) oder Energie-korrigierte Milchleistung (ECM) im

Datensatz enthielten. Alle entwickelten Gleichungen wurden einer internen Kreuzvalidierung unterzogen.

Die beste Vorhersagegüte wurde für die Gleichungen erreicht, die aus den 43 GC analysierten MFA erstellt wurden. Die Vorhersagegüte der Gleichungen aus dem MIRS- und dem äquivalenten GC-Datensatz waren vergleichbar. Die zusätzlichen Variablen DMI oder ECM konnten die Vorhersagegüte in den meisten Fällen verbessern. Es konnte in den verschiedenen Vorhersagegleichungen keine einzelne, wiederkehrende MFA mit überragendem Vorhersagepotential identifiziert werden. Unabhängig von der verwendeten Methode zur Bestimmung der MFA-Konzentrationen wurde eine schlechtere Vorhersagegüte für die Leinsamen-supplementierten Rationen erhalten. Universelle CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen, basierend auf gepoolten Daten aller Rationsgruppen, konnten mit moderater bis hoher Präzision ( $R^2_{CV}$  von 0,48 bis 0,85) abgeleitet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen ausschließlich basierend auf Variablen aus MFA-Konzentrationen möglich sind. Universelle Gleichungen können zur Bestimmung der individuellen CH<sub>4</sub>-Emission von Kühen eingesetzt werden. Darüber hinaus kann die Methode MIRS zur Bestimmung von MFA verwendet werden, um daraus CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen abzuleiten. Die Variablen DMI und ECM verbessern die Güte von CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen. Für milchproduzierende Betriebe ist der Einsatz von CH<sub>4</sub>-Vorhersagegleichungen basierend auf MIRS-analysierten MFA und der zusätzlichen Variable ECM der tauglichste indirekte Marker, da die dafür notwendigen Parameter aus der Milchprüfung bereits zur Verfügung stehen oder leicht integriert werden können.

## **Summary of the Doctoral Thesis**

### **Development of an indirect marker based on milk fatty acids to predict methane emission of dairy cows applicable on farm**

Methane (CH<sub>4</sub>) is a greenhouse gas contributing to global warming. Anthropogenic greenhouse gas emissions should be decreased to increase efficiency and sustainability in agriculture especially in dairy farming. Currently, individual largescale quantification of methane emission from dairy cows or farms are not technically feasible but are the prerequisite for monitoring and mitigation of CH<sub>4</sub>-emission. In the present work an indirect marker of methane emission based on milk fatty acids (MFA) concentrations and energy-corrected milk yield (ECM) was developed to estimate cow-individual CH<sub>4</sub>-emission applicable on farm.

For this purpose, 20 lactating Holstein Friesian cows were fed four different diets ( $n = 10/\text{diet}$ ) in a cross-over design to provoke a wide range of CH<sub>4</sub>-production. The fed diets were total mixed rations based largely on grass- or corn silage supplemented with or without extruded linseed. Quantification of CH<sub>4</sub>-emission was recorded in respiration chambers and at the same time milk samples were collected. The MFA profile was determined by two different analytical methods namely gas chromatography (GC) and mid-infrared spectroscopy (MIRS). It is well known that common metabolic pathways between CH<sub>4</sub>-emission and MFA exist and correlations in the present study have been confirmed such a relationship. Therefore CH<sub>4</sub>-prediction equations using MFA as variables were developed for individual and pooled dietary groups. Using the GC method concentrations of 43 individual MFA variables were provided for the statistical dataset to develop the regression equations. Using the MIRS method concentrations of less MFA variables could be estimated (7 MFA groups and 2 individual MFA) and used to construct a dataset. We were interested to know the predictive power of equations containing groups of biochemically related MFA instead of individual MFA. For comparing the developed equations among the two analytical methods, the 43 MFA of the GC-derived dataset were summed as biochemically related MFA groups in the same manner as MFA groups were predicted by MIRS. In total two MFA datasets based on GC analyses and one dataset based on MIRS-derived MFA were made available. In addition, all datasets were extended further by the implementation of dry matter intake (DMI) or ECM data. All developed equations were revised by an internal cross-validation.

The best accuracy was observed for CH<sub>4</sub>-prediction equations based on datasets with 43 MFA. The accuracies of CH<sub>4</sub>-prediction equations based on datasets with MFA determined by MIRS or the equivalent MFA analyzed by GC but biochemically grouped were comparable. The



additional variables DMI or ECM improved prediction accuracy in most cases. No individual MFA variable providing a superior predictive value could be identified. Independent of the used dataset, prediction accuracy was worse for diets supplemented with linseed compared to diets without linseed supplementation. Universal prediction equations could be developed for datasets based on all pooled dietary groups resulting in moderate to high prediction accuracy ( $R^2_{CV}$  ranged from 0.48 to 0.85).

It can be concluded from the present work that  $CH_4$ -prediction equations based solely on MFA variables are suitable. Universal prediction equations for data from all diets collectively can be used to estimate individual  $CH_4$ -emission of dairy cows. In addition, MFA determined by MIRS could be used to develop  $CH_4$ -prediction equations. The inclusion of DMI or ECM improved the prediction accuracy of the models. Among investigated prediction equations, models based on MFA estimated by MIRS and ECM were the best as screening method for individual methane emission of cows.

**Literaturverzeichnis**

- Allen, M. S. 2014. Drives and limits to feed intake in ruminants. *Anim. Prod. Sci.* 54(10):1513-1524.
- Aluwong, T., P. A. Wuyep, and L. Allam. 2011. Livestock-environment interactions: Methane emissions from ruminants. *Afr. J. Biotechnol.* 10(8):1265-1269.
- Alves, S. P., J. Santos-Silva, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca, and R. J. B. Bessa. 2013. Detailed dimethylacetal and fatty acid composition of rumen content from lambs fed lucerne or concentrate supplemented with soybean oil. *PLoS One* 8(3):14.
- Angulo, J., B. Hiller, M. Olivera, L. Mahecha, D. Dannenberger, G. Nuernberg, B. Losand, and K. Nuernberg. 2012. Dietary fatty acid intervention of lactating cows simultaneously affects lipid profiles of meat and milk. *J. Sci. Food Agric.* 92(15):2968-2974.
- Appuhamy, J., J. France, and E. Kebreab. 2016. Models for predicting enteric methane emissions from dairy cows in North America, Europe, and Australia and New Zealand. *Glob. Chang. Biol.* 22(9):3039-3056.
- Arndt, C., J. M. Powell, M. J. Aguerre, P. M. Crump, and M. A. Wattiaux. 2015. Feed conversion efficiency in dairy cows: Repeatability, variation in digestion and metabolism of energy and nitrogen, and ruminal methanogens. *J. Dairy Sci.* 98(6):3938-3950.
- Bannink, A., J. France, S. Lopez, W. J. J. Gerrits, E. Kebreab, S. Tamminga, and J. Dijkstra. 2008. Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. *Anim. Feed Sci. Technol.* 143(1-4):3-26.
- Bannink, A., J. Kogut, J. Dijkstra, J. France, E. Kebreab, A. M. Van Vuuren, and S. Tamminga. 2006. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. *J. Theor. Biol.* 238(1):36-51.
- Bannink, A., M. W. van Schijndel, and J. Dijkstra. 2011. A model of enteric fermentation in dairy cows to estimate methane emission for the Dutch National Inventory Report using the IPCC Tier 3 approach. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-67:603-618.
- Barber, M. C., R. A. Clegg, M. T. Travers, and R. G. Vernon. 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* 1347(2-3):101-126.
- Bauman, D. E. and J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23:203-227.
- Bauman, D. E., K. J. Harvatine, and A. L. Lock. 2011. Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 31:299-319.
- Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, and A. L. Lock. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89(4):1235-1243.
- Bauman, D. E., J. W. Perfield, K. J. Harvatine, and L. H. Baumgard. 2008. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model. *J. Nutr.* 138(2):403-409.

