

# Omsetjing av planteøstrogen hos mjølkeku - effekt av botanisk samansetjing av surfôret

HÅVARD STEINSHAMN<sup>1</sup>, STEFFEN ADLER<sup>1,2</sup>, KARI MARIE NJÅSTAD<sup>2</sup>, ERLING THUEN<sup>2</sup> OG JENS HANSEN-MØLLER<sup>3</sup>

Bioforsk Økologisk<sup>1</sup>, Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap, Universitetet for miljø- og biovitenskap<sup>2</sup>, Institut for husdyrbiologi og sundhed, Aarhus universitet<sup>3</sup>

## Innleiing

Historisk har interessa for planteøstrogen vore knytt til fertilitetsproblem hos husdyr, men det er lite som tyder på at det er et problem hos storfe. I seinare tid har interessa for planteøstrogen vore retta mot innhald i matvarer og moglege helseeffektar. I mjølk frå kyr som har ete raudkløver, finn ein mye meir planteøstrogen enn i mjølk produsert på andre grovfôrslag (Steinshamn *et al.* 2008; Andersen *et al.* 2009; Mustonen *et al.* 2009). Raudkløver inneheld mye formononetin og biochanin A, som hører til planteøstrogengruppa isoflavon, samanlikna med andre grovfôrartar brukt som fôr til mjølkekyr. Formononetin blir omdanna av bakteriar til daidzein, som også finns i raudkløver, og vidare til equol under fordøyinga av fôret. I og med at equol blir danna i dyret blir det kalt mammalsk østrogen, og det er rekna for å vere meir biologisk verksamt enn stoffa det blir danna av. Svært lite av både formononetin og equol blir funne att i mjølk, og dess høgare opptaket av formononetin og daidzein er dess mindre del blir overført (Steinshamn *et al.* 2008). Det må bety at formononetin, daidzein og equol blir skild ut andre vegar eller at det blir brote ned til andre sambindingar. Laboratorieforsøk (*in vitro*) har synt at formononetin raskt blir omsatt av mikroorganismar i frå vomma (Nilsson *et al.* 1967). Vi kjenner ikkje til om omsetjinga av planteøstrogen er undersøkt og kvantifisert i dyret (*in vivo*). Så formålet med dette arbeidet var å undersøkje omsetjinga av planteøstrogen i vom og utskiljing til mjølk, gjødsel og urin hos lakterande mjølkekyr gitt surfôr med ulik botanisk samansetjing.

## Materiale og metode

Surfôr laga av avlinga i frå 1. og 3. slått av kortvarig gras-raudkløvereng (KORT, ca 36 % raudkløver i avlinga), langvarig artsrik eng (LANG), rein raigraseng (RAI), og rein timoteieng (TIM) blei gitt til 4 mjølkekyr med vomfistel i 4 periodar kvar på 21 dagar. Forsøket var utforma som eit 4×4 latinsk kvadrat. Kyrne hadde fri tilgang på surfôret, men i den siste veka i kvar periode fikk dei 90% av det daglege opptaket målt i dei to føregåande vekene. Fôropptak,

mjølkeproduksjon og mengd utskild gjødsel og urin blei målt siste veka i kvar periode. Samstundes blei det teke prøver av fôr, mjølk, gjødsel, urin og bladmage. Passasje av fôr til tarm blei estimert ved å tilsette markørar og ved å ta prøver av ulike fasar i frå bladmagen. Detaljar om forsøksopplegget er å finne hos Adler *et al.* (2011) i dette fortrykket. Innhaldet av ulike planteøstrogen blei analysert ved Institut for husdyrbiologi og sundhed, Aarhus universitet etter prosedyrar skildra hos (Steinshamm *et al.* 2008). Data vart analysert statistisk med surfôrtype og periode som faste effektar og ku som tilfeldig effekt.

## Resultat og diskusjon

Innhaldet av formononetin og daidzein var som venta høgast i KORTt med raudkløver (tabell 1). Kvitkløver inneheld også litt formononetin (Andersen *et al.* 2009). Det er nok årsaka til at LANG og RAI inneheld litt formononetin sidan det var høvesvis 9 og 6 % kvitkløver i avlinga frå dei to engtypane, samt at LANG også hadde litt raudkløver (Adler *et al.* 2011). Konsentrasjonen av formononetin i både bladmage, gjødsel og mjølk var også høgast hos kyr som fikk LANG, men forskjellane mellom fôrassjonane tek til å bli viska ut og at formononetin og daidzein har blitt omdanna til equol.

