



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101902924 A

(43) 申请公布日 2010.12.01

(21) 申请号 200880122226.1 *A23K 1/165*(2006.01)

(22) 申请日 2008.12.18 *A23K 1/18*(2006.01)

(30) 优先权数据 *C12N 9/18*(2006.01)
07150205.8 2007.12.20 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日
2010.06.21

(86) PCT申请的申请数据
PCT/EP2008/067885 2008.12.18

(87) PCT申请的公布数据
W02009/080701 EN 2009.07.02

(71) 申请人 诺维信公司
地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 安德斯·维克索-尼尔森
伯思·H·索伦森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
代理人 史悦

(51) Int. Cl.
A23L 1/015(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 序列表 3 页
附图 0 页

(54) 发明名称
用于饲料产品的解毒的角质酶

(57) 摘要
本发明涉及一种方法,包括用于受到真菌毒素玉米赤霉烯酮污染的饲料产品的解毒的角质酶处理。

1. 一种用于降解饲料产品中的玉米赤霉烯酮的方法,该方法包括用角质酶处理所述饲料产品。
2. 权利要求1的方法,其中所述角质酶的剂量是0.01-100mg酶蛋白质每kg干物质,优选0.1-10mg酶蛋白质每kg干物质,或更优选1-5mg酶蛋白质每kg干物质。
3. 根据权利要求1或2任一项的方法,其中所述饲料产品是基于谷物的饲料产品。
4. 根据权利要求1-3任一项的方法,其中所述饲料产品包含选自玉米、小麦、大麦、黑麦、稻、高粱和粟中的一种或多种。
5. 根据权利要求1-4任一项的方法,其中所述饲料产品是动物饲料组合物。
6. 根据权利要求1-5任一项的方法,其中所述饲料产品是来自发酵方法的副产物。
7. 根据权利要求1-6任一项的方法,其中所述饲料产品包括啤酒酒糟、蒸馏酒酒糟、蒸馏酒湿酒糟、和/或蒸馏酒干酒糟。
8. 根据权利要求1-7任一项的方法,其中所述饲料产品是猪饲料产品。
9. 根据权利要求1-8任一项的方法,其中所述角质酶是具有SEQ ID NO:1所示序列或同源序列的角质酶。
10. 根据权利要求1-9任一项的方法,其中所述角质酶是SEQ ID NO:1所示角质酶的变体,所述变体包含取代G8D、N15D、S48E、A88H、N91H、A130V和R189V中的一个或多个,如包括全部上述取代。
11. 根据权利要求1-10任一项的方法,其中所述角质酶是具有SEQ IDNO:2所示序列或同源序列的角质酶。
12. 角质酶用于降解真菌毒素的用途。
13. 根据权利要求12的用途,其中所述真菌毒素是玉米赤霉烯酮。
14. 根据权利要求12或13任一项的用途,其用于基于谷物的饲料产品。
15. 根据权利要求12-14任一项的用途,其中所述角质酶的剂量是0.01-100mg酶蛋白质每kg干物质,优选0.1-10mg酶蛋白质每kg干物质,或更优选1-5mg酶蛋白质每kg干物质。

用于饲料产品的解毒的角质酶

[0001] 关于序列表

[0002] 本申请含有计算机可读形式的序列表。通过提述将该计算机可读形式并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及一种方法,包括使用角质酶处理用于使受到真菌毒素玉米赤霉烯酮污染的饲料产品解毒。

[0004] 发明背景

[0005] 谷类上的数种植物病原性和 / 或收割后镰孢属物种生成家畜和家禽生产者相当关注的有毒物质,例如脱氧瓜萎镰菌醇 (deoxynivalenol)、T-2 毒素、HT-2 毒素、蛇形菌素 (diacetoxyscirpenol) 和玉米赤霉烯酮 (zearalenone)。

[0006] 玉米赤霉烯酮在全世界见于多种谷类作物,如玉米 (maize, corn)、大麦 (barley)、燕麦 (oats)、小麦 (wheat)、黑麦 (rye)、稻 (rice)、粟 (millet) 和高粱 (sorghum)。在收割之前似乎不发生显著量的玉米赤霉烯酮生成,但是在合适的环境条件下,它易于在贮藏的谷物和小谷粒 (small grains) 上生成。