- Bayat, A. R., I. Tapio, J. Vilkki, K. J. Shingfield, and H. Leskinen. 2018. Plant oil supplements reduce methane emissions and improve milk fatty acid composition in dairy cows fed grass silage-based diets without affecting milk yield. *J. Dairy Sci.* 101(2):1136-1151.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara, and T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Aust. J. Exp. Agric.* 48(1-2):21-27.
- Beauchemin, K. A., T. A. McAllister, and S. M. McGinn. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB reviews - abstracts* 4(035):1-18.
- Bell, M. J., S. L. Potterton, J. Craigon, N. Saunders, R. H. Wilcox, M. Hunter, J. R. Goodman, and P. C. Garnsworthy. 2014. Variation in enteric methane emissions among cows on commercial dairy farms. *Animal* 8(9):1540-1546.
- Benchaar, C., F. Hassanat, R. Gervais, R. Y. Chouinard, H. V. Petit, and D. I. Masse. 2014. Methane production, digestion, ruminal fermentation, nitrogen balance, and milk production of cows fed corn silage- or barley silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 97(2):961-974.
- Benchaar, C., F. Hassanat, R. Martineau, and R. Gervais. 2015. Linseed oil supplementation to dairy cows fed diets based on red clover silage or corn silage: Effects on methane production, rumen fermentation, nutrient digestibility, N balance, and milk production. *J. Dairy Sci.* 98(11):7993-8008.
- Bielak, A., M. Derno, A. Tuchscherer, H. M. Hammon, A. Susenbeth, and B. Kuhla. 2016. Body fat mobilization in early lactation influences methane production of dairy cows. *Sci. Rep.* 6:28135.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Massé. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Can. J. Anim. Sci.* 84(3):319-335.
- Bobé, G., J. A. M. Bormann, G. L. Lindberg, A. E. Freeman, and D. C. Beitz. 2008. Estimates of genetic variation of milk fatty acids in US Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 91(3):1209-1213.
- Brade, W. and O. Distl. 2015. Das ruminale Mikrobiom des Rindes (The ruminal microbiota of bovine). *Berichte über Landwirtschaft. BLE, Hg.* 93(3).
- Brade, W. and K. Nürnberg. 2016. Fatty acids in the milk: Biosynthesis and possible using as specific biomarkers. *Züchtungskunde* 88(3):216-232.
- Buccioni, A., M. Decandia, S. Minieri, G. Molle, and A. Cabiddu. 2012. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174(1-2):1-25.
- Cabezas-Garcia, E. H., S. J. Krizsan, K. J. Shingfield, and P. Huhtanen. 2017. Between-cow variation in digestion and rumen fermentation variables associated with methane production. *J. Dairy Sci.* 100(6):4409-4424.

- Caro, D., E. Kebreab, and F. M. Mitloehner. 2016. Mitigation of enteric methane emissions from global livestock systems through nutrition strategies. *Clim. Change* 137(3-4):467-480.
- Cassandro, M., M. Mele, and B. Stefanon. 2013. Genetic aspects of enteric methane emission in livestock ruminants. *Ital. J. Anim. Sci.* 12(3):9.
- Castro-Montoya, J., A. M. Bhagwat, N. Peiren, S. De Campeneere, B. De Baets, and V. Fievez. 2011. Relationships between odd- and branched-chain fatty acid profiles in milk and calculated enteric methane proportion for lactating dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-67:596-602.
- Castro-Montoya, J. M., S. De Campeneere, B. De Baets, and V. Fievez. 2016a. The potential of milk fatty acids as biomarkers for methane emissions in dairy cows: A quantitative multi-study survey of literature data. *J. Agric. Sci.* 154(3):515-531.
- Castro-Montoya, J. M., N. Peiren, J. Veneman, B. De Baets, S. De Campeneere, and V. Fievez. 2016b. Predictions of methane emission levels and categories based on milk fatty acid profiles from dairy cows. *Animal*:1-10.
- Castro-Montoya, J. M., N. Peiren, J. Veneman, B. De Baets, S. De Campeneere, and V. Fievez. 2017. Predictions of methane emission levels and categories based on milk fatty acid profiles from dairy cows. *Animal* 11(7):1153-1162.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, R. M. Mansbridge, and M. Doreau. 2000. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales De Zootechnie* 49(3):181-205.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, and M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109(8):828-855.
- Chilliard, Y., C. Martin, J. Rouel, and M. Doreau. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 92(10):5199-5211.
- Chung, Y. H., M. L. He, S. M. McGinn, T. A. McAllister, and K. A. Beauchemin. 2011. Linseed suppresses enteric methane emissions from cattle fed barley silage, but not from those fed grass hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-67:321-329.
- Clapham, W. M., J. G. Foster, J. P. S. Neel, and J. M. Fedders. 2005. Fatty acid composition of traditional and novel forages. *J. Agric. Food Chem.* 53(26):10068-10073.
- Clark, H. 2013. Nutritional and host effects on methanogenesis in the grazing ruminant. *Animal* 7:41-48.
- Coppa, M., A. Revello-Chion, D. Giaccone, A. Ferlay, E. Tabacco, and G. Borreani. 2014. Comparison of near and medium infrared spectroscopy to predict fatty acid composition on fresh and thawed milk. *Food Chem.* 150:49-57.
- Cottle, D. J., J. V. Nolan, and S. G. Wiedemann. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: A review. *Anim. Prod. Sci.* 51(6):491-514.

