



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102112009 A

(43) 申请公布日 2011.06.29

(21) 申请号 200980130234.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.06.02

A23K 1/16(2006.01)

A23K 1/18(2006.01)

(30) 优先权数据

08009909.6 2008.05.30 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.01.30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/055901 2009.06.02

(87) PCT申请的公布数据

W02010/031602 EN 2010.03.25

(71) 申请人 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 吉瑞·布洛兹 奥雷利娅·塞奥恩

卡洛斯·斯莫思-奴恩斯

(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

代理人 肖善强

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 4 页

(54) 发明名称

琥珀酸的用途

(57) 摘要

本发明涉及包含琥珀酸或其衍生物的组合物。发明人已惊讶地发现：琥珀酸及其衍生物具有用于动物饲料中的巨大潜力，例如用于改进饲料转换比 (FCR) 和 / 或用于调控肠菌群。因此，本发明的一个主要目的是提供用于在动物饲料中使用琥珀酸的组合物和方法。

1. 琥珀酸或其衍生物用于制备在动物饲料中使用的组合物的用途。
2. 根据权利要求 2 的用途,用于制造下述营养药物组合物,所述营养药物组合物用于改进饲料转换比 (FCR) 和 / 或调控肠微生物区系。
3. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中琥珀酸的衍生物包括琥珀酸盐例如琥珀酸碱金属盐、琥珀酸碱土金属盐和琥珀酸铵。
4. 包含琥珀酸、其衍生物或其代谢产物作为活性成分的饲料或动物饲料添加剂。
5. 根据权利要求 4 的饲料或动物饲料添加剂,其包含琥珀酸盐作为活性成分。
6. 根据权利要求 4 或 5 的动物饲料添加剂,所述添加剂包含
  - (a) 至少一种脂溶性维生素,
  - (b) 至少一种水溶性维生素,
  - (c) 至少一种微量矿物质,和 / 或
  - (d) 至少一种大量矿物质。
7. 根据权利要求 4 到 6 中任一项的动物饲料或饲料添加剂,其除琥珀酸以外还包含二氢丁香酚。
8. 根据权利要求 4 到 7 中任一项的动物饲料或饲料添加剂,其通过改进饲料转换比 (FCR) 和 / 或调控肠微生物区系来改进动物饲料利用。
9. 根据权利要求 5 的动物饲料组合物,其具有 50 到 800g/kg 饲料的粗制蛋白质含量。
10. 根据权利要求 6 的组合物,其为抗细菌、抗真菌和 / 或消除恶臭的组合物。
11. 用饲料喂养动物的方法,其中向所述饲料添加琥珀酸。
12. 根据权利要求 11 的用饲料喂养动物的方法,其中除了琥珀酸以外还向所述饲料添加二氢丁香酚。
13. 用于改进动物饲料转换比 (FCR) 和 / 或调控动物肠微生物区系的方法,其中向所述饲料添加琥珀酸或其衍生物。

## 琥珀酸的用途

[0001] 本发明涉及包含活性成分琥珀酸、其衍生物或代谢产物的营养药物组合物用于动物、尤其是猪的新颖用途。

[0002] 琥珀酸衍生物的特定例子包括琥珀酸盐,如琥珀酸碱金属盐、琥珀酸碱土金属盐和琥珀酸铵。

[0003] 如在本文中使用的,术语“营养药物性”表示在营养和药物两个应用领域中的有用性。因此,营养药物性组合物可用作完全的动物饲料(膳食)、用作动物饲料的补剂和用作用于肠应用或肠胃外应用的药物配制物,其可以是固体配制物或液体配制物。

[0004] 术语动物包括所有动物,包括人。动物的例子是非反刍动物和反刍动物。反刍动物包括下述动物,例如绵羊、山羊和牛,例如肉牛和奶牛。在一个具体的实施方案中,动物是非反刍动物。非反刍动物单胃动物,例如猪或豕(swine)(包括但不限于仔猪、生长猪(growing pig)和母猪);家禽例如火鸡、鸭和鸡(包括但不限于肉鸡(broiler chick)、蛋鸡(layer));鱼(包括但不限于三文鱼、鳟鱼、罗非鱼、鲶鱼和鲤鱼);和甲壳动物(包括但不限于虾和蟹)。

[0005] 术语饲料或饲料组合物表示适用于或旨在被动物摄入的任何化合物、制备物、混合物或组合物。

[0006] 有机酸在动物喂养中的用途是已知的。例如,EP-A-0 683 985 公开了包含苯甲酸及其盐的饲料组合物,其可以被用于最小化猪场中来自有机废弃物(尤其是动物粪便和废料)的臭味氨的散发。还已知对断奶小猪膳食添加苯甲酸改善动物的畜牧学表现。

[0007] 还已知;其他有机酸例如柠檬酸或丁酸可以在动物营养学中用作抗生素生长促进剂的可能的替代方式,尤其是对猪而言。迄今为止,琥珀酸在动物营养学中的用途尚无描述。

[0008] 本发明人惊讶地发现:琥珀酸及其衍生物具有在动物饲料中使用的巨大潜力,例如用于改进动物的每日体重/平均增重和/或用于改进饲料转换比(FCR)。

[0009] 本发明人惊讶地发现:琥珀酸还具有抗微生物活性以及调控动物肠菌群(gut flora)的潜力。

[0010] 抗微生物活性可以例如是杀菌的、抑菌的、杀真菌的、抑真菌的、和/或杀病毒的。术语“杀菌的”应当被理解为能够杀死细菌细胞;术语“抑菌的”应当被理解为能够抑制细菌生长,即抑制生长中的细菌细胞;术语“杀真菌的”应当被理解为能够杀死真菌细胞;术语“抑真菌的”应当被理解为能够抑制真菌生长,即抑制生长中的真菌细胞;术语“杀病毒的”应当被理解为能够使病毒灭活。

[0011] 本发明的一个主要目的是提供用于在动物饲料中使用琥珀酸的组合物和方法。

[0012] 琥珀酸可以商业获得,或由技术人员使用现有技术中公知的工艺和方法容易地制备。

[0013] 然而,就动物饲料中的用途而言,琥珀酸不需要如此纯净;其可包含其它烷基衍生物,和/或如果其由微生物(例如重组或非重组的真核细胞如酵母)生产时,可提取和纯化自生物质。

[0014] 本发明的第二个方面是在动物喂养中使用琥珀酸,以改进每日体重 / 平均增重和 / 或饲料转换比 (FCR) 和 / 或调控动物的肠菌群。

[0015] 在本文上下文中,术语饲料转换比 (Feed Conversion Ratio) 或 FCR 与术语饲料转化率 (feed conversion) 作为同义词使用。FCR 被计算为相对于体重增加 (以 g/ 动物表示) 的饲料摄入 (以 g/ 动物表示)。

[0016] 本发明的第三方面涉及含有包含琥珀酸的组合物的动物饲料和预混物或添加剂组合物。

[0017] 琥珀酸或其衍生物可以作为常规被喂养给动物的营养组合物的组分被施用给动物。因此,琥珀酸及其衍生物可作为动物饲料的组分或在动物的饮用水中被合适地施用给动物。

[0018] 施用给动物的琥珀酸或其衍生物的量在以喂养给动物的每种饲料的总重为基础 0.1% -5% 的范围内。在本发明的一个优选的实施方案中,琥珀酸或琥珀酸衍生物以下述量使用,所述量足以对要施用琥珀酸的动物提供每 kg 体重 300mg 到每 kg 体重约 15000mg 的每日剂量。

