申請日期：91-12-24	IPC分類
申請案號：91136777	A23L 1/00

(以上各欄由本局填註)

200302053

發明專利說明書

一、發明名稱	中文	用於如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素的生物解毒作用之微生物，以及使用方法及用途
	英文	MICROORGANISM FOR BIOLOGICAL DETOXIFICATION OF MYCOTOXINS, NAMELY OCHRATOXINS AND/OR ZEARALENONS, AS WELL AS METHOD AND USE THEREOF
二、發明人(共4人)	姓名(中文)	1.葛德・史契茲梅爾 2.黛恩・海德勒 3.伊莎貝斯・富契斯
	姓名(英文)	1.GERD SCHATZMAYR 2.DIAN HEIDLER 3.ELISABETH FUCHS
	國籍(中英文)	1.奧地利 AT 2.奧地利 AT 3.奧地利 AT
	住居所(中文)	1.奧地利・維也納A-1190・波哥尼卡路2A/3號 2.奧地利・維也納A-1190・波哥尼卡路2A/3號 3.奧地利・維也納A-1170・史契威格街43/17號
	住居所(英文)	1.Pokornygasse 2A/3, A-1190 Vienna, Austria 2.Pokornygasse 2A/3, A-1190 Vienna, Austria 3.SchweglerstraBe 43/17, A-1170 Vienna, Austria
三、申請人(共1人)	名稱或姓名(中文)	1.艾爾柏有限公司
	名稱或姓名(英文)	1.ERBER AKTIENGESELLSCHAFT
	國籍(中英文)	1.奧地利 AT
	住居所(營業所)(中文)	1.奧地利・海索根堡3130・工業街21號　(本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所(營業所)(英文)	1.IndustriestraBe 21, 3130 Herzogenburg, Austria
	代表人(中文)	1.艾里奇・艾爾柏
	代表人(英文)	1.ERICH ERBER

92261.ptd

200302053

申請日期：	IPC分類
申請案號：	

（以上各欄由本局填註）

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	
	英 文	
發明人（共4人）	姓 名（中文）	4.伊凡-瑪莉亞・拜德
	姓 名（英文）	4.EVA-MARIA BINDER
	國 籍（中英文）	4.奧地利 AT
	住居所（中 文）	4.奧地利・湯恩A-3430・葛洛頓街33號
	住居所（英 文）	4.Grottenthalgasse 33, A-3430 Tulln, Austria
三、申請人（共1人）	名稱或姓 名（中文）	
	名稱或姓 名（英文）	
	國 籍（中英文）	
	住居所（營業所）（中 文）	
	住居所（營業所）（英 文）	
	代表人（中文）	
	代表人（英文）	

一、本案已向

國家(地區)申請專利	申請日期	案號	主張專利法第二十四條第一項優先權
奧地利 AT	2001/12/20	A 2000/2001	有

二、□主張專利法第二十五條之一第一項優先權:

申請案號:

無

日期:

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項□第一款但書或□第二款但書規定之期間

日期:

四、□有關微生物已寄存於國外:

寄存國家:

寄存機構:

無

寄存日期:

寄存號碼:

□有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構):

寄存機構:

寄存日期:

無

寄存號碼:

□熟習該項技術者易於獲得,不須寄存。

五、發明說明（1）

[發明所屬之技術領域]

本發明乃有關用於如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素的生物解毒作用之微生物，及於食品及動物飼料中藉助於至少一種微生物生物性地進行如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素之解毒作用之方法，以及於食品及動物飼料中使用細菌及/或酵母解毒赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之用途。

[先前技術]

黴菌毒素為影響全世界農業產品，少量即已引致毒性效應的黴菌天然存在之次級代謝物。農業產品之黴菌毒素侵擾包括極大的傷害及亦導致男性及動物之黴菌毒素症（部分具有劇烈效應）。由於黴菌毒素及因其引致之黴菌毒素症所造成之高經濟損失及對男性與動物之沉重壓力，業界長久以來試圖尋找對抗黴菌毒素污染之措施，文獻上已有兩種已知方法。第一個方法目的在預防黴菌於食品及動物飼料上之生長，同時預防產生黴菌毒素；第二個方法針對接續之黴菌毒素破壞，或使食品及/或動物飼料去污染。

因此，舉例而言，WO 91/13555敘述飼料補充劑以及使黴菌毒素失活之方法，其中於飼料中添加頁矽酸鹽礦粒，使所述黴菌毒素失活。為了增加彼等頁矽酸鹽之效力，乃以多價螯合劑被覆礦粒，擬加速其作用。再者，例如，WO 92/05706揭示一種動物飼料，該動物飼料含蒙脫石黏土作為飼料補充劑。彼等具有大的內表面面積之天然

五、發明說明（2）

黏土礦石，由於具多孔性，可與黴菌毒素淺薄地結合，而予以固定。

此外，奧地利新型專利案AT-U 504揭示一種飼料補充劑，該飼料補充劑使用能形成環氧酶與內酯酶及於動物飼料與動物消化道中均可化學降解黴菌毒素之酵素製劑。根據AT-U 504，此酵素製劑的活性可藉由添加沸石等而有所增進。

動物飼料中添加黴菌毒素黏合劑，該等黏合劑於消化期間立即與黴菌毒素在消化道中結合，可使牲畜體中之毒素效應減至最小。除了上述選擇之外，可施加之物質包含苜蓿、膨潤土、沸石、黏土、活性碳、氫化之鈉鈣鋁矽酸鹽、頁矽酸鹽及酵母或細菌細胞壁（US 5,165,946; WO 99/57994; US 6,045,834; EP 9721741; US 5,165,946; US 5,935,623; WO 98/34503; WO 00/41806）。毒素與此等物質之結合作用取決於該毒素之結構特性。因此，迄今尚未發現對新月毒素（trichothecenes)有效的黴菌毒素黏合劑。黴菌毒素黏合劑之另一缺點為除了吸附於所述毒素外，其亦可吸附於飼料中之重要營養素例如維生素或抗生素。