- Danielsson, R., J. Dicksved, L. Sun, H. Gonda, B. Muller, A. Schnurer, and J. Bertilsson. 2017. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. *Front. Microbiol.* 8:e226.
- De Marchi, M., V. Toffanin, M. Cassandro, and M. Penasa. 2014. Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits. *J. Dairy Sci.* 97(3):1171-1186.
- Dehareng, F., C. Delfosse, E. Froidmont, H. Soyeurt, C. Martin, N. Gengler, A. Vanlierde, and P. Dardenne. 2012. Potential use of milk mid-infrared spectra to predict individual methane emission of dairy cows. *Animal* 6(10):1694-1701.
- Derno, M., H. G. Elsner, E. A. Paetow, H. Scholze, and M. Schweigel. 2009. Technical note: A new facility for continuous respiration measurements in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 92(6):2804-2808.
- Dewhurst, R. 2013. Milk production from silage: comparison of grass, legume and maize silages and their mixtures. *Agr. Food Sci.* 22(1):57-69.
- Dijkstra, J., S. van Gastelen, E. C. Antunes-Fernandes, D. Warner, B. Hatew, G. Klop, S. C. Podesta, H. J. van Lingen, K. A. Hetinga, and A. Bannink. 2016. Relationships between milk fatty acid profiles and enteric methane production in dairy cattle fed grass- or grass silage-based diets. *Anim. Prod. Sci.* 56(2-3):541-548.
- Dijkstra, J., S. M. van Zijderveld, J. A. Apajalahti, A. Bannink, W. J. J. Gerrits, J. R. Newbold, H. B. Perdok, and H. Berends. 2011. Relationships between methane production and milk fatty acid profiles in dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:590-595.
- Doreau, M. and A. Ferlay. 2015. Linseed: A valuable feedstuff for ruminants. *OCL* 22(6):D611.
- Doreau, M., S. Laverroux, J. Normand, G. Chesneau, and F. Glasser. 2009. Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. *Lipids* 44(1):53-62.
- Eckard, R. J., C. Grainger, and C. A. M. de Klein. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livest. Sci.* 130(1-3):47-56.
- Ellis, J. L., J. Dijkstra, E. Kebreab, A. Bannink, N. E. Odongo, B. W. McBride, and J. France. 2008. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *J. Agric. Sci.* 146:213-233.
- Engelke, S. W., G. Daş, M. Derno, A. Tuchscherer, W. Berg, B. Kuhla, and C. C. Metges. 2018. Milk fatty acids estimated by mid-infrared spectroscopy and milk yield can predict methane emissions in dairy cows. *Agron. Sustain. Dev.* 38(3):27.
- Engelke, S. W., G. Das, M. Derno, A. Tuchscherer, K. Wimmers, M. Rychlik, H. Kienberger, W. Berg, B. Kuhla, and C. C. Metges. 2019. Methane prediction based on individual or groups of milk fatty acids for dairy cows fed rations with or without linseed. *J. Dairy Sci.* 102(2):1788-1802.
- Enjalbert, F., S. Combes, A. Zened, and A. Meynadier. 2017. Rumen microbiota and dietary fat: A mutual shaping. *J. Appl. Microbiol.* 123(4):782-797.

- Eshel, G., A. Shepon, T. Makov, and R. Milo. 2014. Land, irrigation water, greenhouse gas, and reactive nitrogen burdens of meat, eggs, and dairy production in the United States. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111(33):11996-12001.
- Eskildsen, C. E., M. A. Rasmussen, S. B. Engelsen, L. B. Larsen, N. A. Poulsen, and T. Skov. 2014. Quantification of individual fatty acids in bovine milk by infrared spectroscopy and chemometrics: Understanding predictions of highly collinear reference variables. *J. Dairy Sci.* 97(12):7940-7951.
- Eugène, M., D. Massé, J. Chiquette, and C. Benchaar. 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 88(2):331-337.
- Ferlay, A., M. Doreau, C. Martin, and Y. Chilliard. 2013. Effects of incremental amounts of extruded linseed on the milk fatty acid composition of dairy cows receiving hay or corn silage. *J. Dairy Sci.* 96(10):6577-6595.
- Ferrand, M., B. Huquet, S. Barbey, F. Barillet, F. Faucon, H. Larroque, O. Leray, J. M. Trommenschlager, and M. Brochard. 2011. Determination of fatty acid profile in cow's milk using mid-infrared spectrometry: Interest of applying a variable selection by genetic algorithms before a PLS regression. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 106(2):183-189.
- Fievez, V., E. Colman, J. M. Castro-Montoya, I. Stefanov, and B. Vlaeminck. 2012. Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function-An update. *Anim. Feed Sci. Technol.* 172(1-2):51-65.
- Firl, N., H. Kienberger, and M. Rychlik. 2014. Validation of the sensitive and accurate quantitation of the fatty acid distribution in bovine milk. *Int. Dairy J.* 35(2):139-144.
- Fischer, E. M. and R. Knutti. 2015. Anthropogenic contribution to global occurrence of heavy-precipitation and high-temperature extremes. *Nat. Clim. Chang.* 5(6):560-564.
- French, E. A., S. J. Bertics, and L. E. Armentano. 2012. Rumen and milk odd- and branched-chain fatty acid proportions are minimally influenced by ruminal volatile fatty acid infusions. *J. Dairy Sci.* 95(4):2015-2026.
- Futtermittelverordnung. 1981. Futtermittelverordnung (FmVO) in der Fassung der Bekanntmachung vom/ Feed regulation in the version of 29 August 2016, Germany
- Gengler, N., H. Soyeurt, F. Dehareng, C. Bastin, F. Colinet, H. Hammami, M. L. Vanrobays, A. Laine, S. Vanderick, C. Grelet, A. Vanlierde, E. Froidmont, and P. Dardenne. 2016. Capitalizing on fine milk composition for breeding and management of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99(5):4071-4079.
- Gerber, P. J., B. Henderson, and H. P. S. Makkar. 2013. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production: A review of technical options for non-CO<sub>2</sub> emissions. in *FAO Animal Production and Health Paper*. FAO, Rome, Italy.
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. 2001. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchtrinder (Recommended energy and nutrient supply for dairy cows and growing cattle). German Society of Nutrition

