



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104244730 B

(45)授权公告日 2017.09.26

(21)申请号 201380020455.3

(22)申请日 2013.04.18

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104244730 A

(43)申请公布日 2014.12.24

(30)优先权数据
12164765.5 2012.04.19 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.10.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/058113 2013.04.18

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/156574 EN 2013.10.24

(73)专利权人 因特奎姆私人控股公司
地址 西班牙巴塞罗那

(72)发明人 J·巴尔塞爾斯特雷斯
F·J·克雷斯波蒙特罗

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 王贵杰

(51)Int.Cl.
A23K 20/00(2016.01)
A23K 50/10(2016.01)

(56)对比文件
CN 101909616 A,2010.12.08,
CN 101601440 A,2009.12.16,
CN 101005848 A,2007.07.25,
US 2011212217 A1,2011.09.01,
WO 2011153299 A2,2011.12.08,

审查员 邹妍

权利要求书1页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

用于减少反刍动物甲烷生成的饲料组合物

(57)摘要

本发明涉及用于减少反刍动物中甲烷产生的方法,所述方法包括对所述反刍动物施用包含黄烷酮糖苷的饲料组合物。

1. 用于减少反刍动物中甲烷产生的方法,包括通过口服给所述反刍动物施用包含黄烷酮糖苷的饲料组合物,所述黄烷酮糖苷选自新橙皮苷、异柚皮苷、枸橼苷、橙皮苷和其混合物。

2. 权利要求1的方法,其中所述饲料组合物是包含新橙皮苷和枸橼苷的混合物。

3. 权利要求2的方法,其中所述混合物还包含柚皮苷。

4. 权利要求1的方法,其中所述混合物是天然植物提取物。

5. 权利要求4的方法,其中所述植物提取物是柑橘属植物提取物。

6. 权利要求1-5任一项的方法,其中所述组合物还包含载体。

7. 权利要求6的方法,其中所述组合物是混合物,其包含25-55%wt.的柚皮苷、10%-20%wt.的新橙皮苷、1%-5%wt.的枸橼苷和足量至100%wt.的载体。

8. 权利要求7的方法,其中所述组合物包含40-50%wt.的柚皮苷、11-15%wt.的新橙皮苷、3-5%wt.的枸橼苷和足量至100%wt.的载体。

9. 权利要求6的方法,其中所述载体是海泡石。

10. 权利要求1的方法,其中所述反刍动物是小牛、母牛、水牛、绵羊、鹿、骆驼或山羊。

11. 权利要求10的方法,其中所述反刍动物是小牛。

12. 权利要求1的方法,其中将所述组合物以固体形式加入到饲料中,其浓度为50-1000mg/Kg干物质。

13. 权利要求12的方法,其中将所述组合物以固体形式加入到饲料中,其浓度为200-500mg/Kg干物质。

用于减少反刍动物甲烷生成的饲料组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及用于减少反刍动物甲烷生成的新组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 甲烷、二氧化碳和氧化亚氮是具有温室效应的主要气体。

[0004] 甲烷(CH₄)是温室气体,其大气浓度在最近的世纪内显著地增加,并且是二氧化碳之后地球变暖的最大潜在贡献者。对流层效应甲烷水平的增加与人口的全球扩张紧密相关。因此,认为约70%的甲烷发出与人类活动相关。废物的陆地填充和农业实践生成甲烷并且将其释放在大气中,其量因世界人口数量的增长而增加。

[0005] 反刍动物(包括牛(cattle)、水牛(buffalo)、绵羊和山羊)具有大前胃,其中发生产生甲烷的发酵。瘤胃消化道由4个胃的隔室构成:瘤胃、网胃、皱胃和重瓣胃。它们中最大且最重要的是瘤胃。瘤胃作为发酵隔室起作用。它包含庞大的微生物群体,包括产生甲烷的古细菌,它们分解植物材料。所述微生物通常称作产甲烷菌。古细菌群体利用氢和二氧化碳,即厌氧微生物发酵产物,生成用于生长的能量,从而产生作为终产物的甲烷。最终,甲烷通过打嗝从瘤胃中放出。

[0006] 牛和绵羊产生甲烷代表了降低生产力的碳损耗途径。如果通过甲烷合成损耗的能量可以通过其它生化途径被改道而通常至丙酸合成,则瘤胃发酵可以变得更为有效且可以在动物体重增长或产奶改善方面反映出来。它对生产者而言是成本有效的且提供减少甲烷放出至大气中的有效工具。实际上,因为甲烷在大气中的寿命是12年(而二氧化碳和氧化亚氮的寿命分别是100年和120年),所以减少甲烷放出可以对环境具有越来越快速的影响。

[0007] 过去使用反刍动物的研究已经证实甲烷产生受膳食影响。通过增加结构/非结构(纤维质/淀粉)性碳水化合物之比,甲烷放出增加。此外,将脂质源添加到膳食中减少了肠甲烷放出。尽管与甲烷减少平行,但是高脂肪补充比例减少了瘤胃微生物发酵、饲料摄入和纤维可消化性。大量化学饲料添加剂例如抗生素(即离子载体)或杀虫剂被导入反刍动物营养物以促进生长,改善饲料利用率和减少甲烷产生。然而,对于动物产品中存在化学残留物和细菌对抗生素的耐药性的发生的担忧已经刺激了寻找更为安全的天然替代品,它们可以用于有机的畜牧场。

[0008] 已经证实包含精油、单宁类、皂苷类、类黄酮和许多其它植物次级代谢产物的植物或植物提取物改善瘤胃代谢靶向特异性类型的瘤胃微生物群体。Patraa A.K.和Saxena J (2010)、Phytochemistry, 71 (11-12):1198-222描述了植物次级代谢产物在抑制瘤胃中甲烷生成中的应用。对比文件W02005000035涉及增强瘤胃发酵、特别是减少甲烷生成的方法,由施用从新鲜紫花苜蓿中得到的可溶性紫花苜蓿提取物组成。

