

[12]发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95195287.0

[45]授权公告日 2002 年 10 月 9 日

[11]授权公告号 CN 1092027C

[22]申请日 1995. 10. 18 [21]申请号 95195287.0
[30]优先权
[32]1994. 10. 19 [33]AT [31]GM357/94
[86]国际申请 PCT/AT95/00204 1995. 10. 18
[87]国际公布 WO96/12414 德 1996. 5. 2
[85]进入国家阶段日期 1997. 3. 26
[73]专利权人 埃贝尔公司
地址 奥地利赫佐根堡
[72]发明人 E·埃贝尔
[56]参考文献
US 5445956A 1995. 8. 29
审查员 阎心奇

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所
代理人 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 0 页

[54]发明名称 失活真菌毒素的饲料添加剂

[57]摘要

一种使动物饲料或动物消化道中的真菌毒素失活的饲料添加剂,含有由选自由植物、细菌、酵母或原生动物的有机体制备的酶制剂,含量为 0.1-3kg/1000kg 饲料,其中产生酶的有机体选自能够产生环氧酶和/或内酯酶的有机体。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1、一种使动物饲料或动物消化道中的真菌毒素失活的饲料添加剂，其中该饲料添加剂由选自植物、细菌、酵母或原生动物的有机体产生的酶制剂组成，其中产生酶的有机体选自能够产生环氧酶和内酯酶的有机体。

2、根据权利要求1的饲料添加剂，其中的酶制剂是由产生酶的有机体的失活纯培养物的粗提取物形成的。

3、根据权利要求1或2的饲料添加剂，其中用酵母菌属菌株，特别是地生酵母的提取物作为酶制剂。

4、根据权利要求1、2的饲料添加剂，其中还含有具有大的内表面的天然或合成多孔矿物，含量为0.5-8kg/1000kg。

5、根据权利要求4的饲料添加剂，其中还含有具有大的内表面的天然或合成多孔矿物，含量为0.7-4kg/1000kg饲料。

6、根据权利要求4的饲料添加剂，其中，累积孔体积为0.05-4cm³/g，的硅藻土、沸石、2-和3-层粘土矿物或它们的混合物被用作有大的内表面的天然或合成多孔矿物质，其表面上的pH值为4.5-7.5。

7、根据权利要求6的饲料添加剂，其中，累积孔体积为0.5-2.5cm³/g，的硅藻土、沸石、2-和3-层粘土矿物或它们的混合物被用作有大的内表面的天然或合成多孔矿物质，其表面上的pH值为4.5-7.5。

8、根据权利要求1或2的饲料添加剂，其中的饲料添加剂由1-65%重量的酶制剂和99-35%重量的具有大的内表面的天然或合成多孔矿物组成的混合物组成。

9、根据权利要求8的饲料添加剂，其中的饲料添加剂中酶制剂的含量为5-50%重量。

10、根据权利要求8的饲料添加剂，其中的饲料添加剂中具有大的内表面的天然或合成多孔矿物组成的混合物的含量为95-50%重量。

11、根据权利要求1-10任一项的饲料添加剂的用途，用于失活饲料中的或动物的消化道中的黄曲霉毒素、T-2毒素、脱氧瓜萎镰菌醇，瓜萎镰菌醇，zearalenones, monoacetoxyscirpenole, H-T-2毒素，疣孢菌素，杆

孢菌素, satratoxin, 巴卡林醇、木霉菌醇, diacetoxyscirpenole, fumonisine, 赭曲毒素, moniliformine, fusarenone X 和扁豆菌素。

12、根据权利要求 11 的饲料添加剂的用途, 其中所述饲料添加剂以 0.1-3kg/1000kg 饲料的量存在于饲料中。

13、制备饲料的方法, 其中进行或没进行磨碎和/或干燥的农作物与根据权利要求 1-10 任一项的饲料添加剂和水混合, 水的 pH 值通过添加酸而调节至 1-4.5 以适于反应, 将混合物在 15-40℃下搅拌 3-30 分钟, 在将 pH 值调节至适于作饲料后和排除了液体成分后用热空气流干燥。