- Physiology/ Ausschuss für Bedarfsnormen, No. 8 ed. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, Germany.
- Gierus, M., I. Alter, and F. Taube. 2009. Auswirkungen des Fettsäuremusters von Futterpflanzen auf die Fettqualität von Milch und Fleisch (Impacts of fatty acids profile of plants on milk and meat fat quality) *Berichte über Landwirtschaft. BLE, Hg. 87(2):214-233.*
- Glasser, F., A. Ferlay, and Y. Chilliard. 2008a. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: A meta-analysis. *J. Dairy Sci. 91(12):4687-4703.*
- Glasser, F., A. Ferlay, M. Doreau, P. Schmidely, D. Sauvant, and Y. Chilliard. 2008b. Long-chain fatty acid metabolism in dairy cows: A meta-analysis of milk fatty acid yield in relation to duodenal flows and de novo synthesis. *J. Dairy Sci. 91(7):2771-2785.*
- Gomez, L. M., S. L. Posada, and M. Olivera. 2016. Starch in ruminant diets: A review. *Rev. Colomb Cienc. Pecu. 29(2):77-90.*
- Gonthier, C., A. F. Mustafa, D. R. Ouellet, P. Y. Chouinard, R. Berthiaume, and H. V. Petit. 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: Effects on blood parameters and milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci. 88(2):748-756.*
- Goopy, J. P., A. Donaldson, R. Hegarty, P. E. Vercoe, F. Haynes, M. Barnett, and V. H. Oddy. 2014. Low-methane yield sheep have smaller rumens and shorter rumen retention time. *Br. J. Nutr. 111(4):578-585.*
- Grainger, C. and K. A. Beauchemin. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Anim. Feed Sci. Technol. 166-67:308-320.*
- Grainger, C., T. Clarke, S. M. McGinn, M. J. Auldist, K. A. Beauchemin, M. C. Hannah, G. C. Waghorn, H. Clark, and R. J. Eckard. 2007. Methane emissions from dairy cows measured using the sulfur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer and chamber techniques. *J. Dairy Sci. 90(6):2755-2766.*
- Grelet, C., J. A. Fernández Pierna, P. Dardenne, V. Baeten, and F. Dehareng. 2015. Standardization of milk mid-infrared spectra from a European dairy network. *J. Dairy Sci. 98(4):2150-2160.*
- Grelet, C., J. A. F. Pierna, P. Dardenne, H. Soyeurt, A. Vanlierde, F. Colinet, C. Bastin, N. Gengler, V. Baeten, and F. Dehareng. 2017. Standardization of milk mid-infrared spectrometers for the transfer and use of multiple models. *J. Dairy Sci. 100(10):7910-7921.*
- Guyader, J., M. Eugene, B. Meunier, M. Doreau, D. P. Morgavi, M. Silberberg, Y. Rochette, C. Gerard, C. Loncke, and C. Martin. 2015. Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. *J. Anim. Sci. 93(7):3564-3577.*
- Guyader, J., M. Eugene, P. Noziere, D. P. Morgavi, M. Doreau, and C. Martin. 2014. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: A meta-analysis approach. *Animal 8(11):1816-1825.*

- Hammond, K., L. A. Crompton, A. Bannink, J. Dijkstra, D. R. Yanez-Ruiz, P. O'Kiely, E. Kebreab, M. A. Eugene, Z. Yu, K. J. Shingfield, A. Schwarm, A. N. Hristov, and C. K. Reynolds. 2016a. Review of current *in vivo* measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 219:13-30.
- Hammond, K. J., A. K. Jones, D. J. Humphries, L. A. Crompton, and C. K. Reynolds. 2016b. Effects of diet forage source and neutral detergent fiber content on milk production of dairy cattle and methane emissions determined using GreenFeed and respiration chamber techniques. *J. Dairy Sci.* 99(10):7904-7917.
- Hammond, K. J., G. C. Waghorn, and R. S. Hegarty. 2016c. The GreenFeed system for measurement of enteric methane emission from cattle. *Anim. Prod. Sci.* 56(2-3):181-189.
- Hart, K. J., J. A. Huntington, R. G. Wilkinson, C. G. Bartram, and L. A. Sinclair. 2015. The influence of grass silage-to-maize silage ratio and concentrate composition on methane emissions, performance and milk composition of dairy cows. *Animal* 9(6):983-991.
- Harvatine, K. J., Y. R. Boisclair, and D. E. Bauman. 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal* 3(1):40-54.
- Hassanat, F., R. Gervais, C. Julien, D. I. Masse, A. Lettat, P. Y. Chouinard, H. V. Petit, and C. Benchaar. 2013. Replacing alfalfa silage with corn silage in dairy cow diets: Effects on enteric methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. *J. Dairy Sci.* 96(7):4553-4567.
- Hatew, B., S. C. Podesta, H. Van Laar, W. F. Pellikaan, J. L. Ellis, J. Dijkstra, and A. Bannink. 2015. Effects of dietary starch content and rate of fermentation on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98(1):486-499.
- Henderson, G., F. Cox, S. Ganesh, A. Jonker, W. Young, P. H. Janssen, and C. Global Rumen Census. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* 5:e14567.
- Hill, J., C. McSweeney, A.-D. G. Wright, G. Bishop-Hurley, and K. Kalantar-zadeh. 2016. Measuring methane production from ruminants. *Trends Biotechnol.* 34(1):26-35.
- Hook, S. E., M. A. Steele, K. S. Northwood, A. D. G. Wright, and B. W. McBride. 2011. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. *Microb. Ecol.* 62(1):94-105.
- Hook, S. E., A. D. G. Wright, and B. W. McBride. 2010. Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*:11 pages.
- Hristov, A. N., J. Oh, J. L. Firkins, J. Dijkstra, E. Kebreab, G. Waghorn, H. P. S. Makkar, A. T. Adesogan, W. Yang, C. Lee, P. J. Gerber, B. Henderson, and J. M. Tricarico. 2013a. Special topics-Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J. Anim. Sci.* 91(11):5045-5069.
- Hristov, A. N., J. Oh, C. Lee, R. Meinen, F. Montes, T. Ott, J. Firkins, A. Rotz, C. Dell, A. Adesogan, W. Yang, J. Tricarico, E. Kebreab, G. Waghorn, J. Dijkstra, and S. Oosting. 2013b. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production: A review of



