



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 398 883 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2347/89

(51) Int.Cl.⁶ : **A23K 1/165**
A61K 37/54

(22) Anmeldetag: 11.10.1989

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1994

(45) Ausgabetag: 27. 2.1995

(30) Priorität:

12.10.1988 HU 5256/88 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

AT-PS 232361
RUSS.ABSTRACT SU 1 397.019-A

(73) Patentinhaber:

REANAL FINOMVEGYSZERGYAR
H-1441 BUDAPEST (HU).

(72) Erfinder:

HUTAS ISTVAN DR.
BUDAPEST (HU).
SZABO ANNA Z.
BUDAPEST (HU).
PRIBEK FERENC DR.
BUDAPEST (HU).
BENDE ZOLTAN DR.
BUDAPEST (HU).
CSOKA ARPAD
BUDAPEST (HU).
JECSAI GYÖRGY
BUDAPEST (HU).
NAGY LASZLO
BUDAPEST (HU).
GYÖRVARI OTTO
BUDAPEST (HU).

(54) IN DER TIERZUCHT VERWENDETES PRÄPARAT SOWIE VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG

(57) Bei einem in der Tierzucht verwendeten Präparat mit einem Gehalt an Lysozym wird vorgeschlagen, daß das Präparat 1 bis 2,5 Masseteile eines oder mehrerer lipophiler Vitamine, wie Vitamin A, D₃ und/oder E zusammen mit Trägern und/oder Verdünnungsmitteln und gegebenenfalls mit einem oder mehreren Hilfsstoffen bezogen auf ein Masseteil Lysozym oder eines Salzes davon enthält.

AT 398 883 B

Die Erfindung betrifft ein der Tierzucht verwendete Präparate mit einem Gehalt an Lysozym. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der obigen Präparate.

Es ist wohlbekannt, daß heutzutage die oral verabreichten Vitamine in der im Großbetrieb durchgeführten Tierzucht und Tierhaltung unentbehrlich sind. Gleichzeitig wird in den letzten Jahrzehnten der Widerstand der Behörden und der Fachwelt gegenüber den maßlos verwendeten chemotherapeutischen Mitteln und Antibiotika immer größer. Zum natürlichen Schutz des tierischen Organismus und zur Verhütung der Krankheiten drängen die biologisch aktiven Stoffe natürlichen Ursprungs (z.B. Enzyme usw.) immer mehr in den Vordergrund. Für die Tierzucht ist bereits die Herstellung fettlöslicher Vitamine enthaltener Präparate mittels spezieller Verfahren bekannt, wobei das Ziel in der Herstellung eines stabilen Präparates liegt. Es ist auch bereits ein Futterzusatz bekannt, welcher Lysozymkochsalz und Essigsäure oder Zitronensäure enthält. Dieses Präparat besitzt eine wachstumsfördernde Wirkung.

Den obigen umweltfreundlichen Enzymen gehört das Lysozym (auch Muramidase genannt) an (Biologisches Lexikon, Band II, Seite 622, Akademischer Verlag, Budapest, 1975). Das Lysozym ist zur Zersetzung der Glukosidbindungen von Mucopolysacchariden und des Lysins, welche die Zellwand der Bakterien bilden, fähig. Das Lysozym besteht aus 129 Aminosäuren, dessen Molekulargewicht beträgt 14 600, es ist basischen Charakters und ein im Wasser gut lösbares Protein. Als reichste Quelle von Lysozym kann das Eiweiß angesehen werden.

Es wurde gefunden, daß Präparate, welche das Enzym Lysozym zusammen mit einem oder mehreren lipophilen Vitamin(en) enthalten, in der Tierzucht als präventive Mittel sehr vorteilhaft verwendet werden können. Die Anwendung von derartigen Präparaten ist insbesondere in solchen Fällen sehr günstig, wenn die Verwendung von konkreten und hochwirksamen Arzneimitteln noch nicht erwünscht oder nicht begründet oder sogar verboten ist (z.B. während der der Abschächtung vorangehenden "Wartzeit").

