(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110312436 B
(45)授权公告日 2022.12.02

(21)申请号 201880013070.7

(22)申请日 2018.02.09

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110312436 A

(43)申请公布日 2019.10.08

(30)优先权数据
00233/17 2017.02.28 CH
62/461,485 2017.02.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.08.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/053341 2018.02.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/153702 EN 2018.08.30

(73)专利权人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司
地址 荷兰海尔伦

(72)发明人 史蒂芬娜·杜沃 迈克·金德曼

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限责任公司 11258
专利代理师 谭玲玲

(51)Int.Cl.
*A23K 20/158*(2006.01)
*A61K 31/00*(2006.01)
*A23K 20/10*(2006.01)
*A23K 50/10*(2006.01)

(56)对比文件
CN 103561586 A,2014.02.05
WO 2012084629 A1,2012.06.28
CN 103260424 A,2013.08.21
CN 105472995 A,2016.04.06
CN 104202999 A,2014.12.10
CN 102781252 A,2012.11.14
Soliva等.Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis in vitro.《Letters Applied Microbiology》.2003,(第37期),第35-39页.
C. K. Reynolds等.effects of 3-nitrooxypropanol on methane emission, digestion, and energy and nitrogen balance of lactating dairy cows.《Journal of Dairy Science》.2014,第97卷(第6期),第3777-3789页.

审查员 钟超

权利要求书2页 说明书12页

(54)发明名称

饲料组合物来减少反刍动物中甲烷排放和/或改善反刍动物性能的用途

(57)摘要

本发明涉及减少反刍动物中甲烷排放的领域。特别地,本发明涉及饲料组合物或饲料添加剂用于减少从反刍动物的消化活动引起的甲烷产生、和/或改善反刍动物性能的用途,所述饲料组合物或饲料添加剂包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和至少一种在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子。

CN 110312436 B

1.包含月桂酸和3-硝基氧基丙醇作为活性成分的饲料组合物或饲料添加剂用于减少从反刍动物消化活动引起的甲烷形成和/或降低反刍动物中乙酸盐/丙酸盐比的用途，其中3-硝基氧基丙醇与月桂酸的摩尔比在0.0025和0.1之间，并且其中被施用于所述反刍动物的3-硝基氧基丙醇的量为每kg饲料1 mg至10 g，并且被施用于所述反刍动物的月桂酸的量是每kg饲料0.1至20 g。

2.如权利要求1所述的用途，其中所述反刍动物选自牛、山羊、绵羊、鹿、骆驼、羊驼、美洲驼、牛羚、羚羊和叉角羚。

3.如权利要求1所述的用途，其中所述反刍动物选自长颈鹿、美洲野牛、欧洲野牛、牦牛、水牛和鹿牛羚。

4.如权利要求1至3中任意一项所述的用途，其中当在代谢室中测量并基于用3-硝基氧基丙醇处理时，反刍动物的甲烷产生降低至少10%。

5.如权利要求1至3中任意一项所述的用途，其中被施用于所述反刍动物的3-硝基氧基丙醇的量为每kg饲料10 mg至1 g，并且被施用于所述反刍动物的月桂酸的量是每kg饲料1至15 g。

6.如权利要求1至3中任意一项所述的用途，其中被施用于所述反刍动物的3-硝基氧基丙醇的量为每kg饲料50 mg至500 mg，并且被施用于所述反刍动物的月桂酸的量是每kg饲料1至10 g。

7.如权利要求1至3中任意一项所述的用途，其中3-硝基氧基丙醇与月桂酸的摩尔比在0.004和0.01之间。

8.一种饲料组合物或饲料添加剂，其包含3-硝基氧基丙醇和月桂酸作为活性成分，其中3-硝基氧基丙醇与月桂酸的摩尔比在0.0025和0.1之间，并且其中被施用于反刍动物的3-硝基氧基丙醇的量为每kg饲料1 mg至10 g，并且被施用于反刍动物的月桂酸的量是每kg饲料0.1至20 g。

9.如权利要求8所述的饲料组合物或饲料添加剂，其中3-硝基氧基丙醇与月桂酸的摩尔比在0.004和0.01之间。

10.如权利要求8或9所述的饲料组合物或饲料添加剂，其中被施用于所述反刍动物的3-硝基氧基丙醇的量为每kg饲料10 mg至1 g，并且被施用于所述反刍动物的月桂酸的量是每kg饲料1至15 g。

11.如权利要求8或9所述的饲料组合物或饲料添加剂，其中被施用于所述反刍动物的3-硝基氧基丙醇的量为每kg饲料50 mg至500 mg。

12.如权利要求8或9所述的饲料组合物或饲料添加剂，其中被施用于所述反刍动物的月桂酸的量为每kg饲料1至10 g。

13.一种用来减少从反刍动物的消化活动引起的甲烷产生和/或降低反刍动物中乙酸盐/丙酸盐比的方法，其包括给所述反刍动物口服饲料组合物或饲料添加剂，所述饲料组合物或饲料添加剂包含月桂酸和3-硝基氧基丙醇，其中3-硝基氧基丙醇与月桂酸的摩尔比在0.0025和0.1之间，并且其中被施用于所述反刍动物的3-硝基氧基丙醇的量为每kg饲料1 mg至10 g，并且被施用于所述反刍动物的月桂酸的量是每kg饲料0.1至20 g。

