



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **148643 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **2506/78**

(51) Int.Cl.⁴: **A 23 K 1/165**

(22) Indleveringsdag: **06 jun 1978**

A 23 K 1/17

(41) Alm. tilgængelig: **28 dec 1978**

(44) Fremlagt: **26 aug 1985**

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: **27 jun 1977 DE 2728850**

(71) Ansøger: ***HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN; Duesseldorf-Holthausen, DE.**

(72) Opfinder: **Gunter *Hiller; DE.**

(74) Fuldmægtig: **Firmaet Chas. Hude**

(54) **Antibiotikum- og enzymholdig svinefoderblan-
ding**

Svinefoder, som det idag sædvanligvis anvendes ved intensivt svinehold, der indeholder en række tilsætningsstoffer med profylaktisk og/eller nærende virkning. Hertil hører bl.a. antibiotika og enzymer. Medens anvendelsen af antibiotika allerede er trængt igennem i blandingsfoder af alle typer, er enzymer i praksis endnu ikke blevet anvendt i større omfang.

De i det moderne intensive svinehold anvendte foderblandinger er i al-

mindelighed optimerede så meget med hensyn til alle næringsstofkomponenter, at en yderligere forbedring ikke uden videre synes mulig. Det har dog overraskende vist sig, at også optimalt sammensat foder kan forbedres med hensyn til foderudnyttelse og/eller den dermed opnåelige vægttilvækst, når man til dette foder tilsætter bestemte antibiotika sammen med proteolytiske enzymer.

Opfindelsen angår følgelig en svinefoderblanding på basis af kulhydrater, æggehvite, fedtstoffer og eventuelt sædvanlige tilsætningsstoffer, kendetegnet ved et indhold af 5-50 ppm af antibiotikumet tylosin og en sådan mængde sure proteaser fra *Rhizopus rhizopodiformis* eller *Aspergillus niger* med virkningsspektrum mellem pH-værdi 2,5 og 6,5.

Antibiotikumet tylosin hører til gruppen af makrolidantibiotika og udvindes på kendt måde ved fermentation af *Streptomyces fradiae*. Den empiriske sumformel er: $C_{45}H_{77}NO_{17}$.

Egnede sure proteaser fås ved dyrkning af mikroorganismer og fraskilning fra næringsopløsningen. Fremgangsmåderne hertil kendes, jf. tysk patentansøgningen P 25 28 490.6. Sådanne proteaser har et særligt bredt virkningsspektrum i det svagt sure område mellem pH-værdi 2,5 og 6,5.

Fra Chemical Abstracts, bind 75 (1971), abstracts nr. 138.268y, Vlaams Diergeneesk. Tijdschr. 1971, 40(5), 217-223 (Neth) er det kendt, at tylosin i en vægtmængde af samme størrelsesorden som i foderblandingen ifølge opfindelsen virker væksthæmmende og forbedrer foderudnyttelsen, når man fodrer svin med et foder, der indeholder det nævnte antibiotikum. Det er endvidere alment kendt, at proteaser forbedrer dyrs udnyttelse af tilstedeværende protein, carbonhydrat og fedtstof i vegetabiliske eller animalske foderstoffer og medfører en hurtigere vægttilvækst med mindre foderforbrug pr. kg vægttilvækst, jf. f.eks. dansk patentskrift nr. 101.397, tysk offentliggørelsesskrift nr. 1.084.123 og 1.212.826 samt US-patentskrift nr. 2.878.123.

Det har imidlertid overraskende vist sig, at en kombination af tylosin og de sure proteaser fra *Rhizopus rhizopodiformis* eller *Asper-*

gillus niger giver en forbedring i tilvæksten og foderanvendelsen, der er bedre end den additive virkning, dvs., de to komponenter giver en synergistisk virkning.

