



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112566502 A

(43) 申请公布日 2021.03.26

(21) 申请号 201980050378.3

(22) 申请日 2019.08.29

(30) 优先权数据

18192131.3 2018.08.31 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/073114 2019.08.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/043836 EN 2020.03.05

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 T·霍夫

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 邵红 刘盈盈

(51) Int.Cl.

A23K 10/14 (2006.01)

A23K 20/189 (2006.01)

A23K 50/75 (2006.01)

G12N 9/54 (2006.01)

权利要求书3页 说明书44页

序列表5页

(54) 发明名称

具有蛋白酶活性的多肽以及编码它们的多核苷酸

(57) 摘要

本发明涉及具有蛋白酶活性的分离的多肽，通过添加蛋白酶改善了动物饲料的营养价值的、包含所述多肽的动物饲料添加剂；本发明还涉及编码这些多肽的多核苷酸，包含这些多核苷酸的核酸构建体、载体和宿主细胞，以及产生这些多肽的方法。

1. 一种具有蛋白酶活性的分离的或纯化的多肽,该分离的或纯化的多肽选自由以下组成的组:

- (a) 与SEQ ID NO:1的成熟多肽具有至少95%序列同一性的多肽;
- (b) (a)的多肽的片段,该片段具有蛋白酶活性。

2. 根据权利要求1所述的多肽,该多肽与SEQ ID NO:1的成熟多肽具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

3. 根据权利要求1或2所述的多肽,该多肽是在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:1的成熟多肽的变体。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的多肽,该多肽包含SEQ ID NO:1或其成熟多肽,基本上由其组成或由其组成。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的多肽,该多肽是SEQ ID NO:1或其成熟多肽的片段,其中该片段具有蛋白酶活性。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的至少一种多肽的用途:

- (a) 在动物饲料中;
- (b) 在动物饲料添加剂中;
- (c) 在用于在动物饲料中使用的组合物的制备中;
- (d) 用于改善动物饲料的营养价值;
- (e) 用于增加动物饲料中的可消化和/或可溶性蛋白质;
- (f) 用于增加动物饮食中的蛋白质的水解程度;和/或
- (g) 用于处理蛋白质。

7. 一种用于改善动物饲料的营养价值的方法,该方法包括向该饲料中添加根据权利要求1-5中任一项所述的至少一种多肽。

8. 一种动物饲料添加剂,其包含:

- (a) 根据权利要求1-5中任一项所述的至少一种多肽;以及
- (b) 至少一种脂溶性维生素,和/或
- (c) 至少一种水溶性维生素,和/或
- (d) 至少一种痕量矿物质。

9. 根据权利要求8所述的动物饲料添加剂,其进一步包含一种或多种淀粉酶;植酸酶;木聚糖酶;半乳聚糖酶; $\alpha$ -半乳糖苷酶;蛋白酶、磷脂酶、 $\beta$ -葡聚糖酶或其任何混合物。

10. 一种动物饲料,其包含根据权利要求8或9所述的动物饲料添加剂。

11. 一种分离的或纯化的多核苷酸,该分离的或纯化的多核苷酸编码根据权利要求1-5中任一项所述的多肽。

12. 一种核酸构建体或表达载体,该核酸构建体或表达载体包含根据权利要求11所述的多核苷酸,其中该多核苷酸优选地可操作地连接至指导该多肽在表达宿主中的产生的一个或多个控制序列。

13. 一种重组宿主细胞,其包含根据权利要求11所述的多核苷酸,该多核苷酸可操作地连接至指导该多肽的产生的一个或多个控制序列。

14. 根据权利要求13所述的重组宿主细胞,该重组宿主细胞是酵母重组宿主细胞,例如,假丝酵母属、汉逊酵母属、克鲁维酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属或耶氏酵母

属细胞,如乳酸克鲁维酵母、卡尔酵母、酿酒酵母、糖化酵母、道格拉氏酵母、克鲁弗酵母、诺地酵母、卵形酵母或解脂耶氏酵母细胞;或者

该重组宿主细胞是丝状真菌重组宿主细胞,例如,枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管霉属、拟蜡菌属、金孢子菌属、鬼伞属、革盖菌属、隐球菌属、线黑粉菌科、镰孢属、腐质霉属、梨孢菌属、毛霉属、毁丝霉属、新美鞭菌属、链孢菌属、拟青霉属、青霉属、平革菌属、射脉菌属、瘤胃壶菌属、侧耳属、裂褶菌属、篮状菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳属、弯颈霉属、栓菌属或木霉属细胞,特别是,泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、黑刺烟管霉、干拟蜡菌、卡内基拟蜡菌、浅黄拟蜡菌、潘诺希塔拟蜡菌、环带拟蜡菌、微红拟蜡菌、虫拟蜡菌、狭边金孢子菌、嗜角质金孢子菌、卢克诺文思金孢子菌、粪状金孢子菌、租金孢子菌、女王杜香金孢子菌、热带金孢子菌、褐薄金孢子菌、灰盖鬼伞、毛革盖菌、杆孢状镰孢、谷类镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾谷镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖孢镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、拟分枝孢镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢、镶片镰孢、特异腐质霉、疏棉状腐质霉、米黑根毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙链孢菌、产紫青霉、黄孢平革菌、射脉菌、刺芹侧耳、埃默森篮状菌、土生梭孢霉、长域毛栓菌、变色栓菌、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉或绿色木霉细胞;或者

该重组宿主细胞是原核重组宿主细胞,例如,选自下组的革兰氏阳性细胞,该组由以下组成:芽孢杆菌属、梭菌属、肠球菌属、土芽孢杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、大洋芽孢杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属或链霉菌属细胞,或者选自下组的革兰氏阴性细菌,该组由以下组成:弯曲杆菌属、大肠杆菌、黄杆菌属、梭杆菌属、螺杆菌属、泥杆菌属、奈瑟氏菌属、假单胞菌属、沙门氏菌属、以及脲原体属细胞,例如嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚硬芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、似马链球菌、酿脓链球菌、乳房链球菌和马链球菌兽疫亚种、不产色链霉菌、除虫链霉菌、天蓝链霉菌、灰色链霉菌、以及浅青紫链霉菌细胞。

15. 一种动物饲料添加剂,其包含一种或多种具有蛋白酶活性的多肽,其中该多肽是S8蛋白酶,并且其中该S8蛋白酶选自由以下组成的组:

(a) 与SEQ ID NO:1具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性的多肽;

(b) 由如下多核苷酸编码的多肽,该多核苷酸与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性;

(c) SEQ ID NO:1中任一种的变体,其中该变体具有蛋白酶活性并且在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个位置中包含一个或多个取代、和/或一个或多个缺失、和/或一个或多个插入或其任何组合;

(d) 包含(a)、(b)或(c)的多肽以及N-末端和/或C-末端His-标签和/或HQ-标签的多肽;

(e) 包含(a)、(b)或(c)的多肽以及多至10个氨基酸,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的N-末端和/或C-末端延伸的多肽;以及

(f) (a)、(b)或(c)的多肽的片段,该片段具有蛋白酶活性并且具有成熟多肽的至少

90%的长度。

## 具有蛋白酶活性的多肽以及编码它们的多核苷酸

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请含有处于计算机可读形式的序列表,将其通过引用并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及具有蛋白酶活性的多肽,编码这些多肽的多核苷酸,包含这些多核苷酸的核酸构建体、载体以及宿主细胞连同产生和使用多肽的方法,并且涉及包含具有蛋白酶活性的多肽的动物饲料或动物饲料添加剂。

### 背景技术

[0004] 在动物饲料中使用蛋白酶(体内),和/或这类蛋白酶用于处理植物性蛋白质(体外)的用途中,应注意蛋白质对于动物和人是必需营养因子。大部分家畜和许多人从植物性蛋白质源获得这些必需蛋白质。重要的植物性蛋白质源是,例如,油籽作物、豆类和谷类。

[0005] 当蛋白质源(例如大豆粉)包含在单胃动物(如猪和家禽)的饲料中时,相当比例的大豆粉未被有效地消化(在小猪、生长猪和家禽如肉鸡、蛋鸡和公鸡中的表观回肠氮消化率仅是80%左右)。通过改善蛋白质的消化率,动物可以吸收更多的蛋白质从而改善性能,例如增加的体增重。

[0006] 动物的胃肠道是由一系列各自呈现不同pH环境的区段组成。在单胃动物如猪和家禽以及许多类型的鱼中,胃是具有潜在地低至2-3的pH的强酸性,而肠具有6-7.5左右的更中性的pH。除胃和肠之外,家禽在胃之前还具有嗉囊。嗉囊中的pH主要由消化的饲料决定并且因此典型地位于pH 4-6的范围内。通过蛋白酶消化蛋白可发生在整个消化道中,其条件是该蛋白酶是有活性的并于该消化道的条件下存活。因此,以下的蛋白酶是特别令人希望的:它们是高度地酸稳定的,可以在胃环境中存活,并且同时在靶动物的消化道的宽范围的生理pH下是有效地有活性的。

[0007] 决定蛋白酶是否可以改善蛋白质吸收的一个方法是通过研究当蛋白酶添加至动物饮食中时回肠氮消化率是否得到改善。运行体内试验可以确认蛋白酶的胃稳定性以及蛋白酶在降解蛋白质方面的有效性。本发明的一个目的是提供显示改善的生长性能增加的蛋白酶,例如通过表观回肠氮消化率实现的。

### 发明内容

[0008] 本发明提供具有蛋白酶活性的分离的或纯化的多肽和编码这些多肽的多核苷酸。

[0009] 因此,本发明涉及具有蛋白酶活性的分离的或纯化的多肽,这些分离的或纯化的多肽选自由以下组成的组:

[0010] (a) 与SEQ ID NO:1的成熟多肽具有至少90%序列同一性,例如至少95%序列同一性的多肽;

[0011] (b) (a)的多肽的片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0012] 本发明还涉及编码本发明的多肽的分离的或纯化的多核苷酸;包含这些多核苷酸

的核酸构建体、重组表达载体、重组宿主细胞；以及产生这些多肽的方法。

[0013] 本发明进一步涉及动物饲料添加剂，其包含一种或多种具有蛋白酶活性的多肽，其中该多肽是S8蛋白酶，并且其中该S8蛋白酶选自由以下组成的组：

[0014] (a) 与SEQ ID NO:1具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性的多肽；

[0015] (b) 由如下多核苷酸编码的多肽，该多核苷酸与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性；

[0016] (c) SEQ ID NO:1中任一种的变体，其中该变体具有蛋白酶活性并且在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个位置中包含一个或多个取代、和/或一个或多个缺失、和/或一个或多个插入或其任何组合；

[0017] (d) 包含(a)、(b)或(c)的多肽以及N-末端和/或C-末端His-标签和/或HQ-标签的多肽；

[0018] (e) 包含(a)、(b)或(c)的多肽以及多至10个氨基酸，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的N-末端和/或C-末端延伸的多肽；以及

[0019] (f) (a)、(b)或(c)的多肽的片段，该片段具有蛋白酶活性并且具有成熟多肽的至少90%的长度。

[0020] 本发明还涉及改善动物的一个或多个性能参数的方法，该方法包括向一种或多种动物施用包含本发明的多肽的动物饲料添加剂；涉及制备动物饲料的方法，该方法包括将包含本发明的多肽的动物饲料添加剂或液体配制品与至少一种蛋白质或蛋白质源混合；涉及用于处理蛋白质的方法，该方法包括将本发明的动物饲料添加剂或液体配制品添加到至少一种蛋白质或蛋白质源中；涉及用于增加蛋白质的消化率和/或溶解度的方法，该方法包括将本发明的动物饲料添加剂或本发明的液体配制品与至少一种蛋白质或蛋白质源混合，并且涉及用于改善动物饲料的营养价值的方法，该方法包括将本发明的动物饲料添加剂或本发明的液体配制品添加到饲料中。

[0021] 本发明还涉及编码信号肽的分离的或纯化的多核苷酸，该信号肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸1至25或由其组成，这些多核苷酸可操作地连接至编码蛋白质的基因；包含这些多核苷酸的核酸构建体、表达载体、和重组宿主细胞；以及产生蛋白质的方法。