14.如权利要求13所述的方法，其中被施用于所述反刍动物的3-硝基氧基丙醇的量为每kg饲料10 mg至1 g，并且被施用于所述反刍动物的月桂酸的量是每kg饲料1至15 g。

15.如权利要求13所述的方法，其中被施用于所述反刍动物的3-硝基氧基丙醇的量为每kg饲料50 mg至500 mg。

16.如权利要求13所述的方法，其中被施用于所述反刍动物的月桂酸的量为每kg饲料1至10 g。

17.如权利要求13至16中任意一项所述的方法，其中所述反刍动物选自由牛、山羊、绵羊、鹿、骆驼、羊驼、美洲驼、牛羚、羚羊和叉角羚组成的组。

18.如权利要求13至16中任意一项所述的方法，其中所述反刍动物选自由长颈鹿、美洲野牛、欧洲野牛、牦牛、水牛和鹿牛羚组成的组。

# 饲料组合物来减少反刍动物中甲烷排放和/或改善反刍动物性能的用途

[0001] 本发明涉及减少反刍动物中甲烷排放的领域。特别地，本发明涉及饲料组合物或饲料添加剂用于减少从反刍动物的消化活动引起的甲烷产生和/或改善反刍动物性能的用途，所述饲料组合物或饲料添加剂包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和至少一种在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子。

[0002] 本发明还涉及包含上述分子的动物饲料或动物饲料组合物以及饲料添加剂。术语“饲料”或“饲料组合物”指适合或意在用于被动物摄入的任何化合物、制剂、混合物或组合物。

[0003] 在本文中，反刍动物是偶蹄目哺乳动物，其通过最初在动物的第一胃(称为瘤胃)里软化、然后使半消化物质(现在称为反刍食物)反刍以及再咀嚼一遍来消化以植物为基础的食物。再次咀嚼反刍食物以进一步分解植物物质和刺激消化的过程被称为“反刍”。

[0004] 瘤胃发酵带来一些弊端。甲烷作为厌氧发酵的自然结果而产生，这代表宿主动物的能量损失。碳水化合物构成典型奶牛口粮中干物质的70-80％，并且尽管如此，从胃肠道吸收碳水化合物通常是非常有限的。其原因是碳水化合物在瘤胃中的广泛发酵，导致产生乙酸酯(乙酸盐，acetate)、丙酸酯(丙酸盐，propinonate)和丁酸酯(丁酸盐，butyrate)作为主产物。这些产物是所谓的挥发性脂肪酸(VFA)的一部分。

[0005] 除能量损失外，甲烷也是温室气体，其比$CO_2$更有力许多倍。其在大气中的浓度在整个上一世纪增加了一倍，并且继续惊人地增加。反刍动物是生物活动甲烷形成的主要贡献者，并且据估计，防止反刍动物的甲烷形成几乎使大气中的甲烷浓度稳定。

[0006] 此外，2009年哥本哈根气候峰会之前的《京都议定书》的评估增加了对减少甲烷排放作为多气体战略(multi-gas strategy)的一部分的优先级。

[0007] 已经发现，抗生素、更特别是离子载体略微减少反刍动物中的甲烷产生(Guan等人，2006，Journal of Animal Science;84:1896-1906)。然而，抗生素对甲烷形成的影响具有一定的缺点，因为微生物群落的快速适应和/或耐药性发展导致在短时间内(2至3周)完全丧失预期的效果，并且因为将抗生素用于非治疗用途在欧洲是禁止的。

[0008] 当使用体外瘤胃仿真模型测试时导致甲烷排放减少的非抗生素产品(胆汁酸衍生物)最近已经公布(WO 2010/072584)。然而，产生适度减少甲烷排放所需的量与反刍动物饲料行业成本限制是不相容的。

[0009] 此外，一些天然植物提取物(大蒜:WO 2009/150264、丝兰、肉桂、大黄)已经在科学文献中描述，作为基于体外实验减少反刍动物中甲烷排放的有力的解决方案。然而，这些方案都不能使其成为商业产品，这是由于副作用(牛奶中残留物)或由于需要向动物供应非常大量的添加剂来显著减少甲烷。

[0010] 在这些情况下，仍然需要开发新的方案来显著减少由反刍动物产生的甲烷形成。除了减少甲烷排放外，这种组合物还应当有利地有助于通过降低乙酸盐/丙酸盐比率来改善反刍动物的性能。

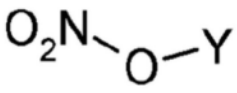
[0011] 本发明人现在惊奇地发现，为了主要减少甲烷的形成而不以对宿主动物有害的方

式影响微生物发酵，本文中后面指定的组合物具有很大的潜力用在动物饲料中。此外，本发明的组合物在由瘤胃乙酸盐/丙酸盐比例所测得的整体动物性能方面还具有很大的好处。所述组合物比现有技术中所描述的那些组合物还更稳定、对动物和人更安全，并且它们在瘤胃中在非常低的浓度下是有活性的。

[0012] 因此，本发明提供饲料组合物或饲料添加剂用于减少从反刍动物的消化活动引起的甲烷产生和/或改善反刍动物性能的用途，所述饲料组合物或饲料添加剂包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和如式(I)所定义的至少一种在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子。