[0019] 在第一个特别的实施方案中,本发明涉及在动物饲料中使用琥珀酸例如用于改进饲料转换比 (FCR) 和 / 或调控肠微生物区系的方法。在可选的实施方案中,琥珀酸通过帮助适当的消化和 / 或支持免疫系统功能来改进动物饲料可消化性,和 / 或维持动物健康。

[0020] 可基于小猪生长试验测定 FCR,所述试验包含第一处理和第二处理,所述第一处理中以合适的每 kg 饲料浓度向动物饲料中添加琥珀酸,所述第二处理 (对照) 中不向动物饲料添加琥珀酸。

[0021] 如通常所已知的,改进的 FCR 低于对照 FCR。在一些具体的实施方案中,与对照相比,FCR 被改进 (即降低) 至少 1.0%,优选地至少 1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4% 或至少 2.5%。

[0022] 如本文所使用的,术语“肠”是指胃肠道或消化道 (也表示消化管),其表示多细胞动物内摄入食物、消化食物提取能量和养分并排出剩余废物的器官系统。

[0023] 如本文所使用的,术语肠“微生物区系”是指下述天然微生物培养物,其居住在肠中,并通过帮助适当的消化和 / 或支持免疫系统功能来维持健康。

[0024] 如本文与肠微生物区系结合使用的,术语“调控”通常表示在健康和正常发挥功能的动物中改变、操作、变更或调节其功能或状态,即非治疗性用途。调控处于对琥珀酸和 / 或本发明微生物株系的应答中。

[0025] 以下是通过本发明的琥珀酸获得的肠微生物区系调控作用的非限制性具体例子 (与不含本发明琥珀酸的对照相比的改变):

[0026] (i) 例如在小猪或肉鸡中,体内出现 *Salmonella* spp 和 / 或 *Clostridium perfringens* 的频率降低;

[0027] (ii) 例如在小猪和 / 或肉鸡中,体内 *Escherichia coli* 和 / 或 *Enterococcus faecalis* 数量降低;

[0028] 再进一步,仍然与肠微生物区系调控作用相关,并涉及不含本发明琥珀酸的对照,本发明的琥珀酸优选地:

[0029] (iii) 不显著影响 (例如降低) 例如从小猪和 / 或肉鸡肠内含物中分离的有害微

生物如细菌的体外生长。

[0030] 在第二个特别的实施方案中,本发明涉及包含含有琥珀酸的组合物的动物饲料和预混物或添加剂组合物。

[0031] 在小猪饲料的一个优选的实施方案中,琥珀酸或琥珀酸衍生物以下述用量使用,所述用量足以对要进行施用的受试者提供每 kg 体重 300mg 到每 kg 体重约 15000mg 的每日剂量。最终猪饲料中琥珀酸或其衍生物的量在从 1 到 50g/kg 饲料的范围内,优选地在 10 到 20g/kg 饲料的范围内,在最终家禽饲料中在 1 到 40g/kg 饲料的范围内,优选地在 2 到 10g/kg 饲料的范围内。

[0032] 本发明组合物的具体例子如下:

[0033] - 动物饲料添加剂,其包含 (a) 琥珀酸, (b) 至少一种脂溶性维生素, (c) 至少一种水溶性维生素, (d) 至少一种微量矿物质和 / 或 (e) 至少一种大量矿物质;

[0034] - 动物饲料组合物,其包含 (a) 琥珀酸和 50 到 800g/kg 饲料的粗制蛋白质含量。

[0035] - 动物饲料组合物,其具有 50 到 800g/kg 的粗制蛋白质含量,并且包含上文定义的微生物菌株。

[0036] 所谓的预混物是本发明动物饲料添加剂的例子。预混物优选地是指一种或多种微量成分与稀释剂和 / 或运载体的均匀混合物。预混物被用于促进更大混合物中微量成分的统一分布。

[0037] 另外,任选的饲料添加剂成分是着色剂,例如类胡萝卜素如  $\beta$ -胡萝卜素、虾青素和叶黄素;芳香化合物;稳定剂;抗微生物肽;多不饱和脂肪酸;产生活性氧的物类;和 / 或至少一种选自以下的酶:植酸酶 (EC 3.1.3.8 或 3.1.3.26);木聚糖酶 (EC 3.2.1.8);半乳聚糖酶 (EC 3.2.1.89); $\alpha$ -半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.22);蛋白酶 (EC 3.4.)、磷脂酶 A1 (EC 3.1.1.32);磷脂酶 A2 (EC 3.1.1.4);溶血磷脂酶 (EC 3.1.1.5);磷脂酶 C (EC 3.1.4.3);磷脂酶 D (EC 3.1.4.4);淀粉酶,例如  $\alpha$ -淀粉酶 (EC 3.2.1.1);和 / 或  $\beta$ -葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4 或 EC 3.2.1.6)。

[0038] 多不饱和脂肪酸的例子是 C18、C20 和 C22 多不饱和脂肪酸,例如花生四烯酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸和  $\gamma$ -亚麻酸。

[0039] 产生活性氧的物类的例子是化学品例如过硼酸盐、过硫酸盐或过碳酸盐;和酶例如氧化酶、加氧酶或合成酶。

[0040] 通常,脂溶性和水溶性维生素以及微量矿物质形成旨在被添加进饲料的所谓预混物,而大量矿物质通常被单独地添加至饲料。当富含琥珀酸时,这些组合物类型中的任一种都是本发明的动物饲料添加剂。

[0041] 以下是这些组分的例子的非排它性列表:

[0042] 脂溶性维生素的例子是维生素 A、维生素 D3、维生素 E 和维生素 K,例如维生素 K3。

[0043] 水溶性维生素的例子是维生素 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,例如 D-泛酸钙。

[0044] 微量矿物质的例子是镁、锌、铁、铜、碘、硒和钴。

[0045] 大量矿物质的例子是钙、磷和钠。

[0046] 这些组分(以家禽和猪仔 / 猪为例)的营养需求列于 WO 01/58275 的表 A 中。营养需求表示这些组分应当以指出的浓度在膳食中提供。

[0047] 或者,本发明的动物饲料添加剂包含至少一种 WO 01/58275 的表 A 中所列的个体组分。至少一种表示任一种,一种或多种,一种、或两种、或三种、或四种依此类推直至所有十三种,或直至所有十五种个体组分。更特别地,该至少一种个体组分以下述用量包含在本发明的添加剂中,所述用量提供表 A 的第 4 列或第 5 列或第 6 列中所指范围内的饲料内浓度 (in-feed-concentration)。

[0048] 动物饲料组合物或膳食具有相对高的蛋白质含量。家禽和猪膳食的特征可如 WO 01/58275 的表 B 第 2-3 列中所示。鱼膳食的特征可如该表 B 的第 4 列中所示。另外,这类鱼膳食通常具有 200-310g/kg 的粗脂肪含量。

[0049] WO 01/58275 对应于 US 09/779334,其通过引用并入本文。

[0050] 根据本发明的动物饲料组合物具有 50-800g/kg 的粗蛋白质含量,并另外包含本文所述和 / 或要求保护的琥珀酸。

[0051] 另外,或(针对上文指出的粗蛋白质含量)可选地,本发明的动物饲料组合物具有 10-30MJ/kg 的可代谢能量含量;和 / 或 0.1-200g/kg 的钙含量;和 / 或 0.1-200g/kg 的可用磷含量;和 / 或 0.1-100g/kg 的甲硫氨酸含量;和 / 或 0.1-150g/kg 的甲硫氨酸加半胱氨酸含量;和 / 或 0.5-50g/kg 的赖氨酸含量。