Foderblandinger, som er i handelen, er såvidt muligt sammensat optimalt med hensyn til de enkelte dyrearters specielle fornødenheder. Grundlaget udgøres af kulhydrater frem for alt af kornkomponenter, majs og lignende. Som æggehvidebærer tjener i første række soyaskrå, fiske-mel, dyrekropsmel, klid og lignende. Manglende aminosyre, f.eks. methionin eller lysin, kan desuden tilsættes. Fedtstoffer tilsættes i form af vegetabiliske eller animalske fedtstoffer eller affaldsfedtstoffer. Til legemsopbygningen tilsættes desuden salte, såsom dicalciumphosphat, calciumcarbonat og kogsalt. Foderblandinger afrundes eventuelt ved tilsætning af sporstoffer, vitaminer, ballaststoffer osv.. Også fermentativt fremstillede stoffer, såsom encelleproteiner, af jordoliefraktioner eller alkoholer, diverse gærarter, algeæggehvide eller andre eventuelt også af affaldsstoffer udvundne stoffer, kan undertiden i betydelig grad udgøre en bestanddel af foderrecepten.

Svinefoderblandingerne ifølge opfindelsen indeholder foruden de sædvanlige for svin afstemte bestanddele yderligere 5-50 ppm, fortrinsvis 10-40 ppm, af det nævnte antibiotikum, alt efter dyrenes alder og foderblandingsens art samt proteolytiske enzymer i en sådan mængde, at enzymaktiviteten udgør 0,05-2,5 mTU/g, fortrinsvis 0,2-0,5 mTU/g.

Den nævnte additivkoncentration er beregnet på indholdet i det samlede foder. Ved koncenterter eller suppleringsfoder ligger koncentrationerne tilsvarende højere. En kombination af tylosin og en sur svampeprotease eller proteaseblanding anvendes specielt. Den dermed opnåede tilvækst eller forbedringen af foderudnyttelsen udgør indtil 6% i sammenligning med tilsvarende kontrolblandinger, som kun indeholder antibiotikum.

Den omhandlede kombination af tylosin og enzymer har stået sin prøve i foder til svineavl og svineopfødning.

Antibiotikumet tilsættes hensigtsmæssigt til foderet i form af en forblanding, f.eks. bundet til soyaekstraktionskrå. Ved anvendelsen af

melformede fodersammensætninger appliceres også enzymkomponenten som forblending. Som bærestof fungerer en vilkårlig foderkomponent, f.eks. ligeledes soyaskrot. Ved anvendelsen af damppelletteret foder skal iblandingen af enzymerne ske i egnet stabiliseret form for at forhindre en desaktivering på grund af fugtighed og varme under pelleteringen. En sådan fremgangsmåde er f.eks. beskrevet i patent nr. ... (tysk patentansøgning P 26 02 260.6).

Til bestemmelse af enzymenheden (TU) undersøges den proteolytiske aktivitet af protease efter de kendte Anson-princip: En egnet fortyndet mængde enzymopløsning inkuberes ved 40°C i 20 minutter med et tilsvarende volumen af en 1,2 vægt% caseinopløsning, hvorhos denne indeholder 0,6% mælkesyre, 6 mol urinstof og 0,1 mol citron- eller eddikesyre. Caseinopløsningens pH-værdi indstilles ved tilsætning af 2N natriumhydroxid på 4,5. Efter inkubationen behandles i volumenforholdet 1:1 med 0,4 N trichloreddikesyre, det dannede bundfald filtreres fra ufordøjet casein og i filtratet bestemmes det ved nedbrydningen dannede proteinspaltningsprodukt efter en vilkårlig æggehvidebestemmelsesmetode. Hertil egner sig f.eks. den af lægen i Methode of Enzymologie 3 (1957) side 448 gg beskrevne fremgangsmåde.

Til hver måleprøve skal der tilberedes en blindværdi, hvorved der først tilsættes trichloreddike og derpå caseinopløsning. Denne blindværdi angiver ved siden af reagensblindværdien mængden af lavmolekylære peptider, som allerede før fordøjelsen er til stede i enzymopløsningen. Differensen mellem hoved- og blindværdi bliver så ved den anførte metode sammenlignet med extinktionen, som giver en bestemt mængde tyrosin ved denne bestemmelse. Denne mængde tyrosin er så et mål for den proteolytiske aktivitet af det foreliggende enzym: En enzymenhed (TU) er den enzyemmængde, som er en caseinopløsning på et minut, frigør spaltningsprodukter, som har den samme extinktion som en 1 M tyrosinopløsning. Sædvanligvis er angivelsen i $\text{mTU} = 10^{-3} \text{ TU}$.