近來發現黴菌毒素可被微生物降解，因而被部分解毒。解毒黴菌毒素之實例，詳言之，為AT-B 406 166中之新月毒素，其中屬於真細菌屬（Eubacterium)及寄存編號DSM 11798之微生物特純培養物以及該真細菌屬與寄存編號11799的腸球菌（Enterococcus)之混合培養物藉由裂解

五、發明說明 (3)

新月毒素上的環氧環而對新月毒素進行解毒。

利用酵素水解的赭麴毒素之解毒作用已由 M.J. Pitout敘述：The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes, Biochem. Pharmacol. 18, 485-491 (1969)。

[內容]

本發明之目的在於提供能以選擇性方式生物化學性地降解黴菌毒素，即赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮，將其轉化成生理上安全之物質，特別是，飼料及食品工業上之安全物質，之特殊微生物以及混合或純培養物及其組合。

為了達成上述目的，乃使用根據本發明之微生物，其最初界定種類之主要特徵為微生物，特別是，好氧性或厭氧性解毒細菌或酵母，該等細菌或酵母分別裂解赭麴毒素的苯丙胺酸基團及降解玉米赤黴烯酮，其中該黴菌毒素解毒細菌係選自 Sphingomonas、Stenotrophomonas、Ochrabactrum、青枯桿菌(Ralstonia)及/或真菌(Eubacterium)等之菌種，及/或該解毒酵母係選自毛髮芽苞菌(Trichosporon)、囊球菌(Cryptococcus)及/或紅色串狀釀母菌(Rhodotorula)等之菌種。藉由使用微生物，詳言之，使用分別裂解赭麴毒素的苯丙胺酸基團及降解玉米赤黴烯酮之好氧性或厭氧性解毒細菌或酵母，得以將赭麴毒素，詳言之，赭麴毒素A或赭麴毒素B，轉化成不具苯丙胺酸基團之代謝物，因此，不再展現赭麴毒素之毒性效應。赭麴毒素之此代謝作用由類似羧基酞酶A之酵素造

五、發明說明（4）

成，其直接或經由多酵素複合物裂解赭麴毒素的醯胺鍵，因而將苯丙胺酸環羥基化，接著斷裂及降解。最後，裂解殘留的阿斯巴甜，因而得到另一個不具毒性之赭麴毒素代謝物。此途徑可以簡單方式予以說明：

藉由使用根據本發明之選自細菌及/或酵母之微生物，不僅得以對赭麴毒素A與赭麴毒素B進行解毒，亦可對4R-羥基赭麴毒素A、4S-羥基赭麴毒素A、赭麴毒素C、赭麴毒素A甲酯、赭麴毒素B甲酯及赭麴毒素B乙酯等代謝物進行解毒。再者，彼等微生物賦能降解，因此亦可對玉米赤黴烯酮進行解毒。

根據本發明，好氧性及厭氧性解毒細菌或酵母均可使用之事實特具關聯性，因為，如果發生於被各個微生物污染的食品及/或動物飼料之攝食時，即使於攝取該等食品及/或動物飼料之後，仍可達成解毒作用。此解毒作用可發生於食料或飼料通過消化管道內之任何階段，或任何相，因為於各情形下，各種微生物或其組合可被選擇性地引致產生作用。一般已知，從胃到結腸，消化道內的狀況為厭氧性逐漸增加，亦即氧化還原電位逐漸減少，因此，一旦攝入被各種黴菌毒素或赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮污染的食料及/或飼料，解毒作用首先由好氧性細菌及/或酵母開始，於消化過程末了，或者食料或飼料已到達腸階段普遍為厭氧狀態時，則由各種厭氧性細菌及/或酵素繼續進行。

若使用選自Sphingomonas、Stenotrophomonas、

五、發明說明 (5)

Ochrabactrum、青枯桿菌及/或真菌等菌種之解毒細菌，及/或選自毛髮芽苞菌、囊球菌及/或紅色串狀釀母菌等菌種之解毒酵母作為所述微生物，則如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素特別完全之解毒作用得以施行。於彼等完全解毒細菌及/或酵母中，選自 Sphingomonas sp. DSM 14170與 DSM 14167、Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168、Stenotrophomonas sp. DSM 14169、青枯桿菌屬之 Ralstonia eutropha DSM 14171 及真細菌屬 DSM 14197的解毒細菌，以及選自毛髮芽苞菌屬新種菌種 DSM 14153、囊球菌屬 DSM 14154、紅色串狀釀母菌屬之 Rhodotorula yarrowii DSM 14155、毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon mucoides DSM 14156與 Trichosporon dulcitum DSM 14162的解毒酵母不但確保黴菌毒素之完全降解，使用於食品及動物飼料時尚具安全性，而具有多種裂解及/或降解黴菌毒素的其他細菌與酵素未必如此，因此已被證實特別有效。

於具同樣分解黴菌毒素能力之所述進一步細菌或酵母中，下文所示者可於培養基或於緩衝液中，或有效地於該二物質中，成功地予以施用。

五、發明說明 (6)

