

Vurdering af reduktionspotentiale for stoffet X

Rådgivningsnotat fra DCA – National Center for Fødevarer og Jordbrug

Af Mette Olaf Nielsen

Institut for Husdyrvidenskab, Aarhus Universitet

Datablad

Titel:	Vurdering og uddybning af metanreduktionspotentiale for stoffet
Forfatter(e):	Professor Mette Olaf Nielsen, Institut for Husdyrvidenskab, Aarhus Universitet
Fagfællebedømmelse:	Seniorrådgiver Christian Friis Børsting, Institut for Husdyrvidenskab, Aarhus Universitet
Kvalitetssikring, DCA:	Specialkonsulent Klaus Horsted, DCA Centerenheden
Rekvirent:	Fødevarestyrelsen
Dato for bestilling/levering:	17.05.2021 / 26.05.2021
Journalnummer:	2021-0241807
Finansiering:	Besvarelsen er udarbejdet som led i "Rammeaftale om forskningsbaseret myndighedsbetjening" indgået mellem Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri og Aarhus Universitet under ID nr. 21-H3-17 i arbejdsprogrammet til "Ydelsesaftale Husdyrproduktion 2021-2024".
Ekstern kommentering:	Nej
Eksterne bidrag:	Nej.
Kommentarer til besvarelse:	<p>I besvarelsen er det kemiske navn for stoffet kaldet X hemmeligholdt af hensyn til et igangværende arbejde omkring patentering. De to virksomheder, DLG og Vlofoss, er ejere af de immaterielle rettigheder vedrørende viden om den metanreducerende effekt af stoffet X, der er observeret ved tildeling til malkekvæg.</p> <p>Dette betyder, at det i rapporten ikke har været muligt at henvise detaljeret til tidligere publicerede artikler vedrørende stoffets afprøvning på andre drøvtyggere, men alene til eksistensen af sådanne artikler, for ikke at kompromittere fremtidige patentmuligheder såfremt nærværende rapport offentliggøres.</p> <p>Rapporten præsenterer resultater, som ved rapportens udgivelse ikke har været i eksternt peer review eller er publiceret andre steder. Ved en evt. senere publicering i tidsskrifter med eksternt peer review vil der derfor kunne forekomme ændringer.</p>
Citeres som:	Nielsen MO. 2021. Vurdering og uddybning af metanreduktionspotentiale for stoffet X. Antal sider: 9. Rådgivningsnotat fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet, leveret: 26.05.2021.
Rådgivning fra DCA:	Læs mere på https://dca.au.dk/raadgivning/

Baggrund

Fødevarestyrelsen har i en bestilling sendt til DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug ønsket et notat, der forklarer status på forskning af stoffet kaldet X, reduktionspotentialen og en uddybende forklaring på estimeringen af reduktionspotentialen. Dette med baggrund dels i en generel stor bevågenhed på udviklingen af metanreducerende fodertilsætningsstoffer som stoffet X, og dels på baggrund af en mailkorrespondance med FVST og AU den 11.5.2021, hvor der er angivet et "estimeret reduktionspotentialen for stoffet "X" på 20-30 %, og potentielt op til 40 %" (forfatterens anmærkning: dette sidste i kombination med andre virkemidler). Det blev oplyst, at "teknologien stadig er præmatur, og der udestår derfor stadig en betydelig forskningsindsats for at kunne kvantificere den endelige reduktion og udelukke negative afledte effekter".