Erfindungsgemäß wird bei dem eingangs erwähnten Präparat vorgeschlagen, daß das Präparat 1 bis 2,5 Masseteile eines oder mehrerer lipophiler Vitamine, wie Vitamin A, D₃ und/oder E oder ein Salz bzw. Salze davon zusammen mit Trägern und/oder Verdünnungsmitteln und gegebenenfalls mit einem oder mehreren Hilfsstoffen zweckmäßig oberflächenaktiven Mitteln, Antioxydationsmitteln und/oder Konservierungsmitteln enthält, bezogen auf ein Masseteil Lysozym oder eines Salzes davon.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß das Enzym Lysozym und lipophile Vitamine enthaltende Präparate in der Tierzucht vorteilhaft als präventive, die Körpergewichtszunahme erhöhende Mittel mit Anti-Stress-Wirkung sowie zur Behandlung einzelner bakterieller Infektionen verwendet werden können, und auf diesen Gebieten erhöht das anwesende Vitamin die Aktivität des Enzyms Lysozym synergistisch. Aus dem Stand der Technik ist diese synergistische Wirkungssteigerung nicht bekannt und es können auch keine Schlüsse darauf gezogen werden.

Die erfindungsgemäßen Präparate können als lipophiles Vitamin Vitamin A-Propionat und/oder Vitamin E-Acetat enthalten.

Als saures Salz des Lysozyms kann zweckmäßig das Lysozymhydrochlorid eingesetzt werden.

Die stabilen kolloidalen Lösung stellen einen besonders vorteilhaften Typ der erfindungsgemäßen Präparate dar. Die Herstellung von stabilen kolloidalen Lösungen ist jedoch wegen der Anwesenheit der lipophilen Vitamine eine ziemlich komplizierte Aufgabe. Die Herstellung von stabilen sterilen kolloidalen Lösungen ist besonders schwierig.

Es wird erfindungsgemäß vorgeschlagen, daß man ein oder mehrere lipophile(s) Vitamin(e) bzw. Salz(e) davon in wäßriger Lösung in Gegenwart von Propylenglykol, einem nichtionischen Tensid und gegebenenfalls einem oder mehreren bekannten Hilfstoff(en), zweckmäßig Antioxydationsmitteln und/oder Konservierungsmitteln, mit dem Enzym Lysozym oder einem Salz davon vermischt, wobei die untere Konzentrationsgrenze vom Propylenglykol 0,05 g/100 ml kolloidale Lösung und die von dem nichtionischen Tensid 5 g/100 ml kolloidale Lösung ist. Die in anderen Trägermedien bzw. in Gegenwart von anderen oberflächenaktiven Mitteln hergestellten Mischungen sind nicht stabil, brechen innerhalb einer kurzen Zeit bzw. es treten Ausscheidungen und Ausfällungen auf, welche die genauen Dosierungen und dadurch die wirksame Anwendung verhindern.

Es können vorzugsweise 0,05 - 50 g Propylenglykol und 5 - 30 g nichtionisches Tensid, auf 100 ml wäßrige kolloidale Lösung gerechnet, verwendet werden. Als nichtionisches Tensid findet Polyoxyethylenglycerin-triricinoleat besonders vorteilhaft Verwendung.

Nach der obigen Methode können die erfindungsgemäßen Präparate in Form einer leicht behandelbaren stabilen sterilen kolloidalen Lösung hergestellt werden. Das Verfahren ist technologisch einfach durchführbar und benötigt keine speziellen Vorrichtungen und Apparate.

Die erfindungsgemäßen Präparate zeigen in der Tierhaltung, insbesondere an Geflügel, eine signifikante Antistresswirkung und können dementsprechend zum präventiven Gesundheitsschutz der Tiere vorteilhafter als die bekannten Kompositionen verwendet werden.

Weitere Einzelheiten der vorliegenden Erfindung sind den nachstehenden Beispielen zu entnehmen, ohne den Schutzzumfang auf diese Beispiele einzuschränken.