Tabell 1. Innhald av formononetin, daidzein og equol i fôr, bladmage, gjødsel, urin og mjølk i frå kyr gitt ulike surfôrassjonar

Surfôrtype <sup>1</sup>	KORT	LANG	RAI	TIM	SE	P-verdi
<i>Fôr, mg/kg TS</i>						
Formononetin	3014 <sup>a</sup>	210,7 <sup>b</sup>	40,4 <sup>c</sup>	7,8 <sup>c</sup>	24,3	<0,001
Daidzein	62,6 <sup>a</sup>	2,4 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	0,2 <sup>b</sup>	1,93	<0,001
<i>Bladmage, mg/kg TS</i>						
Formononetin	64,3 <sup>a</sup>	3,3 <sup>b</sup>	1,5 <sup>c</sup>	1,0 <sup>c</sup>	7,40	<0,001
Daidzein	8,5 <sup>a</sup>	1,4 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	1,2 <sup>b</sup>	1,12	<0,001
Equol	494,4 <sup>a</sup>	17,3 <sup>b</sup>	4,1 <sup>b</sup>	1,4 <sup>b</sup>	16,48	<0,001
<i>Gjødsel, mg/kg TS</i>						
Formononetin	20,8 <sup>a</sup>	0,8 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1,91	<0,001
Daidzein	4,2 <sup>a</sup>	0,5 <sup>b</sup>	0,4 <sup>b</sup>	0,3 <sup>b</sup>	0,6	0,011
Equol	349,5 <sup>a</sup>	11,9 <sup>b</sup>	4,2 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	27,6	<0,001
<i>Urin, µg/L</i>						
Formononetin	55,6 <sup>b</sup>	40,0 <sup>b</sup>	11,2 <sup>b</sup>	806,1 <sup>a</sup>	157,4	0,016
Daidzein	135,5	77,0	25,8	147,7	29,3	0,056
Equol	27276 <sup>a</sup>	5217 <sup>b</sup>	212 <sup>b</sup>	52,0 <sup>b</sup>	2838	<0,001
<i>Mjølk, µg/L</i>						
Formononetin	8,2 <sup>a</sup>	2,8 <sup>b</sup>	2,3 <sup>b</sup>	1,6 <sup>b</sup>	0,55	<0,001
Daidzein	5,5 <sup>a</sup>	2,0 <sup>ab</sup>	1,5 <sup>b</sup>	1,1 <sup>b</sup>	0,29	<0,001
Equol	442,5 <sup>a</sup>	50,1 <sup>b</sup>	12,8 <sup>b</sup>	3,9 <sup>b</sup>	28,3	<0,001

<sup>1</sup> KORT = raudkløver/graseng, LANG = langvarig eng, RAI = raigraseng, TIM = timoteieng  
SE = standardfeilen

<sup>a,b,c</sup> Tal med ulik bokstav innan rad er statistisk ulike

Konsentrasjonen av formononetin, daidzein og equol i mjølk på KORT samsvarar godt med det andre har funne i mjølk med fôrrasjonar med raudkløver (Steinshamn *et al.* 2008). Årsaka til at innhaldet av formononetin i urin frå TIM er høgare enn på dei andre rasjonane kan vi ikkje forklare.

Fôropptaket var likt for dei ulike rasjonane (tabell 2), så inntaket av formononetin og daidzein (tabell 2) var direkte relatert til konsentrasjonen i fôret (tabell 1). Det var ei sterk omsetjing i vomma. Berre 7-15 % av inntaket av formononetein og daidzein blei funne att i bladmagen som summen av formononetin, daidzein og equol (FDE, tabell 2). Det betyr at formononetin og daidzein ikkje berre blir omdanna til equol men at også formononetin, daidzein og equol i veldig sterk grad blir brote ned til andre sambindingar i vomma. Nedbrytinga var sterkare på LS og RS (om lag 8% attfinning) enn på KORT og TIM (om lag 15% attfinning). Mesteparten av FDE vart skild ut i gjødsel (5 - 1196 mg/d) og veldig lite i mjølk (0,10 - 7,85 mg/d), og mengd utskild var størst der inntaket av NDE var høgst, altså på KS. Analysane av konsentrasjonen av planteøstrogena i urin var veldig usikre. Men med det atterhaldet, så tilsvarte utskiljinga mellom 5 og 461 mg/d, altså ein god del meir enn i mjølk men litt mindre enn i gjødsel.