[0022] 本发明进一步涉及动物饲料添加剂，其包含：

[0023] (a) 根据权利要求1-5中任一项所述的至少一种多肽；和

[0024] (b) 至少一种脂溶性维生素，和/或

[0025] (c) 至少一种水溶性维生素，和/或

[0026] (d) 至少一种痕量矿物质。

[0027] 一个相关方面涉及包含如本发明所定义的动物饲料添加剂的动物饲料。

[0028] 序列表概述

[0029] SEQ ID NO:1是来自海泥芽孢杆菌(*Bacillus oceanisediminis*)的S8蛋白酶的氨基酸序列。

[0030] SEQ ID NO:2是编码来自海泥芽孢杆菌的SEQ ID NO:1的S8蛋白酶的DNA序列。

[0031] 定义

[0032] 根据此详细描述,以下定义适用。注意,单数形式“一种/个(a/an)”以及“该(the)”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确指明。

[0033] 本文提及“约”值或参数包括针对该值或参数本身的方面。例如,提及“约X”的描述包括方面“X”。

[0034] 除非另外定义或由上下文明确指示,否则本文所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的不同含义。

[0035] 动物:术语“动物饲料”是指除人以外的所有动物。动物的实例为非反刍动物和反刍动物。反刍动物包括例如以下动物,如绵羊、山羊、牛(例如,肉牛、奶牛和小牛)、鹿、牦牛、骆驼、美洲驼和袋鼠。非反刍动物包括单胃动物,例如猪或生猪(包括但不限于小猪、生长猪和母猪);家禽,如火鸡、鸭和鸡(包括但不限于肉鸡和蛋鸡);马(包括但不限于热血马、冷血马和温血马)、小牛;鱼(包括但不限于琥珀鱼、巨滑舌鱼、魮鱼、鲈鱼、蓝鱼、菖鲉(bocachico)、鲤科鱼、鲶鱼、卡叉马鱼(cachama)、鲤鱼、鲶鱼、卡特拉鱼、遮目鱼、嘉鱼、丽鱼科鱼、军曹鱼、鳕鱼、小翻车鱼、金头鲷、石首鱼、鳗鱼、虾虎鱼、金鱼、丝足鱼、石斑鱼、瓜波特鱼(guapote)、大比目鱼、爪哇鱼(java)、野鲮属鱼、菜鱼(lai)、泥鳅、鲭鱼、牛奶鱼、银鲈、泥鱼、鲱鱼、帕高鱼(paco)、珍珠斑点鱼(pearlspot)、佩杰瑞鱼(pejerrey)、河鲈鱼、狗鱼、鲟参鱼、斜齿鳊、鲑鱼、虾米鱼(sampa)、加拿大鱈鱼、黑鲈、海鲤、发光鱼(shiner)、睡鲨(sleeper)、黑鱼、鲷鱼、锯盖鱼、比目鱼、刺足鱼、鲟鱼、翻车鱼、香鱼(sweetfish)、丁鲷、特罗尔鱼(terror)、罗非鱼、鳟鱼、鲑鱼、多宝鱼、白鳟鱼、白斑鱼和白鱼);以及甲壳动物(包括但不限于虾和对虾)。

[0036] 动物饲料:术语“动物饲料”是指适合于或打算用于由动物摄入的任何化合物、制剂或混合物。单胃动物的动物饲料典型地包含浓缩物连同维生素、矿物质、酶、直接饲喂微生物(direct fed microbial)、氨基酸和/或其他饲料成分(如在预混物中),而反刍动物的动物饲料通常包含草料(包括粗粮和青贮),并且还可包含浓缩物连同维生素、矿物质、酶直接饲喂微生物、氨基酸和/或其他饲料成分(如在预混物中)。

[0037] 表观回肠氮消化率:术语“表观回肠氮消化率”(或AIDN)是当考虑到小肠末端(回肠)干物质的表观消失时,回肠消化物和饲料之间的氮浓度百分比差异。AIDN被用作小肠粗蛋白质消化率的估计,而不考虑小肠内源性蛋白的释放。这意味着与AIDN相比,真正的粗蛋白质消化率总是更大。AIDN的增加通常与小肠对氨基酸的吸收增加有关,并且是改善的动物性能的标记。使用以下公式计算表观回肠氮消化率(AIDN):

[0038] 
$$\text{AIDN}(\%) = 100 - [(C_{mf}/C_{me}) \times (C_{ne}/C_{nf})] \times 100;$$

[0039] 其中

[0040]  $C_{mf}$  = 饲料中标记的浓度; $C_{me}$  = 回肠消化物中标记的浓度;

[0041]  $C_{nf}$  = 饲料中营养素的浓度; $C_{ne}$  = 回肠消化物中营养素的浓度。

[0042] 术语“与阴性对照相比,使回肠氮消化率提高至少x%(例如,4%)”意味着如果阴性对照(即,相同饲料,但不向饮食中添加蛋白酶)的表观回肠氮消化率为y%(例如,75%),则蛋白酶组的表观回肠氮消化率的百分比至少为y%+x%(因此在此实例中>79%)。

[0043] 体增重:术语“体增重(body weight gain)”意指在给定时间段期间动物的活重的增加,例如从第1天到第21天的体增重。

[0044] cDNA:术语“cDNA”意指可以通过从获得自真核或原核细胞的成熟的、剪接的mRNA分子进行反转录而制备的DNA分子。cDNA缺乏可以存在于对应基因组DNA中的内含子序列。初始的初级RNA转录物是mRNA的前体,其要通过一系列的步骤(包括剪接)进行加工,然后呈现为成熟的剪接的mRNA。

[0045] 编码序列:术语“编码序列”意指直接指定多肽的氨基酸序列的多核苷酸。编码序列的边界通常由可读框确定,该可读框以起始密码子(例如ATG、GTG或TTG)开始并且以终止密码子(例如TAA、TAG或TGA)结束。编码序列可为基因组DNA、cDNA、合成DNA或其组合。

[0046] 组合物:术语“组合物”是指包含载体和本发明的至少一种酶的组合物。可以将本文描述的组合物与动物饲料混合,并且可以将其称为“粉状饲料”。

[0047] 浓缩物:术语“浓缩物”意指具有高蛋白和能量浓度的饲料,例如鱼粉、糖蜜、寡糖、高粱、种子和谷物(例如来自玉米、燕麦、黑麦、大麦、小麦的整体或由破碎、碾磨等制备的)、油籽滤饼(例如来自棉籽、红花、向日葵、大豆、油菜籽/卡诺拉(canola)、花生或落花生)、棕榈仁饼、酵母衍生材料和酒糟(例如湿酒糟(WDS)和具有可溶物的干酒糟(DDGS))。

[0048] 控制序列:术语“控制序列”意指对于表达编码本发明的多肽的多核苷酸所必需的核酸序列。每个控制序列对于编码该多肽的多核苷酸来说可以是天然的(即,来自相同基因)或异源的(即,来自不同基因),或相对于彼此是天然的或异源的。此类控制序列包括但不限于前导序列、多腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列、以及转录终止子。最少,控制序列包括启动子、以及转录和翻译终止信号。出于引入有利于将控制序列与编码多肽的多核苷酸的编码区连接的特异性限制位点的目的,这些控制序列可以提供有多个接头。

[0049] 欧洲生产效能因子(EPEF):术语“欧洲生产效能因子”是决定生产效率并考虑到饲料转化率、死亡率和日增重的一个术语。EEF计算为 $[(\text{存活率}(\%) \times \text{体增重}(\text{kg})) / (\text{以天计的研究持续时间}) \times \text{FCR}] \times 100$ 。

[0050] 表达:术语“表达”意指涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于:转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰、以及分泌。

[0051] 表达载体:术语“表达载体”意指直链或环状DNA分子,其包含编码多肽的多核苷酸并且可操作地连接至提供用于其表达的控制序列。

[0052] 饲料转化率:术语“饲料转化率”是指用来将动物的体重增加一个指定量的喂给动物的饲料量。改善的饲料转化率意指较低的饲料转化率。“较低的饲料转化率”或“改善的饲料转化率”意味着当饲料不包含所述饲料添加剂组合物时,与以将动物体重增加到相同量所需的饲料量相比,在饲料中使用饲料添加剂组合物导致需要将更少量的饲料喂给动物,以将动物的体重增加一个指定量。

[0053] 饲料效率:术语“饲料效率”意指当动物在一段时间内被任意喂养或喂养指定量的食物时每单位饲料的增重的量。“增加的饲料效率”意味着根据本发明的饲料添加剂组合物在饲料中的使用导致与不用所存在的所述饲料添加剂组合物喂养的动物相比,每单位饲料摄入的增加的增重。

[0054] 草料:如本文定义的术语“草料”还包括粗粮。草料是新鲜的植物物料,例如来自草料植物(禾草)和其他草料植物(海草、发芽谷物和豆类植物)或其任何组合的干草和青贮。草料植物的实例是紫花苜蓿(Alfalfa、lucerne)、百脉根、芸苔属植物(例如,羽衣甘蓝、油菜籽(卡诺拉、芜菁甘蓝(瑞典芜菁)、萝卜)、三叶草(例如,杂三叶、红三叶、地三叶、白三



叶)、禾草(例如,百慕大草、雀麦、伪燕麦草、羊茅、石南草(heath grass)、草地早熟禾、鸭茅(orchard grass)、黑麦草、梯牧草(Timothy-grass))、玉米(玉蜀黍)、小米、大麦、燕麦、黑麦、高粱、大豆和小麦和蔬菜(例如甜菜)。草料进一步包括来自谷物生产的作物残余物(例如玉米秸秆;来自小麦、大麦、燕麦、黑麦和其他谷物的稻草);来自蔬菜像甜菜缨(beet top)的残余物;来自油籽生产像来自大豆、油菜籽和其他豆科作物的茎和叶的残余物;以及来自用于动物或人消耗的谷物精制或来自燃料生产或其他行业的部分。

[0055] 片段:术语“片段”意指具有从成熟多肽或结构域的氨基和/或羧基末端缺失的一个或多个(例如,几个)氨基酸的多肽;其中该片段具有蛋白酶活性。在一些实施例中,片段含有至少320个氨基酸残基(例如SEQ ID NO:1的氨基酸26至345)、至少340个氨基酸残基(例如SEQ ID NO:1的氨基酸26至365)、或至少360个氨基酸残基(例如SEQ ID NO:1的氨基酸26至385)。

[0056] 融合多肽:术语“融合多肽”是其中一种多肽在本发明多肽的N-末端或C-末端融合的多肽。通过将编码另一种多肽的多核苷酸融合于本发明的多核苷酸来产生融合多肽。用于产生融合多肽的技术是本领域已知的,且包括连接编码多肽的编码序列使得它们符合读框,而且融合多肽的表达处于一个或多个相同的启动子和终止子的控制之下。还可以使用内含肽技术构建融合多肽,其中在翻译后产生融合多肽(Cooper等人,1993,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]12:2575-2583;Dawson等人,1994,Science[科学]266:776-779)。融合多肽可进一步包含两个多肽之间的切割位点。在融合蛋白分泌之时,位点被切割,从而释放出这两种多肽。切割位点的实例包括但不限于在以下文献中披露的位点:Martin等人,2003,J.Ind.Microbiol.Biotechnol.[工业微生物生物技术杂志]3:568-576;Svetina等人,2000,J.Biotechnol.[生物技术杂志]76:245-251;Rasmussen-Wilson等人,1997,Appl.Environ.Microbiol.[应用与环境微生物学]63:3488-3493;Ward等人,1995,Biotechnology[生物技术]13:498-503;和Contreras等人,1991,Biotechnology[生物技术]9:378-381;Eaton等人,1986,Biochemistry[生物化学]25:505-512;Collins-Racie等人,1995,Biotechnology[生物技术]13:982-987;Carter等人,1989,Proteins:Structure,Function,and Genetics[蛋白质:结构、功能以及遗传学]6:240-248;以及Stevens,2003,Drug Discovery World[药物发现世界]4:35-48。

[0057] 异源的:对于宿主细胞,术语“异源的”意指多肽或核酸不是天然存在于宿主细胞中。对于多肽或核酸,术语“异源的”意指控制序列(例如多肽或核酸的启动子或结构域)不与该多肽或核酸天然地相关联,即,控制序列是来自编码SEQ ID NO:1的成熟多肽的基因以外的基因。

[0058] 宿主细胞:术语“宿主细胞”意指其中引入了包含本发明多核苷酸的核酸构建体或表达载体的任何微生物或植物细胞。引入方法包括但不限于原生质体融合、转染、转化、电穿孔、接合和转导。在一些实施例中,宿主细胞是分离的重组宿主细胞,其与至少一种其他组分(包括但不限于例如蛋白质、核酸、细胞等)部分或完全分离。