[0013] 本发明还提供一种减少从反刍动物的消化活动所引起的甲烷产生和/或改善反刍动物性能的方法，其包括给动物口服足量的饲料组合物或饲料添加剂，所述饲料组合物或饲料添加剂包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和如式(I)所定义的至少一种在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子或其盐。口服应当理解为简单喂养或丸剂的人工给服。

[0014] 在本发明的所有实施方式中，在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子或其盐由下式(I)定义：

[0015] 
式（I）

[0016] 其中Y为具有下列组成的有机分子：$C_aH_bO_dN_eS_g$，

[0017] 其中

[0018] a包含在1和25之间、优选地1和10之间，

[0019] b包含在2和51之间、优选地2和21之间，

[0020] d包含在0和8之间、优选地0和6之间，

[0021] e包含在0和5之间、优选地0和3之间，

[0022] g包含在0和3之间、优选地0和1之间。

[0023] 更优选地，在本发明的所有实施方式中，式(I)的有机分子具有以下组成$C_aH_bO_dN_eS_g$，其中

[0024] a包含在1和10之间，

[0025] b包含在2和21之间，

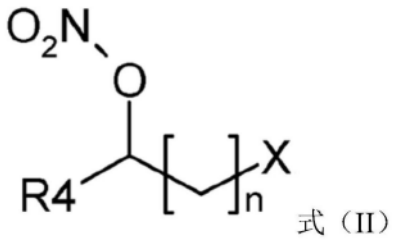
[0026] d包含在0和6之间，

[0027] e包含在0和3之间，

[0028] g包含在0和1之间。

[0029] 在另一个实施方式中，根据本发明的式(I)的优选化合物为其中b为包含在3和51之间、优选地b包含在3和21之间的化合物。

[0030] 在另一个实施方式中，根据本发明的式(I)的优选化合物为式(II)的化合物，

[0031] 

式（II）

[0032] 其中

[0033] n包含在0和12之间、优选地包含在0和6之间，并且其中如果n≠0，碳链为直链的、环状的、或支链的脂族碳链，其可以是未取代的或被多至3个羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基或硝基氧基基团、或烯基、或炔基碳链取代，其是单不饱和的或多不饱和的以及呈任何同分异构体形式，

[0034] R4独立地为氢或包含1至12个碳原子、优选地1至6个碳原子的饱和直链、环状或支链的烷基或烯基基团，

[0035] X为氢、R5、R5＝N、-OR5、-OCOR5、-NR5R6、-ONO2、-COOR5、-CONR5R6、-NHSO2R5、或-SO2NHR5，

[0036] R5和R6独立地为氢，C1-C12直链的、支链的或环状的烷基链，其未取代或被多至3个羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基或硝基氧基基团、烯基、或炔基碳链取代，其可以为单不饱和的或多不饱和的以及呈任何同分异构体形式。

[0037] 对于本发明的所有实施方式，可以理解式(I)的化合物和式(II)的化合物可以是任何同分异构体形式。

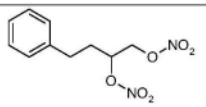
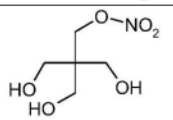
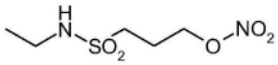
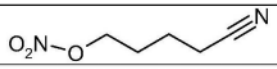
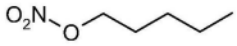
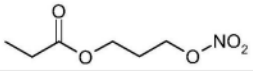
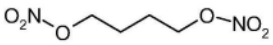
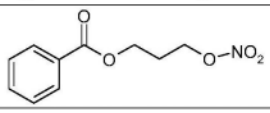
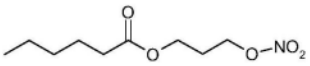
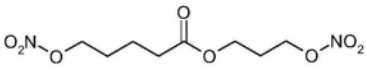
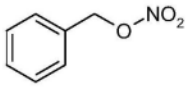
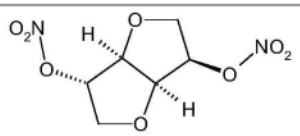
[0038] 应当理解，在式(II)的化合物的上述定义中，当n>2时，碳链可以是直链或在沿碳链的任意位置上被支化。此外，碳链可以是在沿碳链的不同位置上被多个支链支化。此外，当n>3时，脂族碳链可以形成环状片段。该环状片段可以在任意位置(2、3、4)上携带硝基氧基片段，并且它还可以是在多个位置上被任何脂族基团支化的。支链的脂族基团优选地为甲基、乙基或丙基。此外，碳链还可以被多至3个羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基或硝基氧基基团取代。

[0039] 在式(II)的衍生物的上述定义中，优选的烷基为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、异丁基、戊基、新戊基、己基、环己基、以及2-乙基己基和辛基。此外，包含三个或更多碳原子的任何烷基或烯基可以是直链、支链、或环状的。此外，对于直链或支链的$C_2$-$C_{10}$-亚烯基基团来说，要理解包括具有一个或(从$C_4$起)多个双键的亚烯基，这种亚烯基基团的例子是式-CH＝CH-、-CH＝CH-$CH_2$-、-CH＝CH-$(CH_2)_3$-和-$(CH＝CH)_2$-的那些。