Beispiel 1

Es wird ein Präparat nachstehender Zusammensetzung in Form einer sterilen, stabilen, kolloidalen Lösung hergestellt:

Vitamin A-Propionat (2 500 000 I.E.)	1200 g
Vitamin D ₃	10 g
Vitamin E-Acetat	3000 g
Lysozym (2000 I.E.)	2000 g
Propylenglykol	20000 g
Polyoxyethylenglycerin-trirhcinoleat (Emulgierungsmittel, nichtionisches Tensid)	15000 g
Butylhydroxytoluol (Antioxydationsmittel)	500 g
Benzylalkohol	1000 g
EDTA-Na	1000 g
Destilliertes Wasser	zu 100 Liter

50 Liter destilliertes Wasser werden in einen Duplikator eingewogen, wonach Lysozymhydrochlorid (in einer 2000 g von Lysozym entsprechenden Menge) und eine oben angegebene Menge von EDTA-Na unter ständigem Rühren und unter Erwärmen bei 75 °C aufgelöst werden. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur wird die Lösung auf 60 °C gekühlt. Die mechanischen Verunreinigungen werden durch Filtrieren entfernt, wonach das Filtrat auf einem Membranfilter (Porendurchmesser 0,22 µ) oder Kerzenfilter keimfrei filtriert wird.

Die lipophilen Vitamine, das Polyoxyethylenglycerin-trirhcinoleat, das Butylhydroxytoluol und der Benzylalkohol werden in einen sterilen Behälter eingewogen. Das Gemisch wird unter schnellem Rühren auf 60 °C erwärmt, wonach die auf 60 °C erwärmte Lysozymlösung und das, nötigenfalls von den mechanischen Verunreinigungen befreite Propylenglykol zugegeben werden. Das Volumen des Gemisches wird mit destilliertem Wasser auf 100 Liter ergänzt.

Die so erhaltene Lösung wird von den mechanischen Verunreinigungen durch Filtrieren befreit, wonach das Filtrat in sterilisierte Gläser gefüllt wird, welche sofort abgeschlossen werden.

Beispiel 2

Man verfährt wie im Beispiel 1, mit dem Unterschied, daß man 2500 g Propylenglykol und 30000 g Polyoxyethylenglycerin-trirhcinoleat (nichtionisches Tensid) einwiegt.

Beispiel 3

Es wird ein Pulvergemisch folgender Zusammensetzung hergestellt:

Vitamin A-Propionat	1560 g
Vitamin D ₃	11 g
Vitamin E-Acetat	3300 g
Polyoxyethylenglycerin-trirhcinoleat	2000 g
Lysozymhydrochlorid	2200 g
EDTA-Na	50 g
Aerosil 200	5000 g
Glukose	zu 100000 g

Die Glukose, das EDTA-Na, Aerosil 200 und das Lysozymhydrochlorid werden in einem säurefesten Pulverrührapparat eingewogen und die Komponenten werden gründlich homogenisiert. Das Vitamin A-Propionat, Vitamin D₃ und Vitamin E-Acetat werden separat miteinander vermischt, das Polyoxyethylenglycerin-trirhcinoleat wird zugemischt, wonach das so erhaltene Gemisch der obigen Pulvermischung unter Rühren tropfenweise zugegeben wird. Nach 20 minütigem Rühren bildet sich aus dem am Träger

gebundenen Wirkstoffgemisch ein gut behandelbares, nichthaftendes, pulverförmiges Produkt. Diese Pulvermischung wird zu 50 g Anteilen in schwarzen Polyethylenfolienbeutel verpackt. Die Pulvermischung kann mindestens 12 Monate lang ohne irgendwelche Veränderung gelagert werden.

Eine Pulvermischung obiger Zusammensetzung kann zur Behandlung von Nutztieren zweckmäßig in einer nachstehenden Dosis pro Tag verwendet werden:

Eintagsgeflügel	20-40 g/1000 Tiere
Junggeflügel und ausgewachsenes Geflügel	40-60 g/1000 Tiere
Andere Tierarten	8-12 g/100 g Lebendgewicht

Beispiel 4

Die Wirksamkeit des Präparates nach Beispiel 3 wurde an Broilerküken bestimmt. Zum Versuch werden drei, je aus 600 Küken bestehende Gruppen verwendet. Die Tiere wurden 45 Tage lang beobachtet. Am 3., 21. und 42.Tag der Versuchsperiode wurden die Tiere der I. Gruppe mit 3 g pro Tag des nach Beispiel 3 hergestellten Präparates (auf 100 Küken berechnet) behandelt; das Präparat wurde dem Trinkwasser der Tiere beigemischt. In den gleichen Zeiträumen wurden die Tiere der III. Gruppe auf die obige Weise und mit der gleichen Dosis mit einem nach Beispiel 3 hergestellten Präparat behandelt, welches jedoch anstatt von Lysozymhydrochlorid eine gleiche Menge von Glukose enthielt. Die Küken der II. Gruppe erhielten keinen Wirkstoff enthaltendes Trinkwasser. Die Tiere der drei Gruppen wurden unter identischen Bedingungen gehalten und mit demselben Futter gefüttert. Das Ergebnis der Behandlung wurde am 45.Tag ausgewertet. Die Ergebnisse werden in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt.