[0059] 杂合多肽:术语“杂合多肽”意指包含来自两个或更多个多肽的结构域的多肽,例如,来自一个多肽的结合模块和来自另一个多肽的催化结构域。结构域可以在N-末端或C-末端融合。

[0060] 杂交:术语“杂交”意指使用标准DNA印迹程序将核酸的基本上互补的链配对。杂交

可以在中、中-高、高或非常高严格条件下进行。中严格条件意指在42℃,于5X SSPE、0.3% SDS、200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时,随后在55℃使用0.2X SSC、0.2% SDS洗涤三次,每次15分钟。中-高严格条件意指在42℃,于5X SSPE、0.3% SDS、200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时,随后在60℃使用0.2X SSC、0.2% SDS洗涤三次,每次15分钟。高严格条件意指在42℃,于5X SSPE、0.3% SDS、200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时,随后在65℃使用0.2X SSC、0.2% SDS洗涤三次,每次15分钟。非常高严格条件意指在42℃,于5X SSPE、0.3% SDS、200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时,随后在70℃使用0.2X SSC、0.2% SDS洗涤三次,每次15分钟。

[0061] 分离的:术语“分离的”是指多肽、核酸、细胞或其他特定材料或组分,其与在自然界中发现的与其天然相关联的至少一种其他材料或组分(包括但不限于,例如,其他蛋白质,核酸,细胞等)分离。分离的多肽包括但不限于含有分泌的多肽的培养液。

[0062] 成熟多肽:术语“成熟多肽”是指翻译和任何翻译后修饰(例如N-末端加工,C-末端截短,糖基化,磷酸化,和信号肽、前肽和前原肽的去除)之后的最终形式的多肽。在一方面,成熟多肽是SEQ ID NO:1的氨基酸26-425。在本领域中已知的是,宿主细胞可以产生由相同多核苷酸表达的两种或更多种不同的成熟多肽(即,具有不同的C-末端和/或N-末端氨基酸)的混合物。在本领域中还已知的是,不同的宿主细胞可以不同地加工多肽,并且因此一个表达多核苷酸的宿主细胞当与另一个表达相同多核苷酸的宿主细胞相比时可以产生不同的成熟多肽(例如,具有不同的C-末端和/或N-末端氨基酸)。

[0063] 成熟多肽编码序列:术语“成熟多肽编码序列”意指编码具有蛋白酶活性的成熟多肽的多核苷酸。

[0064] 天然的:术语“天然的”意指天然存在于宿主细胞中的核酸或多肽。

[0065] 核酸构建体:术语“核酸构建体”意指单链或双链的核酸分子,该核酸分子是从天然存在的基因中分离的,或以原本不存在于自然界中的方式被修饰成包含核酸的区段,或者是合成的,该核酸分子包含一个或多个控制序列。

[0066] 可操作地连接:术语“可操作地连接”意指如下构型,在该构型中,控制序列被放置在相对于多核苷酸的编码序列适当的位置处,使得该控制序列指导该编码序列的表达。

[0067] 丸粒:术语“丸粒”和/或“丸粒化”是指固体圆形、球形和/或圆柱形片或丸粒,以及用于形成此类固体形状的过程,特别是饲料丸粒和固体挤出的动物饲料。如本文所用的,术语“挤出(extrusion或extruding)”是本领域熟知的术语,并且是指如本文描述的,在压力下使组合物通过孔口的过程。

[0068] 性能参数:术语“性能参数”是指选自以下列表的许多项中的一项,该列表由以下组成:体增重、欧洲生产效率因子(EPEF)、欧洲生产效能因子(EFF)以及FCR。术语“改善一个或多个性能参数”意指在一种或多种动物中体增重的增加、欧洲生产效率因子(EPEF)的增加、欧洲生产效能因子(EFF)的增加和/或FCR的降低。

[0069] 蛋白酶:术语“蛋白酶”在本文中定义为水解肽键的酶。它包括属于EC 3.4酶组的任何酶(包括其十三个亚类中的每一种[http://en.wikipedia.org/wiki/Category:EC\\_3.4](http://en.wikipedia.org/wiki/Category:EC_3.4))。EC编号参考加利福尼亚州(California)的圣迭戈(San Diego)的NC-IUBMB,学术出版

社 (Academic Press) 的 1992 年酶命名法, 分别包括出版于以下中的增刊 1-5: Eur. J. Biochem. [欧洲生物化学杂志] 223:1-5 (1994) Eur. J. Biochem. [欧洲生物化学杂志] 232:1-6 (1995) Eur. J. Biochem. [欧洲生物化学杂志] 237:1-5 (1996) Eur. J. Biochem. [欧洲生物化学杂志] 250:1-6 (1997) 和 Eur. J. Biochem. [欧洲生物化学杂志] 264:610-650 (1999)。术语“枯草杆菌酶”是指根据 Siezen 等人, 1991, Protein Engng. [蛋白质工程] 4: 719-737 和 Siezen 等人, 1997, Protein Science [蛋白质科学] 6:501-523 的丝氨酸蛋白酶亚组。丝氨酸蛋白酶或丝氨酸肽酶是蛋白酶的子组, 该蛋白酶特征在于在活性位点具有与底物形成共价加合物的丝氨酸。另外, 枯草杆菌酶 (以及丝氨酸蛋白酶) 特征在于除了具有丝氨酸以外, 还具有两个活性位点氨基酸残基, 即组氨酸和天冬氨酸残基。枯草杆菌酶可以划分为 6 个亚部, 即, 枯草杆菌蛋白酶家族、嗜热蛋白酶 (Thermitase) 家族、蛋白酶 K 家族、羊毛硫抗生素肽酶家族、Kexin 家族和 Pyrolysin 家族。

[0070] 蛋白酶活性: 术语“蛋白酶活性”意指蛋白质水解活性 (EC 3.4)。具有蛋白酶活性的多肽或蛋白酶有时还被指定为肽酶、胰酶、肽水解酶或蛋白质水解酶。蛋白酶可以是始于任一端的水解肽的外切型蛋白酶或在多肽链内部发挥作用的内切型蛋白酶 (内肽酶)。内肽酶对 N-和 C-封端的肽底物显示出活性, 这些底物与所讨论的蛋白酶的特异性有关。

[0071] 存在几种蛋白酶活性类型, 例如在 Arg 和 Lys 残基的羧基末端侧切割的胰蛋白酶样蛋白酶以及在疏水性氨基酸残基的羧基末端侧切割的糜蛋白酶样蛋白酶。本发明的蛋白酶是具有轻微碱性最适 pH (最适 pH 8-9.5) 的丝氨酸内肽酶 (EC 3.4.21)。

[0072] 可以使用任何测定来测量蛋白酶活性, 其中采用一种底物, 该底物包括与所讨论的蛋白酶的特异性相关的肽键。测定 pH 值和测定温度同样适用于所讨论的蛋白酶。测定 pH 值的实例是 pH 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12。测定温度的实例是 15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、37°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、80°C、90°C、或 95°C。普通蛋白酶底物的实例是酪蛋白、牛血清白蛋白以及血红蛋白。在经典的 Anson 和 Mirsky 方法中, 将变性的血红蛋白用作底物并且在用所讨论的蛋白酶孵育测定后, 确定三氯乙酸可溶的血红蛋白的量用作蛋白酶活性的量度 (Anson 和 Mirsky, 1932, J. Gen. Physiol. [普通生理学杂志] 16:59 以及 Anson, 1938, J. Gen. Physiol. [普通生理学杂志] 22:79)。

[0073] 出于本发明的目的, 使用描述于“材料与方法”中的测定来确定蛋白酶活性, 如 Suc-AAPF-pNA 测定和普罗塔酶 AK (Protazyme AK) 测定。对于普罗塔酶 AK 测定, 当用蛋白酶孵育时, 不可溶普罗塔酶 AK (天青精-交联的酪蛋白) 底物释放蓝色并且确定该颜色作为蛋白酶活性的量度。对于 Suc-AAPF-pNA 测定, 当用蛋白酶孵育时, 无色的 Suc-AAPF-pNA 底物释放黄色的对硝基苯胺并且确定该黄色作为蛋白酶活性的量度。

[0074] 本发明的这些多肽具有 SEQ ID NO:1 的多肽的至少 20%, 例如至少 40%、至少 65%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、以及至少 100% 的蛋白酶活性。

[0075] 肽酶家族 S8 含有丝氨酸内肽酶, 并且就序列数目和特征肽酶两者而言, 是丝氨酸肽酶第二大家族。在亚家族 S8A 中, 活性位点残基经常发生在基序 Asp-Thr/Ser-Gly、His-Gly-Thr-His 和 Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Xaa-Pro 中。由此, 这些催化残基被鉴定为 Asp-41、His-103 和 Ser-278 并且第四个活性位点氨基酸被鉴定为 Asn-208。这些催化残基的任何氨基酸的突变将导致酶活性的改变或丧失。

[0076] 纯化的: 术语“纯化的”是指基本上不含其他组分的核酸或多肽, 如通过本领域熟

知的分析技术(例如,在电泳凝胶、色谱洗脱液和/或经过密度梯度离心的培养基中,纯化的多肽或核酸可形成离散的条带)所测定。纯化的核酸或多肽是至少约50%纯的,通常是至少约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%、约99.8%或更加纯的(例如,以摩尔计的重量百分比)。在相关意义上,当在应用纯化或富集技术之后存在分子的浓度的大幅度增加时,对于该分子而言组合物被富集了。术语“富集”是指化合物、多肽、细胞、核酸、氨基酸或其他指定材料或组分以高于起始组合物的相对或绝对浓度存在于组合物中。

[0077] 重组体:当用于提及细胞、核酸、蛋白质或载体时,术语“重组体”意指已经从其天然状态经修饰。因此,例如,重组细胞表达在天然(非重组)形式的细胞内未发现的基因,或与在自然界中发现的相比,以不同水平表达或在不同条件下表达天然基因。重组核酸与天然序列的差异在于一个或多个核苷酸和/或与异源序列(例如,表达载体中的异源启动子)可操作地连接。重组蛋白与天然序列的差异可以在于一个或多个氨基酸和/或与异源序列融合。包含编码多肽的核酸的载体是重组载体。术语“重组体”与“遗传修饰的”和“转基因的”同义。

[0078] 粗粮:术语“粗粮”意指具有高水平纤维的干植物物料,例如来自种子和谷物以及作物残余物(例如秸秆、干椰肉(copra)、稻草、谷壳、糖甜菜废料)的纤维、麸、苞叶。

[0079] 序列同一性:两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的关联度通过参数“序列同一性”来描述。

[0080] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite),Rice等人,2000,Trends Genet.[遗传学趋势]16:276-277)(优选6.6.0版本或更新版本)的尼德尔程序中所实施的尼德曼-翁施算法(Needleman-Wunsch algorithm)(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性作为“最长同一性”的输出。使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBLUSUM62(BLUSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。为了使尼德尔程序报告最长同一性,必须在命令行中指定非简化(nobrief)选项。尼德尔标记的“最长同一性”的输出计算如下:

[0081]  $(\text{相同的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0082] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite),Rice等人,2000,同上)(优选6.6.0版本或更新版本)的尼德尔程序中所实施的尼德曼-翁施算法(Needleman和Wunsch,1970,同上)来确定两个多核苷酸序列之间的序列同一性作为“最长同一性”的输出。使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)取代矩阵。为了使尼德尔程序报告最长同一性,必须在命令行中指定非简化(nobrief)选项。尼德尔标记的“最长同一性”的输出计算如下:

[0083]  $(\text{相同的脱氧核糖核苷酸} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0084] 青贮:术语“青贮”是指可以喂养反刍动物(反刍-咀嚼(cud-chewing)动物,如牛和绵羊)或用作厌氧消化器的生物燃料原料的发酵的、高水分储存饲料。它被发酵并储存在称为青贮(ensilage、ensiling或silaging)的过程中,并且通常由草或谷类作物(例如玉蜀

黍、高粱、燕麦、黑麦、梯牧草等饲草植物)或豆类作物(如三叶草(clovers/trefoils)、苜蓿、野豌豆)使用整个绿色植物(不仅是谷物)制成。青贮可以由许多大田作物制成,并且取决于类型可以使用特殊术语(针对燕麦的燕麦青贮(oatlage)、针对苜蓿的半干青贮(haylage))。通过将切割的绿色植被放在青贮窖中,通过将其堆积在用塑料片覆盖的大堆中,抑或通过将大包包裹在塑料膜中来制造青贮。