Besvarelse

1) Status på forskning af stoffet kaldet X

Stoffet X er et såkaldt GRAS stof (Generally Regarded As Safe), dvs det er godkendt til brug i fødevarerindustrien uden øvre grænseværdier for indhold i fødevarer, men det er pt. ikke godkendt som foderadditiv til husdyr. Det formodes at stoffet X er en specifik inhibitor af det hastighedsbegrænsende enzym i metansyntesen, som særlige mikroorganismer (metanogene arkæer) i drøvtyggers formaver er ansvarlig for. I syntesen af metan (CH₄) forbruges to andre gasser, der dannes af bakterier, når foderet forgæres, nemlig kuldioxid (CO₂) og brint (H₂). Der dannes også vand (H₂O) som slutprodukt, som vist i følgende overordnede reaktionsligning: $CO_2 + 4 H_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$

I den videnskabelige litteratur findes der så vidt vides indtil videre kun 2 videnskabelige artikler, der beskriver stoffets effekt på metanemission fra levende drøvtyggere, og det er næsten 50 år gamle forsøg, hvor stoffet blev tildelt i foderet til får, der i forvejen var udsat for en særlig form for forgiftning. Hos disse forgiftede får medførte tildeling af stoffet en markant reduktion af deres metanemission.

Forskning med stoffet X startede i Danmark i sommeren 2019, som led i en række screeningsforsøg ved Københavns Universitet med henblik på at identificere stoffer eller biomasser med betydelig evne til at reducere den enteriske metandannelse hos drøvtyggere. Disse forsøg blev udført *in vitro*, dvs under laboratorieforhold, ved brug af en særlig opsætning, der simulerer foderets omsætning i drøvtyggers formaver.

Som det fremgår af Figur 1, var stoffet X i stand til stort set at eliminere metandannelsen, når det i forskellige doser blev tilsat majsensilage, som er en normal hovedbestanddel af grundfoderet til kvæg i danske besætninger, i forhold til en normal produktion fra majsensilage på 25 ml CH₄ ved STP (Standard Temperatur

og Tryk)/g ensilage tørstof. Der blev ikke observeret en negativ effekt på vomnedbrydeligheden af majsensilagen.

Dernæst blev der i december 2019 udført et pilotforsøg ved Aarhus Universitet, hvor stoffet for første gang nogensinde blev tildelt til 2 højtydende malkekøer. Køerne blev placeret i respirationskamre i 2 døgn for at måle udskillelsen af gasser, herunder metan og brint (hastighedsbegrænsende substrat for metandannelsen). Det første døgn blev køerne fodret og malket som normalt. På andendagen fik de i forbindelse med fodring og malkning om morgenen (kl ca. 7.00 begge dage) og aftenen (ca. 17.30 begge dage) indgivet en støddosis på hhv 180 og 360 mg af stoffet gennem en fistel direkte ind i vommen. Figur 2 viser hvordan koncentration af metan (Ko 1: røde kurver, Ko 2: grønne kurver) og brint (Ko 1: gule kurver, Ko 2: orange kurver) ændrer sig gennem døgnet i luft, der kontinuerligt blev suget ud af kammeret i forsøgsperioden. I forbindelse med fodring og malkning kl 07:00 og 17:30 blev dørene til respirationskamrene åbnet, hvilket ses som et dyk i de røde og grønne kurver for metankoncentration som resultat af opblanding med atmosfærisk luft.

Panel A i figur 2 viser målinger af metan- og brintkoncentrationer i kammerluften det 1. døgn, og afspejler altså køernes normale niveau for enterisk produktion af metan og brint. Middelniveauet for metankoncentration i kammerluften de første ca 4 timer efter hver af de to fodringer er angivet ved en vandret hvid streg. Det ses, at produktionen af brint normalt er meget lav (gule og orange kurver ligger tæt på 0, bortset fra små toppe lige efter fodring).

Panel B) viser målinger det 2. døgn, hvor der blev tildelt en støddosis på 180 hhv 360 mg af stoffet X direkte i vommen gennem en vomfistel kl 07.00 hhv 17:00. Der blev observeret en akut og dosis afhængig reduktion i metanemission, idet de røde og grønne kurver ikke nåede op på niveau med den vandrette hvide streg, der fortsat angiver niveauet observeret dag 1. Ved den højeste dosis var reduktionen i metanproduktion reduceret med omkring en tredjedel til halvdelen af det der blev målt dagen før. Det ses også, at effekten af stoffet X på metanemission aftog gradvist med tiden, hvilket ses ved, at de røde og grønne kurver gradvist over tid nærmer sig det niveau, der blev målt dag 1. Dette skyldes formodentlig at stoffet X gradvist passerer ud af vommen og videre i fordøjelsessystemet sammen med unedbrudte foderrester.