[0009] 因此,对于包含天然来源的化合物且有效地减少甲烷产生和安全地用于畜牧场的可替代反刍动物饲料组合物存在需求。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明的作者目前已经发现,通过给反刍动物施用包含天然化合物的饲料组合物,显著地减少了甲烷放出。

[0012] 因此,在一个方面中,本发明涉及减少反刍动物中甲烷产生的方法,所述方法包括通过口服给所述反刍动物施用包含黄烷酮糖苷的饲料组合物,所述黄烷酮糖苷选自新橙皮苷、异柚皮苷、枸橼苷和橙皮苷或其混合物。

[0013] 在本发明的一个具体的实施方案中,所述组合物是包含新橙皮苷和枸橼苷的混合物。在一个更具体的实施方案中,所述混合物还包含柚皮苷。在一个优选的实施方案中,所述混合物是天然植物提取物。在一个更优选的实施方案中,所述植物是柑橘属植物提取物。

[0014] 在本发明的一个具体的实施方案中,所述组合物还包含载体。在一个优选的实施方案中,所述载体是海泡石。

[0015] 在一个具体的实施方案中,所述组合物是混合物,其包含25—55%wt.的柚皮苷、10%—20%wt.的新橙皮苷、1%—5%wt.的枸橼苷和足量至100%wt.的载体。在一个优选的实施方案中,所述组合物包含40—50%wt.的柚皮苷、11—15%wt.的新橙皮苷、3—5%的枸橼苷和足量至100%wt.的载体。

[0016] 在本发明的一个具体的实施方案中,所述反刍动物是小牛(calf)、母牛(cow)、水牛、绵羊、鹿或山羊。在一个优选的实施方案中,所述反刍动物是小牛。

[0017] 在一个具体的实施方案中,将本发明的组合物以50—1000mg/Kg DM浓度的固体形式加入到饲料中。在一个优选的实施方案中,以200—500mg/Kg DM的浓度加入所述组合物。

[0018] 附图简述

[0019] 图1表示生物气和甲烷产生的分布图。平均值使用应用未补充定量(对照品)或补充不同类型的类黄酮得到的“体外”模拟系统中的剂量。

[0020] 发明详述

[0021] 如上所述,本发明的作者已经发现,通过给反刍动物施用包含类黄酮、特别是黄烷酮糖苷类的饲料组合物,显著地减少了甲烷放出。

[0022] 因此,在一个方面中,本发明涉及用于减少反刍动物中甲烷产生的方法,所述方法包括通过口服给所述反刍动物施用包含黄烷酮糖苷的饲料组合物,所述黄烷酮糖苷选自新橙皮苷、异柚皮苷、枸橼苷和橙皮苷或其混合物。

[0023] 本文所用的术语“反刍动物”是指任意反刍亚目(Ruminantia)的偶蹄哺乳动物。所述哺乳动物咀嚼反刍食物并且具有4个隔室的胃,其中之一是瘤胃。该类型包括鹿、羚羊、水牛、牛、绵羊、骆驼和山羊。

[0024] 本文所用的术语“类黄酮”是指一类在花瓣上产生黄色或红色/蓝色色素沉着的水溶性植物色素。术语“黄烷酮类”是指一种类型的类黄酮。黄烷酮类一般地被7位上的二糖糖基化,得到“黄烷酮糖苷类”。

[0025] 正如下列实施例中所示,发明人已经令人意外地发现,通过给反刍动物施用本发明的饲料组合物显著地减少了甲烷放出。

[0026] 可以使用本领域众所周知的方法测定反刍动物的甲烷产量。例如,六氟化硫(SF₆)示踪法是一种技术,其能够使用围绕在母牛颈部的连续对呼气采样的抽成真空的金属气体采样罐测定来自母牛个体的甲烷。其它方法包括开路呼吸室,它们是密封的,和气候控制室,其中居留单个母牛,从而允许分析该动物产生的所有气体。

[0027] 还可以通过红外光谱法、气相色谱法、质谱法和可调谐的激光二极管技术、基于饲料特征的发酵平衡的附件技术(例如呼吸测热法)预测方程、同位素示踪物技术等测定放出

的甲烷。

[0028] 此外,可以在“体外”测定甲烷产量。在这种情况下,从动物中采集瘤胃流体并且在厌氧条件下使用温育培养基温育。

[0029] 在本发明的一个具体的实施方案中,所述组合物是包含新橙皮苷和枸橼苷的混合物。在一个更具体的实施方案中,所述混合物包含新橙皮苷、枸橼苷和柚皮苷。在本发明另一个具体的实施方案中,所述混合物是天然植物提取物的形式。在一个优选的实施方案中,所述植物提取物是柑橘属植物提取物且更优选苦橙 (bitter orange) 植物提取物,所述提取物包含不同的类黄酮,特别是黄烷酮类糖苷类。在一个优选的实施方案中,所述植物提取物包含新橙皮苷、枸橼苷和柚皮苷的混合物。正如下列实施例中所示,所述植物提取物是天然植物提取物,其包含约20%wt.的柚皮苷和40%wt.的苦橙提取物 (25—27%柚皮苷;11—13%新橙皮苷和3—5%枸橼苷)。在具体情况中,所述天然植物提取物是商购的 (**Bioflavex®**)。

[0030] 因此,根据本发明,本发明组合物的黄烷酮类可以得自植物,更具体地,得自柑橘属植物。

[0031] 本发明组合物中的所有成分是天然来源的且易于得到的产物。此外,如果该组合物是混合物形式,所述混合物易于操作且可以根据本领域专业人员公知的工业化配制方法制备。