[0085] 子序列:术语“子序列”意指从成熟多肽编码序列的5'端和/或3'端缺失一个或多个(例如,几个)核苷酸的多核苷酸;其中该子序列编码具有蛋白酶活性的片段。

[0086] 变体:术语“变体”意指具有蛋白酶活性的、在一个或多个(例如,几个)位置处包含人为突变(即取代、插入和/或缺失(例如截短))的多肽。取代意指用不同的氨基酸替代占据某一位置的氨基酸;缺失意指去除占据某一位置的氨基酸;而插入意指在邻接并且紧随占据某一位置的氨基酸之后添加氨基酸。

[0087] 野生型:关于氨基酸序列或核酸序列的术语“野生型”意指该氨基酸序列或核酸序列是天然或天然存在的序列。如本文所用的,术语“天然存在的”是指在自然界中发现的任何物质(例如蛋白质、氨基酸或核酸序列)。相反,术语“非天然存在的”是指在自然界中未发现的任何物质(例如,在实验室中产生的重组核酸和蛋白质序列、或野生型序列的修饰)。

## 具体实施方式

[0088] 具有蛋白酶活性的多肽

[0089] 在一些实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:1的成熟多肽具有至少95%、例如至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%的序列同一性的分离的多肽,这些分离的多肽具有蛋白酶活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:1的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0090] 在一个优选的实施例中,本发明的多肽具有蛋白酶活性并且是S8蛋白酶。

[0091] 该多肽优选地包含SEQ ID NO:1或其成熟多肽的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成;或者是其具有蛋白酶活性的片段。

[0092] 在一些实施例中,本发明涉及由如下多核苷酸编码的具有蛋白酶活性的分离的多肽,这些多核苷酸在中严格条件、中-高严格条件、高严格条件、或非常高严格条件下与其成熟多肽编码序列的全长互补体或其cDNA杂交(Sambrook等人,1989,Molecular Cloning,A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第2版,Cold Spring Harbor[冷泉港],纽约)。

[0093] 可以使用多核苷酸或其子序列、连同SEQ ID NO:1的成熟多肽或其片段来设计核酸探针以根据本领域熟知的方法来鉴定和克隆编码来自不同属或物种的菌株的具有蛋白酶活性的多肽的DNA。此类探针可以用于遵循标准DNA印迹程序与目的细胞的基因组DNA或cDNA杂交,以便鉴定和分离其中相应的基因。此类探针可明显短于完整序列,但是长度应为至少15个,例如至少25个、至少35个、或至少70个核苷酸。优选地,核酸探针长度为至少100个核苷酸,例如长度为至少200个核苷酸、至少300个核苷酸、至少400个核苷酸、至少500个核苷酸、至少600个核苷酸、至少700个核苷酸、至少800个核苷酸、或至少900个核苷酸。DNA和RNA探针两者都可使用。典型地将探针进行标记(例如,用<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>H、<sup>35</sup>S、生物素、或抗生物素蛋白),用于检测相应的基因。此类探针涵盖于本发明中。

[0094] 可以筛选从此类其他菌株制备的基因组DNA或cDNA文库的与上述探针杂交并编码具有蛋白酶活性的多肽的DNA。来自此类其他菌株的基因组DNA或其他DNA可通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳或其他分离技术来分离。可将来自文库的DNA或分离的DNA转移到并固定在硝化纤维素或另一个适合的运载体材料上。为了鉴定与多核苷酸或其子序列杂交的克隆或DNA,在DNA印迹中使用运载体材料。

[0095] 出于本发明的目的,杂交表示多核苷酸在中至非常高严格条件下与标记的核酸探针杂交。可以使用例如X-射线胶片或本领域已知的任何其他检测手段来检测在这些条件下核酸探针杂交的分子。

[0096] 在一些实施例中,核酸探针是编码SEQ ID NO:1的成熟多肽或其片段的多核苷酸。

[0097] 在一些实施例中,本发明涉及在一个或多个(例如,几个)位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:1的成熟多肽的变体。在一方面,引入SEQ ID NO:1的成熟多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个。氨基酸改变可以具有微小性质,即,不会显著地影响蛋白质的折叠和/或活性的保守氨基酸取代或插入;典型地为1-30个氨基酸的小缺失;小的氨基末端或羧基末端延伸,如氨基末端的甲硫氨酸残基;多达20-25个残基的小接头肽;或小的延伸,其通过改变净电荷或另一功能(例如聚组氨酸段、抗原表位或结合模块)来促进纯化。

[0098] 可以根据本领域中已知的程序,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham和Wells,1989,Science[科学]244:1081-1085)来鉴定多肽中的必需氨基酸。在后一项技术中,在该分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变,并且测试所得分子的蛋白酶活性以鉴定对于该分子的活性关键的氨基酸残基。还参见,Hilton等人,1996,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]271:4699-4708。酶或其他生物学相互作用的活性部位还可通过对结构的物理分析来确定,如由下述技术确定:核磁共振、晶体学(crystallography)、电子衍射、或光亲和标记,连同对推定的接触位点(contact site)氨基酸进行突变。参见例如,de Vos等人,1992,Science[科学]255:306-312;Smith等人,1992,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]224:899-904;Wlodaver等人,1992,FEBS Lett.[欧洲生化学会联合会快报]309:59-64。还可以从与相关多肽的比对来推断必需氨基酸的身份。

[0099] 使用已知的诱变、重组和/或改组方法,随后进行相关的筛选程序可以做出单或多氨基酸取代、缺失和/或插入并对其进行测试,这些相关的筛选程序例如由Reidhaar-Olson和Sauer,1988,Science[科学]241:53-57;Bowie和Sauer,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]86:2152-2156;WO 95/17413;或WO 95/22625披露的那些。其他可以使用的方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如Lowman等人,1991,Biochemistry[生物化学]30:10832-10837;美国专利号5,223,409;WO 92/06204)以及区域定向诱变(Derbyshire等人,1986,Gene[基因]46:145;Ner等人,1988,DNA 7:127)。

[0100] 诱变/改组方法可以与高通量、自动化的筛选方法组合以检测由宿主细胞表达的克隆的、诱变的多肽的活性(Ness等人,1999,Nature Biotechnology[自然生物技术]17:893-896)。可从宿主细胞回收编码活性多肽的诱变的DNA分子,并使用本领域的标准方法快速测序。这些方法允许快速确定多肽中各个氨基酸残基的重要性。

[0101] 在一些实施例中,多肽含有至少340个氨基酸残基(例如SEQ ID NO:1的氨基酸26至365)、至少360个氨基酸残基(例如SEQ ID NO:1的氨基酸26至385)、或至少380个氨基酸

残基(例如SEQ ID NO:1的氨基酸26至405)。

[0102] 该多肽可以是杂合多肽或融合多肽。

[0103] 当与动物饲料混合时,本发明的多肽表现出一定水平的蛋白酶活性,从而增加了蛋白质的消化率和/或溶解度,并因此改善了动物饲料的营养价值。

[0104] 具有蛋白酶活性的多肽的来源

[0105] 可以从任何属的微生物获得本发明的具有蛋白酶活性的多肽。出于本发明的目的,如本文结合给定来源使用的术语“获得自”应当意指由多核苷酸编码的多肽是由该来源或由已经插入了来自该来源的多核苷酸的菌株产生的。在一方面,获得自给定来源的多肽被分泌到细胞外。

[0106] 在另一方面,多肽是海泥芽孢杆菌多肽。

[0107] 应理解的是,对于前述物种,本发明涵盖完全和不完全阶段(perfect and imperfect states),和其他分类学等同物(equivalent),例如无性型,而与它们已知的种名无关。本领域的技术人员会容易地识别适当等同物的身份。

[0108] 这些物种的菌株可容易地在许多培养物保藏中心为公众所获得,如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)、德国微生物和细胞培养物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,DSMZ)、荷兰菌种保藏中心(Centraalbureau Voor Schimmelcultures,CBS)以及美国农业研究服务专利培养物保藏中心北方地区研究中心(Agricultural Research Service Patent Culture Collection,Northern Regional Research Center,NRRL)。

[0109] 可以使用以上提到的探针从其他来源,包括从自然界(例如,土壤、堆肥、水等)分离的微生物或直接从天然材料(例如,土壤、堆肥、水等)获得的DNA样品鉴定和获得多肽。用于从天然生境中直接分离微生物和DNA的技术是本领域熟知的。然后通过类似地筛选另一微生物的基因组DNA或cDNA文库或混合的DNA样品来获得编码该多肽的多核苷酸。一旦已经用一种或多种探针检测到编码多肽的多核苷酸,则可以通过利用本领域普通技术人员已知的技术(参见例如,Sambrook等人,1989,同上)分离或克隆多核苷酸。

[0110] 多核苷酸

[0111] 本发明还涉及编码本发明的多肽的分离的多核苷酸,如本文所述。

[0112] 用于分离或克隆多核苷酸的技术是本领域已知的且包括从基因组DNA或cDNA或其组合进行分离。来自基因组DNA的多核苷酸的克隆可以例如通过使用聚合酶链式反应(PCR)或用以对具有共有的结构特征的克隆的DNA片段进行检测的表达库抗体筛选来实现。参见例如,Innis等人,1990,PCR:A Guide to Methods and Application[PCR:方法和应用指南],Academic Press[学术出版社],纽约。可以使用其他核酸扩增程序例如连接酶链式反应(LCR)、连接激活转录(LAT)和基于多核苷酸的扩增(NASBA)。这些多核苷酸可以克隆自芽孢杆菌属的菌株或相关生物,并且因此,例如可以是该多核苷酸的多肽编码区的物种变体。

[0113] 编码本发明的多肽的多核苷酸的修饰对于合成基本上类似于该多肽的多肽可以是必需的。术语“基本上类似”于该多肽是指多肽的非天然存在的形式。这些多肽可以因某种工程化方式而与从其天然来源分离的多肽不同,例如在比活性、热稳定性、最适pH等方面不同的变体。可以如下构建这些变体:基于编码SEQ ID NO:1的成熟多肽或其子序列的多核苷酸,和/或通过引入不会改变该多肽的氨基酸序列,但对应于预期用于产生该酶的宿主生

物的密码子用法的核苷酸取代,或通过引入可能产生不同氨基酸序列的核苷酸取代。对于核苷酸取代的一般描述,参见例如Ford等人,1991,Protein Expression and Purification[蛋白质表达与纯化]2:95-107。

[0114] 核酸构建体

[0115] 本发明还涉及包含本发明的多核苷酸的核酸构建体,其中该多核苷酸优选地可操作地连接至一个或多个控制序列,在与控制序列相容的条件下,该一个或多个控制序列指导该编码序列在适合的宿主细胞中的表达。

[0116] 可用许多方式操作该多核苷酸以提供多肽的表达。取决于表达载体,在多核苷酸插入载体之前对其进行操作可以是理想的或必需的。用于利用重组DNA方法修饰多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0117] 控制序列可为启动子,即,被宿主细胞识别用于表达编码本发明的多肽的多核苷酸的多核苷酸。该启动子包含介导多肽的表达的转录控制序列。启动子可以是在宿主细胞中显示转录活性的任何多核苷酸,包括突变型、截短型和杂合型启动子,并且可以获得自编码与宿主细胞同源或异源的细胞外或细胞内多肽的基因。

[0118] 用于在细菌宿主细胞中指导本发明核酸构建体的转录的适合启动子的实例是从以下基因中获得的启动子:解淀粉芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因(amyQ)、地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因(amyL)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因(penP)、嗜热脂肪芽孢杆菌产麦芽糖淀粉酶基因(amyM)、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因(sacB)、枯草芽孢杆菌xylA和xylB基因、苏云金芽孢杆菌cryIIIA基因(Agaisse和Lereclus,1994,Molecular Microbiology[分子微生物学]13:97-107)、大肠杆菌lac操纵子、大肠杆菌trc启动子(Egon等人,1988,Gene[基因]69:301-315)、天蓝链霉菌琼脂水解酶基因(dagA)和原核 $\beta$ -内酰胺酶基因(Villa-Kamaroff等人,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]75:3727-3731)以及tac启动子(DeBoer等人,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]80:21-25)。其他启动子描述于Gilbert等人,1980,Scientific American[科学美国人]242:74-94的“Useful proteins from recombinant bacteria[来自重组细菌的有用蛋白质]”;和在Sambrook等人,1989,同上。串联启动子的实例披露于WO 99/43835中。