菌株	來源	降解作用	
		於培養基中	於緩衝液中
洋蔥假單胞菌(Pseudomonas cepacia)	土壤	60%	100%
赭菌屬(Ochrobactrum)	土壤/水	100%	100%
無色菌屬(Achromobacter)	土壤/水	50%	100%
青枯桿菌屬(Ralstonia)	土壤/水	100%	100%
Stenotrophomonas	土壤/水	100%	100%
嗜紅色紅球菌(Rhodococcus erythropolis)	DSM 1069	75%	90%
土壤桿菌屬(Agrobacterium sp.)	DSM 30201	20 至 100%	60 至 100%
根癌土壤桿菌(Agrobacterium tumefaciens)	DSM 9674	25 至 40%	0 至 60%
惡臭假單胞菌(Pseudomonas putida)	ATCC 700007	10 至 50%	0%
Comomonas acidovorans	ATCC 11299a	20 至 57%	0 至 50%
囊子菌綱酵母(Ascomycetes ytast)	HA 168	95%	40%
黃囊球菌(Cryptococcus flavus)	HB 402	90%	100%
紅色串狀釀母菌屬之 Rhodotorula mucilaginosa	HB 403	20%	0%
囊球菌屬之 Cryptococcus laurentii	HB 404	50%	0%
未知菌種	HB 508	30%	30%
毛髮芽苞菌屬(Trichosporon)新穎菌種	HB 704	40%	40%
未知菌種	HB 529	100%	95%
囊子菌綱酵母	HA 1265	90%	0%
囊子菌綱酵母	HA 1322	0%	95%
毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon ovoides	HB 519	100%	90%
毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon dulcitum	HB 523	100%	100%
紅色串狀釀母菌屬之 Rhodotorula fujisanensis	HB 711	30%	0%
囊球菌屬之 Cryptococcus curvatus	HB 782	20%	95%
毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon guehoae	HB 892	50%	20%
毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon coremiiforme	HB 896	40%	20%
毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon mucoides	HB 900	100%	100%
毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon cutaneum	ATCC 46446	0%	70%
毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon dulcitum	ATCC 90777	0%	100%
毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon laibachii	ATCC 90778	0%	100%
毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon moniliiforme	ATCC 90779	0%	60%

五、發明說明（7）

菌株	來源	降解作用	
		於培養基中	於緩衝液中
囊球菌屬之 Cryptococcus humicolus	ATCC 90770	0%	30%
真細菌屬	F6	30 至 70%	100%
真細菌屬之 Eubacterium callanderi	Dil_8	90%	100%
鏈球菌屬	Dü2_20		40 至 70%
犢乳桿菌 (Lactobacillus vitulinus)	Ru8		0 至 100%
Stenotrophomonas nitritreducens	DSM 17575	100%	100%
Stenotrophomonas nitritreducens	DSM 17576	50%	100%
Stenotrophomonas 屬	DSM 13117	50%	95%

與本發明較佳之進一步發展相符地，利用冷凍乾燥、噴霧乾燥或微膠囊化特別安定細菌及/或酵母，已證實特別有利。藉由安定該等微生物，可增進或加強其生活力及壽命，此外，可施用範圍更為寬廣，因而可於任何所需應用之任何時間呈安定狀態予以施用。經由冷凍乾燥、噴霧乾燥或微膠囊化之安定作用為本質上已知，該等方法係獲得安定、具生活力的微生物之迅速、可實現之方法。

根據本發明之進一步發展，所述細菌及/或酵母係呈不含細胞之萃取物或粗萃取物予以利用。因此，使用不含細胞之萃取物之進一步發展意指後者係於溶液（特別是，水溶液）中使用。不含細胞的萃取物之水溶液所提供的優點為，噴霧於欲處理的食品或飼料上後，與所污染黴菌毒素的表面直接接觸，在噴霧該萃取物的同時，因而已立即達成解毒作用。藉由施用超音波、酵素分解、組合急驟冷凍與解凍、流動均質器、法式壓濾器（French press）、於

五、發明說明 (8)

高 NaCl濃度之自溶 (autolysis)、及 /或球磨等方式獲得的細菌與酵母之粗萃取物，其具有的優點為該等粗萃取物可以特別快及不成問題的方式獲得，因此，在需要迅速使用解毒或黴菌毒素降解物質時，使用粗萃取物可獲得迅速且可信賴的結果。此外，粗萃取物可直接用於製造動物飼料，俾使補充微生物的飼料為動物所攝取，詳言之，酵母或細菌僅在動物的消化道產生作用。本文中，本發明亦涵蓋含有各種解毒細菌及 /或酵母粗萃取物的混合物之用途。

與較佳具體實例相符地，於 pH值介於 1與 12(特別是，2與 8)間之未經緩衝或含磷酸鹽或參鹽酸鹽緩衝劑之緩衝溶液中使用該等微生物，所具有的優點為，微生物可直接與食料或飼料投與，因而於氧化還原電位適合所用微生物的最適作用之消化道區段產生作用。緩衝溶液之使用將使消化道中普遍存在的各個 pH之立即調適成為可行，俾使補充該微生物緩衝溶液之食物或精製物對於消化道普遍存在的 pH不會引起任何轉移或干預，因此一方面增進經補充食料或飼料之易消化性，及預防胃腸環境之任何消化性干預。

本發明之另一目的在於提供可用於對食品或精製物進行解毒之物質或微生物，而除了對存在該食品或精製物上的黴菌毒素進行解毒外，不損及或影響攝取其等之生物及不損及或影響所處理的該等食品或精製物。

為了達成彼等目的，根據本發明發現使用選自

五、發明說明 (9)