Samtidig med reduktion i emission af metan blev der lige efter tildeling af stof X observeret en voldsom stigning i kammerluftens koncentration af brint (gule og orange kurver i Figur 2 Panel B). Ved den højeste tildeling af stof X steg koncentrationen af brint til næsten samme niveau som koncentrationen af metan. Dette understøtter hypotesen om at stoffet X inhiberer omdannelsen af brint til metan.

Disse resultater bekræftede, at stoffet X har en markant og akut hæmmende virkning på metandannelsen ud fra brint i vommen hos normale malkekøer.

2) Reduktionspotentialet og uddybende forklaring på estimering af dette potentiale

På baggrund af de lovende resultater af pilotforsøget, blev der i 2020 indsendt en ansøgning til Innovationsfond Danmark, som efterfølgende har bevilget støtte til opstart af et nyt projekt i 2021: No-Methane. Projektet har til formål at udvikle et tredobbelt-virkemiddel-foderadditiv til reduktion af metanemission fra kvæg. De 3 virkemidler er: 1) stoffet X, som er en direkte hæmmer af det hastighedsbegrænsende enzym i metansyntesen, 2) probiotiske bakterier, der kan fange og fastholde overskudsbrint og omdanne det til mikrobiel biomasse, der kan udnyttes af koen, og 3) probiotisk bakterier og arkæale virus (normalt forekommende i vommen), der direkte kan undertrykke populationen af de metanogene arkæer i vommen.

Det første forsøg med køer i projektet er et såkaldt romerkvadrat forsøg, hvor 4 køer i hver af 4 perioder af 2 ugers varighed får tildelt 4 forskellige doser af stoffet X (0, 320, 640, 800 mg/dag). Analysearbejdet er ikke afsluttet, men målinger af gasemission i respirationskamre (se Figur 3) bekræftede, at stoffet X tildelt som støddosis direkte i vommen (dosis ligeligt fordelt på 2 daglige tildelinger) kan reducere metanemission fra malkekøer på en dosis-respons afhængig måde, og med op til 79% ved en dosering på i alt 800 mg (fra 559 til 116 L/døgn, Figur 3 Panel C). Ved så høj reduktion i metanemission ses imidlertid også et dramatisk fald i både foderoptagelse (50%, Figur 3 Panel B) og mælkeydelse (33%, Figur 3 Panel A). Ved den højeste dosis var faldet i foderoptagelse ledsaget af en stigning på 1400% i udskillelsen af brint (fra 19 til 266 L/døgn). Det er vores hypotese, at en stor stigning i brinttrykket i vommen kan være en del af forklaringen på at foderoptagelsen hæmmes, idet dette fald i foderoptagelse også er observeret ved brug af høje doser af andre metanhæmmende stoffer (upublicerede studier af P. Lund et al, Aarhus Universitet). I forsøget blev stof X som nævnt tildelt som en støddosis direkte i vommen 2 gange dagligt. Vi forventer, at den negative effekt på foderoptagelse og mælkeydelse vil være væsentligt mindre udtalt, hvis/når stoffet i stedet tildeles som ingrediens i f.eks. en vitamin/mineral pille der kan blandes i en fuldfoderration, som indtages af køerne jævnt henover døgnet. Under alle omstændigheder ser stof X ud til at have en væsentlig mere markant negativ effekt på metanemission end på både foderoptagelse og mælkeydelse.