Eksempel 1

259 grise blev i vægtafsnit fra 7,24 kg til 23,34 kg fodret med identisk sammensat foder til opdræt, som dog

- a) var uden tilsætning af antibiotikum eller enzym
- b) havde en tilsætning af 40 ppm tylosin eller
- c) havde en tilsætning af 40 ppm tylosin og 0,45 mTU/g sure proteaser fra *Rhizopus rhizopodiformis* og *Aspergillus niger*,
- d) havde en tilsætning af 0,45 mTU/g sur protease fra *Rhizopus rhizopodiformis* og *Aspergillus niger*.

Dyrene var anbragt i fladbure til 7 eller 8 dyr. Fodringen skete ad libitum. Til tilvækning fik alle grupper et identisk sammensat startfoder ved en omtrentlig vægt på ca. 6,92 kg. Derpå fik dyrene de egentlige forsøgsblandinger (s.o.).

Ved regelmæssige vejninger blev vækstforløbet og foderudnyttelsen bestemt. Med "foderudnyttelse" forstås forholdet mellem foderforbrug og tilvækst.

Fodersammensætning (%) :

Æggehvidefoder bestående af:

62,5% soyaskrå (44% råprotein),	18%
25% fiskemel	
12,5% mineralstof og vitaminforblanding	

Havre	14%
Hvedeklið	10%
Byg	28%
Hvede	15%
	100%

Resultat

	a) uden tilsæt- ning	b) med tylosin	c) med tylosin enzym	d) med enzym
Daglig tilvækst				
Ialt (g)	364,2	375,3	380,8	360
Foderudnyttelse	1,98	1,99	1,87	1,95

Eksempel 2

108 svin blev i vægtafsnit fra 20-60 kg fodret med et identisk sammensat foder til opdræt, som dog

- a) var uden tilsætning af antibiotikum eller enzymer,
- b) havde en tilsætning af 40 ppm tylosin eller
- c) en tilsætning af 40 ppm tylosin og 0,45 mTU/g sure proteaser fra *Rhizopus rhizopodiformis* og *Aspergillus niger*,
- d) kun havde en enzymtilsætning af den under c) nævnte størrelse.

Dyrene var anbragt i grupper og blev fodret ad libitum.

Fodersammensætning:

- 75% byg
- 22% soyaskrå
- 3% mineralstoffer og vitaminer.

Resultat

	<u>Daglig tilvækst (g)</u>	<u>Foderudnyttelse</u>
a) uden tilsætning	710	2,84
b) med tylosin	713	2,79
c) med tylosin og enzym	735	2,74
d) med enzym	667	2,98

Eksempel 3

80 svin i det samme vægtafsnit blev afprøvet påny. Grundlaget var følgende forsøgsplan:

- a) uden tilsætning af antibiotikum eller enzym,
- b) med tilsætning af 30 ppm tylosin,
- c) med en tilsætning af 30 ppm tylosin og 0,3 mTU/g sur protease fra *Aspergillus niger*,
- d) alene tilsætning af 0,3 mTU/g sur protease fra *Aspergillus niger*.

Resultat:

	<u>Daglig tilvækst (g)</u>	<u>Foderudnyttelse</u>
a) uden tilsætning	691	2,98
b) med tylosin	708	2,90
c) med tylosin og enzym	728	2,81
d) med enzym	674	3,05

P a t e n t k r a v

Foderblanding til svin på basis af kulhydrater, æggehvide, fedtstoffer og eventuelt sædvanlige tilsætningsstoffer, k e n d e t e g n e t ved et indhold af 5-50 ppm af antibiotikummet tylosin og en sådan mængde sure proteaser fra *Rhizopus rhizopodiformis* eller *Aspergillus niger* med virkningsspektrum mellem pH-værdi 2,5 og 6,5, at der eksisterer en enzymatisk aktivitet på 0,05-2,5 mTU/g.

Fremdragne publikationer:

DK patent nr. 101397
DE fremlæggeskrifter nr. 1084123, 1212826
US patent nr. 2878123
Chem.Abstr., bind 75 (1971), 138268 y.