Sphingomonas sp. DSM 14170與 DSM 14167、Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168、Stenotrophomonas sp. DSM 14169、青枯桿菌屬之 Ralstonia eutropha DSM 14171 及真細菌屬 DSM 14197的細菌，及/或選自毛髮芽苞菌屬新穎菌種 DSM 14153、囊球菌屬 DSM 14154、紅色串狀釀母菌屬之 Rhodotorula yarrowii DSM 14155、毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon mucoides DSM 14156與 Trichosporon dulcitum DSM 14162的酵母，可利用其裂解苯丙胺酸基團及降解玉米赤黴烯酮，對存在食品或動物飼料上之如赭麴毒素之黴菌毒素進行解毒，而不影響處理該食品或動物飼料所用之任何方式。

頃已證實毛髮芽苞菌屬新穎菌種 DSM 14153、真細菌屬 DSM 14197或 Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168特別適用於本發明之目的，彼等微生物確保，詳言之，如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素之完全降解，而不需承擔任何風險。

為了使特別是於食品或動物飼料中的黴菌毒素之經濟解毒作用可行，可使用數種細菌及/或酵母之混合培養液或組合，進行食品及/或動物飼料中赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之解毒作用。

本發明之另一目的在於提供於食品及動物飼料中利用微生物進行如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素之生物解毒作用之方法，俾使於與食品或動物飼料直接接觸

五、發明說明（10）

後，或於攝入該食品或動物飼料的生物之消化管內，將污染的毒素完全且迅速地解毒。

為了達成上述目的，根據本發明方法之主要特徵為使根據本發明之微生物，特別是，根據本發明之細菌或酵母，以介於0.01重量%至1重量%(特別是，0.05重量%至0.5重量%)範圍內之量，與食品或動物飼料混合。藉由混合呈固體形式之食品或動物飼料與根據本發明之微生物（特別是，根據本發明之細菌或酵母），將可獲得呈安定形式之具有經安定之微生物之食品或動物飼料。若攝取補充根據本發明微生物之該等食品或動物飼料，於摻雜唾液咀嚼期間，將形成懸浮液，在被人或動物分別攝入該等食品或動物飼料後，立即開始其解毒作用，特別是，赭麴毒素之降解。以此方式，即確保如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮的有毒黴菌毒素於攝食宿主動物消化管中之完全降解，俾使該生物不受有毒黴菌毒素任何方式之壓力。

若意欲攝入已解毒之食品或動物飼料，本發明之進一步發展係提供藉由於含有20至99重量%(特別是，35至85重量%)水之該微生物之水性懸浮液中，溫度10至60℃（特別是15至45℃）下，攪拌2分鐘至12小時（特別是5分鐘至2小時），以混合該食品或動物飼料。藉由此等於各微生物之水性懸浮液中攪拌食品或動物飼料，一方面得以提供欲處理食品或動物飼料與解毒微生物之密切接觸，另一方面則提供微生物之謹慎處理，因而確保後者與食品或動物飼料接觸時不致於劣化或被殺死。於混合期間，最重要的，需

五、發明說明 (11)

小心不要讓混合溫度過高或過低，漿狀物或懸浮液的持續時間與組成亦需完全依照本發明行事，俾使安全地防止破壞或殺死微生物。

下文將藉由實例詳細說明本發明有關微生物分離及其作用方式事宜。

[實施方式]

1. 毛髮芽苞菌屬新穎菌種酵母(DSM 14153)之培殖、生產及回收

酵母之生長係使用下述培養基：

10 克酵母萃取物

20 克麥芽萃取物

10 克葡萄糖

5 克蛋白腖

400 ppm赭麴毒素A

1升 RO水

pH 5.5

以高壓殺菌釜於121℃處理25分鐘。於100毫升錐形燒瓶中製備30毫升預培養液(接菌率0.33%)。25℃下，於振盪器上進行培養72小時，所得細菌計數為約5x 10^7/毫升。

彼等30毫升接著作為於75升發酵槽發酵接菌用之預培養液，發酵時係使用下述培殖用培養基：

麥芽萃取物	4克/升
酵母萃取物	10克/升
蛋白腖	5克/升

五、發明說明（12）

葡萄糖	10克 /升
消泡劑	0.1%
pH	5.5

其他參數為調整pO$_2$於40%及最大通氣量於3立方米/小時。開始時pH為5.00，於生長過程產生變化（升至8.5）。於約40至44小時後，其內容物可作為3.6立方米生產發酵槽之接菌用，後者係使用下述培養基：

麥芽萃取物	17克 /升
酵母萃取物	5克 /升
蛋白腖	2克 /升
消泡劑	0.1%

通氣量為每小時15立方米空氣。40至48小時後，利用流動分離器濃縮細胞，將發酵液濃縮至約1：10，獲得約3 × 10^9/毫升之細菌計數。

接著利用冷凍乾燥或噴霧乾燥予以安定化。冷凍乾燥中，以乳清粉末作為低溫保護劑。以濃縮液容積計，添加10%。然後，於-80℃冷凍該濃縮液。0.400毫巴壓力下，進行冷凍乾燥，架區（shelf area)溫度為20℃。層厚1.5公分，進行約30小時。

噴霧乾燥參數：

-乾燥介質（空氣）入口溫度：160℃

-出口溫度：80℃

-壓力：3巴

2. Stenotrophomonas nitritreducens細菌（DSM 14168）

五、發明說明（13）

之培殖、生產及回收

於營養培養液中進行細菌培殖，一次於Oxoid CM 001 B中，一次於具有400ppb赭麴毒素A之CM 067 B中。於100毫升錐形燒瓶中，以高壓殺菌釜於121℃處理30毫升培養基25分鐘。取得自有效細胞庫試管之1.5毫升作為種菌。於30℃，在振盪器上進行培養72小時。