Ved en dosering af stoffet X på 640 mg/dag blev metanemissionen reduceret med 53% uden at mælkeydelsen blev påvirket signifikant, omend der var et numerisk fald på ~4 kg EKM, samtidig med et fald i foderoptagelsen på 33 % og en 1150% stigning i den daglige udledning af brint. Hvis der havde indgået et større antal køer i forsøget, ville faldet i mælkeydelsen formodentlig have været signifikant, og det er urealistisk at forestille sig at mælkeydelsen kan opretholdes uændret over en længevarende periode ved så stort et fald i foderoptagelsen.

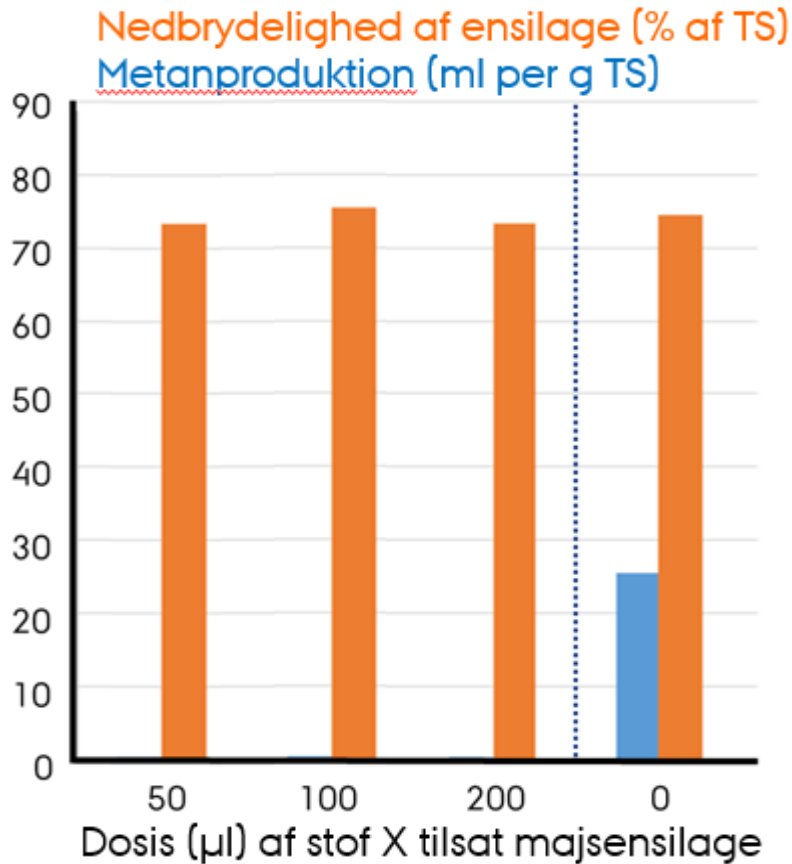
I den sammenhæng skal det bemærkes, at en given kvantitativ reduktion i volumen af emitteret metan (i henhold til den kemiske ligning vist i Afsnit 1) er forbundet med et 4 gange så stort volumen af uforbrugt brint i metandannelsen. Som det fremgår af Figur 3 Panel c, gav en reduktion i metanemission på ca 330 og 450 L/dag efter tildeling af 640 hhv 800 mg af stof X imidlertid kun anledning til en stigning i brintemis-

sion på hhv ca 200 og 250 L/d. Kommende forsøg vil skulle afklare, om det kan være udtryk for en omdirigering af brint til syntese af mikrobiel biomasse, som kan udnyttes af koen. Det ville i så fald kunne forklare, hvorfor stof X havde en væsentlig mindre negativ effekt på mælkeydelsen end på foderoptagelsen.