[0032] 本文所用的术语“柑橘 (citrus)”是指柑橘属植物。所述柑橘属植物的实例包括文旦 (*Citrus maxima*) (柚)、枸橼 (*Citrus medica*) (枸橼)、桔 (*Citrus reticulate*) (橘子)、酸橙 (*Citrus aurantium*) (苦橙)、波斯青柠 (*Citrus latifolia*) (波斯青柠)、柠檬 (*Citrus limon*) (柠檬)、葡萄柚 (*Citrus paradisi*) (葡萄柚)、甜橙 (*Citrus sinensis*) (甜橙)、枳 (*Citrus trifoliata*) (枳) 等。

[0033] 用于从植物中分离类黄酮的方法是本领域众所周知的。在具体的情况中,可以由本领域技术人员通过提取、过滤、浓缩、沉淀、净化和最终干燥这样的常规方法从磨碎的柑橘类果实 (尤其是酸橙) 中得到苦橙提取物。提取过程可以在二元醇/水系统中进行,其中所述醇选自甲醇、乙醇、丙醇等。优选使用甲醇。作为可替代的非限制性实例,用300ml甲醇提取50g干燥的苦橙。离心该混悬液以分离残余物,并且真空浓缩母液至最终体积为50ml。在5天过程中在室温下静置得到的液体,过滤以分离不溶物,再次通过硅藻土床过滤,并且喷雾干燥。

[0034] 在一个具体的实施方案中,所述黄烷酮可以得自柑橘类植物的果实。例如,柚皮苷是得自一些柠檬的果实例如葡萄柚和苦橙 (酸橙) 果皮的糖基化的黄烷酮。它还在果实的果肉和植物的叶、花和种子中被发现。本发明用于分离类黄酮的示例性、非限制性方法是,例如描述在对比文件US2421063A和US2421062A中的那些方法,其中描述了从植物材料中回收柚皮苷的方法,此外,可以根据对比文件US2442110A、US2348215A和US2400693A中所述的方法得到橙皮苷。同样,可以柑橘对比文件US3375242A中所述的方法得到新橙皮苷。US3375242A描述了用于生产新橙皮苷的方法,其中使柚皮苷与异香草醛反应,产生新橙皮苷查耳酮。然后使该查耳酮环化,得到新橙皮苷。

[0035] 另外,易于得到本发明组合物的黄烷酮类,因为它们是商购的。例如,正如本发明附带的实施例中所示,异柚皮苷、neohesperidin和枸橼苷购自INDOFINE Chemical Company, Inc (USA)。此外,如上所述,本发明所述的天然植物提取物是商购的 (

Bioflavex®)。

[0036] 在本发明的一个具体的实施方案中,所述组合物是混合物,其包含25—55%wt.的柚皮苷、10%—20%wt.的新橙皮苷、1%—5%wt.的枸橼苷和足量至100%wt.的载体。在一个更具体的实施方案中,所述组合物包含40—50%wt.的柚皮苷、11—15%wt.的新橙皮苷、3—5%的枸橼苷和足量至100%wt.的载体。

[0037] 根据本发明的另一个优选的实施方案,所述组合物包含载体。在一个具体的实施方案中,所述载体是海泡石。海泡石是沉淀来源的天然存在的粘土矿物。它是不可溶胀的、轻质的、多孔性的粘土,其具有大的比表面积。在化学上,海泡石是含水硅酸镁,其颗粒各自具有针状形态。这种粘土的高表面积和多孔性说明了它对于液体的显著的吸收力。这些特性使得它成为广泛应用的有价值的材料,例如宠物垃圾、动物饲料添加剂、载体、吸收剂、助悬和触变添加剂和增稠剂。

[0038] 根据本发明的方法,当给动物饲喂本发明包含天然来源的类黄酮的组合物时,减少了反刍动物中的甲烷放出/产生。饲喂效率在饲养业中具有经济关联。已知抑制反刍动物中甲烷生成的化合物导致瘤胃发酵转移至产生更期望的脂肪酸分布,从而增加丙酸而不是乙酸的比例,由此瘤胃富有活力的发酵变得更有效(参见美国专利号US3,745,221;US3,615,649;和US3,862,333)。因此,本发明的另一个目的在于提供用于抑制反刍动物中甲烷生成的方法,其对增加饲料利用效率的瘤胃微生物发酵产生有益效果。正如下列实施例中所示,本发明的组合物降低了产生的甲烷水平并且转变成有利于丙酸的挥发性脂肪酸产生。

[0039] 用于测定挥发性脂肪酸的方法是本领域众所周知的。典型地,使用色谱方法,例如HPLC或带有火焰离子化检测的气相色谱法。

[0040] 饲喂方式不限于任意具体的方式且可以在化合物饲料上添加顶肥得到本发明的饲料组合物,或在将本发明的饲料组合物与化合物饲料混合后饲喂。此外,对于饲喂的量没有限制,只要有效地减少甲烷生成,同时营养平衡不受不良影响。

[0041] 因此,在本发明的一个优选的实施方案中,将所述组合物以固体形式添加到饲料中。在一个具体的实施方案中,以50—1000mg/Kg DM(干物质)的浓度添加所述组合物。在一个更具体的实施方案中,以200—500mg/Kg DM浓度的固体形式添加所述组合物。

[0042] 本发明的组合物可以包含其它饲料成分,例如维生素、酶、无机盐、谷物粉、包含蛋白质的成分、包含碳水化合物的成分、小麦粗粉和/或麦麸。

[0043] 本发明的饲料组合物的形状不限于任意具体形式且可以是任意常规的饲料组合物形式,例如粉末和颗粒。此外,可以根据用于生产化合物饲料和饲料补充剂的一般使用的方法生产所述饲料组合物。