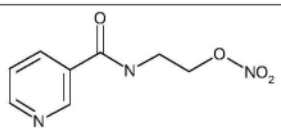
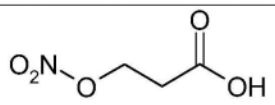
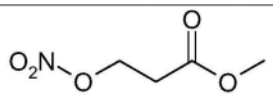
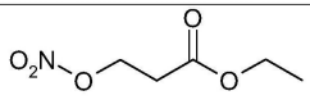
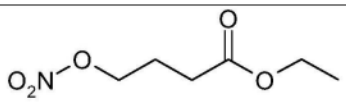
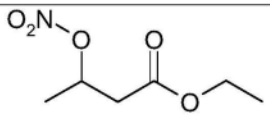
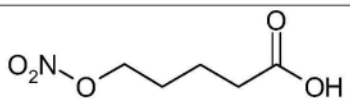
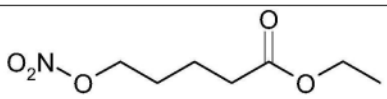
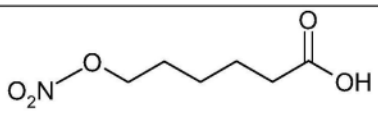
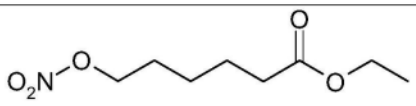
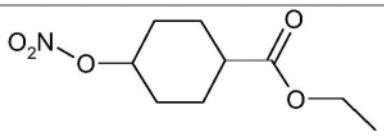
[0040] 在另一个实施方式中，根据本发明的式(I)的更优选化合物选自表1中与其化学式一同列出的化合物以及其盐的列表。

[0041] 表1：根据本发明的式(I)的优选化合物

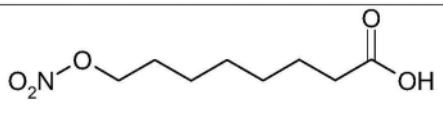
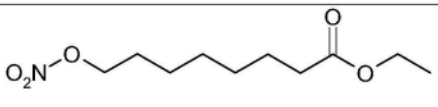
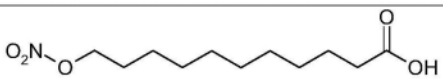
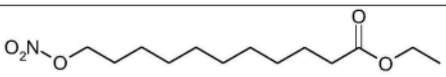
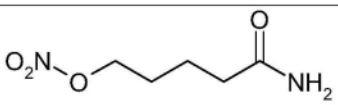
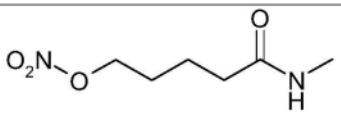
[0042]

| 化合物编号 | 分子结构 | 化学名 |
|---|---|---|
| 1 |  | 3-硝基氧基丙醇 |
| 2 |  | 外消旋-4-苯基丁烷-1,2-二基二硝酸酯 |
| 3 |  | 2-(羟甲基)-2-(硝基氧基甲基)-1,3-丙二醇 |
| 4 |  | N-乙基-3-硝基氧基-丙磺酰胺 |
| 5 |  | 5-硝基氧基戊腈 |
| 6 |  | 5-硝基氧基戊烷 |
| 7 |  | 3-硝基氧基-丙基丙酸酯 |
| 8 |  | 1,3-双-硝基氧基丙烷 |
| 9 |  | 1,4-双-硝基氧基丁烷 |
| 10 |  | 1,5-双-硝基氧基戊烷 |
| 11 |  | 3-硝基氧基-丙基苯甲酸酯 |
| 12 |  | 3-硝基氧基-丙基己酸酯 |
| 13 |  | 3-硝基氧基-丙基 5-硝基氧基己酸酯 |
| 14 |  | 硝酸苄酯 |
| 15 |  | 二硝酸异山梨酯 |

[0043]

| | | |
|---|---|---|
| 16 |  | N-[2-(硝基氧基)乙基]-3-吡啶甲酰胺 |
| 17 |  | 3-硝基氧基丙酸 |
| 18 |  | 3-硝基氧基丙酸甲酯 |
| 19 |  | 3-硝基氧基丙酸乙酯 |
| 20 |  | 4-硝基氧基丁酸乙酯 |
| 21 |  | 3-硝基氧基丁酸乙酯 |
| 22 |  | 5-硝基氧基戊酸 |
| 23 |  | 5-硝基氧基戊酸乙酯 |
| 24 |  | 6-硝基氧基己酸 |
| 25 |  | 6-硝基氧基己酸乙酯 |
| 26 |  | 4-硝基氧基环己基甲酸乙酯 |

[0044]

| | | |
|---|---|---|
| 27 |  | 8-硝基氧基辛酸 |
| 28 |  | 8-硝基氧基辛酸乙酯 |
| 29 |  | 11-硝基氧基十一烷酸 |
| 30 |  | 11-硝基氧基十一烷酸乙酯 |
| 31 |  | 5-硝基氧基-戊酰胺 |
| 32 |  | 5-硝基氧基-N-甲基-戊酰胺 |

[0045] 在另一个实施方式中，式(I)的甚至更优选化合物选自包含下列化合物及其盐的列表：3-硝基氧基丙醇、3-硝基氧基丙酸乙酯、3-硝基氧基丙酸甲酯和3-硝基氧基丙酸。在本发明的所有实施方式中，最优选的是使用3-硝基氧基丙醇。