På baggrund af ovenstående har vi skønsmæssigt anslået, at det vil være realistisk at tildele en daglig dosis af stof X til malkekøer, som ligger et sted imellem 320 og 640 mg/dag, hvorved reduktionspotentialet for stoffet X estimeres til at ligge i området 20-30%, udfra det ønskelige i at opretholde både mælkeydelse og foderoptagelse på normalt niveau. Såfremt det i No-Methane projektet lykkes at udvikle mikrobielle virkemidler, der kan anvendes i kombination med stoffet X for at binde overskudsbrint, kan det rent hypotetisk være muligt at den daglige dosering af stoffet X kan hæves og/eller brinttilgængeligheden nedsættes så meget, at man i synergi mellem de to virkemidler vil kunne opnå et reduktionspotentialt op imod 40% uden samtidige negative effekter på mælkeydelse eller foderoptagelse.

3) Konklusion

Så vidt vides er der på verdensplan med malkekøer kun udført de ovennævnte 2 kortvarige forsøg på Aarhus Universitet. Forsøgsgrundlaget for kvantificering af den metanreducerende effekt af stoffet X på langt sigt er derfor endnu ikke tilstede. Det vil være nødvendigt at udføre langtidsstudier for at tilvejebringe denne viden, og også for at afdække om der evt. kan være afledte negative effekter ved anvendelse af denne teknologi. Der udestår derfor stadig en betydelig forskningsindsats for at kunne kvantificere reduktionspotentialt og udelukke eventuelle negative afledte effekter på køernes sundhed og den sundhedsmæssige kvalitet af mælk og oksekød til konsum. Det forventes, at et stort bidrag til denne viden vil blive skabt i det nystartede Innovationsfond støttede projekt, No-Methane, hvor det også vil blive afdækket i hvor høj grad det vil være muligt at opnå synergivirkninger mellem stoffet X og mikrobielle virkemidler med henblik på reduktion af metanemission fra kvæg.



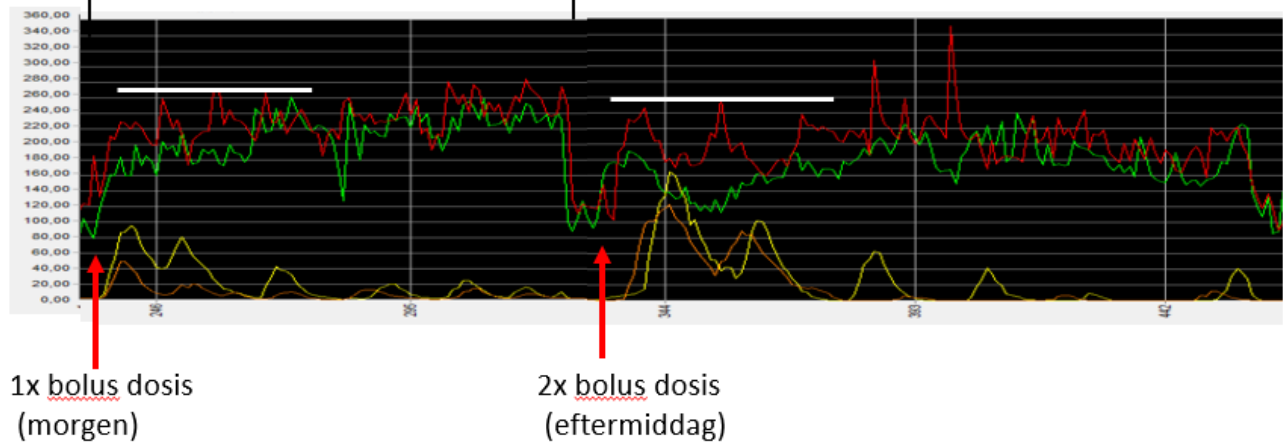
Figur 1: In vitro simuleringer af vomomsætningen hos kvæg viste, at stoffet X i 3 forskellige doser (50-200 µl af en opløsning) stort set kunne reducere produktionen af metan (blå søjler forsvinder) under forgæring af majsensilage uden at reducere vomnedbrydeligheden af majsensilagen (orange søjler forbliver uændret høje).