[0044] 在本发明的一个具体的实施方案中,所述反刍动物是小牛、母牛、水牛、绵羊、鹿、骆驼或山羊。在一个优选的实施方案中,所述反刍动物是小牛。

[0045] 现在参照下列实施例更详细地描述本发明,这些实施例决不以预以限定本发明的范围。

实施例

[0046] 材料和方法

[0047] 使用基于Theodorou M K等人(1994)Animal Feed Science and Technology,48

(3), p.185-197; Mauricio, R.M. 等人 (1999) Animal Feed Science and Technology 79, 321-330所述的实验方案, 设计按照相同实验方案的两种试验以研究不同的纯类黄酮对瘤胃的影响。

[0048] 由半自动压力计测定气体产量, 预先计算压力水平与产生的气体体积之间的相关性。

[0049] 将接受主要由浓缩物组成 (90:10) 的混合定量的瘤胃插套管的小牛用作瘤胃的流体供体; 饲料组成如表1中所示。采集接种物并且通过双层外科手术用纱布过滤, 且保存在恒温罐中。一式三份用预加热的瓶 (39℃) 施用类黄酮 (表2) +600mg浓缩物 (表1) 和作为底物的60mg大麦麦秆并且维持在厌氧条件下。类黄酮异柚皮苷、neoeeritrocin、枸橼苷购自 INDOFINE Chemical Company, Inc (USA)。将10ml瘤胃流体和40ml温育培养基加入到瓶中 (McDougall, EI (1948) Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem J. 43 (1) 99-109)。一旦瓶充满且施加厌氧条件, 则密封瓶并且在热水浴中启动温育过程。在2、4、6、8、12、24、36和48小时进行压力读取。一式三份, 分两组或两批温育每种样品。

[0050] 表1. 浓缩物的化学组成 (%)

成分 (%):	对照品
谷物	35
大麦	25
大豆粉 (44%)	10
向日葵粉 (30%)	3.5
麦麸	6
谷蛋白饲料 (20%)	8
甜菜渣	7
棕榈油	2.5
矿物钙	1.3
磷酸二钙	0.8
盐	0.3
Vit/Min 补充剂	0.4
海泡石	0.2
Bioflavex® (*)	0
化学组成	
粗蛋白	16
CP (可降解)	11
NDF	22.4
淀粉	41
灰分	5.8
ME, (Mcal/kg DM)	2.9

[0052] CP:粗蛋白;NDF:中性洗涤剂纤维;DM:干物质,ME:可代谢的能量

[0053] (*) 20%wt.柚皮苷;40%wt.苦橙提取物;海泡石至100%wt。

[0054] 表2:用于第一次和第二次实验的类黄酮剂量 (mg/Kg DM)

	类黄酮	剂量 I	剂量 II
	实施例 1		
	柚皮苷	200	500
	新橙皮苷	“	“
	橙皮苷	“	“
	异柚皮苷	“	“
[0055]	新北美圣草苷	“	“
	枸橼苷	“	“
	Bioflavex		
	实施例 2		
	赋形剂(海泡石)	“	“
	CBC(*)	“	“
	新橙皮苷	“	“
	Bioflavex	“	“

[0056] (*) 柑橘类植物生物类黄酮复合物

[0057] 12小时温育后,打开来自每次处理的1个瓶子(重复),读取pH并且对瓶子采样用于挥发性脂肪酸(Jouany,J.P.,1982 Science des Aliments 2,131-144)、乳酸(Taylor,K.A.C.C.,1996.Appl.Biochem.Biotechnol.Enzym.Eng.Biotechnol.56,49-58)和氨(Chaney,A.L.,Marbach,E.P.,1962.Clin.Chem.8,130-132)分析。

[0058] 使用Yu和Morrison(2004)提出的技术提取环境DNA。通过qPCR、使用特异性引物对牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、埃氏巨球形菌(*Megasphaera elsdenii*)和反刍动物月形单胞菌(*Selenomonas ruminantium*))DNA进行定量(Tajima,K.等人2001.Appl.Environ.Microb.67,2766-2774;Ouwerkerk,D.等人2002.J.Appl.Microbiol.92,753-758)。使用SAS统计软件包的PROC MIXED程序(SAS,2000,User's guide:Statistics,第8版inst.,Inc.,Cary,NC)对结果进行统计学分析。最小显著差异用于比较平均值。将其中 $P < 0.05$ 的平均值之间的差异接受为显著性。

[0059] 结果:

[0060] 1. 气体产生:

[0061] 图1显示给“体外”培养物补充了不同类型和剂量的类黄酮的瘤胃流体时气体和甲烷产生的动力学。分布图代表两次剂量的平均值。每次处理的平均值、剂量和采样时间与结果的统计学分析如表3中所示。

[0062] 气体产生水平成指数地随温育时间增加。添加类黄酮显著地改变了生物气产量(P

<0.05), 尽管这种改变在不同的类黄酮物质中并非均匀地发生。新北美圣草苷与对照品相比增加了气体产生水平 (266.7与253.72 $P>0.05$), 柚皮苷没有改变 ($P>0.05$), 而其余的多酚类降低了平均产生水平 ($P<0.05$)。最低值相当于新橙皮苷和**Bioflavex**[®]混合物 (分别为230.7和233.3)。异柚皮苷、枸橼苷和橙皮苷 (分别为236.6、238和239.6) 也减少了气体产生。包含体水平 (200和500mg/kg) 对气体产生具有显著作用 ($P<0.001$), 但这种作用根据类黄酮的类型而不同。使用新橙皮苷得到了更显著的剂量效应。

[0063] 分析类黄酮物质对理论上负责甲烷产生的古细菌 (archaea) 群的一些发酵活动的作用。图1 (b) 显示甲烷产生的进展值且表4提供了平均值和统计学分析。