- technical options for non-CO<sub>2</sub> emissions. P. J. Gerber, B. Henderson, and H. P. S. Makkar, ed. FAO, Rome, Italy.
- Huhtanen, P., E. H. Cabezas-Garcia, S. Utsumi, and S. Zimmerman. 2015. Comparison of methods to determine methane emissions from dairy cows in farm conditions. *J. Dairy Sci.* 98(5):3394-3409.
- Ingvarstsen, K. L. and K. Moyes. 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal* 7:112-122.
- IPCC. 2006. 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme. Eggleston H.S., Buendia L., Miwa K., Ngara T., Tanabe K., ed. IPCC, IGES, Japan.
- IPCC. 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change T. F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, and P. M. Midgley, ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, USA.
- IPCC. 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. R. K. Pachauri and L. A. Meyer, ed. IPCC, Geneva, Switzerland.
- Ivan, M., H. V. Petit, J. Chiquette, and A. D. G. Wright. 2013. Rumen fermentation and microbial population in lactating dairy cows receiving diets containing oilseeds rich in C-18 fatty acids. *Br. J. Nutr.* 109(7):1211-1218.
- Jacobs, A. A. A., J. van Baal, M. A. Smits, H. Z. H. Taweel, W. H. Hendriks, A. M. van Vuuren, and J. Dijkstra. 2011. Effects of feeding rapeseed oil, soybean oil, or linseed oil on stearoyl-CoA desaturase expression in the mammary gland of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(2):874-887.
- Jahani-Moghadam, M., E. Mahjoubi, and E. Dirandeh. 2015. Effect of linseed feeding on blood metabolites, incidence of cystic follicles, and productive and reproductive performance in fresh Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98(3):1828-1835.
- Jaurena, G., J. M. Cantet, J. I. Arroquy, R. A. Palladino, M. Wawrzkiwicz, and D. Colombatto. 2015. Prediction of the Ym factor for livestock from on-farm accessible data. *Livest. Sci.* 177:52-62.
- Jayasundara, S., J. Appuhamy, E. Kebreab, and C. Wagner-Riddle. 2016. Methane and nitrous oxide emissions from Canadian dairy farms and mitigation options: An updated review. *Can. J. Anim. Sci.* 96(3):306-331.
- Jenkins, T. C. and K. J. Harvatine. 2014. Lipid feeding and milk fat depression. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 30(3):623-642.
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to december 2000. *J. Dairy Sci.* 85(2):295-350.

- Jiao, H. P., A. J. Dale, A. F. Carson, S. Murray, A. W. Gordon, and C. P. Ferris. 2014. Effect of concentrate feed level on methane emissions from grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97(11):7043-7053.
- Johnson, K. A. and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73(8):2483-2492.
- Journal of Dairy Science®. 2016. Instructions to Authors: Style and Form. [http://www.journalofdairyscience.org/pb/assets/raw/Health%20Advance/journals/jods/2016\\_SF.pdf](http://www.journalofdairyscience.org/pb/assets/raw/Health%20Advance/journals/jods/2016_SF.pdf). [zuletzt abgerufen/last downloaded February 9, 2019]
- Kamphues, J. 2014. *Supplemente zur Tierernährung: Für Studium und Praxis (Supplements for animal nutrition: For study and practice)*. Schaper, Hannover, Germany.
- Kaps, M. and W. Lamberson. 2004. *Biostatistics for animal science*. CABI Publishing, United Kingdom.
- Kirchgeßner, M. 2011. *Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis (Animal nutrition: Guidelines for study, advice and practice)*. DLG Verlag, Frankfurt am Main, Germany.
- Kliem, K. E., D. J. Humphries, C. K. Reynolds, R. Morgan, and D. I. Givens. 2017. Effect of oilseed type on milk fatty acid composition of individual cows, and also bulk tank milk fatty acid composition from commercial farms. *Animal* 11(2):354-364.
- Kliem, K. E., R. Morgan, D. J. Humphries, K. J. Shingfield, and D. I. Givens. 2008. Effect of replacing grass silage with maize silage in the diet on bovine milk fatty acid composition. *Animal* 2(12):1850-1858.
- Kliem, K. E. and K. J. Shingfield. 2016. Manipulation of milk fatty acid composition in lactating cows: Opportunities and challenges. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118(11):1661-1683.
- Knapp, J. R., G. L. Laur, P. A. Vadas, W. P. Weiss, and J. M. Tricarico. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J. Dairy Sci.* 97(6):3231-3261.
- Kumar, S., P. K. Choudhury, M. D. Carro, G. W. Griffith, S. S. Dagar, M. Puniya, S. Calabro, S. R. Ravella, T. Dhewa, R. C. Upadhyay, S. K. Sirohi, S. S. Kundu, M. Wanapat, and A. K. Puniya. 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(1):31-44.
- Lanier, J. S. and B. A. Corl. 2015. Challenges in enriching milk fat with polyunsaturated fatty acids. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:26-35.
- Larios, A. D., S. K. Brar, A. A. Ramirez, S. Godbout, F. Sandoval-Salas, and J. H. Palacios. 2016. Challenges in the measurement of emissions of nitrous oxide and methane from livestock sector. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 15(2):285-297.
- Lascano, G. J., M. Alende, L. E. Koch, and T. C. Jenkins. 2016. Changes in fermentation and biohydrogenation intermediates in continuous cultures fed low and high levels of fat with increasing rates of starch degradability. *J. Dairy Sci.* 99(8):6334-6341.

- Leahy, S. C., W. J. Kelly, R. S. Ronimus, N. Wedlock, E. Altermann, and G. T. Attwood. 2013. Genome sequencing of rumen bacteria and archaea and its application to methane mitigation strategies. *Animal* 7:235-243.
- Leroy, J., R. G. Sturmey, V. Van Hoeck, J. De Bie, P. J. McKeegan, and P. E. J. Bols. 2014. Dietary fat supplementation and the consequences for oocyte and embryo quality: hype or significant benefit for dairy cow reproduction? *Reprod. Domest. Anim.* 49(3):353-361.
- Livingstone, K. M., D. J. Humphries, P. Kirton, K. E. Kliem, D. I. Givens, and C. K. Reynolds. 2015. Effects of forage type and extruded linseed supplementation on methane production and milk fatty acid composition of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98(6):4000-4011.
- Lourenco, M., E. Ramos-Morales, and R. J. Wallace. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4(7):1008-1023.
- Lourenco, M., G. Van Ranst, B. Vlaeminck, S. De Smet, and V. Fievez. 2008. Influence of different dietary forages on the fatty acid composition of rumen digesta as well as ruminant meat and milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145(1-4):418-437.
- Madsen, J., B. S. Bjerg, T. Hvelplund, M. R. Weisbjerg, and P. Lund. 2010. Methane and carbon dioxide ratio in excreted air for quantification of the methane production from ruminants. *Livest. Sci.* 129(1-3):223-227.
- Maia, M. R. G., L. C. Chaudhary, L. Figueres, and R. J. Wallace. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91(4):303-314.
- Martin, C., A. Ferlay, P. Mosoni, Y. Rochette, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2016. Increasing linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: Effect on enteric methane emission, rumen microbial fermentation, and digestion. *J. Dairy Sci.* 99(5):3445-3456.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal* 4(3):351-365.
- McAllister, T. A. and C. J. Newbold. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aust. J. Exp. Agric.* 48(1-2):7-13.
- McGinn, S. M., K. A. Beauchemin, A. D. Iwaasa, and T. A. McAllister. 2006. Assessment of the sulfur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer technique for measuring enteric methane emissions from cattle. *J. Environ. Qual.* 35(5):1686-1691.
- McParland, S., G. Banos, B. McCarthy, E. Lewis, M. P. Coffey, B. O'Neill, M. O'Donovan, E. Wall, and D. P. Berry. 2012. Validation of mid-infrared spectrometry in milk for predicting body energy status in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 95(12):7225-7235.
- McParland, S., E. Lewis, E. Kennedy, S. G. Moore, B. McCarthy, M. O'Donovan, S. T. Butler, J. E. Pryce, and D. P. Berry. 2014. Mid-infrared spectrometry of milk as a predictor of energy intake and efficiency in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97(9):5863-5871.
- Meignan, T., C. Lechartier, G. Chesneau, and N. Bareille. 2017. Effects of feeding extruded linseed on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 100(6):4394-4408.