[0007] 当在乙醇生产中使用谷类谷物及消耗淀粉时,玉米赤霉烯酮在发酵副产物中,例如在蒸馏酒干酒糟中浓缩。发酵副产物中的玉米赤霉烯酮含量可以相对于谷类谷物升高为三倍。

[0008] 该毒素是热稳定的,而且它不受长期贮藏、焙烧 (roasting)、或添加丙酸或发霉延迟剂破坏。

[0009] 尽管它们的结构与类固醇雌激素类不同,但是玉米赤霉烯酮及其数种衍生物拥有雌激素活性。玉米赤霉烯酮经历折叠,使得羟基或潜在羟基变成适当取向的,以便于结合通常结合雌激素的组织受体。

[0010] 玉米赤霉烯酮是引起不孕不育、流产或其它育种问题的主要毒素,尤其在猪中。青春期前的小母猪中的症状尤其严重,包括扩大的乳房、子宫和外阴肿胀、及卵巢萎缩。在严重的病例中,可发生外阴和直肠脱垂。公猪展现扩大的乳房和萎缩的睾丸。

[0011] 玉米赤霉烯酮存在于来自用受到污染的谷物喂养的动物的肉以及自受到污染的小麦烤制的面包。虽然罕见人中毒的病例,但是关注人长期暴露于此类雌激素活性的影响。

[0012] 使用环氧酶或内酯酶灭活真菌毒素,包括玉米赤霉烯酮披露于 W09612414。

[0013] 需要使受到真菌毒素玉米赤霉烯酮污染的动物饲料产品,例如发酵副产物,包括蒸馏酒湿和干酒糟解毒的其它方法。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明的发明人发现,用角质酶处理饲料产品能降解饲料产品中的玉米赤霉烯酮。因而,在第一个方面,本发明提供一种用于降解饲料产品中的玉米赤霉烯酮的方法,该方法包括用角质酶处理所述饲料产品。

[0016] 在第二个方面,本发明提供角质酶用于降解真菌毒素的用途。

[0017] 发明详述

[0018] 玉米赤霉烯酮

[0019] 在本发明的语境中,术语“玉米赤霉烯酮”包含自某些镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) 生成的真菌毒素玉米赤霉烯酮。IUPAC 名称是 (4S,12E)-15,17-二羟基-4-甲基-3-氧双环 [12.4.0] 十八-12,15,17,19-四烯-2,8-二酮。术语“玉米赤霉烯酮”还涵盖玉米赤霉烯酮的任何衍生物,其包含对角质酶修饰易感的内部羧酸酯键。

[0020] 动物饲料产品

[0021] 术语“动物”包括所有动物,包括人类。动物的例子有牛(包括但不限于母牛(cow)和小牛);单胃动物,例如,猪(包括但不限于小猪、饲养猪和母猪);家禽,如火鸡和鸡(包括但不限于仔鸡、蛋鸡);和鱼(包括但不限于鲑鱼)。

[0022] 术语“饲料”或“饲料产品”指适合或意图由动物摄取的任何化合物、制备物、混合物或组合物。

[0023] 饲料产品可以是不含有害水平 (unwanted level) 的玉米赤霉烯酮的产品,其适合动物消费。饲料产品也可以是怀疑含有害水平的玉米赤霉烯酮的产品、和 / 或具有未知水平的玉米赤霉烯酮的产品,包括不包含可检测水平的玉米赤霉烯酮的产品。