[0064] 平均甲烷产率低于产生的总生物气。对于对照品, 甲烷产率约为总气体产生的15%。实验处理改变了平均值和蓄积的甲烷产量, 而这些改变在处理中是不同的: 与对照品相比, 新北美圣草苷增加 ($P<0.05$) 甲烷产生水平。通过在培养基中包含橙皮苷或柚皮苷不会改变产甲烷活性 ($P<0.01$)。然而, 新橙皮苷、异柚皮苷、枸橼苷和Bioflavex混合物减少了甲烷产生 ($P<0.05$)。新橙皮苷显示最显著的减少, 这一结果也不同于橙皮苷 ($P<0.05$)。一般而言, 剂量“本身”未显示显著性差异, 除外新橙皮苷的情况, 其中通过增加剂量更减少了甲烷产生。

[0065] 本实验设计允许测定类黄酮对甲烷产生的作用是否来源于微生物活性的一般性减少, 且生物气产生或相反地类黄酮是否对产甲烷 (古细菌) 群产生特别地影响。为了这一目的, 对总气体产生中的甲烷贡献的统计学分析如表5中所示。在培养基中存在类黄酮减少了总生物气产生中的甲烷贡献 ($P<0.05$), 尽管上述举出的影响也不是均匀的。

[0066] 包含新北美圣草苷 (表5) 显著地增加了甲烷比例, 而存在Bioflavex和新橙皮苷显然降低了这一比例 (对于新橙皮苷、Bioflavex和对照品, 分别为13.70与13.66和14.58)。其余的多酚类显著地降低了产甲烷活性, 不过, 报道的差异不具有统计学显著性。新北美圣草苷和Bioflavex混合物的剂量 (500与200mg/kg DM) 倾向于抑制甲烷产生, 但是其余的FL-物质未显示任何作用, 这在剂量 $\times$ FL-物质类型的显著相互作用中反映出来 ($P<0.05$)。

[0067] 在第二种试验中, 测试海泡石 (作为填充剂) 和CBC (柑橘类植物的生物类黄酮复合物) 与阴性 (不含类黄酮, 对照品) 和两种阳性参比物 (含有类黄酮源为新橙皮苷和Bioflavex)。在气体和甲烷产生项目中赋形剂 (海泡石) 的作用为零 (表6和7), 而CBC适度地减少了气体产生, 但对甲烷产生未检测到改变。

[0068] 表3. 补充了不同类型类黄酮的“体外”瘤胃流体培养基中的生物气的蓄积产量 (72h) 和平均值、剂量和温育时间。

[0069]

项目	类黄酮	SEM ¹	温育时间				SEM	剂量 ²		SEM
			12	24	48	72		1	2	
新北美圣草苷	266.78 ^a		211.78	259.11	288.43	307.80		277.08	256.47	
柚皮苷	248.17 ^{bc}		193.90	236.91	270.98	290.91		251.15	245.19	
异柚皮苷	236.62 ^{de}		185.58	223.38	258.85	278.66		235.13	238.1	
枸橼苷	237.95 ^{de}	1.87	180.63	224.90	262.00	284.28	2.61	234.43	241.48	2.65
新橙皮苷	230.71 ^e		175.93	217.84	253.99	275.06		238.13	223.28	
橙皮苷	239.65 ^{cd}		187.19	227.31	261.28	282.84		239.91	239.4	
Bioflavex	233.36 ^{de}		181.44	219.64	255.47	276.89		235.73	231.00	
对照品	253.72 ^b	2.65	198.71	242.07	275.69	298.43	3.69			
显著性										
	类黄酮	小时	剂量	FxD	FxH	FxDxH	DxH			
	***	***	0.0011	***	ns	ns	ns			

[0070] ¹ SEM: 平均值的标准误差[0071] ² 剂量: 0.2g/kg DM y 0.5g/kg DM 底物

[0072] *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 和 ns 无显著性

[0073] 具有不同指数的平均值 (a、b、c、d) 表示这些平均值之间的显著性差异 (P<0.05)。

[0074] 表4. 补充了不同类型类黄酮 (处理) 的“体外”瘤胃流体培养基中的平均和蓄积的甲烷产量 (72小时)、剂量和温育时间。

[0075]

项目	类黄酮	SEM ¹	小时				SEM	剂量 ²		SEM
			12	24	48	72		1	2	
新北美圣草苷	38.40 ^a		29.65	37.03	41.74	45.18		39.51	37.28	
柚皮苷	31.50 ^b		23.38	29.46	34.93	38.24		32.28	30.73	
异柚皮苷	27.42 ^{de}		19.84	24.94	30.81	34.08		27.40	27.43	
枸橼苷	27.04 ^{de}	0.52	19.19	24.43	30.50	34.07	0.66	26.61	27.47	0.74
新橙皮苷	25.54 ^e		18.02	23.15	28.84	32.18		27.63	23.46	
橙皮苷	28.42 ^{cd}		21.08	26.03	31.54	35.04		28.11	28.74	
Bioflavex	27.33 ^{de}		20.17	24.74	30.53	33.89		26.30	28.36	
对照品	30.70 ^{bc}	0.74	23.00	28.17	33.84	37.77	0.94			
显著性										
	类黄酮	小时	剂量	FxD	FxH	FxDxH	DxH			
	***	***	ns	0.001	ns	ns	ns			

[0076] ¹ SEM:平均值的标准误差

[0077] ²剂量:0.2g/kg DM y 0.5g/kg DM底物

[0078] *P<0.05,**P<0.01,***P<0.001和ns无显著性

[0079] 具有不同指数的平均值(a、b、c、d)表示这些平均值之间的显著性差异(P<0.05)。

[0080] 表5.补充了不同类型类黄酮(处理)的“体外”瘤胃流体培养基中产生的生物气中的甲烷比例、剂量和温育时间。

[0081]