[0052] 在一些具体的实施方案中,可代谢能量、粗蛋白质、钙、磷、甲硫氨酸、甲硫氨酸加半胱氨酸和 / 或赖氨酸的含量在 WO 01/58275 的表 B 中范围 2、3、4 或 5 任一中 (R. 2-5)。

[0053] 粗蛋白质被计算为氮 (N) 乘以因数 6.25,即粗蛋白质 (g/kg) = N(g/kg) x 6.25。氮含量通过 Kjeldahl 方法测定 (A. O. A. C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC)。

[0054] 可代谢的能量可基于 NRC publication Nutrient requirements in swine, ninth revised edition 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D. C., pp. 2-6 和 European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, The Netherlands. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5 来计算。

[0055] 基于饲料表 (feed table) 来计算完全动物膳食中钙、可利用磷和氨基酸的膳食含量,所述饲料表例如 Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7。

[0056] 在一个具体的实施方案中,本发明的动物饲料组合物含有至少一种植物蛋白或蛋白来源。其也可含有动物蛋白,例如肉粉和骨粉,和 / 或鱼粉,通常含量为 0-25%。如在本文使用的,术语植物蛋白是指下述任何化合物、组合物、制备物或混合物,其包含至少一种衍生自或来源于植物的蛋白质,包括经修饰的蛋白质和蛋白质衍生物。在具体的实施方案中,植物蛋白的蛋白质含量至少为 10%、20%、30%、40%、50% 或 60% (w/w)。

[0057] 植物蛋白可衍生自植物蛋白来源,例如豆类和谷物,例如来自 Fabaceae (Leguminosae)、Cruciferae、Chenopodiaceae 和 Poaceae 科植物的材料,例如大豆粉、羽扇豆粉和油菜籽粉。

[0058] 在一个具体的实施方案中,植物蛋白来源是来自一种或多种 Fabaceae 科植物例如大豆 (soybean)、羽扇豆、豌豆或黄豆 (bean) 的材料。

[0059] 在另一个具体的实施方案中,植物蛋白来源是来自一种或多种 Chenopodiaceae 科植物例如甜菜 (beet)、糖萝卜 (sugar beet)、菠菜或奎奴亚藜 (quinoa) 的材料。

[0060] 植物蛋白来源的其它例子是油菜籽、向日葵籽、棉籽和卷心菜。

[0061] 植物蛋白来源的其它例子是谷物,例如大麦、小麦、黑麦、燕麦、玉米 (苞谷)、水稻、黑小麦和高粱。

[0062] 还在其它一些具体的实施方案中,本发明的动物饲料组合物含有 0-80% 玉米;和 / 或 0-80% 高粱;和 / 或 0-70% 小麦;和 0-70% 大麦;和 / 或 0-30% 燕麦;和 / 或 0-30% 黑麦;和 / 或 0-40% 大豆粉;和 / 或 0-25% 鱼粉;和 / 或 0-25% 肉粉和骨粉;和 / 或 0-20% 乳清。

[0063] 动物膳食可例如被制作作为醪液饲料 (mash feed) (非丸状) 或丸状的饲料。通常,将经研磨的饲料混合,并根据所述物种的规范添加足量的必需维生素和矿物质。琥珀酸和 / 或其衍生物可作为固体或液体配制物被添加。

[0064] 以下实施例进一步阐述了本发明,但是它们不应被理解为限制本发明。

[0065] 实施例 1

[0066] 动物饲料添加剂

[0067] 通过向以下预混物 (每 kg 预混物) 中添加 100g 琥珀酸,制备动物饲料添加剂:

[0068] 1100000IE 维生素 A

[0069] 300000IE 维生素 D3

[0070] 4000IE 维生素 E

[0071] 250mg 维生素 B1

[0072] 800mg 维生素 B2

[0073] 1200mg D- 泛酸钙

[0074] 500mg 维生素 B6

[0075] 2.5mg 维生素 B12

[0076] 5000mg 烟酸

[0077] 10000mg 维生素 C

[0078] 300mg 维生素 K3

[0079] 15mg 生物素

[0080] 150mg 叶酸

[0081] 50004mg 胆碱氯化物

[0082] 6000mg Fe

[0083] 3000mg Cu

[0084] 5400mg Zn

[0085] 8000mg Mn

[0086] 124mg I

[0087] 60mg Co

[0088] 29.7mg Se

[0089] 9000mg 拉沙洛西钠 (Lasalocid Sodium) (Avatec)

[0090] 17.3% Ca

[0091] 0.8% Mg

[0092] 11.7% Na

[0093] 实施例 2

[0094] 动物饲料

[0095] 通过混合成分制备具有以下组成(%, w/w)的生长肉鸡 (broiler grower) 膳食。小麦、黑麦和 SBM 48 可得自 Moulin Moderne Hirsingue, Hirsingue, 法国。混合后, 在期望的温度例如约 70°C 下将饲料制成丸 (3x 25mm)。

[0096] 小麦 46.00

[0097] 黑麦 15.00

[0098] 大豆粉 (SBM 48) 30.73

[0099] 大豆油 4.90

[0100] DL- 甲硫氨酸 0.04

[0101] DCP (磷酸二钙) 1.65

[0102] 石灰石 0.43

[0103] 盐 0.15

[0104] TiO<sub>2</sub> 0.10

[0105] 动物饲料添加剂 (上文) 1.00

[0106] 得到的动物饲料每 kg 含有 1g 琥珀酸 (1000ppm)。

[0107] 可以用相似的方式制备其他动物饲料和饲料添加剂组合物。

[0108] 实施例 3

[0109] 体外评价琥珀酸对肠微生物区系的影响

[0110] 针对从胃肠微生物区系中分离的微生物体外评价琥珀酸 (118, 1g/mol) 和柠檬酸 (210, 14g/mol) 的比较性抗微生物活性。使用适当的 API 系统 (BioMérieux, Marcy l'Étoile, 法国) 进行生物化学测试和革兰氏染色后, 通过显微镜检查确定微生物的身份。

[0111] 通过在 595nm 下测量吸光度的微量滴定发酵液稀释方法 (micro titre broth dilution method), 测定琥珀酸和柠檬酸对这些细菌的细菌生长的影响。所有体外实验在无菌的 96 孔平板 (Falcon 353072 微量滴定板, Becton Dickinson Labware, Meylan, 法国) 中以 200 微升的终体积按照下文所述来进行: 将在适当发酵液中含有约 10<sup>5</sup>CFU/ml 纯细菌的 100 微升悬浮液添加至以连续 2 倍稀释度含有琥珀酸或柠檬酸的 100 微升发酵液中, 或添加质 100 微升发酵液中作为对照。在对纯细菌的最适生长而言适当的温度下孵育适当时间后, 通过用 Multiskan Ascent (ThermoLabsystems, Helsinki, 芬兰) 测量 595nm 下的吸光度来测定生长抑制。

[0112] 通过从对照培养物的 OD<sub>595</sub> 中减去 24 小时或 48 小时后测试培养物的 OD<sub>595</sub>, 来测定培养物密度的降低。通过将培养物密度的降低表述为对照培养物 OD<sub>595</sub> 的百分比, 将其标准化。MIC<sub>90</sub> 对应于将培养物密度降低 90% (表示抑制测试的生物 90% 的生长) 所需的酸浓度 (MIC<sub>90</sub> 被定义为抑制生物 90% 生长所需的最小抑制浓度)。这些评价的结果展示