[0024] 优选的是,饲料产品是基于谷物的产品。优选的是,基于谷物的产品包含谷类,例如玉米、小麦、大麦、黑麦、稻、高粱和粟中的一种或多种。还优选的是基于谷物的产品,其包含源自玉米、小麦、大麦、黑麦、稻、高粱和粟中的一种或多种的材料。在一个实施方案中,饲料产品可以例如仅仅衍生自谷类,而且在另一个实施方案中,部分源自豆类(例如大豆)且部分源自谷类。基于谷物的产品可包含整个的或碾碎的谷物,例如湿磨或干磨的谷物,包括含有湿磨或干磨谷物的级分(例如面筋 (gluten)、蛋白质、淀粉、和 / 或油级分)的基于谷物的产品。还优选包含来自酿造和 / 或发酵方法的副产物,例如酒糟的产品。酒糟指来自含酒精饮料和乙醇燃料生产的副产物。啤酒酒糟 (BSG) 指使用发芽大麦作为主要原材料的啤酒厂中制造啤酒的残余物。蒸馏酒酒糟 (DSG) 是蒸馏酒厂中通过自发酵的谷物如玉米、小麦、大麦、黑麦、和稻蒸馏取出酒精后剩下的产物。蒸馏酒酒糟也称作蒸馏酒糟。将湿蒸馏酒酒糟 (WDG) 干燥以生成干蒸馏酒酒糟 (DDG),其主要用作动物饲料。

[0025] 角质酶

[0026] 在本发明的语境中,术语“角质酶”包括酶分类 E. C. 3. 1. 1. 74 所包含的酶。优选下文所述酶以及具有同源序列的酶,尤其是重组的和 / 或基本上纯化的酶。

[0027] 角质酶可以源自真菌。具体而言,角质酶可以源自腐质霉属 (*Humicola*),特别是特异腐质霉 (*H. insolens*) 的菌株,更特别的是特异腐质霉菌株 DSM1800 (US 5, 827, 719) 或镰孢属 (*Fusarium*),例如大刀粉红镰孢 (*F. roseumculmorum*),或特别是茄病镰孢 (*F. solani pisi*) 的菌株 (WO 90/09446 ;WO94/14964,WO 94/03578)。真菌角质酶也可以源自丝核菌属 (*Rhizoctonia*),例如立枯丝核菌 (*R. solani*) 的菌株或链格孢属 (*Alternaria*),例如甘蓝链格孢 (*A. brassicicola*) 的菌株 (WO 94/03578)。角质酶也可以是亲本角质酶的变体,如记载于 WO 00/34450 或 WO 01/92502 的那些,通过提述都并入本文。角质酶可以是特异腐质霉角质酶的变体,其包含取代 E6Q、G8D、A14P、N15D、E47K、S48E、R51P、A88H、A91H、A130V、E179Q 和 R189V,其披露于 10038. 204-WO 的第 24 页第 11 行。

[0028] SEQ ID NO :1 是特异腐质霉角质酶的氨基酸序列(对应于 US 5, 827, 719 的 SEQ ID NO :2 的和 WO 01/92502 的 SEQ ID NO :1 的成熟部分),而 SEQ ID NO :2 是依照 WO 94/14964

图 1D 的茄病镰孢的氨基酸序列。

[0029] 角质酶必须以有效量存在于待解毒的培养基中。优选的是,角质酶以 0.01-100mg 酶蛋白质每 kg 干物质,优选 0.1-10mg 酶蛋白质每 kg 干物质,或更优选 1-5mg 酶蛋白质每 kg 干物质的浓度存在。

[0030] 培养基

[0031] 在一个实施方案中,角质酶降解包含饲料产品的培养基中的玉米赤霉烯酮。所述培养基优选是含水的,而且可以是液体、糊体或浆体。为了形成合适的培养基,可以向饲料产品添加水。可以在适合施用于所述培养基的固体或液体配制物中包含角质酶。

[0032] 在一个实施方案中,角质酶降解玉米赤霉烯酮至一定程度,由此每 kg 干物质饲料产品的玉米赤霉烯酮含量降低至少于初始量的 50%,优选少于 60%,更优选少于 70%,和最优选少于 80%。

[0033] 本发明的解毒效率取决于例如培养基的缓冲剂、温度、pH 和水的可用性。例如,可以在实际角质酶的相对活性为至少 50、或 60、或 70、或 80 或 90% 的 pH 值进行处理。同样地,例如,可以在实际角质酶的相对活性为至少 50、或 60、或 70、或 80 或 90% 的温度进行处理。相对于观察到最高活性的 pH 值处的活性计算相对活性。