项目	类黄酮	SEM ¹	小时				SEM	剂量 ²		SEM
			12	24	48	72		1	2	
新北美圣草苷	16.07 ^a		14.00	15.75	16.33	18.19		15.96	16.17	
柚皮苷	14.86 ^b		12.04	14.28	16.14	16.97		14.87	14.85	
异柚皮苷	14.48 ^{bc}		10.68	13.56	16.79	16.89		14.53	14.43	
枸橼苷	13.86 ^{cd}	0.15	10.62	11.94	16.54	16.34	0.30	13.92	13.80	0.22
新橙皮苷	13.66 ^d		10.21	12.34	15.91	16.20		13.98	13.35	
橙皮苷	14.16 ^{cd}		11.26	12.40	16.43	16.55		14.05	14.27	
Bioflavex	13.70 ^d		11.12	12.13	16.32	16.03		13.27	14.53	
对照品	14.59 ^{bc}	0.22	11.58	12.03	17.11	17.65	0.42			
显著性										
	类黄酮	小时	剂量	FxD	FxH	FxDxH	DxH			
	***	***	0.0385	0.001	***	ns	ns			

[0082] ¹ SEM:平均值的标准误差

[0083] ²剂量:0.2g/kg DM y 0.5g/kg DM底物

[0084] *P<0.05,**P<0.01,***P<0.001和ns无显著性

[0085] 具有不同指数的平均值(a、b、c、d)表示这些平均值之间的显著性差异(P<0.05)。

[0086] 表6.补充了不同类型类黄酮[处理]的“体外”瘤胃流体培养基中的生物气的蓄积产量(72h)和平均值、剂量和温育时间。

[0087]

项目	类黄酮	SEM ¹	小时				SEM	剂量 ²		SEM
			12	24	48	72		1	2	
赋形剂(海泡石)	282.19 ^a		222.40	264.81	306.38	326.17		279.7	276.7	
CBC	278.67 ^b		224.32	267.09	303.25	320.01		276.8	280.5	
新橙皮苷	268.16 ^c	1.41	215.60	256.18	292.28	308.57	1.55	267.1	269.2	2.00
Bioflavex	262.42 ^c		209.55	250.47	286.10	303.55		259.3	265.5	
对照品	285.08 ^a		225.74	272.58	312.61	329.40				
显著性										
	类黄酮	小时	剂量	FxD	FxH	FxDxH	DxH			
	***	***	ns	0.0124	***	ns	ns			

[0088] ¹ SEM:平均值的标准误差

[0089] ²剂量:0.2g/kg DM y 0.5g/kg DM底物

[0090] *P<0.05,**P<0.01,***P<0.001和ns无显著性

[0091] 具有不同指数的平均值(a、b、c、d)表示这些平均值之间的显著性差异(P<0.05)。

[0092] 表7.补充了不同类型类黄酮[处理]的“体外”瘤胃流体培养基中的生物气的蓄积产量(72h)和平均值、剂量和温育时间。

[0093]

项目	类黄酮	SEM ¹	小时				SEM	剂量 ²		SEM
			12	24	48	72		1	2	
赋形剂(海泡石)	34.03 ^a		25.24	31.53	38.37	40.99		34.7	33.4	
CBC	34.40 ^a		26.04	32.13	38.27	41.16		34.6	34.2	
新橙皮苷	30.44 ^b	0.45	22.52	27.98	34.31	36.95	0.47	30.1	30.8	0.64
Bioflavex	30.63 ^b		22.78	28.22	34.30	37.23		29.8	31.4	
对照品	34.54 ^a		25.02	31.99	39.18	41.97				

显著性

类黄酮	小时	剂量	FxD	FxH	FxDxH	DxH
***	***	ns	Ns	***	ns	ns

[0094] ¹ SEM:平均值的标准误差

[0095] ²剂量:0.2g/kg DM y 0.5g/kg DM底物

[0096] *P<0.05,**P<0.01,***P<0.001和ns无显著性

[0097] 具有不同指数的平均值(a、b、c、d)表示这些平均值之间的显著性差异(P<0.05)。

[0098] 2.瘤胃发酵的表征

[0099] 2.1 VFA和氨的浓度

[0100] 含有或不含类黄酮(有关类型和剂量)的‘体外’培养基中挥发性脂肪酸(VFA)和氨(N-NH₃)的平均浓度如表8中所示。(VFA和N-NH₃)的平均(μ)浓度如其在每种类黄酮类型和剂量的温育时间自始至终进展后的第一个相应栏中所示。显然,Bioflavex显示较高的VFA平均值和蓄积浓度;然而,差异未达到统计学显著性(P>0.05)。氨水平超过了阈值水平,以确保适当的微生物发酵(50mg/L)。显然,新北美圣草苷(227.84mg/L)和Bioflavex混合物(209.92mg/L)分别显示最高和最低的平均值。

[0101] 起始VFA浓度[在t=0记录的恒定值]增加。在0—12h之间的增加高于12—72h之间记录的值,这反映出在温育时间过程中逐步的底物发酵[即在第一个期限(0—12小时)内平均VFA浓度(mmol/L)增加为2.1mmol/小时,而在该期限后,这些增加降至平均值为0.2mmol/小时]。根据矿物混合物的缓冲活性,VFA浓度的增加未反映在培养基酸度的增加中。平均pH值在0、12和72小时分别为6.81、6.77±0.0034y 6.73±0.0033。根据严格的平均值的标准误差证实培养基的稳定性。