[0119] 用于在丝状真菌宿主细胞中指导本发明核酸构建体的转录的适合启动子的实例是从以下基因中获得的启动子:构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)乙酰胺酶、黑曲霉中性 $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)葡糖淀粉酶(glaA)、米曲霉TAKA淀粉酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)胰蛋白酶样蛋白酶(WO 96/00787)、镶片镰孢(*Fusarium venenatum*)淀粉葡糖苷酶(WO 00/56900)、镶片镰孢Daria(WO 00/56900)、镶片镰孢Quinn(WO 00/56900)、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)脂肪酶、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶、里氏木霉(*Trichoderma reesei*) $\beta$ -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶I、里氏木霉纤维二糖水解酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶I、里氏木霉内切葡聚糖酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶III、里氏木霉内切葡聚糖酶V、里氏木霉木聚糖酶I、里氏木霉木聚糖酶II、里氏木霉木聚糖酶III、里氏木霉 $\beta$ -木糖苷酶,以及里氏木霉翻译延伸因子,连同NA2-tpi启动子(来自曲霉属中性 $\alpha$ -淀粉酶基因的经修饰的启动子,其中已经用来自曲霉属丙糖磷酸异构酶基因的未翻译的前导序列替代未翻译的前导序列;非限制性实例包括来自黑曲霉中性 $\alpha$ -淀粉酶基因



的经修饰的启动子,其中已经用来自构巢曲霉或米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的未翻译的前导序列替换未翻译的前导序列);及其突变型、截短型及杂合型启动子。其他启动子在美国专利号6,011,147中描述。

[0120] 在酵母宿主中,有用的启动子从以下的基因获得:酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 烯醇酶 (ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶 (GAL1)、酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (ADH1、ADH2/GAP)、酿酒酵母丙糖磷酸异构酶 (TPI)、酿酒酵母金属硫蛋白 (CUP1)、以及酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶。酵母宿主细胞的其他有用的启动子由Romanos等人,1992, *Yeast* [酵母]8:423-488描述。

[0121] 控制序列也可为由宿主细胞识别以终止转录的转录终止子。该终止子可操作地连接至编码该多肽的多核苷酸的3'-末端。在宿主细胞中有功能的任何终止子可用于本发明中。

[0122] 细菌宿主细胞的优选终止子从以下的基因获得:克劳氏芽孢杆菌碱性蛋白酶 (aprH)、地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶 (amyL)、和大肠杆菌核糖体RNA (rrnB)。

[0123] 用于丝状真菌宿主细胞的优选终止子从以下的基因获得:构巢曲霉乙酰胺酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉 $\alpha$ -葡糖苷酶、米曲霉TAKA淀粉酶、尖孢镰孢胰蛋白酶样蛋白酶、里氏木霉 $\beta$ -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶I、里氏木霉纤维二糖水解酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶I、里氏木霉内切葡聚糖酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶III、里氏木霉内切葡聚糖酶V、里氏木霉木聚糖酶I、里氏木霉木聚糖酶II、里氏木霉木聚糖酶III、里氏木霉 $\beta$ -木糖苷酶以及里氏木霉翻译延伸因子。

[0124] 酵母宿主细胞的优选终止子从以下的基因获得:酿酒酵母烯醇酶、酿酒酵母细胞色素C (CYC1) 以及酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶。酵母宿主细胞的其他有用的终止子由Romanos等人(1992,同上)描述。

[0125] 控制序列还可以是启动子下游和基因的编码序列上游的mRNA稳定子区域,其增加该基因的表达。

[0126] 适合的mRNA稳定子区域的实例是从以下获得的:苏云金芽孢杆菌cryIIIA基因 (WO 94/25612) 和枯草芽孢杆菌SP82基因 (Hue等人,1995, *J. Bacteriol.* [细菌学杂志]177:3465-3471)。

[0127] 控制序列也可以是前导序列,即对宿主细胞翻译很重要的mRNA的非翻译区域。该前导序列可操作地连接至编码该多肽的多核苷酸的5'-末端。可以使用在宿主细胞中有功能的任何前导序列。

[0128] 用于丝状真菌宿主细胞的优选前导序列从米曲霉TAKA淀粉酶和构巢曲霉丙糖磷酸异构酶的基因获得。

[0129] 酵母宿主细胞的适合的前导序列从以下的基因获得:酿酒酵母烯醇酶 (ENO-1)、酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母 $\alpha$ -因子和酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (ADH2/GAP)。

[0130] 控制序列还可以是多腺苷酸化序列,一种可操作地连接至该多核苷酸的3'-末端并且当转录时由宿主细胞识别为将多腺苷酸残基添加至所转录的mRNA的信号的序列。可以使用在宿主细胞中有功能的任何多腺苷酸化序列。

[0131] 用于丝状真菌宿主细胞的优选多腺苷酸化序列从以下酶的基因获得:构巢曲霉邻

氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉 $\alpha$ -葡糖苷酶、米曲霉TAKA淀粉酶以及尖孢镰孢胰蛋白酶样蛋白酶。

[0132] 酵母宿主细胞的有用的多腺苷酸化序列由Guo和Sherman, 1995, *Mol. Cellular Biol.* [分子细胞生物学] 15:5983-5990描述。

[0133] 控制序列还可以是编码与多肽的N-末端连接的信号肽并指导多肽进入细胞的分泌途径的信号肽编码区。多核苷酸的编码序列的5'端本身可以含有在翻译阅读框中天然与编码多肽的编码序列区段相连接的信号肽编码序列。可替代地, 编码序列的5'端可以含有对于该编码序列是异源的信号肽编码序列。在编码序列天然地不含有信号肽编码序列的情况下, 可能需要异源信号肽编码序列。可替代地, 异源信号肽编码序列可以单纯地替代天然信号肽编码序列以便增强多肽的分泌。然而, 可以使用指导已表达多肽进入宿主细胞的分泌途径的任何信号肽编码序列。

[0134] 用于细菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从芽孢杆菌NCIB11837产麦芽糖淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌 $\beta$ -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT、nprS、nprM)和枯草芽孢杆菌prxA的基因获得的信号肽编码序列。另外的信号肽由Simonen和Palva, 1993, *Microbiol. Rev.* [微生物评论] 57: 109-137描述。

[0135] 用于丝状真菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从以下酶的基因获得的信号肽编码序列: 黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米曲霉TAKA淀粉酶、特异腐质霉纤维素酶、特异腐质霉内切葡聚糖酶V、疏棉状腐质霉脂肪酶和米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶。

[0136] 用于酵母宿主细胞的有用的信号肽从酿酒酵母 $\alpha$ -因子和酿酒酵母转化酶的基因获得。其他的有用的信号肽编码序列由Romanos等人(1992, 同上)描述。

[0137] 控制序列还可以是编码位于多肽的N-末端的前肽的前肽编码序列。所得的多肽被称为前体酶(proenzyme)或多肽原(或在一些情况下被称为酶原(zymogen))。多肽原通常是无活性的并且可通过催化切割或自身催化切割来自多肽原的前肽而转化为活性多肽。前肽编码序列可以从以下的基因获得: 枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶(aprE)、枯草芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT)、嗜热毁丝霉漆酶(WO 95/33836)、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶和酿酒酵母 $\alpha$ -因子。

[0138] 在信号肽序列和前肽序列二者都存在的情况下, 该前肽序列位于紧邻多肽的N-末端且该信号肽序列位于紧邻前肽序列的N-末端。

[0139] 还可希望的是添加调节序列, 这些调节序列调节宿主细胞生长相关的多肽的表达。调节序列的实例是引起基因表达以响应于化学或物理刺激(包括调节化合物的存在)而开启或关闭的那些。原核系统中的调节序列包括lac、tac、和trp操纵子系统。在酵母中, 可以使用ADH2系统或GAL1系统。在丝状真菌中, 可以使用黑曲霉葡糖淀粉酶启动子、米曲霉TAKA $\alpha$ -淀粉酶启动子和米曲霉葡糖淀粉酶启动子、里氏木霉纤维二糖水解酶I启动子以及里氏木霉纤维二糖水解酶II启动子。调节序列的其他实例是允许基因扩增的那些序列。在真核系统中, 这些调节序列包括在甲氨蝶呤存在下扩增的二氢叶酸还原酶基因以及用重金属扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况中, 编码多肽的多核苷酸会与调节序列可操作地连接。

[0140] 表达载体

[0141] 本发明还涉及包含本发明的多核苷酸、启动子、以及转录和翻译终止信号的重组表达载体。多个核苷酸和控制序列可连接在一起以产生重组表达载体,该重组表达载体可包括一个或多个便利的限制位点以允许编码该多肽的多核苷酸在此类位点处的插入或取代。可替代地,可以通过将多核苷酸或包含该多核苷酸的核酸构建体插入用于表达的适当载体中而表达该多核苷酸。在产生表达载体时,编码序列如此位于载体中,使得编码序列与用于表达的适当控制序列可操作地连接。

[0142] 重组表达载体可以是方便地经受重组DNA程序并且可以引起多核苷酸表达的任何载体(例如,质粒或病毒)。载体的选择将典型地取决于载体与待引入载体的宿主细胞的相容性。载体可以是直链或闭合环状质粒。

[0143] 载体可以是自主复制载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如质粒、染色体外元件、微染色体或人工染色体。载体可以含有用于确保自我复制的任何手段。可替代地,载体可以是这样的载体,当它引入宿主细胞中时整合入基因组中并与其中已整合了它的一个或多个染色体一起复制。此外,可以使用单独的载体或质粒或两个或更多个载体或质粒,其共同含有待引入宿主细胞基因组的总DNA,或可以使用转座子。

[0144] 载体优选地含有允许方便地选择转化细胞、转染细胞、转导细胞等细胞的一个或多个选择性标记。选择性标记是一种基因,其产物提供了杀生物剂抗性或病毒抗性、对重金属抗性、对营养缺陷型的原养型等。

[0145] 细菌选择性标记的实例是地衣芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌 $dal$ 基因、或赋予抗生素抗性(如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、新霉素、大观霉素、或四环素抗性)的标记。酵母宿主细胞的适合的标记包括但不限于: $ADE2$ 、 $HIS3$ 、 $LEU2$ 、 $LYS2$ 、 $MET3$ 、 $TRP1$ 和 $URA3$ 。用于在丝状真菌宿主细胞中使用的选择性标记包括但不限于 $adeA$ (磷酸核糖酰氨基咪唑-琥珀羧胺合酶)、 $adeB$ (磷酸核糖酰-氨基咪唑合酶)、 $amdS$ (乙酰胺酶)、 $argB$ (鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、 $bar$ (草丁膦乙酰转移酶)、 $hph$ (潮霉素磷酸转移酶)、 $niaD$ (硝酸还原酶)、 $pyrG$ (乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶)、 $sC$ (硫酸腺苷基转移酶)以及 $trpC$ (邻氨基苯甲酸合酶)连同其等同物。优选的用于曲霉细胞中的是构巢曲霉或米曲霉 $amdS$ 和 $pyrG$ 基因以及吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*) $bar$ 基因。优选的用于木霉属细胞的是 $adeA$ 、 $adeB$ 、 $amdS$ 、 $hph$ 以及 $pyrG$ 基因。

[0146] 选择性标记可以是如WO 2010/039889中所述的双选择性标记系统。在一方面,双选择性标记是 $hph$ - $tk$ 双选择性标记系统。

[0147] 载体优选地含有允许载体整合到宿主细胞的基因组中或载体在细胞中独立于基因组自主复制的一个或多个元件。

[0148] 对于整合到宿主细胞基因组中,载体可以依靠编码该多肽的多核苷酸序列或用于通过同源或非同源重组整合到该基因组中的该载体的任何其他元件。可替代地,载体可以含有用于指导通过同源重组而整合入宿主细胞基因组中的染色体中的精确位置处的另外的多核苷酸。为了增加在精确位置处整合的可能性,整合元件应当含有足够数目的核酸,例如100至10,000个碱基对、400至10,000个碱基对和800至10,000个碱基对,这些核酸与相应的靶序列具有高度序列同一性以增强同源重组的概率。整合元件可以是与宿主细胞基因组内的靶序列同源的任何序列。此外,整合元件可以是非编码或编码的多核苷酸。另一方面,