彼等30毫升接著作為於75升發酵槽發酵接菌用之預培養液，發酵時係使用下述培殖用培養基：

肉蛋白胨	5克 /升
肉萃取物	3克 /升
消泡劑	0.1%

其他參數為調整pO於40%及最大通氣量於3立方米 /小時。攪拌速率為200rpm。開始時pH約6.8至6.9，於生長過程產生變化，升至8.3。於約40至44小時後，其內容物可作為3.6立方米生產發酵槽之接菌用，後者係使用下述培養基：

黃豆粉	17克 /升
酵母萃取物	5克 /升
蛋白胨	2克 /升
消泡劑	0.1%

將通氣量調整至每小時15立方米空氣；攪拌速度250 rpm。

40至48小時後，利用流動分離器濃縮細胞，濃縮比率約為1：100。

五、發明說明 (14)

接著利用冷凍乾燥或噴霧乾燥予以安定化。冷凍乾燥中，以乳清粉末作為低溫保護劑。以濃縮液容積計，多數情形添加10%。然後，於-80℃（10小時）或藉助於液態氮（2小時），冷凍該濃縮液。0.400毫巴壓力下，進行冷凍乾燥，架區溫度20℃。層厚1.5公分，進行約30小時。

噴霧乾燥參數：

-乾燥介質（空氣）入口溫度：160℃

-出口溫度：80℃

-壓力：3巴

3. 真細菌屬細菌（DSM 14197）之培殖、生產及回收

使用下述培養基培殖此厭氧性細菌：

D(+)-葡萄糖	4克/升
酪蛋白腖	2克/升
酵母萃取物	2克/升
礦物質溶液 I	75毫升/升
[KH_2PO_4 6克/升]	
礦物質溶液 II	75毫升/升
[K_2HPO_4 6克/升；$(NH^4)SO^4$ 6克/升；	
NaCl 12克/升；$MgSO_4 \times 7 H_2O$ 2.5克/升；	
CaC 12× 2 H_2O 3克/升]	
血晶質	1毫克/升
脂肪酸混合物	3.1毫升/升
半胱胺酸-HCl	0.5克/升
刃天青（Resazurin）	1毫克/升

五、發明說明（15）

赭麴毒素 A　　400ppb

pH　　6.9

於具有矽酮中隔之100毫升派萊克斯（Pyrex)燒瓶中進行培殖。傾斜取出80毫升經高壓殺菌處理之培養基，使其與 KH_2PO_4/Na_2HPO 緩衝液（pH7)混合。於添加得自有效細胞庫的低溫瓶之內容物後，燒瓶上部空間以 N_2 充氣（1分鐘）。將瓶閉合後，於37℃培養72小時。

然後，於5升首德（Schott)燒瓶中，將4.5升上述培養溶液高壓殺菌。該燒瓶由洩汽接管及具有滅菌濾片（供種菌[redacted]氣用）的兩個管子組成。將培養基冷卻至37℃後，添加緩衝劑溶液（1 %磷酸鹽緩衝液），接著添加80毫升種菌。上部空間以氮充氣（5分鐘）後，所有開口處以管鉗夾住，於37℃培養種菌約64小時。經純度試驗後，可使用其作為1立方米發酵槽（容積700公升）之種菌。

下述培養基乃供生產之用：

葡萄糖	10克/升
酵母萃取物	5克/升
蛋白胨	2克/升
胱胺酸 HCl	0.5克/升
p[redacted]	7.00

發酵槽中的培養基經殺菌處理（40分鐘，121℃，1.21巴）及再冷卻至37℃後，添加種菌。發酵槽的上部空間以 N_2 充氣。攪拌速率為100rpm。以氫氧化鈉（8莫耳/升）調整pH。開始時，氧化還原電位為約-240mV，生長期間降至

五、發明說明（16）

-500mV以下。發酵時間為約48小時。使用流動分離器進行濃縮。

接著利用冷凍乾燥或噴霧乾燥予以安定化。冷凍乾燥中，以乳清粉末作為低溫保護劑。以濃縮液容積計，添加10%。然後，於-80℃（10小時）或藉助於液態氮（2小時），冷凍該濃縮液。0.400毫巴壓力下，進行冷凍乾燥，架區溫度20℃。層厚1.5公分，進行約30小時。

貯存期間，使用植物油，利用流動床粒化技術（Holtmelt法，頂部噴霧）保護微生物，以防止不利之生存條件。

噴霧速率：　約80至150克/分鐘

通入空氣溫度：　50℃

噴霧壓力：　3巴

空氣量：　750至1500立方米/小時

產物溫度：　<47℃

噴霧乾燥參數：

-乾燥介質（惰性氣體）入口溫度：160℃

-出口溫度：80℃

-壓力：3巴

4. 利用根據實例1至3之細菌與酵母產物之赭麴毒素A（OTA）之解毒作用

以得自實例1至3之產物，於生理食鹽水溶液中製備對數稀釋系列至10^{-9}階段。於10^{-1}至10^{-9}階段，各以吸管吸取2毫升至補充200ppb OTA之18毫升各個培養基（最低營養素

五、發明說明 (17)

培養基（Na_2HPO_4 2.44克/升；KH_2PO_4 1.52克/升；$(NH_3)_2SO_4$ 0.50克/升；$MgSO_4 \times 7H_2O$ 0.20克/升；$CaCl_2 \times 2H_2O$ 0.05克/升）、酵母培養基或營養培養液（Oxoid CM001B））中。適當條件下，於水平式振盪器上，將種菌接入所用燒瓶中。經2.5、5及24小時後，取樣並利用高壓液相層析法檢測OTA裂解。於10^{-3}稀釋階段（相當於10^5之產物細菌計數），最低營養素培養基之酵母經5小時後已裂解90%赭麴毒素A；24小時後則裂解100%。