14、根据权利要求 13 的方法, 其中的饲料粉在干燥之前用已知方法压成丸。

失活真菌毒素的饲料添加剂

本发明涉及一种使动物饲料或动物的消化道中的真菌毒素失活的饲料添加剂，在饲料中含有由选自植物、细菌、酵母或原生动物的有机体制备的酶制剂（这些有机体生产酶），含量为 0.1-3kg/1000kg 饲料。本发明进一步涉及使动物饲料或动物的消化道中的真菌毒素失活的饲料添加剂的用途，并涉及制备含有该饲料添加剂的饲料的方法。

从 EP - A 0257996 可知一种饲料预混物及其生产方法，该饲料预混物除了含有生理可接受的载体例如谷粉外，还添加有一种或多种酶。EP - A 0286056 也揭示了一种饲料混合物和处理饲料原料的方法，该饲料混合物添加有酶制剂。这两种已知的饲料混合物中所添加的基本是淀粉酶，因为年幼的动物，特别是小猪缺乏这些分解谷物的酶。

此外，从 AT - PS 397756 可知一种饲料添加剂，其含有诸如硅酸盐或沸石的、具有很大的内表面的无机物以及有机杂环聚合物来吸收毒素。

真菌毒素是霉菌的有毒代谢产物，在饲料工业和家畜饲养中某种程度上被认为是不可避免的，并在很大程度上被认为是导致有用动物的驯养和繁殖能力丧失的原因。因此，长期以来使用了许多方法来避免真菌毒素达到动物身体内或失活达到动物身体内的真菌毒素，从而避免真菌毒素在动物身体里的有害作用。基于真菌毒素因其分子中存在的功能基团而显示出高度化学反应性这一事实，这一努力尤其必要。这种高度化学反应性在这种物质的毒性上起着重要的作用，因为这些基团与诸如核酸、酶、细胞膜中的类脂类物质等生物学上重要的分子相互作用。

为了将真菌毒素脱毒，至今已阐述了诸如提取、加热、辐射和毒素的吸附的物理方法，以及真菌毒素的化学失活方法，如用酸、碱和不同的氧化剂进行处理。在这些已知的不同方法中，吸附在实践中是最为有用的。这种吸附通常是通过添加大量的吸附剂如粘土、活性炭或聚合物来完成的。由于吸附的作用方式，这种方法不可能将真菌毒素完全失活或将全部真菌毒素固定在吸附剂上。吸附作用基本上是在吸附剂上形成被称为水合

层的层，极性分子由于范德华力而聚集其上。到目前为止，用这种方法能够较为令人满意地失活诸如黄曲霉毒素的极性真菌毒素。但对于具有极性不太强的官能团的真菌毒素，这种方法不能将其充分地固定在吸附剂上。现有技术的吸附方法不可能充分地失活这种真菌毒素。

因此，本发明的目的在于提供一种使动物饲料或动物的消化道中的真菌毒素失活的饲料添加剂，具体地说是一种基于选自由植物、细菌、酵母或原生动物（生产酶的）有机体的酶制剂。用它可将通常存在于饲料中的真菌毒素吸附并至少部分地降解，由此基本去除饲料中的真菌毒素带来的有害作用。

本发明进一步的目的在于一种饲料添加剂的用途，它能够失活存在于饲料中的或在动物的消化道中的真菌毒素，从而避免损失有用动物饲养效率。

为了解决这个问题，本发明的饲料添加剂在于生产酶的有机体系选自能够产生环氧酶和/或内酯酶的有机体。由于产生酶的有机体选自能够产生环氧酶和/或内酯酶的有机体这一事实，饲料添加剂中所含的酶制剂能在饲料或肠道中很大程度地降解具有高度化学反应性、因此毒性极强、存在于饲料中的真菌毒素，和/或将其化学转化成毒性小或无毒性化合物，从而可以大大降低毒性。