[0102] 2.2 VFA的摩尔比

[0103] 使用碳水化合物源(主要由淀粉组成;即浓缩物)进行培养基补充导致VFA分布显著改变,这导致丙酸(20.03、28.20和26.45)和丁酸(在0、12和72小时分别为9.07、9.88和10.45)比例增加,而观察到乙酸比例减少(mol/100mol;62.5、55.86和55.86)。然而,增加在不同类黄酮类型中并不是均匀的。培养基中的丙酸比例因柚皮苷、异柚皮苷、枸橼苷、Bioflavex混合物和新橙皮苷而比对照品改善,但是其余的未改变。应注意在新橙皮苷、柚皮苷和Bioflavex中,对温育时间的响应还显著地受剂量调节(D x H:P<0.009)。一般而言,观察到甲烷产生(表5)与丙酸比例(表9)之间的负相关,包含新北美圣草苷增加了甲烷比例,而在新橙皮苷和Bioflavex的情况中相反的结果是确切的,它们显然抑制甲烷放出(对于新橙皮苷、Bioflavex和对照品分别为13.70和13.66与14.58),从而改善了丙酸的比例(对于新橙皮苷、Bioflavex与对照品和neoeritrocin丙酸比例分别为25.7和25.8与24.4(P<0.1和23.7(P<0.05))。

[0104] 表8. 未补充(对照品)或补充不同类型和剂量的类黄酮的“体外”瘤胃流体培养物中挥发性脂肪酸浓度(VFA;mmol/l)和氨(N-NH₃;mg/l)。

[0105]

项目	VFA, mmol/l				N-NH ₃ , mg/l			
	μ	0	12	72	M	0	12	72
新北美圣草苷	35.76	13.78	39.75	53.75	227.84	149.99	186.19	347.34
柚皮苷	33.35	13.78	35.23	51.03	219.57	149.99	172.47	336.25
异柚皮苷	34.18	13.78	36.49	52.26	212.66	149.99	165.46	322.53
枸橼苷	34.21	13.78	36.98	51.87	209.16	149.99	159.33	318.15
新橙皮苷	34.60	13.78	36.97	53.04	219.18	149.99	168.38	339.17
橙皮苷	35.25	13.78	38.25	53.70	220.15	149.99	187.36	323.11
Bioflavex	36.50	13.78	41.31	54.41	209.92	149.99	172.47	319.31
对照品	34.09	13.78	40.19	48.29	208.18	149.99	164.00	310.56
SEM ¹	2.19				1.06			
显著性								
项目	类黄酮	小时	剂量	F x D	F x H		D x H	
总 VFA	ns	***	Ns	ns	Ns		Ns	
N-NH ₃ ,	ns	***	Ns	ns	Ns		Ns	

[0106] ¹ SEM: 平均值的标准误差

[0107] ² 剂量: 0.2g/kg DM 和 0.5g/kg DM 底物

[0108] *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 和 ns 无显著性

[0109] 具有不同指数的平均值(a、b、c、d)表示这些平均值之间的显著性差异(P<0.05)。

[0110]

表 9. 未补充(对照品)或补充不同类型和剂量的类黄酮的“体外”瘤胃流体培养物中在不同温育时间时的乙酸、丙酸和丁酸的摩尔比 (mol/100mol) 和 A/P 之比。

项目	%乙酸				%丙酸				%丁酸				A/P			
	μ	0	12	72	M	0	12	72	μ	0	12	72	0	12	72	72
新北美圣草苷	58.15	62.51	55.73	56.21	23.73 ^a	20.03	26.77	24.39	10.90 ^b	9.07	11.84	11.79	3.12	2.09	2.31	
柚皮苷	57.18	62.51	53.70	55.34	25.59 ^b	20.03	30.00	26.75	9.96 ^{ab}	9.07	10.47	10.33	3.12	1.79	2.07	
异柚皮苷	57.26	62.51	53.94	55.34	25.72 ^a	20.03	30.20	26.94	9.87 ^{ab}	9.07	10.31	10.24	3.12	1.79	2.06	
枸橼苷	57.77	62.51	55.44	55.36	25.57 ^a	20.03	29.52	26.96	9.63 ^a	9.07	9.61	10.20	3.12	1.88	2.05	
新橙皮苷	57.62	62.51	54.68	55.68	25.66 ^b	20.03	30.05	26.91	9.57 ^a	9.07	9.68	9.96	3.12	1.82	2.07	
橙皮苷	58.48	62.51	56.88	56.04	24.35 ^{ab}	20.03	27.22	25.80	10.08 ^{ab}	9.07	10.41	10.78	3.12	2.09	2.17	
Bioflavex	59.12	62.51	58.22	56.64	25.78 ^b	20.03	28.33	26.97	9.21 ^{ab}	9.07	8.47	10.11	3.12	2.06	1.98	
对照品	58.27	62.51	58.35	53.94	24.43 ^{ab}	20.03	28.32	27.93	9.20 ^a	9.07	8.31	10.21	3.12	2.06	2.19	
SEM	0.61	2.19			0.30	0.51			0.21	0.36					0.07	

显著性

项目	类黄酮	小时	剂量	F x D	F x H	D x H
乙酸	ns	***	ns	ns	ns	0.0263
丙酸	**	***	ns	ns		0.0089
丁酸	**	***	ns	ns	*	ns
乙酸/丙酸	*	***	ns	ns	ns	0.017

¹ SEM: 平均值的标准误差

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 和 ns 无显著性

[0111] 2.1. 乳酸浓度和微生物分布。

[0112] 瘤胃内乳酸浓度与酸中毒功能障碍之间的相关性已经通过实验加以证实。得自温育12小时的瓶的乳酸浓度值和产生乳酸(牛链球菌(S.bovis))或消耗(反刍动物月形单胞

菌 (*S.ruminantium*) 和埃氏巨球形菌 (*M.elsdenii*)) 的细菌滴度如表10中所示。

[0113] 使用不同类黄酮对乳酸浓度的作用是适度的且仅存在的新橙皮苷、橙皮苷和 Bioflavex 倾向于缓解温育期限中记录的增加 ($[c]t=0:22.16\text{mg/l}$)。预先描述的发酵条件的变化 (表8和9) 导致微生物DNA浓度增加, 不过, 当对比对照品、新北美圣草苷、枸橼苷和橙皮苷滴度时, 增加仅在新橙皮苷的情况中达到统计学显著性。本实验处理未改变牛链球菌和反刍动物月形单胞菌滴度, 然而, 根据从前述实验中得到的结果, 与记录的对照值相比, 新橙皮苷和 Bioflavex 混合物均改善了记录的埃氏巨球形菌滴度。