- Moate, P. J., S. R. O. Williams, M. H. Deighton, M. C. Hannah, J. L. Jacobs, and W. J. Wales. 2017. Can concentrations of trans octadecenoic acids in milk fat be used to predict methane yields of dairy cows? *Anim. Prod. Sci.* 57(7):1465-1470.
- Mohammed, R., S. M. McGinn, and K. A. Beauchemin. 2011. Prediction of enteric methane output from milk fatty acid concentrations and rumen fermentation parameters in dairy cows fed sunflower, flax, or canola seeds. *J. Dairy Sci.* 94(12):6057-6068.
- Moraes, L. E., A. B. Strathe, J. G. Fadel, D. P. Casper, and E. Kebreab. 2014. Prediction of enteric methane emissions from cattle. *Glob. Chang. Biol.* 20(7):2140-2148.
- Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin, and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4(7):1024-1036.
- Morgavi, D. P., W. J. Kelly, P. H. Janssen, and G. T. Attwood. 2013. Rumen microbial (meta) genomics and its application to ruminant production. *Animal* 7:184-201.
- Naumann, C., R. Bassler, R. Seibold, and C. Barth. 1976. *Methodenbuch III: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln/ Method book III: Chemical analysis of feedstuffs.* VDLUFA - Verlag, Darmstadt, Germany.
- Negussie, E., Y. de Haas, F. Dehareng, R. J. Dewhurst, J. Dijkstra, N. Gengler, D. P. Morgavi, H. Soyeurt, S. van Gastelen, T. Yan, and F. Biscarini. 2017. Invited review: Large-scale indirect measurements for enteric methane emissions in dairy cattle: A review of proxies and their potential for use in management and breeding decisions. *J. Dairy Sci.* 100(4):2433-2453.
- Neveu, C., B. Baurhoo, and A. Mustafa. 2014. Effect of feeding extruded flaxseed with different grains on the performance of dairy cows and milk fatty acid profile. *J. Dairy Sci.* 97(3):1543-1551.
- O'Brien, D., J. L. Capper, P. C. Garnsworthy, C. Grainger, and L. Shalloo. 2014. A case study of the carbon footprint of milk from high-performing confinement and grass-based dairy farms. *J. Dairy Sci.* 97(3):1835-1851.
- Opio, C., P. Gerber, A. Mottet, A. Falcucci, G. Tempio, M. MacLeod, T. Vellinga, B. Henderson, and H. Steinfeld. 2013. *Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains - A global life cycle assessment.* FAO, Rome, Italy.
- Palmquist, D. L. 2006. Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. Pages 43-92 in *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids.* P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, ed. Springer US, Boston, MA.
- Palmquist, D. L., A. D. Beaulieu, and D. M. Barbano. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76(6):1753-1771.
- Patra, A. K. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livest. Sci.* 155(2-3):244-254.
- Patra, A. K. 2016. Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants. *Front. Vet. Sci.* 3(May):39.

- Pickering, N. K., V. H. Oddy, J. Basarab, K. Cammack, B. Hayes, R. S. Hegarty, J. Lassen, J. C. McEwan, S. Miller, C. S. Pinares-Patino, and Y. de Haas. 2015. Animal board invited review: Genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *Animal* 9(9):1431-1440.
- Pinares-Patino, C. S., S. M. Hickey, E. A. Young, K. G. Dodds, S. MacLean, G. Molano, E. Sandoval, H. Kjestrup, R. Harland, C. Hunt, N. K. Pickering, and J. C. McEwan. 2013. Heritability estimates of methane emissions from sheep. *Animal* 7:316-321.
- Plaizier, J. C., D. O. Krause, G. N. Gozho, and B. W. McBride. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176(1):21-31.
- Rabiee, A. R., K. Breinhild, W. Scott, H. M. Golder, E. Block, and I. J. Lean. 2012. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 95(6):3225-3247.
- Ramin, M. and P. Huhtanen. 2013. Development of equations for predicting methane emissions from ruminants. *J. Dairy Sci.* 96(4):2476-2493.
- Rasch, D., G. Herrendörfer, J. Bock, N. Victor, and V. Guiard. 1998. *Verfahrensbibliothek: Versuchsplanung und -auswertung - Band III (Process library: designing experimental methods and evaluating the results - Volume III)*. Oldenbourg Verlag, München, Wien.
- Reynolds, C. K. 2006. Production and metabolic effects of site of starch digestion in dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 130(1-2):78-94.
- Rico, D. E., P. Y. Chouinard, F. Hassanat, C. Benchaar, and R. Gervais. 2016. Prediction of enteric methane emissions from Holstein dairy cows fed various forage sources. *Animal* 10(2):203-211.
- Roche, J. R., N. C. Friggens, J. K. Kay, M. W. Fisher, K. J. Stafford, and D. P. Berry. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J. Dairy Sci.* 92(12):5769-5801.
- Roehe, R., R. J. Dewhurst, C. A. Duthie, J. A. Rooke, N. McKain, D. W. Ross, J. J. Hyslop, A. Waterhouse, T. C. Freeman, M. Watson, and R. J. Wallace. 2016. Bovine host genetic variation influences rumen microbial methane production with best selection criterion for low methane emitting and efficiently feed converting hosts based on metagenomic gene abundance. *PLoS Genet.* 12(2):e1005846.
- Saliba, L., R. Gervais, Y. Lebeuf, and P. Y. Chouinard. 2014. Effect of feeding linseed oil in diets differing in forage to concentrate ratio: 1. Production performance and milk fat content of biohydrogenation intermediates of  $\alpha$ -linolenic acid. *J. Dairy Res.* 81(1):82-90.
- SAS Institute Inc. 2017. SAS OnlineDoc® Version 9.4. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Shetty, N., G. Difford, J. Lassen, P. Lovendahl, and A. J. Buitenhuis. 2017. Predicting methane emissions of lactating Danish holstein cows using fourier transform mid-infrared spectroscopy of milk. *J. Dairy Sci.* 100(11):9052-9060.