Tabell 2. Dagleg fôropptak, mjølkeproduksjon og opptak, utskiljing og omsetjing av formononetin og daidzein (FDE = formononetin + daidzein + equol i mg/d) hos mjølkeku gitt ulike surfôrrasjonar

Surfôrtype <sup>1</sup>	KORT	LANG	RAI	TIM	SE	P-verdi
Fôropptak totalt, kg TS/d	17,9	17,9	17,4	16,7	1,13	0,295
Mjølk, kg/d	18,1 <sup>a</sup>	18,1 <sup>a</sup>	17,9 <sup>a</sup>	16,3 <sup>b</sup>	0,34	0,007
<i>FDE</i>						
Opptak (FDEo), mg/d	38282 <sup>a</sup>	2708 <sup>b</sup>	533 <sup>b</sup>	120 <sup>b</sup>	1299	<0,001
Til bladmage (FDEb), mg/d	5710 <sup>a</sup>	194 <sup>b</sup>	45 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	206	<0,001
FDEb/FDEo, mg/mg	0,149 <sup>a</sup>	0,072 <sup>b</sup>	0,089 <sup>b</sup>	0,150 <sup>a</sup>	0,013	0,006
Mjølk (FDEm), mg/d	7,85 <sup>a</sup>	0,97 <sup>b</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,52	<0,001
FDEm/FDEo, mg/g	0,20 <sup>b</sup>	0,35 <sup>ab</sup>	0,52 <sup>ab</sup>	0,70 <sup>a</sup>	0,17	0,021
FDEm/FDEb, mg/g	1,4	5,0	6,2	6,4	1,44	0,098
Gjødsel (FDEg), mg/d	1196 <sup>a</sup>	44 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	0,075	<0,001
FDEg/FDEo, mg/mg	0,032	0,016	0,028	0,042	0,001	0,235
FDEg/FDEb, mg/mg	0,21	0,23	0,31	0,26	0,048	0,491

<sup>1</sup> KORT = raudkløver/graseng, LANG = langvarig eng, RAI = raigraseng, TIM = timoteieng  
SE = standardfeilen

<sup>a,b,c</sup> Tal med ulik bokstav innan rad er statistisk ulike

Overføringsgraden av FDE i frå fôr til mjølk (FDEm/FDEo) var minst for KORT (0,20 mg/g) og høgst der inntaket av FDE var minst på TIM (0,70 mg/g) (tabell 2). Nivået samsvarar godt med tidligare granskingar og med at dess høgare inntaket av

formononetin og daidzein er dess lågare er overføringsgraden (Steinshamn *et al.* 2008). Overføringsgraden av FDE i frå bladmage til mjølk (FDEm/FDEb) følgde det same mønsteret som frå fôr til mjølk, sjølv om det statistisk sett berre var ein tendens. Derimot så var overføringsgraden i frå fôr til gjødsel og frå bladmage til gjødsel uavhengig av surførslag og inntak av FDE (tabell 2, FDEg/FDEo og FDEg/FDEb). Det betyr at omsetjinga av FDE i kroppen (intermediær omsetjing) utanom vom og tarm var avgrensa av farten og av ikkje tilgangen på substrat, sannsynlegvis enzymatisk i levra. Derimot var omsetjinga i meltingsskanalen (vom og tarm) sannsynlegvis ikkje avgrensa enzymatisk eller på annan måte.

## Konklusjon

Planteøstrogena formononetin og daidzein blir i stor grad omsatt til equol og vidare til ukjende sambindingar i vomma. Nedbrytinga av planteøstrogena i vom var sterkare i surfôr laga på raigras og langvarig artsrik eng enn i surfôr laga av timoteieng eller kortvarig eng med raudkløver. Attfinninga av planteøstrogena var størst i gjødsel og minst i mjølk. Omsetjinga av equol i kroppen (intermediær) var avgrensa av fart (rate limiting) medan dette synest ikkje å vere tilfelle i vom og tarm.

Arbeidet er ein del av prosjektet PhytoMilk finansiert gjennom den transnasjonale ordninga "CORE ORGANIC Funding Body Network" (NFR 184680/I10).

## Referansar

Adler, S., Steinshamn, H., Thuen, E., Krogh Jensen, S & Hansen-Møller, J. 2011.

*Hydrogenering av fettsyrer i vomma - effekt av botanisk sammensetning av surføret.*

*Husdyrforsøksmøtet 2011. I dette fortrykket*

Andersen, C., Nielsen, T.S., Purup, S., Kristensen, T., Eriksen, J., Soegaard, K., Sorensen, J. &

Frette, X.C. 2009. *Phyto-oestrogens in herbage and milk from cows grazing white clover, red clover, lucerne or chicory-rich pastures. Animal, 3, 1189-1195.*

Mustonen, E.A., Tuori, M., Saastamoinen, I., Taponen, J., Wähälä, K., Saloniemi, H. &

Vanhatalo, A. 2009. *Equol in milk of dairy cows is derived from forage legumes such as red clover. British Journal of Nutrition, 102, 1552-1556.*

Nilsson, A., Hill, J.L. & Lloyd Davies, H. 1967. *An in vitro study of formononetin and*

*biochanin A metabolism in rumen fluid from sheep. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 148, 92-98.*

Steinshamn, H., Purup, S., Thuen, E. & Hansen-Møller, J. 2008. *Effects of clover-grass*

*silages and concentrate supplementation on the content of phytoestrogens in dairy cow milk. Journal of Dairy Science, 91, 2715-2725.*