[0034] 培养基中的 pH

[0035] 根据所采用的角质酶的特征等,所采用的培养基中的 pH 通常应当在 5-11 的范围内,优选在范围 6-10 中,例如 6.5-8.5。

[0036] 培养基中的温度

[0037] 优选的是,应用接近角质酶的最适温度的反应温度。在本发明的众多实施方案中,应当采用 10-65°C 的范围中的温度,更优选 30-50°C。

[0038] 处理持续时间

[0039] 处理持续时间取决于处理类型、待处理的项目的类型、培养基的特性(例如温度和 pH)及所采用的酶的类型和量等。

[0040] 继续酶促反应,直至实现期望的结果,之后可以通过灭活酶(例如通过热处理步骤)来终止,或者不这样做。

[0041] 为了解毒目的,可采用 1 分钟至 1 周的范围中的处理时间。在许多情况中,6-48 小时的范围中的处理时间会是合适的。

[0042] 同一性

[0043] 两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性以参数“同一性”来描述。

[0044] 就本发明而言,两个氨基酸序列之间的同一性程度使用 EMBOSS 包(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice 等, 2000, Trends in Genetics 16: 276-277) 的 Needle 程序中执行的 Needleman-Wunsch 算法(Needleman 和 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) 来确定, 优选 3.0.0 版或其后版本。所使用的任选参数是缺口打开罚分 10, 缺口延伸罚分 0.5, 和 EBLOSUM62(EMBOSS 版本的 BLOSUM62) 取代矩阵。使用 Needle 标记的“最长同一性”(使用 -nobrief 选项获得) 的输出作为百分比同一性, 且如下计算:

[0045] $(\text{相同残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的缺口总数})$

[0046] 就本发明而言,两个脱氧核糖核苷酸序列之间的同一性程度使用 EMBOSS 包

(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice 等, 2000, 见上文) 的 Needle 程序中执行的 Needleman-Wunsch 算法 (Needleman 和 Wunsch, 1970, 见上文) 来确定, 优选 3.0.0 版或其后版本。所使用的任选参数是缺口打开罚分 10, 缺口延伸罚分 0.5, 和 EDNAFULL (EMBOSS 版本的 NCBI NUC4.4) 取代矩阵。使用 Needle 标记的“最长同一性”(使用 -nobrief 选项获得的) 的输出作为百分比同一性, 且如下计算:

[0047] $(\text{相同脱氧核糖核苷酸} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的缺口总数})$

[0048] 同源序列

[0049] 术语“同源序列”定义为在用规定序列进行的 tfasty 搜索 (Pearson, W. R., 1999, 于 Bioinformatics Methods and Protocols, S. Misener 和 S. A. Krawetz 编, pp. 185-219) 中给出小于 0.001 的 E 值 (或期望值) 的预测蛋白质。

[0050] 术语“同源序列”也可以定义为与规定序列具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或甚至 100% 的同一性程度的序列。

实施例

[0051] 实施例 1

[0052] 酶: 重组生产的酶组合物, 其包含 10038.204-W0 第 24 页第 11 行披露的来自特异腐质霉的角质酶变体。

[0053] 测定法: 在装有玉米赤霉烯酮 30 μ M, Tris 100mM 和酶 0.1mg EP/mL 的 Eppendorf 管中的 300 微升体积中进行反应。在对照反应中, 用等量的 H₂O 取代酶体积。将反应于 37°C 温育 24 小时, 之后通过添加 600 微升 100 μ M 乙腈终止溶液来终止。将反应物保存于 -20°C, 直至层析分析。

[0054] 层析分析: 将样品离心, 并如 Smedsgaard (J. Chromatogr. A, 1997, 760, 264-270) 所述通过 HPLC-DAD 对上清液分析玉米赤霉烯酮。DAD 扫描 200-600nm。在 Phenomenex (Torrance, CA) Luna C18(2) 10 \times 2mm ID, 3 微米, 柱 2 上使用线性梯度 5% 变动至 100% 乙腈在 20 分钟里进行分离。相对于对照计算残余玉米赤霉烯酮。结果呈现于表 1。

[0055] 表 1: 有或无角质酶于 pH 7 温育 24 小时后的残余玉米赤霉烯酮。

[0056]

[0057] 酶	残余玉米赤霉烯酮 (%)
[0059] 对照	100
[0060] 角质酶	19

[0058]