具体地说，使用一种酶制剂，该酶制剂是用本身已知的方法、在最佳的生长条件下、通过制备能够产生环氧酶和/或内酯酶的有机体的一种纯培养物或多种纯培养物而便利地制得的。然后用本身也是已知的方法将这些增殖的纯培养物细胞失活，从而得到酶，这些酶不变性因而得以保持不受损伤。作为酶制剂，这些失活细胞或这些细胞的纯提取物或粗提取物能够被直接混合到饲料中。根据特别优选的实施方案，使用环氧酶/或内酯酶。酶或酶制剂具有这样的好处，它们使属于种类非常不相同的化学物质的真菌毒素降解或化学改性。其原因是，由于许多真菌毒素是以氧作为杂原子的环状烃，这些环中的氧键经常是环氧化物或内酯的形式。优选使用环氧酶，它属于水解酶，通过形成两个羟基而使真菌毒素的环氧环打开，羟基可以随后容易地被动物体降解。同样优选使用的内酯酶以类似的方式起作用。

为了达到这个目的，将饲料、本发明饲料添加剂和水混合，调节至微酸性或中性 PH 值，再用这种混合物作饲料，可以在用作饲料之前实现真菌毒素的部分降解。需注意不能将饲料粉制成强酸性，以免对动物的喂饲习惯产生不利影响或引起健康上的问题。在这方面，特别优选酶制剂对真菌毒素的降解在无需提供额外能量的情况下进行，并只需在动物的消化道环境中通过酶制剂和饲料的均匀混合而实现。如果需要，这能够通过调至适当 PH 值的水混合而得到。

根据本发明，优选使用酵母菌属菌株 (*Saccharomyces*-strains)，特别是地生酵母的提取物作为酶制剂。酵母属菌株是一种特殊种类的酵母菌，是获得酶的最重要的种类之一。该酵母可以非常高的量产生不同的水解酶，并且，已经显示出在饲料工业中用于完全不同目的的酵母属菌株也可以用来特别迅速完全地降解含有环氧基团和内酯基团的真菌毒素。为此地生酵母是优选使用的，用它可以在动物胃肠的自然条件下完成 trichothecenes，特别是 T-2 毒素、H-T-2 毒素和脱氧瓜萎镰菌醇 (deoxynivalenole) 的降解。尤其添加地生酵母能够打开上述真菌毒素的环氧环，所形成的二羟基化合物随后在消化道中被代谢掉而无任何毒害作用。

为了达到饲料中所含真菌毒素最大可能的失活，本发明饲料添加剂中优选以 0.5-8kg/1000kg，特别是 0.7-4kg/1000kg 饲料的含量含有一种有大的内表面的天然或合成多孔矿物。由酶制剂和有大的内表面的天然或合成多孔矿物质的混合物制得的饲料添加剂可以确保在具有相应于动物胃肠的 PH 值的含水介质中或在动物消化道中，存在于饲料表面的所有真菌毒素，特别是极性真菌毒素被吸附在矿物质上或被酶制剂降解或化学转化。有大的内表面的天然或合成多孔矿物质的存在还具有这样的优点，即通过将真菌毒素吸附在这些矿物质的表面上使这些真菌毒素容易被酶制剂分解。

根据本发明，累积孔体积为 $0.05-4\text{cm}^3/\text{g}$ ，特别是 $0.5-2.5\text{cm}^3/\text{g}$ ，其表面上的 PH 值为 4.5-7.5 的硅藻土、沸石、2-和 3-层粘土矿物或它们的混合物被优选用作有大的内表面的天然或合成多孔矿物质。累积孔体积为 $0.05-4\text{cm}^3/\text{g}$ ，特别是 $0.5-2.5\text{cm}^3/\text{g}$ 的硅藻土、沸石和层状粘土矿物质或它们的混合物能够非常有效地吸附真菌毒素，由此很大程度地使它们失活。这