[0046] 本发明的式(I)的化合物还包括硝基氧基有机分子的盐。用于盐制备的优选阳离子选自由钠(Na+)、钾(K+)、锂(Li+)、镁(Mg2+)、钙(Ca2+)、钡(Ba2+)、锶(Sr2+)、以及铵(NH4+)组成的组。盐还可以由碱金属或碱土金属制备。

[0047] 原则上可以根据硝基氧基有机分子的本身已知的合成方法和/或基于PCT/EP2010/069338和欧洲专利申请No.10 195 857.7中所描述的方法生产根据本发明的式(I)的化合物。

[0048] 本文所用的术语“含有至少5个碳原子的脂肪酸”是指含有至少5个碳原子的饱和或不饱和一元羧酸，例如优选地指具有5个碳原子至28个碳原子、更优选地具有7个碳原子至21个碳原子、最优选地具有9个碳原子至16个碳原子的饱和或不饱和一元羧酸。这种脂肪酸的实例包括但不限于月桂酸、油酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、肉豆蔻油酸、棕榈油酸、亚油酸和亚麻酸。在本发明的所有实施方式中，脂肪酸优选地是具有通式$C_nH_{2n+1}COOH$的饱和一元羧酸，其中n是在4至27范围内、优选地6至20范围内、更优选地8至15范围内、最优选地9至13范围内选择的整数。在本发明的所有实施方式中，最优选的是使用月桂酸，最优选地作为唯一的脂肪酸(即在不存在其他脂肪酸的情况下)。

[0049] 脂肪酸可以原样使用或以其合适的盐的形式使用。用于制备盐的优选阳离子可选自由钠(Na+)、钾(K+)、锂(Li+)、镁(Mg2+)、钙(Ca2+)、钡(Ba2+)、锶(Sr2+)和铵(NH4+)组成的组，例如特别是相应的碱金属或碱土金属盐。最优选的是相应的钠钾盐或钙盐。

[0050] 可以容易地在代谢室中通过本领域已知的方法(Grainger等人.,2007J.Dairy Science;90:2755-2766)测量反刍动物单个动物的甲烷排放。此外，还可以通过新兴技术采用激光束在舍圈水平上评估(McGinn等人,2009,Journal of Environmental Quality;38:1796-1802)。可替换地，奶牛反刍动物产生的甲烷还可以通过根据WO 2009/156453测量牛

奶中脂肪酸分布来评估。

[0051] 反刍动物性能可以通过本领域公知的方法评估，并且通常以乙酸盐/丙酸盐比例(摩尔比)来表征。

[0052] 本发明还涉及饲料组合物或饲料添加剂与至少一种额外活性物质组合的用途，所述饲料组合物或饲料添加剂包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和如式(I)所定义的至少一种在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子或其盐，所述额外活性物质在瘤胃中的甲烷形成方面现出类似效果，并且选自由二烯丙基二硫醚、大蒜油、烯丙基异硫氰酸酯、去氧胆酸、鹅去氧胆酸以及其衍生物组成的组。

[0053] 可以与根据本发明的化合物一起给出的其他组分是，例如酵母、牛至提取物和精油，例如百里酚、3-甲基苯酚、香草醛、愈创木酚和丁子香酚。

[0054] 目前的设想是，将二烯丙基二硫醚、大蒜油、烯丙基异硫氰酸酯、去氧胆酸、鹅去氧胆酸以及其衍生物独立地以例如每kg饲料0.01-500mg活性物质(ppm)的剂量范围施用。这些化合物要么是市售的，要么可以由技术人员采用现有技术中公知的工艺和方法容易地制备。

[0055] 根据本发明的反刍哺乳动物包括牛、山羊、绵羊、长颈鹿、美洲野牛、欧洲野牛、牦牛、水牛、鹿、骆驼、羊驼、美洲驼、牛羚、羚羊、叉角羚、和鹿牛羚。

[0056] 对于本发明的所有实施方式来说，驯养的牛、绵羊、山羊为更优选的物种。就本发明的目的而言，最优选的物种是驯养的牛。该术语包括所有种族的驯养牛和所有生产种类的牛，尤其是奶牛和肉牛。

[0057] 本发明还涉及饲料组合物或饲料添加剂的用途，所述饲料组合物或饲料添加剂包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和如式(I)所定义的至少一种在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子或其盐，其中当在代谢室中测量并基于用至少一种在任何位置取代的有机分子处理时，反刍动物的甲烷产生降低至少10％。优选地甲烷减少至少15％、更优选至少20％、甚至更优选至少25％、最优选至少30％。还可以采用替代的甲烷排放测量，例如采用激光束或对于奶牛反刍动物将甲烷产生与牛奶中VFA分布相关联。

[0058] 本发明还涉及饲料组合物或饲料添加剂的用途，所述饲料组合物或饲料添加剂包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和如式(I)所定义的至少一种在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子或其盐，其中基于用至少一种在任何位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子的处理，乙酸盐与丙酸盐的挥发性脂肪酸比例降低至少10％。优选地，挥发性脂肪酸比例降低至少15％，更优选降低至少20％。

[0059] 本发明还涉及饲料组合物或饲料添加剂的用途，所述饲料组合物或饲料添加剂包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和如式(I)所定义的至少一种在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子或其盐，其中被施用于反刍动物的式(I)中定义的有机分子的量为从每kg饲料1mg至10g、优选地从每kg饲料10mg至1g、更优选地从每kg饲料50mg至500mg，并且被施用于反刍动物的该至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸的量是每kg饲料0.1至20g，优选地每kg饲料1至15g，更优选地每kg饲料1至10g。然而，对于用在动物饲料中，如式(I)所定义的在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子或其盐不需要那么纯；例如它可以包含其他化合物和衍生物。