于图 1 到 4。

[0113] 优选地被选择的可能有害的微生物是共生的 *Escherichia coli*, 致病性 *Escherichia coli* K88, *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *Enteritidis* 和 *Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* 和 *Clostridium perfringens*, 对它们而言琥珀酸和柠檬酸的 MIC90 是相当的, 并优选地低于 31250  $\mu$  M (3.69g/l), 这比有益的革兰氏阳性 bacillus 如 *Lactobacillus acidophilus* 菌株的 MIC90 至少小 50%。对其他有益的革兰氏阳性 bacillus 如 *Lactobacillus fermentum* 菌株而言, 琥珀酸和柠檬酸的 MIC90 低于 125000  $\mu$  M。与有益细菌相比, 琥珀酸和柠檬酸对从小猪内含物中分离的有害细菌而言更有活性。

[0114] 结果在图 1 到 4 中进一步阐述。

[0115] • 图 1: 琥珀酸 (黑色曲线) 和柠檬酸 (灰色曲线) 针对 *Escherichia coli* 的体外抗微生物活性

[0116] • 图 2: 琥珀酸 (黑色曲线) 和柠檬酸 (灰色曲线) 针对 *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *Enteritidis* 和 *Typhimurium* 的体外抗微生物活性

[0117] • 图 3: 琥珀酸 (黑色曲线) 和柠檬酸 (灰色曲线) 针对 *Lactobacillus fermentum* 和 *Lactobacillus acidophilus* 的体外抗微生物活性

[0118] • 图 4: 琥珀酸 (黑色曲线) 和柠檬酸 (灰色曲线) 针对 *Clostridium perfringens* 和 *Enterococcus faecalis* 的体外抗微生物活性

[0119] 实施例 4

[0120] 评价断奶小猪膳食中琥珀酸的影响

[0121] 使用 72 只早期断奶的小猪。将动物分配进 18 个畜栏中 (每个畜栏 4 只动物)。对动物喂养基本膳食 (T1 组) 或添加 1% 由 DSM Fine Chemicals Linz, Austria 提供的琥珀酸的膳食 (T2 组)。

[0122] 如下将每个膳食处理指派给 9 个重复组 (36 只小猪 / 处理):

[0123] • 膳食和喂养: 基于玉米、大麦、干燥的乳清和大豆粉作为主要饲料成分 (18.7% CP, 14.2MJ ME/kg) 的标准起始者膳食, 以丸状形式无限制地喂养。测试制品: DSM Fine Chemicals, Linz, Austria 提供的琥珀酸。

[0124] • 膳食处理: :

[0125] T-1) 阴性对照 (基础膳食)

[0126] T-2) 1.0% 的琥珀酸。

[0127] • 实验参数: 活重增加 (第 0、14、24 和 36 天), 每日体重增加 (第 0-14 天、14-24 天、24-36 天和总体), 饲料摄入 (每个阶段 & 总体), 饲料 / 增重比 (每个阶段 & 总体), 死亡率。

[0128] 这些结果概括于下表 1 和 2 中。

[0129] 表 1

处理化合物膳食内含物(%)	T-1 阴性对照 0	T-2 琥珀酸 1.0
小猪活重(kg)		
-初始, 第 0 天	8.39	8.51
-第 14 天	12.10	12.01
-第 24 天	16.80	16.90
-最终, 第 36 天	24.59	24.32
处理化合物膳食内含物(%)	T-1 阴性对照 0	T-2 琥珀酸 1.0
每日体重增加(g)		
-第 0-14 天	265	250
-第 14-24 天	469	489
-第 24-36 天	649	618
-总体, 第 0-36 天	450	439
-指数(%)	100.0	97.6

[0131] 表 2

处理化合物膳食内含物(%)	T-1 阴性对照 0	T-2 琥珀酸 1.0
每日饲料摄入(g)		
-初始, 第 0 天	493	368
-第 14 天	660	649
-第 24 天	894	869
-最终, 第 36 天	673	613
饲料转化率 (饲料/增重比)		
-第 0-14 天	1.86	1.48
-第 14-24 天	1.43	1.33
-第 24-36 天	1.38	1.41
-总体, 第 0-36 天	1.50	1.40
-指数(%)	100.0	93.3

[0133]

[0134] 结果清楚地显示, 1.0% 膳食水平琥珀酸的膳食添加引起饲料摄入的某数量的减少, 特别是在第一试验阶段 (第 0-14 天, -25.4%) 期间, 这导致饲料转化率的可观提高。

[0135] 实施例 5

[0136] 评价用琥珀酸补充膳食对断奶小猪的畜牧学表现的影响

[0137] 使用四十八只 28 日龄的大白猪 x 长白猪 (Large-White x Landrace) 断奶小猪, 其初始体重为 8.1±0.88kg。将动物分配进两个相等的组 (A 和 B) 中, 并在环境受控的房间中以 7 只 (每组 2 个亚组) 和 5 只动物 (每组 2 个亚组) 的亚组居住于笼中。每个笼子具有涂有塑料的焊接钢丝地板 (plastic-coated welded wire floor), 并装有 2 个喂水奶嘴 (water nipple) 和 2 个不锈钢饲喂器 (feeder)。室温初始为 27℃, 并且每周降低约 2℃ 直至 21-22℃。整个实验期间的环境湿度百分比为 50%。

[0138] 用基础膳食 (A 组) 或以 0.5% 水平添加琥珀酸 (DSM Fine Chemicals) 的膳食 A (B 组) 将动物喂养 29 天。配制基础膳食 A 以满足动物的需求。基础膳食的组成展示于表 3 中。

[0139] 针对 29 天的试验持续时间评价表现。每日控制健康状态。

[0140] 结果概括于表 4 和 5 中。

[0141] 摄取具有琥珀酸的膳食的组具有的 DWG 比针对对照组观察的 DWG 数值上更高 (+5%)。通过膳食补充数值上提高饲料摄入。

[0142] 本实验证实以 0.5% 水平在小猪膳食中包括琥珀酸改进了断奶小猪的每日平均增重。

[0143] 表 3. 实验膳食的组成和特征 (%)

成分(%)	A	B
大豆粉	7.5	
小麦	18.8	
大麦	29	
马铃薯浓缩物	8	
玉米	10	
[0144] 燕麦粉	10	
甜菜浆	5.4	
甜菜糖	3.5	
大豆油	2.7	
小麦淀粉	1.6	
矿物质、合成的氨基酸、微量元素和维生素预混物(1)	3.5	
琥珀酸(%)	0	0.5

[0145] (1)- 不含有机酸的混合物

[0146] 表 4- 琥珀酸对小猪表现的影响。

[0147]

A (n=24)	B (n=24)
每日体重增加(g)	
217 ± 56	227 ± 66
(100)	(105)
体重增加(kg)	
6,28 ± 1,63	6,57 ± 1,91
(100)	(105)

[0148] 表 5- 琥珀酸对小猪表现的影响。

[0149]

A (n = 4)	B (n = 4)
饲料摄入(g/天)	
401 ± 45	416 ± 37
(100)	(104)

[0150]

[0151] 实施例 6

[0152] 评价不同剂量的琥珀酸在五周中对肉鸡生长表现的影响

[0153] 本试验 ( 试验 A ) 的一个目的是在五周的地板畜栏试验中评价琥珀酸对肉鸡小鸡生长性能的影响。琥珀酸以四种不同的剂量水平补充。

[0154] 将 1 日龄 (day-old) 的雄性和雌性肉鸡按照体重分为 20 只鸟的两组。将每组置于散落着刨花的一个地板畜栏 (floor pen) 中, 并分派给不同的膳食处理之一。每种处理用每组性别的 4 组重复进行