序列表

<110> 诺维信公司 (Novozymes A/S)

<120> 用于饲料产品的解毒的角质酶

<130>11339. 204-WO

<160>2

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>194

<212>PRT

<213> 特异腐质霉 (*Humicola insolens*)

<220>

<221> 成熟肽

<222>(1).. (194)

<400>1

Gln	Leu	Gly	Ala	Ile	Glu	Asn	Gly	Leu	Glu	Ser	Gly	Ser	Ala	Asn	Ala
1				5					10					15	
Cys	Pro	Asp	Ala	Ile	Leu	Ile	Phe	Ala	Arg	Gly	Ser	Thr	Glu	Pro	Gly
			20					25						30	
Asn	Met	Gly	Ile	Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Leu	Ala	Asn	Gly	Leu	Glu	Ser
		35					40					45			
His	Ile	Arg	Asn	Ile	Trp	Ile	Gln	Gly	Val	Gly	Gly	Pro	Tyr	Asp	Ala
	50					55					60				
Ala	Leu	Ala	Thr	Asn	Phe	Leu	Pro	Arg	Gly	Thr	Ser	Gln	Ala	Asn	Ile
65					70					75				80	
Asp	Glu	Gly	Lys	Arg	Leu	Phe	Ala	Leu	Ala	Asn	Gln	Lys	Cys	Pro	Asn
				85					90					95	
Thr	Pro	Val	Val	Ala	Gly	Gly	Tyr	Ser	Gln	Gly	Ala	Ala	Leu	Ile	Ala
				100					105					110	
Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Leu	Ser	Gly	Ala	Val	Lys	Glu	Gln	Val	Lys	Gly
				115				120						125	
Val	Ala	Leu	Phe	Gly	Tyr	Thr	Gln	Asn	Leu	Gln	Asn	Arg	Gly	Gly	Ile

130	135	140
Pro Asn Tyr Pro Arg Glu Arg Thr Lys Val Phe Cys Asn Val Gly Asp		
145	150	155
Ala Val Cys Thr Gly Thr Leu Ile Ile Thr Pro Ala His Leu Ser Tyr		
	165	170
Thr Ile Glu Ala Arg Gly Glu Ala Ala Arg Phe Leu Arg Asp Arg Ile		
	180	185
Arg Ala		190

<210>2

<211>199

<212>PRT

<213> 茄病镰孢 (*Fusarium solani pisi*)

<220>

<221> 成熟肽

<222>(1).. (199)

<400>2

Gly Arg Thr Thr Arg Asp Asp Leu Ile Asn Gly Asn Ser Ala Ser Cys		
1	5	10
Ala Asp Val Ile Phe Ile Tyr Ala Arg Gly Ser Thr Glu Thr Gly Asn		
	20	25
Leu Gly Thr Leu Gly Pro Ser Ile Ala Ser Asn Leu Glu Ser Ala Phe		
	35	40
Gly Lys Asp Gly Val Trp Ile Gln Gly Val Gly Gly Ala Tyr Arg Ala		
	50	55
Thr Leu Gly Asp Asn Ala Leu Pro Arg Gly Thr Ser Ser Ala Ala Ile		
65	70	75
Arg Glu Met Leu Gly Leu Phe Gln Gln Ala Asn Thr Lys Cys Pro Asp		
	85	90
Ala Thr Leu Ile Ala Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Ala Leu Ala Ala		
	100	105
Ala Ser Ile Glu Asp Leu Asp Ser Ala Ile Arg Asp Lys Ile Ala Gly		
	115	120
Thr Val Leu Phe Gly Tyr Thr Lys Asn Leu Gln Asn Arg Gly Arg Ile		
	130	135
Pro Asn Tyr Pro Ala Asp Arg Thr Lys Val Phe Cys Asn Thr Gly Asp		
145	150	155
		160

Leu Val Cys Thr Gly Ser Leu Ile Val Ala Ala Pro His Leu Ala Tyr
 165 170 175

Gly Pro Asp Ala Arg Gly Pro Ala Pro Glu Phe Leu Ile Glu Lys Val
 180 185 190

Arg Ala Val Arg Gly Ser Ala
 195