载体可以通过非同源重组整合入宿主细胞的基因组中。

[0149] 为了自主复制,载体可以进一步包含复制起点,该复制起点使得载体在讨论中的宿主细胞中自主复制成为可能。复制起点可以是在细胞中发挥作用的介导自主复制的任何质粒复制子。术语“复制起点”或“质粒复制子”意指使质粒或载体能够在体内复制的多核苷酸。

[0150] 细菌复制起点的实例是允许在大肠杆菌中复制的质粒pBR322、pUC19、pACYC177、和pACYC184的复制起点,以及允许在芽孢杆菌属中复制的质粒pUB110、pE194、pTA1060、和pAMB1的复制起点。

[0151] 用于酵母宿主细胞中的复制起点的实例是2微米复制起点、ARS1、ARS4、ARS1与CEN3的组合、及ARS4与CEN6的组合。

[0152] 在丝状真菌细胞中有用的复制起点的实例是AMA1和ANS1 (Gems等人,1991, Gene [基因]98:61-67; Cullen等人,1987, Nucleic Acids Res. [核酸研究]15:9163-9175; WO 00/24883)。可以根据WO 00/24883中披露的方法完成AMA1基因的分离和包含所述基因的质粒或载体的构建。

[0153] 可将本发明多核苷酸的多于一个拷贝插入宿主细胞以增加多肽的产生。通过将序列的至少一个另外的拷贝整合到宿主细胞基因组中或者通过包括与该多核苷酸一起的可扩增的选择性标记基因可以获得多核苷酸的增加的拷贝数目,其中通过在适当的选择性试剂的存在下培养细胞可以选择包含选择性标记基因的经扩增的拷贝以及由此该多核苷酸的另外的拷贝的细胞。

[0154] 用于连接以上所述的元件以构建本发明的重组表达载体的程序是本领域的普通技术人员熟知的(参见例如, Sambrook等人,1989,同上)。

[0155] 宿主细胞

[0156] 本发明还涉及重组宿主细胞,这些宿主细胞包含可操作地连接至一个或多个控制序列的本发明的多核苷酸,该一个或多个控制序列指导本发明的多肽的产生。将包含多核苷酸的构建体或载体引入宿主细胞中,这样使得该构建体或载体作为染色体整合体或作为自主复制的染色体外载体维持,如较早前所述。宿主细胞的选择将在很大程度上取决于编码该多肽的基因及其来源。

[0157] 在一些实施例中,多肽与重组宿主细胞是异源的。

[0158] 在一些实施例中,一个或多个控制序列中的至少一个与编码多肽的多核苷酸是异源的。

[0159] 在一些实施例中,重组宿主细胞包含本发明的多核苷酸的至少两个拷贝,例如三个、四个或五个。

[0160] 宿主细胞可以是可用于重组产生本发明的多肽的任何微生物或植物细胞,例如原核细胞或真菌细胞。

[0161] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包括但不限于:芽孢杆菌属、梭菌属、肠球菌属、土芽孢杆菌属(Geobacillus)、乳杆菌属、乳球菌属、大洋芽孢杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属和链霉菌属。革兰氏阴性细菌包括但不限于弯曲杆菌属、大肠杆菌、黄杆菌属、梭杆菌属、螺杆菌属、泥杆菌属、奈瑟氏菌属、假单胞菌属、沙门氏菌属、以及脲原体属。

[0162] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌属细胞,包括但不限于嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚硬芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及苏云金芽孢杆菌细胞。

[0163] 细菌宿主细胞还可以是任何链球菌属细胞,包括但不限于似马链球菌(*Streptococcus equisimilis*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)和马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*)细胞。

[0164] 细菌宿主细胞还可以是任何链霉菌属细胞,包括但不限于:不产色链霉菌(*Streptomyces achromogenes*)、除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)、天蓝链霉菌、灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)、以及浅青紫链霉菌(*Streptomyces lividans*)细胞。

[0165] 将DNA引入芽孢杆菌属细胞中可以通过以下方式来实现:原生质体转化(参见,例如,Chang和Cohen,1979,*Mol. Gen. Genet.* [分子与普通遗传学]168:111-115)、感受态细胞转化(参见例如,Young和Spizizen,1961,*J. Bacteriol.* [细菌学杂志]81:823-829;或Dubnau和Davidoff-Abelson,1971,*J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志]56:209-221)、电穿孔(参见例如,Shigekawa和Dower,1988,*Biotechniques* [生物技术]6:742-751)或接合(参见例如,Koehler和Thorne,1987,*J. Bacteriol.* [细菌学杂志]169:5271-5278)。将DNA引入大肠杆菌细胞中可以通过以下方式来实现:原生质体转化(参见例如,Hanahan,1983,*J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志]166:557-580)或电穿孔(参见例如,Dower等人,1988,*Nucleic Acids Res.* [核酸研究]16:6127-6145)。将DNA引入链霉菌属细胞中可以通过以下方式来实现:原生质体转化、电穿孔(参见例如,Gong等人,2004,*Folia Microbiol. (Praha)* [叶线形微生物学(布拉格)]49:399-405)、接合(参见例如,Mazodier等人,1989,*J. Bacteriol.* [细菌学杂志]171:3583-3585)、或转导(参见例如,Burke等人,2001,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊]98:6289-6294)。将DNA引入假单胞菌属细胞中可以通过以下方式来实现:电穿孔(参见例如,Choi等人,2006,*J. Microbiol. Methods* [微生物学方法杂志]64:391-397)或接合(参见例如,Pinedo和Smets,2005,*Appl. Environ. Microbiol.* [应用与环境微生物学]71:51-57)。将DNA引入链球菌属细胞中可以通过以下方式来实现:天然感受态(natural competence)(参见例如,Perry和Kuramitsu,1981,*Infect. Immun.* [感染与免疫]32:1295-1297)、原生质体转化(参见例如,Catt和Jollick,1991,*Microbios* [微生物学]68:189-207)、电穿孔(参见例如,Buckley等人,1999,*Appl. Environ. Microbiol.* [应用与环境微生物学]65:3800-3804)、或接合(参见例如,Clewell,1981,*Microbiol. Rev.* [微生物学评论]45:409-436)。然而,可以使用本领域已知的将DNA引入宿主细胞中的任何方法。

[0166] 宿主细胞可以是真菌细胞。如本文所用的“真菌”包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)和接合菌门(Zygomycota)以及卵菌门(Oomycota)和所有有丝分裂孢子真菌(如由Hawksworth等人在以下文献中所定义:Ainsworth and Bisby's *Dictionary of The Fungi* [安斯沃思和拜斯比真菌字典],第8版,1995,CAB International [国际应用生物科学中心],University Press [大学出版社],Cambridge,UK [英国剑桥])。

[0167] 真菌宿主细胞可以为酵母细胞。如本文所用的“酵母”包括产子囊酵母(ascosporogenous yeast)(内孢霉目(Endomycetales))、产担子酵母(basidiosporogenous yeast)和属于半知菌类(Fungi Imperfecti)(芽孢纲(Blastomycetes))的酵母。由于酵母的分类可在将来变化,出于本发明的目的,酵母应当如Biology and Activities of Yeast[酵母的生物学与活性](Skinner, Passmore和Davenport编辑, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No.9[应用细菌学学会专题论文集系列9], 1980)中所描述的那样定义。

[0168] 酵母宿主细胞可以是假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、酵母属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)或耶氏酵母属(*Yarrowia*)细胞,如乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、卡尔酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、糖化酵母(*Saccharomyces diastaticus*)、道格拉氏酵母(*Saccharomyces douglasii*)、克鲁弗酵母(*Saccharomyces kluyveri*)、诺地酵母(*Saccharomyces norbensis*)、卵形酵母(*Saccharomyces oviformis*)或解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)细胞。

[0169] 真菌宿主细胞可为丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌门(Eumycota)和卵菌门(Oomycota)的亚门的所有丝状形式(如由Hawksworth等人, 1995(同上)所定义的)。丝状真菌通常的特征在于由几丁质、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖和其他复杂多糖构成的菌丝体壁。营养生长是通过菌丝延伸来进行的,而碳分解代谢是专性需氧的。相反,酵母(如酿酒酵母)的营养生长是通过单细胞菌体的出芽(budding)来进行的,而碳分解代谢可以是发酵性的。

[0170] 丝状真菌宿主细胞可以是枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管霉属(*Bjerkandera*)、拟蜡菌属、金孢子菌属、鬼伞属、革盖菌属(*Coriolus*)、隐球菌属、线黑粉菌科(*Filibasidium*)、镰孢属、腐质霉属、梨孢菌属、毛霉属、毁丝霉属、新美鞭菌属、链孢菌属、拟青霉属、青霉属、平革菌属、射脉菌属(*Phlebia*)、瘤胃壶菌属、侧耳属(*Pleurotus*)、裂褶菌属、篮状菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳属、弯颈霉属、栓菌属(*Trametes*)或木霉属细胞。

[0171] 例如,丝状真菌宿主细胞可以是泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、黑刺烟管霉(*Bjerkandera adusta*)、干拟蜡菌(*Ceriporiopsis aneirina*)、卡内基拟蜡菌(*Ceriporiopsis caregiea*)、浅黄拟蜡菌(*Ceriporiopsis gilvescens*)、潘诺希塔拟蜡菌(*Ceriporiopsis pannocinta*)、环带拟蜡菌(*Ceriporiopsis rivulosa*)、微红拟蜡菌(*Ceriporiopsis subrufa*)、虫拟蜡菌(*Ceriporiopsis subvermispora*)、狭边金孢子菌(*Chrysosporium inops*)、嗜角质金孢子菌(*Chrysosporium keratinophilum*)、卢克诺文思金孢子菌(*Chrysosporium lucknowense*)、粪状金孢子菌(*Chrysosporium merdarium*)、租金孢子菌(*Chrysosporium pannicola*)、女王杜香金孢子菌(*Chrysosporium queenslandicum*)、热带金孢子菌(*Chrysosporium tropicum*)、褐薄金孢子菌(*Chrysosporium zonatum*)、灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)、毛革盖菌(*Coriolus hirsutus*)、杆孢状镰孢、谷类镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾谷镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖孢镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、拟分枝孢镰孢、疏色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢、镶片镰孢、特异腐质霉、疏棉状腐质霉、米黑根毛霉、嗜热毁丝霉、

粗糙链孢菌、产紫青霉、黄孢平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、射脉菌 (*Phlebia radiata*)、刺芹侧耳 (*Pleurotus eryngii*)、埃默森篮状菌、土生梭孢霉、长域毛栓菌 (*Trametes villosa*)、变色栓菌 (*Trametes versicolor*)、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉或绿色木霉细胞。

[0172] 可以将真菌细胞通过涉及原生质体形成、原生质体转化、以及细胞壁再生的方法以本身已知的方式转化。用于转化曲霉属和木霉属宿主细胞的适合程序描述于以下文献中:EP 238023, Yelton等人, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 81: 1470-1474以及Christensen等人, 1988, Bio/Technology [生物/技术] 6: 1419-1422。用于转化镰孢属物种的适合方法由Malardier等人, 1989, Gene [基因] 78: 147-156和WO 96/00787描述。可以使用由以下文献描述的程序转化酵母:Becker和Guarente, 在Abelson, J.N. 和 Simon, M.I. 编辑, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology [酵母遗传学与分子生物学指南], Methods in Enzymology [酶学方法], 第194卷, 第182-187页, Academic Press, Inc. [学术出版社有限公司], 纽约; Ito等人, 1983, J. Bacteriol. [细菌学杂志] 153: 163; 以及Hinnen等人, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 75: 1920。

[0173] 产生方法

[0174] 本发明还涉及产生本发明的多肽的方法, 这些方法包括 (a) 在有益于产生该多肽的条件下培养细胞, 该细胞以其野生型形式产生该多肽; 和任选地 (b) 回收该多肽。在一方面, 该细胞是芽孢杆菌属细胞。在另一方面, 该细胞是海泥芽孢杆菌细胞。

[0175] 本发明还涉及产生本发明的多肽的方法, 这些方法包括 (a) 在有益于产生该多肽的条件下培养本发明的重组宿主细胞; 和任选地 (b) 回收该多肽。

[0176] 宿主细胞是在适合使用本领域已知的方法产生多肽的营养培养基中培养的。例如, 可以通过摇瓶培养、或在实验室或工业发酵罐中小规模或大规模发酵 (包括连续、分批、补料分批或固态发酵) 培养细胞, 该培养在适合的培养基中并且在允许表达和/或分离多肽的条件下进行。使用本领域中已知的程序, 培养发生在包含碳和氮来源及无机盐的适合的营养培养基中。适合的培养基可从商业供应商获得或可以根据公开的组成 (例如, 在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) 的目录中) 制备。如果多肽被分泌到该营养培养基中, 那么可以直接从该培养基中回收该多肽。如果多肽不进行分泌, 那么其可以从细胞裂解液中进行回收。