I det anvendte in vitro system (Ankom^{RF}, USA) blev majsensilage (0.5 g) inkuberet under anaerobe forhold i 48 timer sammen med 90 mL af et inkubationsmedie bestående af vomvæske tilsat buffer. Det totale volumen gas produceret i løbet af inkubationsperioden blev målt (mL ved STP: Standard Temperatur og Tryk), og koncentrationen af metan (CH₄) i den producerede gas blev bestemt ved gaschromatografi. TS: tørstof (M Mansouryar, HH Hansen og MO Nielsen, Upubliceret, Københavns Universitet)

A) Metan- og brintkoncentrationer i kammerluft (ppm) dag 1 af forsøget



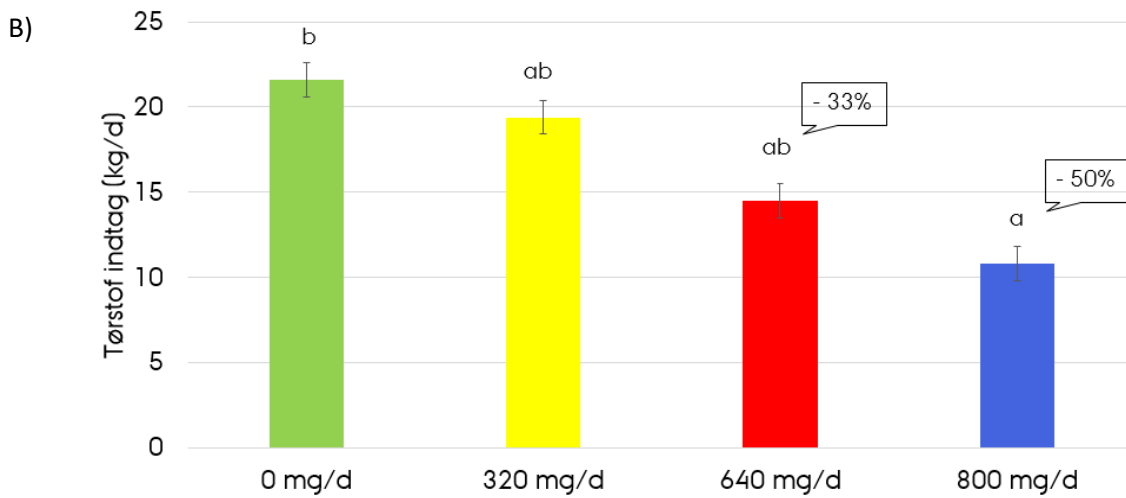
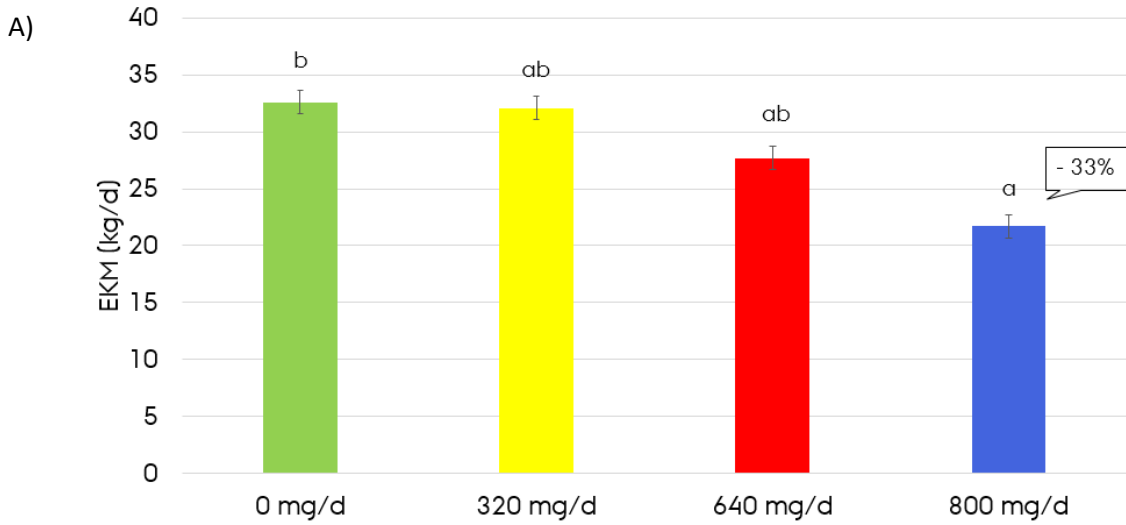
B) Metan- og brintkoncentration i kammerluft (ppm) dag 2 af forsøget