[0155] 鸟能够不加限制地接触饲料和自来水。在第 1、22 和 36 天称重动物。测定中间阶段的饲料消耗, 并计算体重增加和饲料转换比 (FCR)。

[0156] 鸡接受基于大豆粉和小麦作为主要成分的膳食 (表 6)。除不含产物补充的对照处理之外, 其他处理以每 kg 饲料 10mg 包含抗生素阿维霉素 (Maxus 200) 作为阳性对照, 和以每 kg 饲料 2.5g、5.0g、7.5g 和 10.0g 包含琥珀酸 (lot S7501 (Sigma product))。

[0157] 在顶部对饲料添加大量琥珀酸, 与适当量的作为运载体的玉米淀粉混合:

[0158] 初始者膳食 (starter diet): 对照 = 每 kg 饲料 0mg 琥珀酸 + 3000mg 玉米淀粉, 对后续处理而言, 用琥珀酸代替玉米淀粉: 每 kg 饲料 750mg 琥珀酸 + 2250mg 玉米淀粉, 每 kg 饲料 1500mg 琥珀酸 + 1500mg 玉米淀粉, 每 kg 饲料 2250mg 琥珀酸 + 750mg 玉米淀粉, 每 kg 饲料 3000mg 琥珀酸 + 0mg 玉米淀粉。

[0159] 生长者膳食 (grower diet): 对照 = 每 kg 饲料 0mg 琥珀酸 + 5000mg 玉米淀粉, 对后续处理而言, 用琥珀酸代替玉米淀粉: 每 kg 饲料 1250mg 琥珀酸 + 3750mg 玉米淀粉, 每 kg 饲料 2500mg 琥珀酸 + 2500mg 玉米淀粉, 每 kg 饲料 3750mg 琥珀酸 + 1250mg 玉米淀粉, 每 kg 饲料 5000mg 琥珀酸 + 0mg 玉米淀粉。

[0160] 收集饲料样品以测定琥珀酸浓度（表 7）。

[0161] 对数据的统计学评价而言，针对每种膳食进行单因数变量分析（因数：处理）。指出显著的处理效果（ $p < 0.05$ ）时，随后用 Newman-Keuls 测试分析处理均值之间的差异。

[0162] 在表 8 中列出了起始者阶段（第 1-22 天）、生长者阶段（第 22-36 天）和从第 1 天到第 36 天的整个实验阶段的生长表现的结果。处理和性别之间没有显著的相互作用，因此展示了两种性别的合并结果。

[0163] 在起始者阶段中，与对照处理相比，补充琥珀酸显著改进了体重增加。用不同的琥珀酸包含水平获得了 3.9% 到 10.5% 范围内的改进。每 kg 饲料补充 5g 琥珀酸导致可与每 kg 饲料补充抗生素生长促进剂阿维霉素相比较的体重增加。与对照处理相比，每 kg 饲料包含 2.5g、7.5g 和 10g 琥珀酸将饲料转换比（FCR）显著改进 5.7%、5.2% 和 4.6%。

[0164] 从第 1 天到第 36 天的整个阶段中，通过琥珀酸补充在数值上改进了体重增加。与对照相比，每 kg 饲料补充 2.5g 和 7.5g 琥珀酸分别观察到 3.6% 和 4.5% 的数值改进。

[0165] 总而言之，有机酸看起来能有效改进肉鸡的生长表现。大部分有益的效果在起始者阶段发现。

[0166] 表 6. 基础膳食的组成

[0167]

成分 (%)	起始者	生长者
小麦	37.3	40.9
玉米	20.0	20.0
大豆粉 (50% CP)	35.1	31.9
大豆油	3.60	3.80
DL- 甲硫氨酸	0.15	0.05
DCP	1.95	1.55
CaCO <sub>3</sub>	0.65	0.53
NaCl	0.20	0.15
预混物 1	1.00	1.00
Acatec	0.06	0.06
二氧化钛	-	0.10
计算的含量：		
粗制蛋白质 (g/kg)	222	210

MEN(MJ/kg) <sup>2</sup>	12.5	12.7
赖氨酸(%)	1.2	1.1
甲硫氨酸+半胱氨酸(%)	0.9	0.7

[0168]

[0169] 1 包括维生素和微量矿物质

[0170] 2 用 EC- 等式计算

[0171] 表 7. 在实验膳食样品中分析的产物活性

处理	产物	剂量	琥珀酸含量 (g/kg 饲料)	
			起始者	生长者
A	对照	-	0	0
B	阿维霉素	10 mg/kg	0	0
C	琥珀酸	2.5 g/kg	2.48	2.54
D	琥珀酸	5.0 g/kg	4.97	5.09
E	琥珀酸	7.5 g/kg	7.5	9.60
F	琥珀酸	10.0 g/kg	9.85	10.13

[0172]

[0173] 表 8. 两种性别的表现 (第 1 天到第 36 天) 均值 ± 标准差

[0174]

产物	对照	阿维霉素	琥珀酸			
处理	A	B	C	D	E	F
剂量(mg/kg)	-	10 mg/kg	2.5 g/kg	5g/kg	7.5 g/kg	10 g/kg
pen x 鸟的数值	8x20	8x20	8x20	8x20	8x20	8x20
<b>第 1-22 天</b>						
体重增加(g)	954 <sup>C</sup>	992 <sup>BC</sup>	1046 <sup>A</sup>	991 <sup>BC</sup>	1054 <sup>A</sup>	1036 <sup>AB</sup>
	±34	±48	±49	±46	±67	±55

[0175]

	100	104.1	109.7	103.9	110.5	108.6
饲料摄入(g)	1381 <sup>A</sup>	1450 <sup>A</sup>	1427 <sup>A</sup>	1446 <sup>A</sup>	1445 <sup>A</sup>	1430 <sup>A</sup>
	±57	±100	±44	±63	±73	±72
	100	105	103.4	104.8	104.6	103.6
饲料转化率 (g 饲料/g 增重)	1.448 <sup>A</sup>	1.462 <sup>A</sup>	1.365 <sup>B</sup>	1.461 <sup>A</sup>	1.372 <sup>B</sup>	1.381 <sup>B</sup>
	±0.044	±0.102	±0.032	±0.052	±0.052	±0.051
	100	101.0	94.3	100.9	94.8	95.4
<b>第 22-36 天</b>						
体重增加(g)	1348 <sup>A</sup>	1366 <sup>A</sup>	1337 <sup>A</sup>	1320 <sup>A</sup>	1350 <sup>A</sup>	1311 <sup>A</sup>
	±92	±110	±50	±119	±131	±124
	100	101.4	99.2	98.0	100.2	97.3
饲料摄入(g)	2354 <sup>A</sup>	2412 <sup>A</sup>	2392 <sup>A</sup>	2347 <sup>A</sup>	2431 <sup>A</sup>	2442 <sup>A</sup>
	±111	±123	±66	±84	±146	±150
	100	102.5	101.6	99.7	103.3	103.8
饲料转化率(g 饲料/g 增重)	1.750 <sup>A</sup>	1.769 <sup>A</sup>	1.790 <sup>A</sup>	1.786 <sup>A</sup>	1.806 <sup>A</sup>	1.870 <sup>A</sup>
	±0.085	±0.072	±0.033	±0.130	±0.069	±0.114
	100	101.1	102.3	102.1	103.2	106.9
<b>第 1-36 天</b>						
体重增加(g)	2301 <sup>A</sup>	2359 <sup>A</sup>	2383 <sup>A</sup>	2311 <sup>A</sup>	2404 <sup>A</sup>	2347 <sup>A</sup>
	±105	±130	±93	±100	±183	±167
	100	102.5	103.6	100.4	104.5	102.0
饲料摄入(g)	3734 <sup>A</sup>	3860 <sup>A</sup>	3817 <sup>A</sup>	3793 <sup>A</sup>	3870 <sup>A</sup>	3868 <sup>A</sup>
	±159	±175	±99	±139	±211	±208
	100	94.3	102.2	101.6	103.7	103.6
饲料转化率(g 饲料/g 增重)	1.623 <sup>A</sup>	1.638 <sup>A</sup>	1.602 <sup>A</sup>	1.642 <sup>A</sup>	1.612 <sup>A</sup>	1.651 <sup>A</sup>
	±0.032	±0.040	±0.027	±0.053	±0.042	±0.068
	100	100.9	98.7	101.2	99.4	101.7