[0114] 表10: 通过qPCR测定的类黄酮在乳酸浓度和细菌DNA浓度 (mg/ml) 中的作用和未补充 (对照品) 或补充不同类型和剂量的类黄酮的“体外”瘤胃流体培养物中在12小时温育时的反刍动物月形单胞菌、牛链球菌和埃氏巨球形菌瘤胃群体的相对定量。

[0115]

项目	乳酸 (mg/l)	细菌 DNA ($\mu\text{g/ml}$)	相对定量 $2^{(\Delta \Delta Ct)}$		
			牛链球 菌	反刍动物月形单 胞菌	埃氏巨球 形菌
新北美圣草苷	122.5	13.14 ^a	0.62	0.79	0.76 ^a
柚皮苷	77.8	22.15 ^{ab}	0.48	0.74	1.26 ^c
异柚皮苷	92.4	16.18 ^{ab}	0.46	0.86	1.08 ^{ab}
枸橼苷	87.5	10.12 ^a	0.44	0.68	0.98 ^{ab}
新橙皮苷	45.8	23.93 ^{ab}	0.25	0.53	1.35 ^c
橙皮苷	44.3	9.18 ^a	0.58	0.74	1.18 ^b
Bioflavex	36.6	21.24 ^{ab}	0.32	0.36	1.46 ^c
对照品	71.71	12.28 ^a	0.74	0.51	1.08 ^{ab}
SEM	6.76	3,065	0.11	0.11	0.24
显著性		*	Ns	ns	*

[0116] ¹ SEM: 平均值的标准误差

[0117] * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 和 ns 无显著性

[0118] 具有不同指数的平均值 (a、b、c、d) 表示这些平均值之间的显著性差异 ($P<0.05$)。

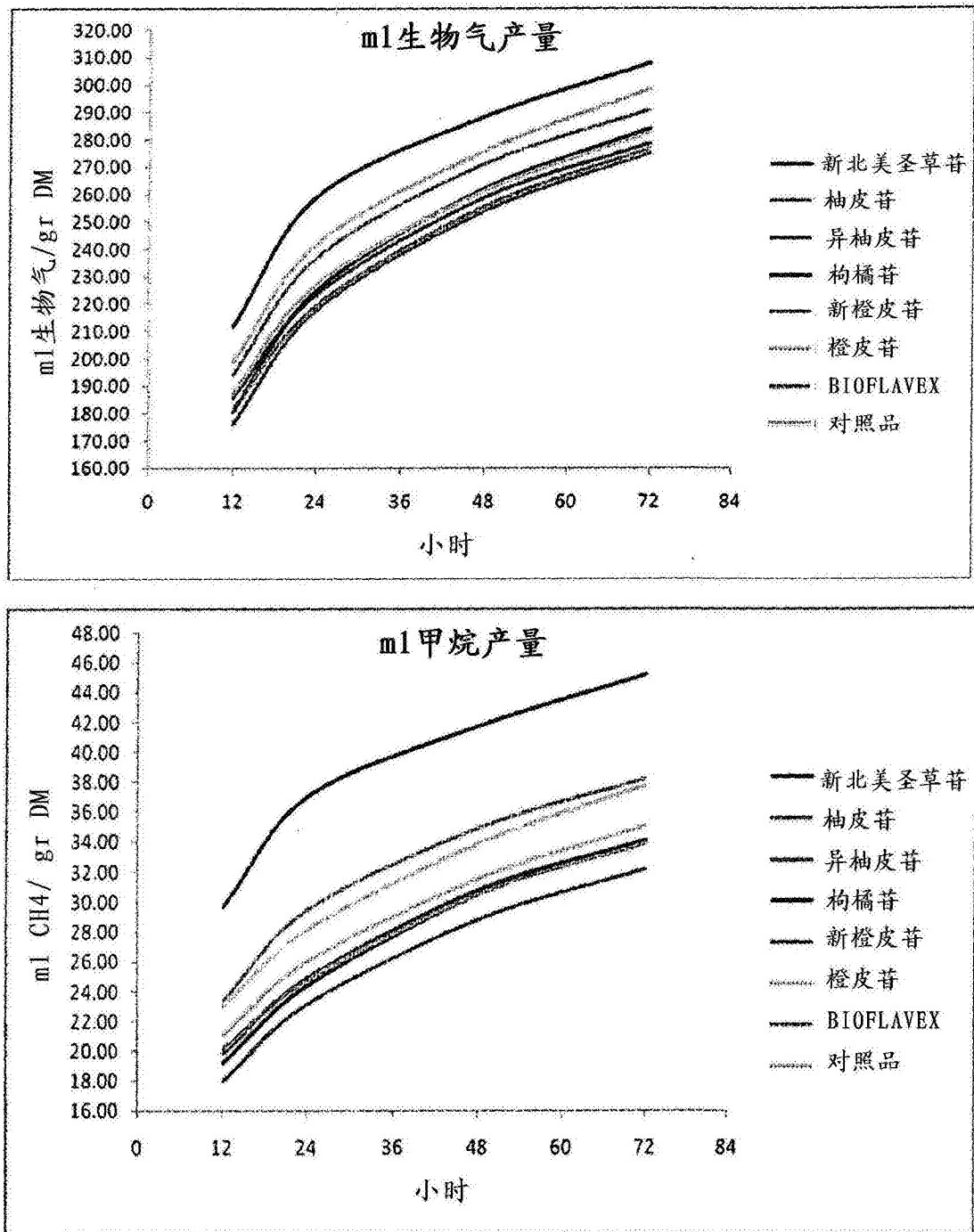


图1