若使用複合酵母培養基作為測試基質，則該產物於10^{-3}稀釋階段，經6小時後，展現90%之裂解率；24小時後，所有OTA均告解毒。

最低營養素培養基中之細菌產物，於10^{-3}稀釋階段（細菌計數為10^6至10^9），經2.5小時後，赭麴毒素A之解毒率達40至100%；24小時後則達100%。於營養培養液中，解毒作用的進行有些緩慢-於階段3，2.5小時後解毒40至50%；24小時後為80至100%。彼等試驗證實，於最小及複合培養基中，微生物可轉化成展現解毒活性之安定產物。

5. 於刺激小腸環境中利用凍乾產物之赭麴毒素（OTA）之降解

測試模式A

此模式用於探討酵母菌株DSM 14153、DSM 14154、DSM 15155、DSM 14156及DSM 14162以及好氧性（DSM 14170、DSM 14167、DSM 14168及DSM 14169）與厭氧性（DSM 14197）細菌菌株之凍乾產物。將剛屠宰之豬小腸切

五、發明說明（18）

成約15公分長片段，各添加至含OTA [200 ppb]之100毫升最低營養素培養基中。最後將所有批次以1克凍乾產物直接接菌並於35℃培養。經0、6、24及48小時後，取樣，利用HPLC進行接續之OTA分析，於進行該分析之前，貯存於超低溫冷凍狀態。

於酵母菌中，菌種DSM 14153、DSM 14156及DSM 14162被證實為最具活性者。於培養第一個六小時後，存在的毒素分別已有70至90%、50至90%及80至90%被轉形（24小時後：90至95%）。其他兩個測試酵母（DSM 14154、DSM 14155)就活性而言，落於上述三菌株之後（6小時後，降解0至20%；24小時後，30至50%；48小時後，80%）。

於好氧性細菌中，菌種DSM 14168最佳：6小時後，50至100%存在的毒素已有反應；24小時後，80至100%。DSM 14169結果也是完全「可接受」：6小時後，0至90% OTA被解毒；24小時後，70至95%。其餘兩個菌株顯然表現較差（6小時後，0至40%；24小時後，50至60%；48小時後，60至80%）。

厭氧性小腸分離物DSM 14197於培養6小時後，以0至60%之比率降解存在之黴菌毒素；24小時後，介於50與100%間之OTA已反應。

以下述菌株進行類似之試驗：

小腸分離物F6：　24小時後，90至95%

結腸分離物Di 1-8：　24小時後，80至95%

毛髮芽苞菌屬之Trichosporon ovoides：24小時後，40至

五、發明說明 (19)

50%

毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon dulcitum: 24小時後，50至90%

囊球菌屬之 Cryptococcus curvatus: 24小時後，40至50%

毛髮芽苞菌屬之 Trichosporon laibachii: 24小時後，50%

Stenotrophomonas nitritreducens: 24小時後，60至95%

Stenotrophomonas sp.: 24小時後，50至70%

此模式證明利用所製造的產物，於含小腸片段(具有適當環境－營養素及腸內菌叢)之緩衝劑培養基中，可使OTA失活。

測試模式 B

此模式用於檢測酵母菌株 DSM 14153、DSM 14156與DSM 14162以及 DSM 14168(好氧性)與 DSM 14169(好氧性)及 DSM 14197(厭氧性)細菌菌株之凍乾產物。

將剛屠宰之豬小腸切成約25公分長片段，其末端以細繩閉合。稱取1克欲檢測之產物至50毫升離心管中，使其再懸浮於含 OTA [200 ppb]之20毫升測試培養基中(好氧性菌種及酵母->最低營養素培養基；厭氧性菌種->厭氧性緩衝液)。除了充分摻合的懸浮液外，亦視需要製備十倍稀釋液。然後將混合的懸浮液各自直接注入小腸片段中。直接從小腸片段抽取零試樣後，使小腸片段懸於250毫升派萊克斯瓶中(亦即一端的細繩以瓶子的螺旋蓋固定住)，於35℃進行培養。經6、24及48小時後，抽取進一步試樣，

五、發明說明 (20)

利用 HPLC進行接續之 OTA轉形分析。

於酵母菌 (約 10^7 KBU/毫升)之情形下，經 6小時後，OTA之降解達到 90%(DSM 14153)。最多於 24小時後，所有試樣均可檢測到相當的高活性 (80至 100%)。

凍乾產物之十倍與百倍稀釋液亦獲得相當的結果。兩個好氧性細菌 DSM 14168與 DSM 14169得到類似的結果。6小時後，20至 60% OTA已轉形；24小時後，則為 80至 95%。厭氧性菌種 DSM 14197於 6小時後顯示 40與 50 %間之降解表現；24小時後，提升至 90%。以 OTA培殖，但不含任何產物之小腸片段則完全未表現解毒活性。

彼等結果顯示，解毒赭麴毒素之微生物在相當於小腸的環境中亦可降解此毒素。因此，明顯地證明微生物特別是作為用於對赭麴毒素進行解毒的食品或飼料補充劑之應用。

6. 食品及動物飼料之解毒作用

於適當條件下，根據實例 1至 3，培殖解毒赭麴毒素之微生物約 66小時。取 25毫升懸浮液，於 3210x g各離心 15分離，將其混於補充 200ppb OTA之適量最低營養素培養基中。形成的懸浮液用來接種於 25克或 25毫升食料、咖啡粉、碎玉米粉、粗粒麵粉、啤酒及酒中。將食料與微生物懸浮液仔細摻合後，抽取試樣 (零試樣)。於 25℃進行各批次之培養 9天。然後，分析 5克此試樣，與零試樣進行比較。此外，空白對照組一起進行培養，其僅提供 OTA，惟不含微生物。欲分析液體食品中所含的赭麴毒素時，以 0.