- Shingfield, K. J., L. Bernard, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2010. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4(7):1140-1166.
- Shingfield, K. J., M. Bonnet, and N. D. Scollan. 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* 7:132-162.
- Soyeurt, H., P. Dardenne, F. Dehareng, G. Lognay, D. Veselko, M. Marlier, C. Bertozzi, P. Mayeres, and N. Gengler. 2006. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *J. Dairy Sci.* 89(9):3690-3695.
- Soyeurt, H., F. Dehareng, N. Gengler, S. McParland, E. Wall, D. P. Berry, M. Coffey, and P. Dardenne. 2011. Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems, and countries. *J. Dairy Sci.* 94(4):1657-1667.
- Spiekers, H., H. Nußbaum, and V. Potthast. 2009. Erfolgreiche Milchviehfütterung/ Successful feeding of dairy cattle. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, Germany.
- Sterk, A., B. E. O. Johansson, H. Z. H. Taweel, M. Murphy, A. M. van Vuuren, W. H. Hendriks, and J. Dijkstra. 2011. Effects of forage type, forage to concentrate ratio, and crushed linseed supplementation on milk fatty acid profile in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(12):6078-6091.
- Suksombat, W., L. P. Thanh, C. Meeprom, and R. Mirattanaphrai. 2016. Effect of linseed oil supplementation on performance and milk fatty acid composition in dairy cows. *Anim. Sci. J.* 87(12):1545-1553.
- van Engelen, S., H. Bovenhuis, J. Dijkstra, J. A. M. van Arendonk, and M. Visker. 2015. Short communication: Genetic study of methane production predicted from milk fat composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98(11):8223-8226.
- van Gastelen, S., E. C. Antunes-Fernandes, K. A. Hettinga, and J. Dijkstra. 2017. Relationships between methane emission of Holstein Friesian dairy cows and fatty acids, volatile metabolites and non-volatile metabolites in milk. *Animal* 11(9):1539-1548.
- van Gastelen, S., E. C. Antunes-Fernandes, K. A. Hettinga, G. Klop, S. J. J. Alferink, W. H. Hendriks, and J. Dijkstra. 2015. Enteric methane production, rumen volatile fatty acid concentrations, and milk fatty acid composition in lactating Holstein-Friesian cows fed grass silage- or corn silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 98(3):1915-1927.
- van Gastelen, S. and J. Dijkstra. 2016. Prediction of methane emission from lactating dairy cows using milk fatty acids and mid-infrared spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.* 96(12):3963-3968.
- van Gastelen, S., H. Mollenhorst, E. C. Antunes-Fernandes, K. A. Hettinga, G. G. van Burgsteden, J. Dijkstra, and J. L. W. Rademaker. 2018. Predicting enteric methane emission of dairy cows with milk Fourier-transform infrared spectra and gas chromatography-based milk fatty acid profiles. *J. Dairy Sci.* 101(6):5582-5598.
- van Lingen, H. J., L. A. Crompton, W. H. Hendriks, C. K. Reynolds, and J. Dijkstra. 2014. Meta-analysis of relationships between enteric methane yield and milk fatty acid profile in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97(11):7115-7132.

- van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74(10):3583-3597.
- Vanlierde, A., H. Soyeurt, N. Gengler, F. G. Colinet, E. Froidmont, M. Kreuzer, F. Grandl, M. Bell, P. Lund, D. W. Olijhoek, M. Eugène, C. Martin, B. Kuhla, and F. Dehareng. 2018. *Short communication*: Development of an equation for estimating methane emissions of dairy cows from milk Fourier transform mid-infrared spectra by using reference data obtained exclusively from respiration chambers. *J. Dairy Sci.* 101(8):7618-7624.
- Vanlierde, A., M. L. Vanrobays, F. Dehareng, E. Froidmont, H. Soyeurt, S. McParland, E. Lewis, M. H. Deighton, F. Grandl, M. Kreuzer, B. Gredler, P. Dardenne, and N. Gengler. 2015. Hot topic: Innovative lactation-stage-dependent prediction of methane emissions from milk mid-infrared spectra. *J. Dairy Sci.* 98(8):5740-5747.
- Vanlierde, A., M. L. Vanrobays, N. Gengler, P. Dardenne, E. Froidmont, H. Soyeurt, S. McParland, E. Lewis, M. H. Deighton, M. Mathot, and F. Dehareng. 2016. Milk mid-infrared spectra enable prediction of lactation-stage-dependent methane emissions of dairy cattle within routine population-scale milk recording schemes. *Anim. Prod. Sci.* 56(2-3):258-264.
- Vanrobays, M. L., C. Bastin, J. Vandenplas, H. Hammami, H. Soyeurt, A. Vanlierde, F. Dehareng, E. Froidmont, and N. Gengler. 2016. Changes throughout lactation in phenotypic and genetic correlations between methane emissions and milk fatty acid contents predicted from milk mid-infrared spectra. *J. Dairy Sci.* 99(9):7247-7260.
- Veneman, J. B., S. Muetzel, K. J. Hart, C. L. Faulkner, J. M. Moorby, H. B. Perdok, and C. J. Newbold. 2015. Does dietary mitigation of enteric methane production affect rumen function and animal productivity in dairy cows? *PLoS One* 10(10):e0140282.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca, and R. J. Dewhurst. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131(3-4):389-417.
- Vlaeminck, B., R. Gervais, M. M. Rahman, F. Gadeyne, M. Gorniak, M. Doreau, and V. Fievez. 2015. Postruminal synthesis modifies the odd- and branched-chain fatty acid profile from the duodenum to milk. *J. Dairy Sci.* 98(7):4829-4840.
- von Engelhardt, W. and G. Breves. 2005. *Physiologie der Haustiere (Physiology of domestic animals)*. Enke, Stuttgart.
- Warner, D., A. Bannink, B. Hatew, H. van Laar, and J. Dijkstra. 2017. Effects of grass silage quality and level of feed intake on enteric methane production in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 95(8):3687-3699.
- Wathes, D. C., Z. Cheng, N. Bourne, V. J. Taylor, M. P. Coffey, and S. Brotherstone. 2007. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33(2):203-225.