[0176]

[0177] 实施例 7

[0178] 评价用琥珀酸组合二氢丁香酚补充膳食对断奶小猪畜牧学表现的影响

[0179] 使用 120 只初始体重为  $8 \pm 0.84\text{kg}$  的 28 日龄大白猪 x 长白猪断奶小猪。将动物分配进五个相等的组 (A、B、C、D 和 E) 中,并在环境受控的房间中以 7 只 (每组 2 个亚组) 和 5 只动物 (每组 2 个亚组) 的亚组居住于笼中。每个笼子具有涂有塑料的焊接钢丝地板,并装有 2 两个喂水奶嘴和 2 个不锈钢饲喂器。室温初始为  $27^\circ\text{C}$ ,并且每周降低约  $2^\circ\text{C}$  直至  $21\text{--}22^\circ\text{C}$ 。整个实验期间的环境湿度百分比为 50%。

[0180] 分别用基础膳食 (A 组),或添加 0.5%琥珀酸 (批次 SYGB 106) 和 200ppm 二氢丁香酚 (批次 07339TT) 的膳食 A(B 组),添加 0.5%琥珀酸和 100ppm 二氢丁香酚的膳食 A(C 组),添加 0.25%琥珀酸和 200ppm 二氢丁香酚的膳食 A(D 组) 和添加 0.25%琥珀酸和 100ppm 二氢丁香酚的膳食 A(E 组) 将动物喂养 32 天。配制基础膳食 A 以满足动物的需求。基础膳食的组成展示于表 9 中。

[0181] 针对最初 12 天实验和整个观察阶段评价表现。每天控制健康状态。

[0182] 结果的统计学处理涉及均值和均值标准差的计算以及双因数分级变量分析。数学模型为:

$$[0183] \quad Y_{ijk} = \mu + A_i + B_{ij} + Z_{ijk}$$

[0184] 其中  $\mu$  是总体均值, $A_i$  是膳食影响, $B_{ij}$  是膳食和动物或围栏的组合影响, $Z_{ijk}$  是残余项。观察到显著的  $A_i$  影响而无  $B_{ij}$  影响时,在变量分析后进行学生“t”检验。这些计算使用 StatBox™(GRIMMER Logiciels, Paris, 法国, 2001) 进行。使用围栏作为实验单位分析饲料摄入和饲料转换比 (FCR) 数据,使用个体作为实验单位分析每日体重增加 (DWG)。

[0185] 结果显示与针对对照组观察的 DWG 相比,在两个观察阶段中所有补充组都具有更好的 DWG (每日体重增加) (表 10)。在最初 12 天,对照组和 D 与 E 组之间的差异是统计学显著的,B 和 C 组的差异非常接近显著性。饲料摄入通常被膳食补充提高 (表 3)。最初 12 天期间 FCR 在数值上被大幅改进,对所有观察阶段而言其以较缓和的形式被改进 (表 11)。

[0186] 本实验展示:与二氢丁香酚组合的琥珀酸改进了断奶小猪的畜牧学表现。

[0187] 表 9. 实验膳食的组成和特征 (%)



[0188]

成分(%)	A	B	C	D	E
大豆粉	7.5				
小麦	18.8				
大麦	29				
马铃薯浓缩物	8				
玉米	10				
燕麦粉	10				
甜菜浆	5.4				
甜菜糖	3.5				
大豆油	2.7				
小麦淀粉	1.6				
矿物质、微量元素和 维生素预混物(1)	3.5				
琥珀酸(%)	0	0.5	0.5	0.25	0.25
二氢丁香酚(ppm)	0	200	100	200	100

[0189] (1)-不含有机酸的混合物

[0190] 表 10- 与二氢丁香酚组合的琥珀酸对小猪体重增加和死亡率的影响。A- 基础膳食, B-A+0.5%琥珀酸+200ppm 二氢丁香酚, C-A+0.5%琥珀酸+100ppm 二氢丁香酚, D-A+0.25%琥珀酸+200ppm 二氢丁香酚和 E-A+0.25%琥珀酸+100ppm 二氢丁香酚

[0191]

A(n=24)	B(n=24)	C(n=24)	D(n=24)	E(n=24)
每日体重增加(g)- D 0-12				
98±42a (100)	128±46ab* (131)	128±43 ab ** (131)	151±39b (155)	144±37b (147)
每日体重增加(g)- D 0-32				
240±47 (100)	252±54 (105)	235±63 (98)	254±62 (106)	268±57 (112)
总体重增加(kg)- D 0-32				
7.68±1.49 (100)	8.08±1.74 (105)	7.51±2.03 (98)	8.12±1.97 (106)	8.57±1.83 (112)

[0192]

[0193] 动物:初始体重  $8 \pm 0.84\text{kg}$  的 28 日龄断奶幼畜;基于大豆粉、小麦和大麦的膳食; a, b- 同一行中具有不同上标字母的数值是统计学不同的 :a-b  $P < 0.005$  ;\*- $P < 0.07$  ;\*\*- $P < 0.06$ 。

[0194] 表 11- 与二氢丁香酚组合的琥珀酸对小猪饲料摄入和饲料转换比的影响。A- 基础膳食, B-A+0.5%琥珀酸+200ppm 二氢丁香酚, C-A+0.5%琥珀酸+100ppm 二氢丁香酚, D-A+0.25%琥珀酸+200ppm 二氢丁香酚和 E-A+0.25%琥珀酸+100ppm 二氢丁香酚

[0195]

A(n=4)	B(n=4)	C(n=4)	D(n=4)	E(n=4)
饲料摄入(g/天)- D 0-12				
$218 \pm 33$ (100)	$223 \pm 30$ (103)	$226 \pm 16$ (104)	$245 \pm 14$ (113)	$251 \pm 3$ (115)
饲料摄入(g/天)- D 0-32				
$418 \pm 43$ (100)	$436 \pm 51$ (104)	$419 \pm 45$ (100)	$453 \pm 45$ (108)	$470 \pm 12$ (112)
饲料转化比(kg/kg)- D 0-12				
$2,972 \pm 1,331$ (100)	$1,922 \pm 0,234$ (65)	$1,838 \pm 0,269$ (62)	$1,655 \pm 0,128$ (56)	$1,75 \pm 0,144$ (59)
饲料转化比(kg/kg)- D 0-32				
$1.83 \pm 0.08$ (100)	$1.769 \pm 0.04$ (97)	$1.799 \pm 0.06$ (98)	$1.786 \pm 0.05$ (98)	$1.748 \pm 0.09$ (96)