五、發明說明（21）

5毫升1M磷酸將不含微生物之正好1毫升各食品酸化，並以5毫升二氯甲烷萃取。氮氣下，乾燥5毫升萃取物。各試樣進行兩次處理，乾燥後的殘留物一次混於乙腈/水/乙酸（45：54：1)中，一次混於甲苯/乙酸（99：1)中。利用HPLC及利用TLC二者進行試樣之分析。分析粗粒麵粉時，稱取5克試樣至100毫升首德燒瓶中，與20毫升乙腈/水（60：40)，於170rpm，振盪一小時。過濾後，此萃取液直接利用HPLC進行分析。碎玉米粉與咖啡之OTA分析過程較費事。此時，各稱取5克試樣入100毫升首德燒瓶中，與20毫升乙腈/水（60：40)振盪一小時。過濾後，取4毫升萃取液與44毫升PBS緩衝液（0.1% Tween 20)混合，裝填於免疫親和性管柱。接著，進行HPLC分析。測定OTA之減少以及代謝物OTα的出現。於咖啡及玉米試樣中，由於施用管柱純化法，未檢測出OTα。可獲得下述降解率：

五、發明說明（22）

表 1

菌株	OTA-減少百分比				
	啤酒	酒	玉米	小麥	咖啡
DSM 14153	100 (+)	99 (+)	94 (+)	100 (+)	~67 (+)
DSM 14154	100 (+)	94 (+)	50 (+)	100 (+)	0 (-)
DSM 14155	30 (+)	0 (-)	99 (+)	100 (+)	0? (-)
DSM 14156	100 (+)	95 (+)	96 (+)	100 (+)	30 (+)
DSM 14162	83 (+)	12 (+)	100 (+)	100 (+)	0 (-)
DSM 14170	75 (+)	0 (-)	0 (-)	89 (+)	0 (-)
DSM 14167	100 (+)	4 (+)	39 (+)	~90 (+)	0 (-)
DSM 14168	100 (+)	0 (-)	50 (+)	94 (+)	0 (-)
DSM 14169	100 (+)	0 (-)	0 (-)	91 (+)	0 (-)
DSM 14171	100 (+)	0 (-)	79 (+)	81 (+)	0 (-)

7. 黴菌毒素之降解

培殖微生物約66小時。然後，離心（3210× g，15分鐘，室溫），將所得沉澱物再懸浮於最低營養素培養基中。於最低營養素培養基中添加1ppm脫氧尼瓦林醇（desoxynivalenol）、1ppm伏馬鐮孢毒素 B_1（fumonisin B_1）、1ppm玉米赤黴烯酮、200ppb黃麴毒素 B_1及2ppm抗黴素。於30℃培養各批次之前，先取樣（「零試樣」）。培養時間為96小時。所有批次利用HPLC分析檢測進行二重複測定，一次使用上澄液（離心後），一次使用整個批次。純化時，分別取3毫升上澄液及2毫升整個試樣裝填於15克伊萃路（Extrelut）材料上。15分鐘後，以40毫升乙酸乙酯稀釋試樣。各取7毫升乙酸乙酯予以乾燥，使其混於適當溶劑中。黃麴毒素 B_1及伏馬鐮孢毒素 B_1之分析於衍生化後進

五、發明說明 (23)

行。

96小時後，檢測試樣中各個毒素之降解作用，與開始之試樣進行比較。為達此目的，分析上澄液(利用離心分離生物量)以及整個試樣(具有生物量)之DON、ZON與AFB_1。結果示於表2。

表2

菌株	ZON-降解率[%]		FB_1-降解率[%]	AFB_1-降解率[%]		CIT-降解率[%]
	上澄液	整個試樣	上澄液	上澄液	整個試樣	上澄液
DSM 14170	0	24	0	0	0	100
DSM 14167	0	28	0	0	10	0
DSM 14168	0	32	0	0	10	0
DSM 14169	88	90	0	8	46	0
DSM 14171	0	43	0	0	24	0
DSM 14153	100	100	19	20	13	0
DSM 14154	19	67	22	64	63	0
DSM 14155	81	100	29	20	38	0
DSM 14156	100	100	6	0	61	0
DSM 14162	17	62	8	0	0	0

由前述分析結果顯見，例如玉米赤黴烯酮(ZON)、黃麴毒素B_1(AFB_1)、伏馬鐮孢毒素B_1(FB_1)之一些黴菌毒素，使用根據本發明之微生物可十分良好地部分降解。抗黴素(CIT)僅可被Sphingomonas sp. (DSM 14170)降解100%。

總之，值得注意的是，根據本發明之微生物易於使，特別是，食品及動物飼料之赭麴毒素降解，於腸環境中亦

五、發明說明（24）

然，惟玉米赤黴烯酮、抗黴素等之降解則部分獲得良好結果。

圖式簡單說明

本案無圖式

四、中文發明摘要 （發明名稱：用於如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素的生物解毒作用之微生物，以及使用方法及用途）