[0177] 可以使用本领域已知的对于多肽是特异性的方法来检测多肽。这些检测方法包括但不限于: 特异性抗体的使用、酶产物的形成或酶底物的消失。例如, 可以使用酶测定来确定多肽的活性。

[0178] 可以使用本领域已知的方法来回收多肽。例如, 可通过常规方法, 包括但不限于, 收集、离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀, 从发酵培养基回收多肽。在一方面, 回收包含多肽的全发酵液。

[0179] 可以通过本领域已知的多种程序纯化该多肽, 包括但不限于色谱法 (例如, 离子交换色谱法、亲和色谱法、疏水色谱法、聚焦色谱法和尺寸排阻色谱法)、电泳程序 (例如, 制备型等电聚焦电泳)、差异性溶解 (例如, 硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE或提取 (参见例如, Protein Purification [蛋白质纯化], Janson和Ryden编辑, VCH Publishers [VCH出版公司], 纽约,

1989),以便获得基本上纯的多肽。

[0180] 蛋白酶活性的去除或降低

[0181] 本发明还涉及产生亲本细胞的突变体的方法,这些方法包括破坏或缺失编码本发明的多肽的多核苷酸或其部分,这导致在相同条件下培养时,与亲本细胞相比,该突变体细胞产生的多肽少。

[0182] 可以使用本领域熟知的方法通过降低或消除该多核苷酸的表达来构建突变体细胞,例如插入、破坏、替代、或缺失。在一个优选的方面,该多核苷酸是灭活的。例如,待修饰或灭活的多核苷酸可以是活性必需的编码区或其一部分,或编码区的表达所需的调节元件。这种调节或控制序列的实例可以是启动子序列或其功能部分,即足以影响该多核苷酸的表达的部分。可修饰的其他控制序列包括但不限于前导序列、多腺苷酸化序列、前肽序列、信号肽序列、转录终止子、和转录激活因子。

[0183] 该多核苷酸的修饰或灭活可以通过使亲本细胞经受诱变,并且选择该多核苷酸的表达被降低或消除的突变体细胞来进行。该诱变可以是特异的或随机的,例如通过使用适合的物理或化学诱变剂、通过使用适合的寡核苷酸、或通过对DNA序列进行PCR产生的诱变来进行。此外,诱变可通过使用这些诱变剂的任何组合来进行。

[0184] 适用于本发明目的的物理或化学诱变剂的实例包括紫外线(UV)照射、羟胺、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)、邻甲基羟胺、亚硝酸、乙基甲磺酸(EMS)、亚硫酸氢钠、甲酸和核苷酸类似物。

[0185] 当使用这些试剂时,诱变一般是在适合条件下在所选的诱变剂的存在下通过孵育有待诱变的亲本细胞并筛选和/或选择展示基因表达降低或不表达的突变体细胞来进行的。

[0186] 该多核苷酸的修饰或灭活可以通过在基因中或在其转录或翻译所需的调节元件中插入、取代、或缺失一个或多个核苷酸来完成。例如,可插入或删除核苷酸从而导致终止密码子的引入、起始密码子的去除、或可读框的变化。此类修饰或灭活可根据本领域已知的方法通过定点诱变或PCR产生的诱变来完成。尽管原则上,修饰可以在体内进行,即直接在表达待修饰的多核苷酸的细胞上进行,但是优选的是如下所示例地在体外进行修饰。

[0187] 消除或降低多核苷酸的表达的便利的方法的实例是基于基因替代、基因缺失、或基因破坏技术的。例如,在基因破坏方法中,将对应于内源多核苷酸的核酸序列在体外进行诱变以产生缺陷的核酸序列,然后将其转化到亲本细胞中以产生缺陷基因。通过同源重组,该缺陷的核酸序列替代内源多核苷酸。令人希望的是,缺陷的多核苷酸还编码可用于选择其中该多核苷酸已经被修饰或破坏的转化体的标记。在一个方面,用选择性标记如本文描述的那些来破坏该多核苷酸。

[0188] 本发明进一步涉及在编码该多肽的多核苷酸或其控制序列或编码该多肽的沉默基因中包含破坏或缺失的亲本细胞的突变体细胞,这导致与亲本细胞相比,该突变体细胞产生的多肽少或不产生多肽。

[0189] 多肽缺陷型突变体细胞作为用于天然和异源多肽的表达的宿主细胞是有用的。因此,本发明进一步涉及产生天然或异源多肽的方法,这些方法包括:(a)在有益于产生该多肽的条件下培养该突变体细胞;和(b)回收该多肽。术语“异源多肽”意指对该宿主细胞来说不是天然的多肽,例如天然蛋白质的变体。该宿主细胞可以包含多于一个拷贝的编码该天



然或异源多肽的多核苷酸。

[0190] 用于培养和纯化目的产物的方法可以通过本领域已知的方法进行。

[0191] 本发明用于产生基本上不含蛋白酶的产物的方法在多肽(例如真菌蛋白质,例如酶)的产生中是令人感兴趣的。蛋白酶缺陷型细胞也可以用于表达在制药上感兴趣的异源蛋白如激素、生长因子、受体等。

[0192] 在另一个方面,本发明涉及通过本发明方法产生的基本上无蛋白酶活性的蛋白质产物。

[0193] 蛋白酶颗粒

[0194] 本发明还涉及包含本发明的蛋白酶的酶颗粒/粒子。在一个实施例中,颗粒包含核心以及任选地包围该核心的一种或多种包衣(外层)。

[0195] 核心的直径(测量为当量球径(基于体积的平均粒度))是20-2000 $\mu\text{m}$ ,特别是50-1500 $\mu\text{m}$ 、100-1500 $\mu\text{m}$ 或250-1200 $\mu\text{m}$ 。

[0196] 在一个实施例中,核心包含一种或多种具有本发明的蛋白酶活性的多肽。

[0197] 该核心可以包括另外的材料如填料、纤维材料(纤维素或合成纤维)、稳定剂、增溶剂、悬浮剂、粘度调节剂、轻球体、增塑剂、盐、润滑剂和芳香剂。

[0198] 该核心可以包含粘合剂,例如合成聚合物、蜡、脂肪或碳水化合物。

[0199] 该核心通常作为均匀的共混物可以包含多价阳离子的盐、还原剂、抗氧剂、过氧化物分解催化剂和/或酸性缓冲液组分。

[0200] 该核心可以包含惰性粒子,其中酶被吸附到该惰性粒子之内,或者被施加(例如通过流化床包衣)到该惰性粒子的表面上。

[0201] 该核心的直径可以是20-2000 $\mu\text{m}$ ,具体地50-1500 $\mu\text{m}$ 、100-1500 $\mu\text{m}$ 或250-1200 $\mu\text{m}$ 。

[0202] 该核心可以被至少一种包衣包围,例如以改善储存稳定性、以减少在处理过程中的粉尘形成或用于着色该颗粒。该一个或多个任选的包衣可以包括盐包衣、或其他适合的包衣材料,如聚乙二醇(PEG)、甲基羟基-丙基纤维素(MHPC)以及聚乙烯醇(PVA)。

[0203] 可以将该包衣按核心的重量计以至少0.1% (例如,至少0.5%、至少1%、至少5%、至少10%或至少15%)的量施加。该量至多可以是100%、70%、50%、40%或30%。

[0204] 该包衣优选是至少0.1 $\mu\text{m}$ 厚,特别是至少0.5 $\mu\text{m}$ 、至少1 $\mu\text{m}$ 或至少5 $\mu\text{m}$ 厚。在一些实施例中,该包衣的厚度低于100 $\mu\text{m}$ ,例如低于60 $\mu\text{m}$ 或低于40 $\mu\text{m}$ 。

[0205] 该包衣应当通过形成基本上连续的层来密封该核心单元。基本上连续的层应当理解为具有极少或没有孔洞的包衣,使得密封/封闭的核心单元具有极少或没有未包衣的区域。层或包衣特别应在厚度上是均匀的。

[0206] 该包衣可以进一步含有其他本领域已知的材料,例如填料、防粘剂、颜料、染料、增塑剂和/或粘合剂,例如二氧化钛、高岭土、碳酸钙或滑石。

[0207] 盐包衣可以包含按重量计至少60%的盐,例如按重量计至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%。

[0208] 为了提供可接受的保护,盐包衣优选是至少0.1 $\mu\text{m}$ 厚,例如至少0.5 $\mu\text{m}$ 、至少1 $\mu\text{m}$ 、至少2 $\mu\text{m}$ 、至少4 $\mu\text{m}$ 、至少5 $\mu\text{m}$ 或至少8 $\mu\text{m}$ 。在一个特定的实施例中,盐包衣的厚度低于100 $\mu\text{m}$ ,例如低于60 $\mu\text{m}$ 或低于40 $\mu\text{m}$ 。

[0209] 该盐可以从盐溶液(其中该盐是完全溶解的)中添加,或者从盐悬浮液(其中这些

细粒子是少于50 $\mu\text{m}$ ,例如少于10 $\mu\text{m}$ 或少于5 $\mu\text{m}$ )中添加。

[0210] 该盐包衣可以包含单一盐或者两种或更多种盐的混合物。该盐可以是水溶性的,特别地具有在20 $^{\circ}\text{C}$ 在100g水中至少0.1g的溶解度,优选至少0.5g/100g水,例如至少1g/100g水、例如至少5g/100g水。

[0211] 该盐可以是无机盐,例如硫酸盐、亚硫酸盐、磷酸盐、膦酸盐、硝酸盐、氯盐或碳酸盐或者简单有机酸(少于10个碳原子,例如6个或更少的碳原子)的盐例如柠檬酸盐、丙二酸盐或乙酸盐。在这些盐中的阳离子的实例是碱或碱土金属离子、铵离子或第一过渡系的金属离子,例如钠、钾、镁、钙、锌或铝。阴离子的实例包括氯、溴、碘、硫酸根、亚硫酸根、亚硫酸氢根、硫代硫酸根、磷酸根、磷酸二氢根、二碱式磷酸根、次磷酸根、焦磷酸二氢根、四硼酸根、硼酸根、碳酸根、碳酸氢根、硅酸根、柠檬酸根、苹果酸根、马来酸根、丙二酸根、琥珀酸根、乳酸根、甲酸根、乙酸根、丁酸根、丙酸根、苯甲酸根、酒石酸根、抗坏血酸根或葡萄糖酸根。特别地,可以使用硫酸根、亚硫酸根、磷酸根、膦酸盐、硝酸盐、氯或碳酸根的碱或碱土金属盐或者简单有机酸的盐如柠檬酸盐、丙二酸盐或乙酸盐。

[0212] 在包衣中的盐可以在20 $^{\circ}\text{C}$ 下具有超过60%的恒定湿度,特别地超过70%、超过80%或超过85%,或者它可以是此盐的另一种水合物形式(例如,无水物)。该盐包衣可以如在WO 00/01793或WO2006/034710中所描述。

[0213] 适合的盐的具体实例是NaCl ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=76\%$ )、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=92\%$ )、 $\text{NaNO}_3$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=73\%$ )、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=95\%$ )、 $\text{Na}_3\text{PO}_4$  ( $\text{CH}_{25^{\circ}\text{C}}=92\%$ )、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=79.5\%$ )、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=93.0\%$ )、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=93.1\%$ )、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=81.1\%$ )、KCl ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=85\%$ )、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=92\%$ )、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=96.5\%$ )、 $\text{KNO}_3$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=93.5\%$ )、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=93\%$ )、 $\text{K}_2\text{SO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=98\%$ )、 $\text{KHSO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=86\%$ )、 $\text{MgSO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=90\%$ )、 $\text{ZnSO}_4$  ( $\text{CH}_{20^{\circ}\text{C}}=90\%$ )以及柠檬酸钠( $\text{CH}_{25^{\circ}\text{C}}=86\%$ )。其他实例包括 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 以及乙酸镁。

[0214] 该盐可以处于无水形式,或者它可以是水合盐,即具有结晶化的一个或多个结合水的结晶水合物,例如描述于WO 99/32595中。具体实例包括无水硫酸钠( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、无水硫酸镁( $\text{MgSO}_4$ )、七水硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、七水硫酸锌( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、七水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、六水硝酸镁( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、二水柠檬酸钠以及四水乙酸镁。