Figur 2: Resultater fra pilot forsøg med 2 vomfistulerede køer placeret i hver sit respirationskammer i 2 døgn for måling af gasemission. Figuren viser hvordan koncentration af metan (ppm; Ko 1: røde kurver, Ko 2: grønne kurver) og brint (ppm; Ko 1: gule kurver, Ko 2: orange kurver) ændrer sig gennem døgnet i luft, der kontinuerligt suges ud af kammeret. Køerne blev fodret og malket kl 07:00 og 17:30, hvor dørene til kamrene blev åbnet, hvilket ses som et dyk i de røde og grønne kurver for metankoncentration som resultat af opblanding med atmosfærisk luft.

Panel A) viser målinger det 1. døgn, og afspejler køernes normale niveau for metan- og brintemission. Det ses at emissionen af brint er meget lav (gule og orange kurver ligger tæt på 0, bortset fra små toppe lige efter fodring). De hvide vandrette streger angiver et middelniveau af metankoncentration i kammerluften de første 4-6 timer efter fodring.

Panel B) viser målinger det 2. døgn, hvor der blev tildelt en støddosis på 180 hhv 360 mg af stoffet X direkte i vommen gennem en vomfistel kl 07:00 hhv 17:00. Der blev observeret en akut og dosisafhængig reduktion i metanemission, idet de røde og grønne kurver ikke nåede op på niveau med den vandrette hvide streg, der angiver niveauet observeret dag 1. Effekten af stoffet X på metanemission aftog gradvist med tiden, hvilket ses ved at de røde og grønne kurver gradvist over tid nærmer sig det niveau, der blev målt dag 1. Samtidig med reduktion i emission af metan ses lige efter tildeling af stof X en voldsom stigning i emissionen af brint (gul og orange kurve). Ved den højeste tildeling af stof X steg koncentrationen af brint i kammerluften til omtrent sammeniveau som koncentrationen af metan (Nielsen et al., Upubliceret. Aarhus Universitet)



C)

Gas emission	Daglig dosis af stof X			
	0 mg/d	320 mg/d	640 mg/d	800 mg/d
CH ₄ (L/d)	559 ^b	501 ^b	262 ^a	116 ^a
H ₂ (L/d)	19.0 ^a	55.9 ^{ab}	215.5 ^{bc}	266.4 ^c

Callouts for CH₄: -53% (640 mg/d vs 0 mg/d), -79% (800 mg/d vs 0 mg/d).
 Callouts for H₂: +1150% (640 mg/d vs 0 mg/d), +1400% (800 mg/d vs 0 mg/d).

Figur 3: Effekt af daglig tildeling af stoffet X på A) produktion af energikorrigeret mælk (EKM; kg/dag), B) indtag af fodertørstof (kg/dag), samt C) emission af metan (CH₄) og brint (H₂) (L/dag). Forsøget blev udført med 4 malkekøer, der i 4 perioder af 2 uger fik tildelt forskellige støddoser af stoffet X direkte ind i vommen gennem en vomfistel i forbindelse med de to daglige fodringer (M Thorsteinsson et al. Upubliceret, Aarhus Universitet)