Gruppe	Verendung	Gewichtszunahme*	Futterverwertung*
I.	3,2%	112%	108%
II.	8,2%	100%	100%
III.	4,3%	104%	103%

* Mit der unbehandelten Kontrolle (Gruppe II.) verglichen

Was die Ableitung dieser Werte aus den ursprünglichen Unterlagen betrifft, wird folgendes dargestellt, zum Masseverhältnis von Lysozym und Vitamin das folgende:

Das Präparat gemäß Beispiel 3 enthält insgesamt 2,2 Masseteile von Vitaminen (Vitamin A ist in Form eines Propionatsalzes und Vitamin E in Form eines Acetatsalzes), bezogen auf 1 Masseteil von Lysozymhydrochlorid. Im Sinne der Beschreibung kann man Lysozym statt Lysozymhydrochlorid ohne weiteres verwenden. Falls man in dem Präparat gemäß Beispiel 3 das Lysozymhydrochlorid durch eine äquivalente Menge Lysozym ersetzt, enthält das Präparat 2,5 Masseteile (genau 2,436 Masseteile) Vitamin-Komponente, bezogen auf 1 Masseteil von Lysozym. Das Präparat gemäß Beispiele 1 und 2 enthält 2,1 Masseteile Vitamin-Komponente (Vitamin A und E in Form der das Beispiel 3 betreffend bereits erwähnten Salze), bezogen auf 1 Masseteil Lysozym. Es besteht kein technisches Bedenken, anstatt des Lysozyms eine äquivalente Menge Lysozymsalz bzw. anstatt der genannten Vitaminsalze die entsprechenden freien Vitamine zu benützen. Falls man in diesem Präparat das Lysozym durch eine äquivalente Menge Lysozymsalz, hergestellt aus einer salzbildenden Säure mit hohe Molgewicht, ersetzt und die Vitamine A und E in freier Form verwendet, kann die untere Grenze von 1 : 1 eingestellt werden.

Patentansprüche

1. In der Tierzucht verwendetes Präparat mit einem Gehalt an Lysozym, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Präparat 1 bis 2,5 Masseteile eines oder mehrer lipophiler Vitamine, wie Vitamin A, D₃ und/oder E oder ein Salz bzw. Salze davon zusammen mit Trägern und/oder Verdünnungsmitteln und gegebenenfalls mit einem oder mehreren Hilfsstoffen zweckmäßig oberflächenaktiven Mitteln, Antioxydationsmitteln und/oder Konservierungsmitteln enthält, bezogen auf ein Masseteil Lysozym oder eines Salzes davon.

2. Präparat nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es als lipophiles Vitamin Vitamin A-Propionat und/oder Vitamin E-Acetat enthält.
3. Präparat nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß es das Enzym Lysozym in Form des Hydrochlorids enthält.
4. Verfahren zur Herstellung von Präparaten nach einen der Ansprüche 1 bis 3 in Form einer stabilen kolloidalen Lösung, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein oder mehrere lipophile(s) Vitamin(e) bzw. Salz(e) davon in wäßriger Lösung in Gegenwart von Propylenglykol, einen nichtionischen Tensid und gegebenenfalls einen oder mehreren bekannten Hilfstoff(en), zweckmäßig Antioxydationsmitteln und/oder Konservierungsmitteln, mit dem Enzym Lysozym oder einem Salz davon vermischt, wobei die untere Konzentrationsgrenze vom Propylenglykol 0,05 g/100 ml kolloidale Lösung und die von dem nichtionischen Tensid 5 g/100 ml kolloidale Lösung ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man 0,05 - 50 g Propylenglykol und 5 - 30 g nichtionisches Tensid, vorteilhaft Polyoxyethylenglycerin-trirhcinoleat, auf 100 ml der kolloidalen Lösung bezogen, verwendet.