[0060] 本发明还涉及饲料组合物或饲料添加剂的用途，所述饲料组合物或饲料添加剂包

含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和如式(I)所定义的至少一种在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子或其盐，其中在饲料组合物或饲料添加剂中如式(I)所定义的有机分子与该至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸的摩尔比在0.00001和1之间，优选地在0.0001和0.5之间，更优选地在0.0025和0.1之间，最优选地在0.004和0.05之间。进一步优选的范围包括0.003至0.05，或者0.004至0.01。

[0061] 饲料组合物或饲料添加剂可以通过饲料配制和处理领域中本身已知的方法来制备。

[0062] 因此，本发明的另一个方面是配方，即包含本文中上述定义的组合物的饲料添加剂和动物饲料组合物。

[0063] 因此，本发明还涉及饲料组合物或饲料添加剂，其包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和至少一种式(I)的化合物或其盐。在一个优选的实施方式中，组合物是矿物质预混物、包含维生素和矿物质的维生素预混物或丸剂。

[0064] 通过饲料摄取提供给动物的根据本发明的组合物的正常每日剂量取决于动物的种类及其状况。正常情况下，该剂量应该在从每kg饲料约1mg至约100g、优选地从约1g至约50g、更优选地5g至10g化合物的范围内。

[0065] 包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和至少一种如式(I)所定义的在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子或其盐可以与存在于动物饲料组合物(饮食)中的常规成分(例如碳酸钙、电解质如氯化铵、蛋白质如大豆粉、小麦、淀粉、向日葵粉、玉米、肉骨粉、氨基酸、动物脂肪、维生素和痕量矿物质)组合使用。

[0066] 本发明的组合物的特定例子如下：

[0067] -包含(a)至少一种选自表1的化合物和(b)至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸、(c)至少一种脂溶性维生素、(d)至少一种水溶性维生素、(e)至少一种痕量矿物质、和/或(f)至少一种常量矿物质的动物饲料添加剂；

[0068] -包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和至少一种选自表1的化合物且具有50至800g/kg饲料的粗蛋白含量的动物饲料组合物。

[0069] 所谓的预混物是本发明的动物饲料添加剂的例子。预混物指一种或多种微量成分与稀释剂和/或载体的一种优选均匀的混合物。预混物被用来促进微量成分均匀分散在较大混合物中。

[0070] 除本发明的活性成分外，本发明的预混物还包含至少一种脂溶性维生素、和/或至少一种水溶性维生素、和/或至少一种痕量矿物质、和/或至少一种常量矿物质。换而言之，本发明的预混物包含根据本发明的至少一种化合物和至少一种选自脂溶性维生素、水溶性维生素、痕量矿物质和常量矿物质的额外组分。

[0071] 常量矿物质可以单独地添加到饲料中。因此，在一个特定的实施方式中，预混物包含本发明的活性成分和和至少一种选自脂溶性维生素、水溶性维生素和痕量矿物质的额外组分。

[0072] 下面是这些组分的一组非排他性例子：

[0073] -脂溶性维生素的例子为维生素A、维生素D3、维生素E和维生素K诸如维生素K3。

[0074] -水溶性维生素的例子为维生素B12、生物素和胆碱、维生素B1、维生素B2、维生素B6、烟酸、叶酸和泛酸盐(泛酸酯)诸如D-泛酸钙。

[0075] -痕量矿物质的例子为锰、锌、铁、铜、碘、硒、和钴。

[0076] -常量矿物质的例子为钙、磷和钠。

[0077] 至于反刍动物(诸如牛)的饲料组合物以及其成分,反刍动物的饮食通常由易降解部分(命名为浓缩物)和富含纤维的不易降解部分(命名为干草、草料或粗饲料)组成。

[0078] 干草由干燥过的草、豆类或全谷物制成。草包括梯牧草、黑麦草、羊茅牧草等。豆类包括三叶草、苜蓿或紫花苜蓿、豌豆、蚕豆和野豌豆等。全谷物包括大麦、玉蜀黍(玉米)、燕麦、高粱等。其他草料作物包括甘蔗、芥兰、芸苔和白菜。此外,块根作物如萝卜、瑞典甘蓝(swede)、饲料甜菜(mangles)、饲用甜菜(fodder beet)、和甜菜(包括甜菜浆和甜菜糖蜜)被用来饲养反刍动物。其他作物还有块茎,例如土豆、木薯和甘薯。青贮饲料为富含纤维部分(例如来自草、豆类或全谷物)的青贮形式,从而用受控的厌氧发酵过程(自然发酵或添加剂处理)处理具有高水含量的材料。

[0079] 浓缩物主要由谷物(例如包括啤酒糟、酒糟的大麦,玉蜀黍,小麦,高粱)制成,而且常含有富含蛋白质的饲料成分,例如大豆、油菜籽、棕榈仁、棉籽和葵花籽。

[0080] 还可以用全混合日粮(TMR)喂养牛,其中所有的膳食组分,例如草料、青贮饲料和浓缩物在使用前混合。

[0081] 如上面提到的,预混物是饲料添加剂的例子,其可包含根据本发明的活性化合物。应当理解,化合物可以以不同的其他形式施用给动物。例如,化合物还可以被包含在丸剂中,而丸剂可被放置于瘤胃中并且在特定的一段时间内以规定好的剂量连续地释放规定量的活性化合物。