些矿物质的孔径优选为 10nm-1 μ m，表面的 PH 值为 4.5-7.5。这些矿物质用本身已知的方法制备，其中尤其优选在约 800 $^{\circ}$ C - 900 $^{\circ}$ C 下不用任何助熔剂煅烧矿物质，以便得到均匀的表面孔结构。例如，可以使用这样的矿物混合物：80 % 斜发沸石和 20 % 白云母，80 % 菱沸石和 20 % 白云母，75 % 斜发沸石和 25 % 高岭土或 85 % 菱沸石和 15 % 高岭土。

最后，本发明使动物饲料或动物的消化道中的真菌毒素失活的饲料添加剂的基本特征在于，饲料添加剂由 1 - 65 % 重量的，特别是 5 - 50 % 重量的酶制剂和 99 - 35 % 重量，特别是 95 - 50 % 重量的具有大的内表面的天然或合成多孔矿物组成。通过使用较大量的，即 1 - 65 % 重量，特别是 5 - 50 % 重量的酶制剂，将确保饲料中全部能降解的真菌毒素被很大程度地降解。另一方面，有大的内表面的天然或合成多孔矿物确保那些不被化学降解的真菌毒素基本上结合于这些矿物的表面上，由此使它们也不能代谢和显示出对动物有害的作用。最好通过混合天然或合成多孔矿物将酶制剂的活性调节为环氧酶 470 - 600UI/g、内酯酶 280 - 400UI/g。

添加或没添加有大的内表面的天然或合成多孔矿物的本发明饲料添加剂特别可以用于失活和降解饲料中的或动物的消化道中的黄曲霉毒素、T - 2 毒素、脱氧瓜萎镰菌醇，瓜萎镰菌醇、zearalenones, monoacetoxyscirpenole, H-T-2 毒素, 疣孢菌素，杆孢菌素，satratoxin, 巴卡林醇 (baccharinole)、木霉菌醇，diacetoxyscirpenole, fumonisine, 赭曲毒素, moniliformine, fusarenone X 和扁豆菌素。

由于可被本发明酶制剂失活或降解的真菌毒素的带宽大，使用本发明饲料添加剂是非常好和有效的从饲料中去除有毒物质的方法。通过使用饲料添加剂，被真菌毒素高度污染的饲料可以不显示出其危害家畜的作用。此外，饲料，特别是仅经过磨碎、干燥或其他处理（以增加耐久性）的天然农作物，在与本发明饲料添加剂混合之后可以直接或与 PH 值被调至微酸性的水调制后，毫无顾虑不经科学机构的进一步检测而喂给家畜。

此外，本发明涉及一种制备饲料的方法，其中，进行或没进行磨碎和/或干燥的农作物与本发明饲料添加剂和水混合，水的 PH 值调节至适于反应，将混合物在 15 - 40 $^{\circ}$ C 下搅拌 3 - 30 分钟，在将 PH 值调节至适于作饲料后和排除了液体成分后用热空气流干燥。PH 值的调节或酸性化可以

用药物可接受的酸，特别是盐酸、醋酸等来完成，其中，PH 值优选被调节至 1 - 4.5 之间以便使饲料中含有的真菌毒素迅速失活。根据本发明，温度范围调节在 15℃ - 40℃，即从室温到体温，时间范围为 3 - 30 分钟，以使真菌毒素几乎完全失活。

由于 PH 值在上述高酸性范围的饲料不能直接喂给动物，在（真菌毒素）失活后可以对饲料进行中和，例如用氢氧化钠、碳酸氢钠、碳酸钠等中和至微酸性或中性 PH 值。然后在抽提掉液体成分后，在热空气流中干燥饲料以便得到没有真菌毒素和能够长期贮藏的饲料。因此，特别优选在进行干燥之前用已知方法将饲料粉压成丸。对于这些丸，可以在提供优异的贮藏和运输性能的同时来通过表面积的减少减少饲料中营养物质的氧化。

下面通过实施例进一步说明本发明。

实施例

本发明饲料添加剂对真菌毒素的临床效果的研究

饲料添加剂：60 % 重量含有环氧酶和内酯酶的酵母制剂

10 % 重量高岭土

30 % 重量斜发沸石

选择 48 只两种性别的杂交幼年猪，平均体重为 8.16kg，变化系数为 20.83 %，平均年龄为 28.6 天进行试验。每个试验步骤选择类似的幼年猪进行。在整个试验中，控制猪栏中的温度和湿度。