- Weill, P., G. Chesneau, Y. Chilliard, M. Doreau, and C. Martin, inventors. 2009. Method for evaluating the amount of methane produced by a dairy ruminant and method for decreasing and controlling this amount. WO 2009/156453 A1.
- Weld, K. A. and L. E. Armentano. 2017. The effects of adding fat to diets of lactating dairy cows on total-tract neutral detergent fiber digestibility: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 100(3):1766-1779.
- Werteker, M., S. Huber, S. Kuchling, B. Rossmann, and M. Schreiner. 2017. Differentiation of milk by fatty acid spectra and principal component analysis. *Measurement* 98:311-320.
- Williams, S. R. O., P. J. Moate, M. H. Deighton, M. C. Hannah, and W. J. Wales. 2014. Methane emissions of dairy cows cannot be predicted by the concentrations of C8:0 and total C18 fatty acids in milk. *Anim. Prod. Sci.* 54(10):1757-1761.
- Yan, T., C. S. Mayne, F. G. Gordon, M. G. Porter, R. E. Agnew, D. C. Patterson, C. P. Ferris, and D. J. Kilpatrick. 2010. Mitigation of enteric methane emissions through improving efficiency of energy utilization and productivity in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(6):2630-2638.
- Zebeli, Q., J. R. Aschenbach, M. Tafaj, J. Boguhn, B. N. Ametaj, and W. Drochner. 2012. Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 95(3):1041-1056.
- Zehetmeier, M., J. Baudracco, H. Hoffmann, and A. Heissenhuber. 2012. Does increasing milk yield per cow reduce greenhouse gas emissions? A system approach. *Animal* 6(1):154-166.



## **Publikationsverzeichnis**

### **Begutachtete Publikationen (*peer reviewed publications*)**

Engelke, S.W., G. Das, M. Derno, A. Tuchscherer, K. Wimmers, M. Rychlik, H. Kienberger, W. Berg, B. Kuhla, C.C. Metges, 2019. Methane prediction based on individual or groups of milk fatty acids for dairy cows fed rations with or without linseed. *J. Dairy Sci.* 102(2):1788-1802.

Engelke, S.W., G. Daş, M. Derno, A. Tuchscherer, W. Berg, B. Kuhla, and C.C. Metges. 2018. Milk fatty acids estimated by mid-infrared spectroscopy and milk yield can predict methane emissions in dairy cows. *Agron. Sustain. Dev.* 38(3):27.

### **Patent**

Metges, C.C., S.W. Engelke, G. Das, B. Kuhla, Prediction method for methane (CH<sub>4</sub>) emission of a dairy cow. WO/2019/043091. International Application number: PCT/EP2018/073327.

### **Begutachtete Kurzfassungen (*peer reviewed abstracts*)**

Engelke, S.W., G. Daş, M. Derno, A. Tuchscherer, W. Berg, B. Kuhla, and C.C. Metges. 2018. Comparison of the quality of methane prediction equations containing a different selection and number of individual or groups of milk fatty acids as explanatory variables. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 27:70.

Engelke, S.W., G. Daş, M. Derno, A. Tuchscherer, B. Kuhla, and C.C. Metges. 2017. Effects of four different diets on the relationship between methane emission and milk fatty acids profile in dairy cows: Deduction of a methane indicator. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 26:43.

Engelke, S.W., G. Daş, M. Derno, B. Kuhla, and C.C. Metges. 2016. Delineation of relationships between feed composition, methane emission and milk fatty acids in cows-prerequisite for the development of an indirect methane indicator. *EAAP Energy and Protein Metabolism and Nutrition* 137:259-260.

Engelke, W., G. Daş, M. Derno, B. Kuhla, and C.C. Metges. 2016. Effects of feeding diets differing in starch and fibre content with or without linseed supplementation on methane emission and milk fatty acids in dairy cows - first results. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 25:150.

Engelke, S.W., G. Daş, M. Derno, B. Kuhla, and C.C. Metges. 2016. Impact of four different diets on methane output and milk fatty acid profile in dairy cows. 9. Doktorandensymposium und DRS Präsentationsseminar "Biomedical Science":21.

Engelke, S.W., G. Daş, M. Derno, A. Tuchscherer, B. Kuhla, and C.C. Metges. 2016. Effects of diets based on grass or corn silage with and without linseed supplementation on milk fatty acid profile and their relationship with methane emission in dairy cows. *Schriftenreihe des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie* 17:25.

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt **Frau Professor Dr. Cornelia C. Metges**, die mir die Bearbeitung dieser Thematik vertrauensvoll überlassen hat. Sie hat mir viel Freiraum in der Durchführung des Projektes gelassen und hatte dabei für jedes Problem ein offenes Ohr. Sie hat mir immer mit konstruktiven Beiträgen zur Seite gestanden und die Möglichkeit gegeben, mich stetig weiter zu entwickeln. Dank ihrer Unterstützung und der finanziellen Hilfe der >>COST organisation<< konnte ich während eines Kurzstipendiums an der INRA in Theix (Herbivore Research Unit; Leiter Dr. Diego Morgavi) über den Tellerrand schauen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei **Herrn Dr. Gürbüz Daş** bedanken, bei dem ich so viel über Statistik gelernt habe! Er hat sich ausgiebig für all meine Fragen rund um Projektarbeiten, Anfertigen wissenschaftlicher Arbeiten, die täglichen Herausforderungen im Berufsalltag und vieles mehr Zeit genommen. Auf Konferenzen und bei Präsentationen war er mein Ruhepol und es hat zusammen viel Spaß gemacht. Vielen lieben Dank dafür!

**Herrn Prof. Dr. Jürgen Zentek** danke ich für die universitäre Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation, die er bereitwillig übernommen hat und bei allen Fragen beratend zur Seite stand. Vielen Dank auch für die spannenden Diskussionen auf dem EAAP-Symposium in Krakau!

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts der Tierernährungsphysiologie „Oskar Kellner“ am Leibniz Institut für Nutztierbiologie. Alle namentlich zu nennen würde den Rahmen sprengen, doch haben alle einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke **Dirk Oswald** und **Tanja Lenke** für all eure Unterstützungen bei den Arbeiten am Tier und dem täglichen Rausstellen von Butterblume, Jaqueline, Dory, Naomi, Avocado und die anderen Mädels. Danke auch an den Herdenmanager der „Tierexperimentellen Anlage Rind“ **Klaus-Dieter Witt**, der die vier Rationen gerechnet, gemischt und überhaupt konstant im Griff hatte, und vieles mit den Tieren möglich gemacht hat.

Mein größter Dank gilt aber **meiner Familie und meinen Lieben**. Ihr habt immer an mich geglaubt, mich jederzeit unterstützt und mir die Basis und den Rückhalt gegeben, damit ich diese Arbeit schaffen kann. Ein Gelingen ohne Euch wäre undenkbar gewesen! Vor allem **Mathias Rauschenberger** hat mir gerade zum Ende hin jede Unterstützung gegeben. Und ohne die Anmerkungen von meiner Mama, **Christina Engelke**, wäre diese Arbeit bestimmt auch nicht so flüssig zu lesen!

### **Selbständigkeitserklärung**

med. vet. Stefanie Wanda Engelke

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*Entwicklung eines praxistauglichen, indirekten Markers für die Methanemission von Milchkühen anhand des Fettsäuremusters in der Milch*“ selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Bern, den 21.10.2019

Stefanie W. Engelke