[0082] 本发明还涉及一种减少从反刍动物的消化活动引起的甲烷产生和/或改善反刍动物性能的方法,其包括口服足量的饲料组合物或饲料添加剂,饲料组合物或饲料添加剂包含至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸和如式(I)所定义的至少一种在任意位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子或其盐,优选实施方式如上所述。

[0083] 此外,本发明还涉及如上所述的方法,其中根据本发明的饲料组合物或饲料添加剂与至少一种选自二烯丙基二硫醚、大蒜油、烯丙基异硫氰酸酯、去氧胆酸、鹅去氧胆酸以及其衍生物的额外活性物质组合施用于动物。

[0084] 本发明还涉及如上所述的方法,其中反刍动物选自由牛、山羊、绵羊、长颈鹿、美洲野牛、欧洲野牛、水牛、牦牛、鹿、骆驼、羊驼、美洲驼、牛羚、羚羊、叉角羚、鹿牛羚组成的组,并且更优选地选自由牛、山羊和绵羊组成的组。

[0085] 本发明还涉及如上所述的方法,其中被施用于反刍动物的式(I)定义的所述至少一种活性有机分子的量为从每kg饲料约1mg至约10g、优选地从约10mg至约1g、更优选地从每kg饲料50mg至500mg化合物,并且被施用于反刍动物的所述至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸的量是每kg饲料0.1至52g,优选地每kg饲料1至15g,更优选地每kg饲料1至10g。

[0086] 本发明还涉及如上所述的方法,其中当在代谢室中测量并基于用至少一种在任何位置取代的有机分子处理时,反刍动物中甲烷产生降低至少10%。优选地甲烷减少至少15%、更优选至少20%、甚至更优选至少25%、最优选至少30%。还可以采用替代的甲烷排放测量,例如采用激光束或对于奶牛反刍动物将甲烷产生与牛奶中VFA分布相关联。

[0087] 本发明还涉及如上所述的方法,其中基于用至少一种在任何位置被至少一个硝基氧基取代的有机分子的处理,乙酸盐与丙酸盐的挥发性脂肪酸比例(摩尔比)降低至少

10％。优选地，挥发性脂肪酸比例降低至少15％，更优选降低至少20％。

[0088] 本发明还涉及如上所述的方法，在饲料组合物或饲料添加剂中如式(I)所定义的有机分子与至少一种含有至少5个碳原子的脂肪酸的摩尔比在0.00001和1之间，优选地在0.0001和0.5之间，更优选地在0.0025和0.1之间，最优选地在0.004和0.01之间。进一步优选的范围包括0.003至0.05，或者0.004至0.01。

[0089] 在一个具体的实施方式中，本发明涉及3-硝基氧基丙醇和月桂酸的混合物用于减少反刍动物中甲烷形成和/或降低反刍动物中乙酸盐/丙酸盐比(摩尔比)的用途。在一个优选的实施方式中，混合物中3-硝基氧基丙醇与月桂酸的摩尔比在0.00001至1的范围内，优选地在0.0001至0.5的范围内，更优选地在0.0025至0.1的范围内，最优选地在0.004至0.01的范围内选择。进一步优选的范围包括0.003至0.05，或0.004至0.01。在另一个优选的实施方式中，基于单独施用3-硝基氧基丙醇(在代谢室中测量)，甲烷减少至少15％、更优选至少20％、甚至更优选至少25％、最优选至少30％，和/或基于单独施用3-硝基氧基丙醇，乙酸盐/丙酸盐比例的降低至少为3％、更优选至少为4％。

[0090] 在另一个实施方式中，本发明涉及反刍动物中甲烷形成的减少和/或乙酸盐/丙酸盐比率(摩尔比)的降低，所述方法包括给反刍动物施用3-硝基氧基丙醇和月桂酸的混合物的步骤。在一个优选的实施方式中，混合物中3-硝基氧基丙醇与月桂酸的摩尔比在0.00001至1的范围内，优选地在0.0001至0.5的范围内，更优选地在0.0025至0.1的范围内，最优选地在0.004至0.01的范围内选择。进一步优选的范围包括0.003至0.05，或0.004至0.01。在另一个优选的实施方式中，基于单独施用3-硝基氧基丙醇(在代谢室中测量)，甲烷减少至少15％、更优选至少20％、甚至更优选至少25％、最优选至少30％，和/或基于单独施用3-硝基氧基丙醇，乙酸盐/丙酸盐比例的降低至少为3％、更优选至少为4％。

[0091] 通过下面实施例进一步描述本发明，但这些实施例不应解释为限制本发明的范围。

## 实施例

[0092] 甲烷产生的体外试验：采用修改的“Hohenheim饲料价值试验”(HFT，Hohenheim Forage value Test)来测试特定化合物对该体外系统模拟的瘤胃功能的影响。

[0093] 方法：将饲料加入具有瘤胃液组合物和缓冲液的适当混合物的注射器中。将该溶液在39℃下温育。8小时后，测定所产生的气体相的量(和组成)，并代入换算公式。

[0094] 试剂：

[0095] 常量元素溶液：

[0096] -6.2g磷酸二氢钾($KH_2PO_4$)