给试验动物喂饲含有三种不同含量和两种不同类型的真菌毒素的食料。四个试验组还喂本发明的饲料添加剂。一个试验组既不喂真菌毒素也不喂本发明饲料添加剂。

饲料中大体含有大豆、小米和乳粉，一天喂 4 - 5 次，水可任意喂。真菌毒素被溶于乙醇并与少量的食料混合以备随后混入饲料中。试验组列于表 1，其中真菌毒素含量相同的两组幼年猪为相同的年龄和来源。

表 1： 添加和不添加饲料添加剂、具有不同真菌毒素含量的试验组

T2 毒素 + 黄曲霉毒素 B₁

饲料添加剂

1	0.3ppm+0.1ppm	0kg/t
2	0.5ppm+0.1ppm	0kg/t
3	1.0ppm+0.1ppm	0kg/t
4	0.3ppm+0.1ppm	2kg/t
5	0.5ppm+0.1ppm	2kg/t
6	1.0ppm+0.1ppm	2kg/t
7	0.0ppm+0.0ppm	2kg/t
8	0.0ppm+0.0ppm	0kg/t

测定的参数是体重、进食量、体重的平均日增加量和饲料转化率。

测定参数的结果示于表 2。

表 2： 8 个试验组的平均进食量、体重的平均日增加量和饲料转化率

组	平均进食量	体重的平均日增加量	饲料的转化率
1	904	453	1.99
2	909	455	1.99
3	796	471	1.69
4	916	530	1.73
5	910	487	1.86
6	818	492	1.66
7	922	520*	1.77
8	899	509	1.77

* 通过去掉一个发育不健全的动物而得到校正

临床评价:

- 1 组 (0.3ppmT-2 毒素 + 0.1ppm 黄曲霉毒素 B₁ 和 0.0kg 饲料添加剂): 轻度结膜炎, 身体状况和皮肤正常, 进食量稍有降低。
- 2 组 (0.5ppmT-2 毒素 + 0.1ppm 黄曲霉毒素 B₁ 和 0.0kg 饲料添加剂): 眼睛、口鼻和口套明显严重发炎, 身体状况正常, 食欲降低。
- 3 组 (1.0ppmT-2 毒素 + 0.1ppm 黄曲霉毒素 B₁ 和 0.0kg 饲料添加剂): 全部幼年猪表现出眼睛、口鼻、口套和颈、胸外侧发炎。从第二周开

始全部幼年猪表现出肠气和食欲大大下降。第 12 天一只幼年猪呕吐。

- 4 和 5 组 (0.3ppm 或 0.5ppm T-2 毒素 + 0.1ppm 黄曲霉毒素 B₁ 和 2kg 饲料添加剂) :

结膜炎的轻度症状, 皮肤发炎, 进食和身体状况认为正常。

- 6 组 (1.0ppmT-2 毒素 + 0.1ppm 黄曲霉毒素 B₁ 和 2kg 饲料添加剂) :

2 只幼年猪 (6) 只表现出轻度的结膜炎, 全部其它测定值在正常范围内。

- 7 组 (0.0ppmT-2 毒素 + 0.0ppm 黄曲霉毒素 B₁ 和 2kg 饲料添加剂) :
和

- 8 组 (0.0ppmT-2 毒素 + 0.0ppm 黄曲霉毒素 B₁ 和 0.0kg 饲料添加剂)
(对照组) :

幼年猪健康。

从上述评价得到, 从 3 个剂量级的每一个中都可以清楚看到本发明饲料添加剂对于进食、体重的日增加和饲料转化率的正效应。未处理的组与用饲料添加剂处理的组相比明显显示出较严重的真菌毒素临床症状。考虑测定参数并从临床的观点来看, 本发明饲料添加剂的有益效果 - 即抗 T - 2 毒素和黄曲霉毒素污染的有效保护作用是明显的。