本發明提供用於黴菌毒素（特別是赭麴毒素）的生物性失活或解毒作用之微生物，該等微生物係選自細菌及/或酵母，其裂解黴菌毒素（特別是赭麴毒素）之苯丙胺酸基團；以及於食品及動物飼料中藉助於微生物，使黴菌毒素（特別是赭麴毒素）生物性失活或解毒之方法；及該等微生物之用途。

本案無圖式

六、英文發明摘要 （發明名稱：MICROORGANISM FOR BIOLOGICAL DETOXIFICATION OF MYCOTOXINS, NAMELY OCHRATOXINS AND/OR ZEARALENONS, AS WELL AS METHOD AND USE THEREOF）

A microorganism for the biological inactivation or detozification of mycotoxins, in particular ochratoxins, which is selected from bacteria and / or yeasts, which cleaves the phenylalanine group of the mycotoxins, in particular ochratoxins, as well as a method for biologically inactivating or detoxifying mycotoxins, in particular ochratoxins, in food

四、中文發明摘要　（發明名稱：用於如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素的生物解毒作用之微生物，以及使用方法及用途）

六、英文發明摘要　（發明名稱：MICROORGANISM FOR BIOLOGICAL DETOXIFICATION OF MYCOTOXINS, NAMELY OCHRATOXINS AND/OR ZEARALENONS, AS WELL AS METHOD AND USE THEREOF）

products and animal feeds by the aid of a microorganism, and the use of the microorganism (S).

六、申請專利範圍

1. 一種用於如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素的生物解毒作用之微生物，其特徵為使用微生物，特別是，好氧性或厭氧性解毒細菌或酵母，該等細菌或酵母分別裂解赭麴毒素的苯丙胺酸基團及降解玉米赤黴烯酮，其中該黴菌毒素解毒細菌係選自Sphingomonas、Stenotrophomonas、Ochrabactrum、青枯桿菌(Ralstonia)及/或真菌(Eubacterium)等屬之菌種，及/或該解毒酵母係選自毛髮芽苞菌(Trichosporon)、囊球菌(Cryptococcus)及/或紅色串狀釀母菌(Rhodotorula)等屬之菌種。

2. 如申請專利範圍第1項之微生物，其特徵為該解毒細菌係選自：Sphingomonas sp. DSM 14170與DSM 14167、Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168、Stenotrophomonas sp. DSM 14169、青枯桿菌屬之Ralstonia eutropha DSM 14171及真細菌屬DSM 14197。

3. 如申請專利範圍第1或2項之微生物，其特徵為該解毒酵母係選自：毛髮芽苞菌屬新穎菌種DSM 14153、囊球菌屬DSM 14154、紅色串狀釀母菌屬之Rhodotorula yarrowii DSM 14155、毛髮芽苞菌屬之Trichosporon mucoides DSM 14156與Trichosporon dulcitum DSM 14162。

4. 如申請專利範圍第1、2或3項之微生物，其特徵為該細菌及/或酵母特別利用冷凍乾燥、噴霧乾燥或微膠囊化

六、申請專利範圍

使其安定。

5. 如申請專利範圍第1至4項中任一項之微生物，其特徵為該細菌及/或酵母係呈不含細胞之萃取物或粗萃取物予以利用。

6. 如申請專利範圍第5項之微生物，其特徵為該微生物係呈於溶液(特別是，水溶液)中之不含細胞之萃取物予以利用。

7. 如申請專利範圍第5項之微生物，其特徵為該粗萃取物係藉由施用超音波、酵素分解、組合急驟冷凍與解凍、流動均質器、法式壓濾器(French press)、於高NaCl濃度之自溶、及/或球磨等方式，自該細菌及酵母獲得。

8. 如申請專利範圍第1至6項中任一項之微生物，其特徵為該微生物係於含有pH介於1與12(特別是，2與8)之間的乙酸鹽、檸檬酸鹽、磷酸鹽或參鹽酸鹽緩衝劑之緩衝溶液中予以利用。

9. 一種於食品及/或動物飼料中使用選自Sphingomonas sp. DSM 14170與DSM 14167、Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168、Stenotrophomonas sp. DSM 14169、青枯桿菌屬之Ralstonia eutropha DSM 14171及真細菌屬DSM 14197之細菌，及/或選自毛髮芽苞菌屬新穎菌種DSM 14153、囊球菌屬DSM 14154、紅色串狀釀母菌屬之Rhodotorula yarrowii DSM 14155、毛髮芽苞菌屬之Trichosporon mucoides DSM

六、申請專利範圍

14156與 Trichosporon dulcitum DSM 14162之酵母，藉由裂解赭麴毒素之苯丙胺酸基團或降解玉米赤黴烯酮，進行如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素之解毒作用之用途。

10.如申請專利範圍第9項之用途，其特徵為於食品及/或動物飼料中使用毛髮芽苞菌屬新穎菌種DSM 14153、真細菌屬DSM 14197或 Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168進行如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素之解毒作用。

11.如申請專利範圍第9或10項之用途，其特徵為於食品及/或動物飼料中使用該細菌/或酵母之混合培養液進行如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素之解毒作用。

12.一種藉助微生物於食品及/或動物飼料中進行如赭麴毒素及/或玉米赤黴烯酮之黴菌毒素之解毒作用之方法，其特徵為以介於0.01重量%至1重量%(特別是，0.05重量%至0.5重量%)範圍內之量，使如申請專利範圍第1至8項中任一項之微生物與食品或動物飼料混合。

13.如申請專利範圍第12項之方法，其特徵為該食品或動物飼料係利用於含有20至99重量%(特別是，35至85重量%)水之該微生物之水性懸浮液中，溫度10至60℃(特別是15至45℃)下，攪拌2分鐘至12小時(特別是5分鐘至2小時)，進行處理。