[0097] -0.6g七水合硫酸镁($MgSO_4*7H_2O$)

[0098] -9ml浓磷酸(1mol/l)

[0099] -溶解于蒸馏水至1L(pH约1.6)

[0100] 缓冲溶液：

[0101] -35.0g碳酸氢钠($NaHCO_3$)

[0102] -4.0g碳酸氢铵($(NH_4)HCO_3$)

[0103] -溶解于蒸馏水至1L

[0104] 痕量元素溶液：

[0105] -13.2g二水合氯化钙($CaCl_2*2H_2O$)

[0106] -10.0g四水合二氯化锰(II)($MnCl_2*4H_2O$)

[0107] -1.0g六水合二氯化钴(II)($CoCl_2*6H_2O$)

[0108] -8.0g氯化铁(III)($FeCl_3*6H_2O$)

[0109] -溶解在蒸馏水中至100ml

[0110] 钠盐溶液：

[0111] -100mg钠盐

[0112] -溶解在蒸馏水中至100ml

[0113] 还原溶液：

[0114] -先后将3ml氢氧化钠(c＝1mol/l)和427.5mg硫化钠水合物($Na_2S*H_2O$)加入到71.25ml $H_2O$中

[0115] -溶液必须在将其加入介质溶液之前不久制备

[0116] 程序：

[0117] 样品称量:将饲料过筛至1mm,通常使用TMR(精料44％、干草6％、玉米青贮饲料37％和牧草青贮饲料13％),并准确称量至64个注射器中。这些注射器中的4个为底物对照,其显示未受测试化合物影响的气体产生。4个其他注射器是其中加入溴乙烷磺酸盐至0.1mM的阳性对照。如果需要,4个注射器包含载体对照(如果测试化合物需要载体)。其余的注射器每4个一组包含测试物质。

[0118] 介质溶液的制备：

[0119] 在Woulff瓶中按照下列顺序混合如下组分：

[0120] -711ml的水

[0121] -0.18ml痕量元素溶液

[0122] -355.5ml缓冲溶液

[0123] -355.5ml常量元素溶液

[0124] 将完成的溶液加热至39℃,随后加入1.83ml钠盐溶液并在36℃下加入还原溶液。当指示剂变成无色时,加入瘤胃液。

[0125] 提取瘤胃液:在持续搅拌并通入$CO_2$气体的条件下,将750ml瘤胃液加入到约1400ml介质溶液中。

[0126] 灌装注射器、温育并测定气体体积和VFA值:将经稀释的瘤胃液(24ml)加入到玻璃注射器中。所述注射器随后在39℃下温和搅拌温育8小时。8小时后,测定所产生的气体的体积,并使用气相色谱法测定气相中的甲烷百分比。

[0127] 结果

[0128] 被发酵的饲料是人工TMR(精料44％、干草6％、玉米青贮饲料37％和牧草青贮饲料13％)。将来自Sigma Aldrich的月桂酸以1000μM的浓度使用。将3-硝基氧基丙醇(3-NOP)以2.5μM和5μM两种不同浓度使用。

[0129] 结果列于下表2和3中。从甲烷减少以及乙酸盐/丙酸盐比例方面来看,3-NOP和月桂酸的组合获得了明显的协同效应,这转化为对动物来说额外的性能益处。下面描述的结果来自使用月桂酸、3-NOP或两者的组合的三次实验的平均值。Ace.＝乙酸盐;Prop.＝丙酸

盐

[0130] 表2:对甲烷产生的影响

[0131]

| 处理 | 3-NOP | 月桂酸 | 总甲烷 | 相对于对照的降低量 | 预期的降低量* | 协同作用° |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | [μM] | [μM] | [8h 后的 mmol] | | | [%] |
| 1 (对照) | - | - | 0.267 | - | - | - |
| 2 (参考) | 2.5 | - | 0.244 | 0.023 | - | - |
| 3 (参考) | 5 | - | 0.097 | 0.17 | - | - |
| 4 (参考) | - | 1000 | 0.255 | 0.012 | - | - |
| 5 (发明) | 2.5 | 1000 | 0.125 | 0.142 | 0.232 | -46 |
| 6 (发明) | 5 | 1000 | 0.022 | 0.245 | 0.085 | -74 |

[0132] *与对照相比,基于加成效应的预期降低量

[0133] °(发现值-预期值)/预期值*100%

[0134] 表2:对挥发性脂肪酸(VFA)分布的影响,即乙酸盐/丙酸盐比例

[0135]

| 处理 | 3-NOP | 月桂酸 | Ace./ Prop. | 相对于对照的降低量 | 预期的降低量* | 协同作用° |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | [μM] | [μM] | [摩尔比] | | | [%] |
| 1 (对照) | - | - | 2.26 | - | - | - |
| 2 (参考) | 2.5 | - | 2.09 | 0.17 | - | - |

[0136]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 (参考) | 5 | - | 1.63 | 0.63 | - | - |
| 4 (参考) | - | 1000 | 1.98 | 0.28 | - | - |
| 5 (发明) | 2.5 | 1000 | 1.63 | 0.63 | 1.81 | -9.9 |
| 6 (发明) | 5 | 1000 | 1.29 | 0.97 | 1.35 | -4.4 |

[0137] *与对照相比,基于加成效应的预期降低量

[0138] °(发现值-预期值)/预期值*100%