[0196] 动物:初始体重  $8 \pm 0.84\text{kg}$  的 28 日龄断奶幼畜;膳食基于大豆粉、小麦和大麦。

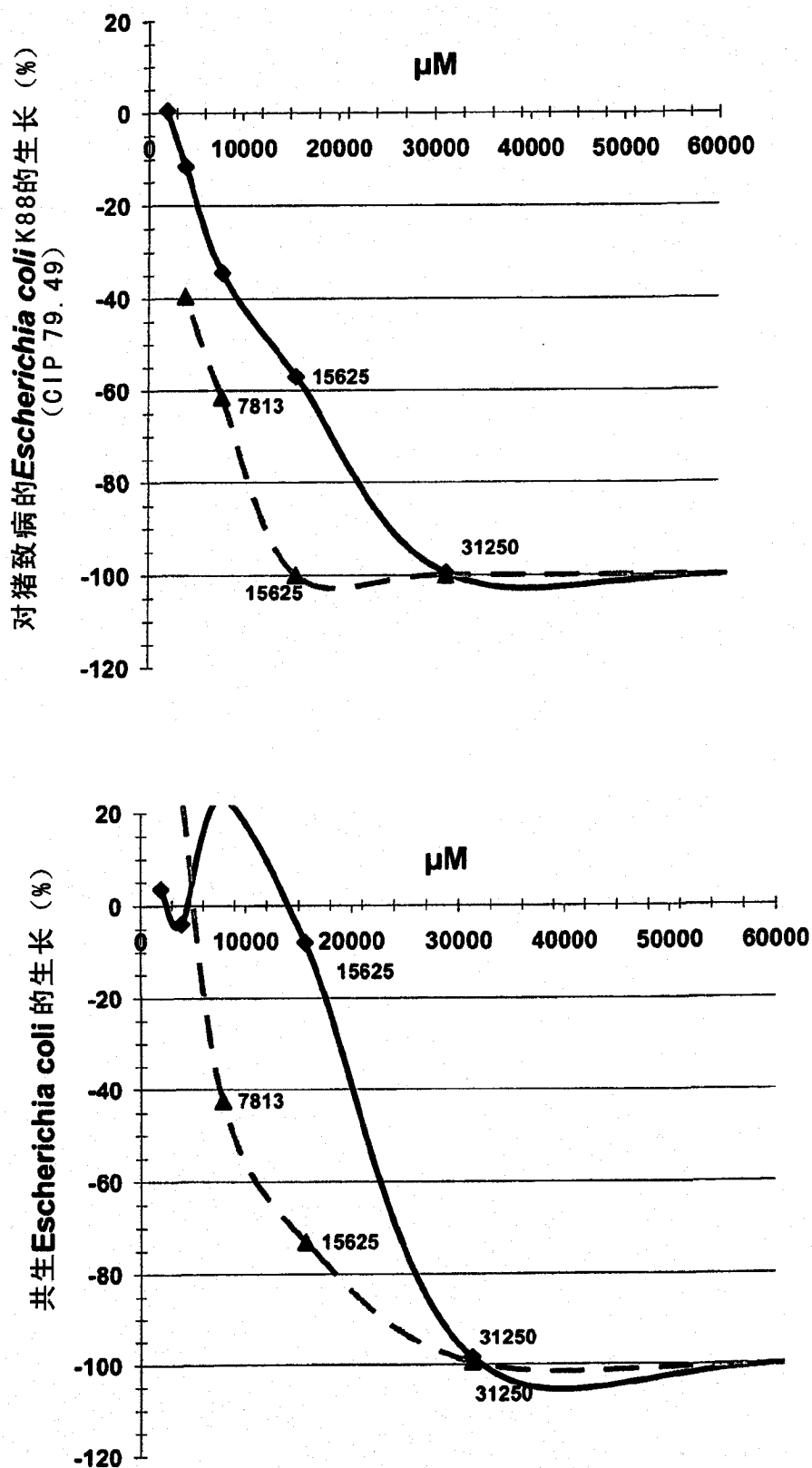


图 1

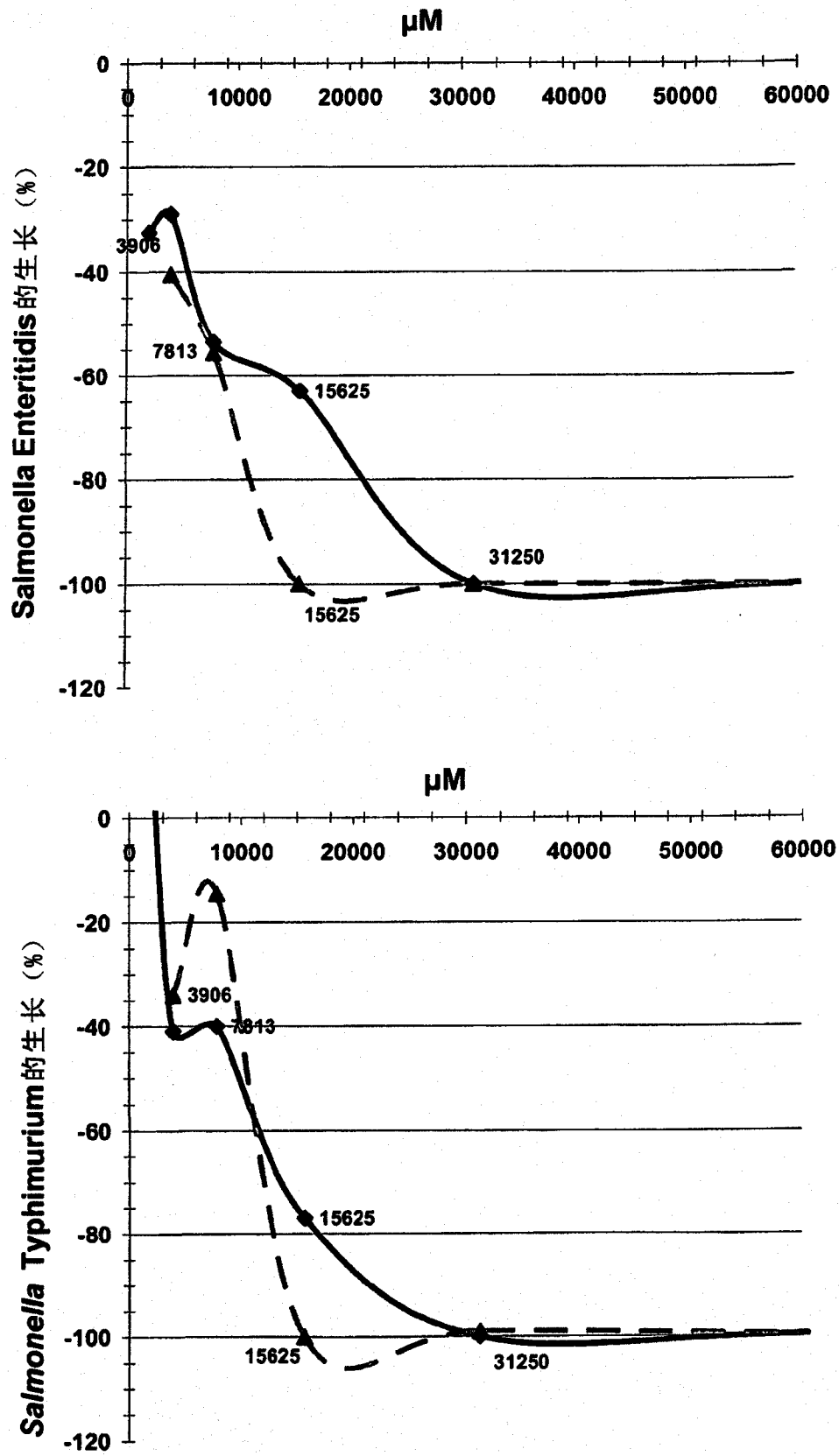


图 2

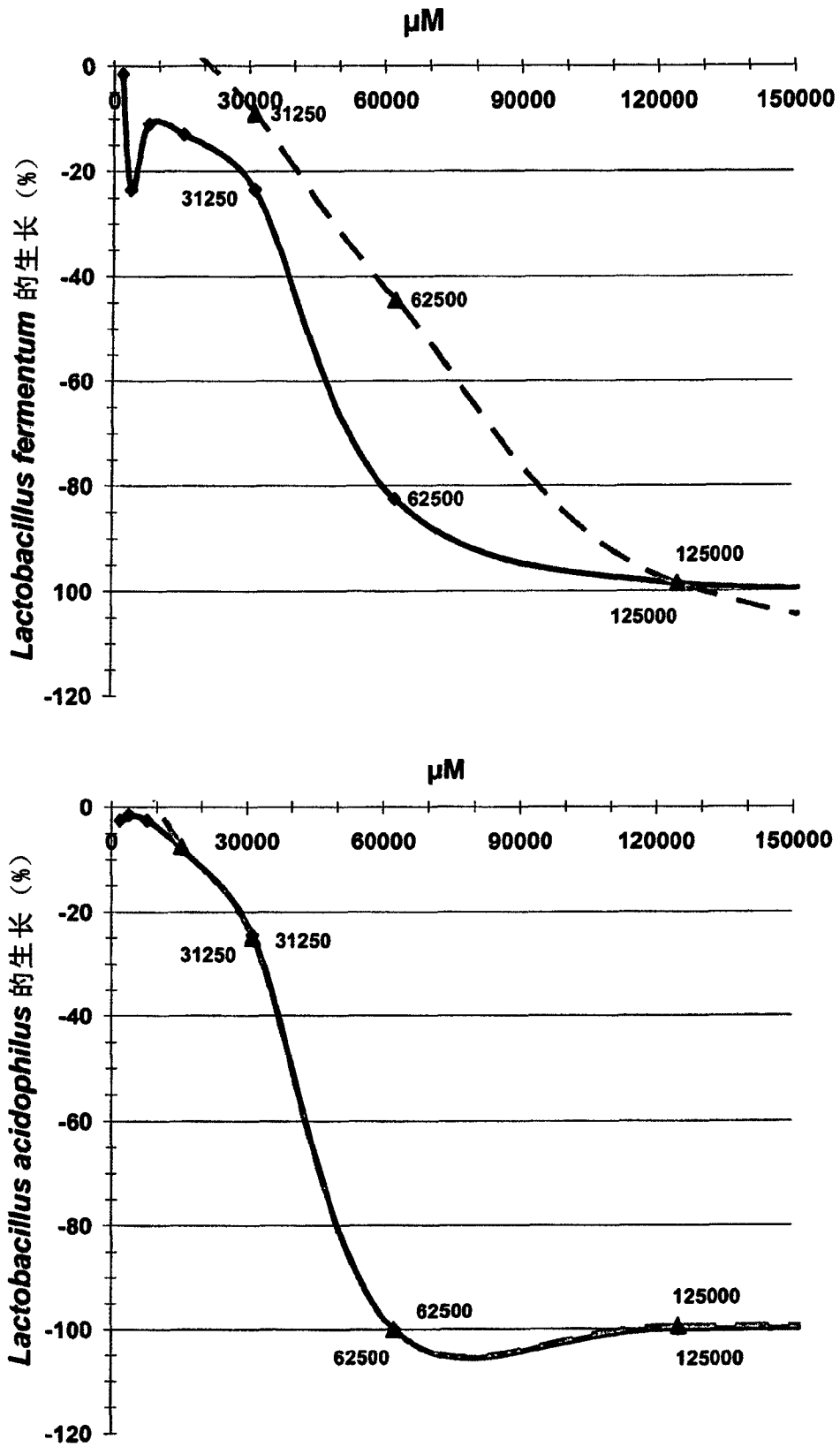


图 3

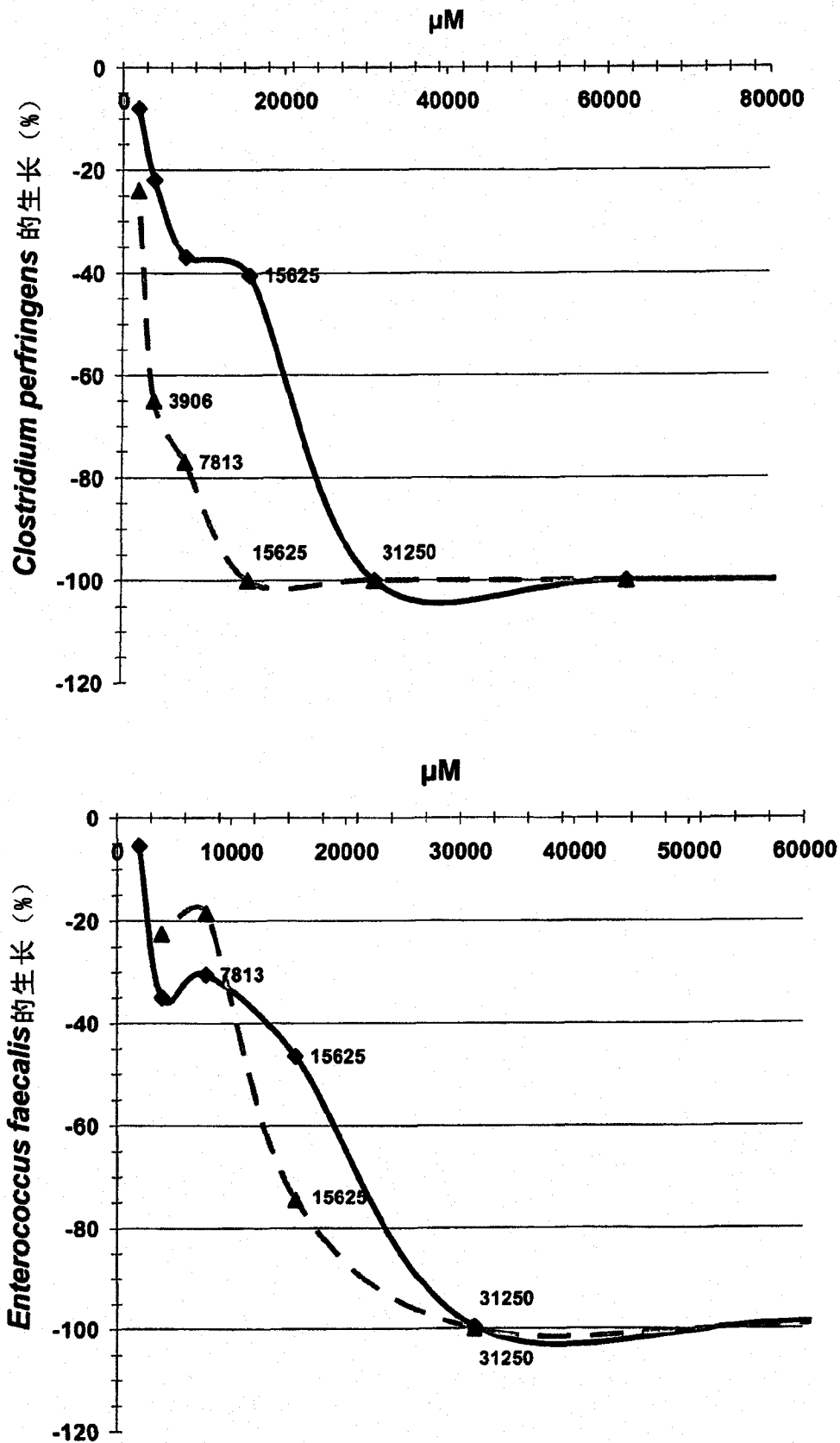


图 4