[0215] 优选地,作为盐溶液使用该盐,例如使用流化床。

[0216] 这些包衣材料可以是蜡状包衣材料和成膜包衣材料。蜡状包衣材料的实例是平均分子量为1000至20000的聚(环氧乙烷)产品(聚乙二醇,PEG);具有16至50个环氧乙烷单元的乙氧基化壬基酚;乙氧基化脂肪醇,其中所述醇含有12至20个碳原子,并且其中存在15至80个环氧乙烷单元;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的甘油单酯、和甘油二酯、和甘油三酯。适合用于通过流化床技术应用的成膜包衣材料的实例在GB 1483591中给出。

[0217] 颗粒可以任选地具有一种或多种另外的包衣。适合的包衣材料的实例是聚乙二醇(PEG)、甲基羟基-丙基纤维素(MHPC)以及聚乙烯醇(PVA)。具有多种包衣的酶颗粒的实例描述于WO 93/07263和WO 97/23606中。

[0218] 该核心可以通过粒化成分的共混物来制备,例如通过包括造粒技术的方法,例如结晶、沉淀、锅包衣(pan-coating)、流化床包衣、流化床凝集、旋转雾化、挤压、颗粒化(prilling)、滚圆(spheronization)、粒度减小法、转鼓造粒(drum granulation)和/或高剪切造粒。

[0219] 用于制备核心的方法可见于Handbook of Powder Technology[粉末技术手册]; C.E.Capes的Particle size enlargement[粒度增大];第1卷;1980;Elsevier[爱思唯尔]。制备方法包括已知的饲料和颗粒配制技术,例如:

[0220] a) 喷雾干燥产品,其中在喷雾干燥塔中雾化液体含酶溶液以形成小液滴,在它们在沿干燥塔下降的过程中干燥形成含酶的微粒状材料;可以用这种方法产生非常小的粒子(Michael S.Showell(编辑);Powdered detergents[粉状洗涤剂];Surfactant Science Series[表面活性剂科学系列];1998;第71卷;第140-142页;Marcel Dekker[马塞尔·德克尔出版社])。

[0221] b) 层状产品,其中酶在预形成的惰性核心粒子周围包衣成层,其中含酶溶液通常在流化床装置中被雾化,在该流化床装置中预形成的核心粒子被流体化并且含酶溶液附着到核心粒子上并干燥,直到使得干的酶层留在核心粒子的表面上。如果可以发现具有期望尺寸的有用核心粒子,则通过这种方式能够获得具有期望尺寸的粒子。这种类型的产品描述于,例如,W0 97/23606中。

[0222] c) 吸收的核心粒子,其中不是将该酶在核心周围包衣成层,而是在核心的表面上和/或表面中吸收该酶。这样的方法描述于W0 97/39116中。

[0223] d) 挤出或丸粒化的产品,其中将含酶糊剂压成丸粒或在压力下通过小的开口挤出并切割为粒子,随后干燥这些粒子。此类粒子通常具有相当大的尺寸,因为开有挤出开口的材料(通常是具有钻孔的平板)限制了通过挤出开口可允许的压力降。此外,当使用小开口时,非常高的挤出压力增加了酶糊剂中的热发生,这对酶是有害的(Michael S.Showell(编辑);Powdered detergents[粉状洗涤剂];Surfactant Science Series[表面活性剂科学系列];1998;第71卷;第140-142页;马塞尔·德克尔出版社)。

[0224] e) 颗粒化的产品,其中含酶粉末悬浮于熔化的蜡中并且例如通过转盘喷雾器将悬浮液喷洒到冷却室中,在此液滴快速地固化(Michael S.Showell(编辑);Powdered detergents[粉状洗涤剂];Surfactant Science Series[表面活性剂科学系列];1998;第71卷;第140-142页;马塞尔·德克尔出版社)。所获得产物是酶均匀分布遍及整个惰性材料而不是集中在其表面上的产物。美国专利号4,016,040和4,713,245描述了这项技术。

[0225] f) 混合器造粒产品,其中将含酶液体添加至常用造粒组分的干燥粉末组合中。将液体和粉末以适合的比例混合,并且因为液体的水分为干燥粉末所吸收,干燥粉末的组分开始附着并凝集,并且粒子将累积,形成包含酶的颗粒。这样的方法描述于美国专利号4,106,991和相关文献EP 170360、EP 304332、EP 304331、W0 90/09440和W0 90/09428中。在此方法的特定产品中,各种高剪切混合器可以用作造粒机。将由酶、填料和粘合剂等组成的颗粒与纤维素纤维混合以强化粒子,而得到所谓的T-颗粒(T-granulate)。经强化的粒子更加坚固,并释放更少的酶粉尘。

[0226] g) 粒度减小,其中通过碾磨或压碎含酶的较大的粒子、丸粒、平片体、坯块(briquette)等产生核心。通过将碾磨或压碎的产物过筛获得所需要的核心粒子级分。可以回收尺寸过大和尺寸过小的粒子。粒度减小描述于Martin Rhodes(编辑);Principles of Powder Technology[粉末技术原理];1990;第10章;John Wiley&Sons[约翰威利父子公司]中。

[0227] h) 流化床造粒。流化床造粒涉及将微粒悬浮于空气流中并经喷嘴喷射液体到流态

化粒子上。被喷洒的液滴击中的粒子湿润并发粘。发粘的粒子与其他粒子碰撞并附着到其上以形成颗粒。

[0228] i) 这些核心可经受干燥,例如在流化床干燥器中。本领域技术人员可以使用在饲料或酶工业中用于干燥颗粒的其他已知的方法。干燥优选在从25°C至90°C的产物温度下进行。对于一些酶来说,重要的是包含酶的核心在用盐包衣之前含有少量的水。如果在过量水去除之前水敏性酶被盐包衣,则水分会截留在核心中并可能消极地影响酶的活性。干燥之后,这些核心优选含有0.1-10%w/w的水。

[0229] 可以产生非粉尘颗粒,例如如美国专利号4,106,991和4,661,452中所披露,并且这些颗粒可以任选地通过本领域已知的方法来包衣。

[0230] 该颗粒可以进一步一种或多种另外的酶。然后,每种酶将存在于更多颗粒中,确保酶的更均匀分布,并且还由于不同的粒度而减少不同酶的物理分离。用于产生多酶共颗粒的方法披露于ip.com公开内容IPCOM000200739D中。

[0231] 通过使用共颗粒配制酶的另一个实例披露于W0 2013/188331中。

[0232] 本发明还涉及根据EP 238,216中披露的方法制备的受保护的酶。另一个方面涉及颗粒,其包含:

[0233] (a) 含有根据权利要求1-6中任一项所述的多肽的核心,和任选地(b)由包围该核心的一个或多个层组成的包衣。

[0234] 在一个实施例中,颗粒还包含一种或多种另外的酶,例如,水解酶、异构酶、连接酶、裂解酶、氧化还原酶和转移酶。该一种或多种另外的酶优选选自下组,该组由以下组成:乙酰木聚糖酯酶、酰基甘油脂肪酶、淀粉酶、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、 $\beta$ -葡糖苷酶、溶血磷脂酶、溶菌酶、 $\alpha$ -甘露糖苷酶、 $\beta$ -甘露糖苷酶(甘露聚糖酶)、植酸酶、磷脂酶A1、磷脂酶A2、磷脂酶D、蛋白酶、支链淀粉酶、果胶酯酶、三酰基甘油脂肪酶、木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶或其任何组合。

[0235] 液体配制品

[0236] 本发明还涉及包含本发明的蛋白酶的液体组合物。该组合物可包含酶稳定剂(酶稳定剂的实例包括多元醇(如丙二醇或甘油)、糖或糖醇、乳酸、可逆蛋白酶抑制剂、硼酸或硼酸衍生物(例如,芳族硼酸酯、或苯基硼酸衍生物(如4-甲酰基苯基硼酸))。

[0237] 在一些实施例中,包括一种或多种填料或一种或多种运载体材料以增加此类组合物的体积。适合的填料或运载体材料包括但不限于硫酸盐、碳酸盐和硅酸盐的各种盐以及滑石、粘土等。用于液体组合物的适合的填料或运载体材料包括但不限于水或低分子量伯醇和仲醇(包括多元醇和二元醇)。此类醇的实例包括但不限于甲醇、乙醇、丙醇以及异丙醇。在一些实施例中,组合物含有约5%至约90%的此类材料。

[0238] 在一个方面,本发明涉及液体配制品,其包含:

[0239] (A) 0.001%至25%w/w的一种或多种具有本发明的蛋白酶活性的多肽;以及

[0240] (B) 水。

[0241] 在另一个实施例中,该液体配制品包含20%至80%w/w的多元醇。在一个实施例中,该液体配制品包含0.001%至2.0%w/w的防腐剂。

[0242] 在另一个实施例中,本发明涉及液体配制品,其包含:

[0243] (A) 0.001%至25%w/w的一种或多种具有本发明的蛋白酶活性的多肽；

[0244] (B) 20%至80%w/w的多元醇；

[0245] (C) 任选地0.001%至2.0%w/w的防腐剂；以及

[0246] (D) 水。

[0247] 在另一个实施例中，本发明涉及液体配制品，其包含：

[0248] (A) 0.001%至25%w/w的一种或多种具有本发明的蛋白酶活性的多肽；

[0249] (B) 0.001%至2.0%w/w的防腐剂；

[0250] (C) 任选地20%至80%w/w的多元醇；以及

[0251] (D) 水。

[0252] 在另一个实施例中，液体配制品包含一种或多种配制剂，例如选自下组的配制剂，该组由以下组成：多元醇、氯化钠、苯甲酸钠、山梨酸钾、硫酸钠、硫酸钾、硫酸镁、硫代硫酸钠、碳酸钙、柠檬酸钠、糊精、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、乳糖、淀粉、PVA、乙酸盐和磷酸盐，优选选自自由以下组成的组：硫酸钠、糊精、纤维素、硫代硫酸钠、高岭土和碳酸钙。在一个实施例中，多元醇选自自由以下组成的组：甘油、山梨醇、丙二醇 (MPG)、乙二醇、二甘醇、三甘醇、1,2-丙二醇或1,3-丙二醇、二丙二醇、平均分子量低于约600的聚乙二醇 (PEG) 和平均分子量低于约600的聚丙二醇 (PPG)，更优选地选自自由以下组成的组：甘油、山梨醇和丙二醇 (MPG) 或其任何组合。

[0253] 在另一个实施例中，液体配制品包含20%-80%的多元醇(即多元醇的总量)，例如，25%-75%多元醇、30%-70%多元醇、35%-65%多元醇或40%-60%多元醇。在一个实施例中，液体配制品包含20%-80%的多元醇，例如，25%-75%多元醇、30%-70%多元醇、35%-65%多元醇或40%-60%多元醇，其中该多元醇选自自由以下组成的组：甘油、山梨醇、丙二醇 (MPG)、乙二醇、二甘醇、三甘醇、1,2-丙二醇或1,3-丙二醇、二丙二醇、平均分子量低于约600的聚乙二醇 (PEG) 和平均分子量低于约600的聚丙二醇 (PPG)。在一个实施例中，液体配制品包含20%-80%的多元醇(即多元醇的总量)，例如，25%-75%多元醇、30%-70%多元醇、35%-65%多元醇或40%-60%多元醇，其中该多元醇选自自由以下组成的组：甘油、山梨醇和丙二醇 (MPG)。

[0254] 在另一个实施例中，防腐剂选自自由以下组成的组：山梨酸钠、山梨酸钾、苯甲酸钠和苯甲酸钾或其任何组合。在一个实施例中，液体配制品包含0.02%至1.5%w/w的防腐剂，例如，0.05%至1.0%w/w防腐剂、或0.1%至0.5%w/w防腐剂。在一个实施例中，液体配制品包含0.001%至2.0%w/w的防腐剂(即防腐剂的总量)，例如，0.02%至1.5%w/w防腐剂、0.05%至1.0%w/w防腐剂、或0.1%至0.5%w/w防腐剂，其中该防腐剂选自自由以下组成的组：山梨酸钠、山梨酸钾、苯甲酸钠和苯甲酸钾或其任何组合。

[0255] 在另一个实施例中，液体配制品还包含一种或多种另外的酶，例如，水解酶、异构酶、连接酶、裂解酶、氧化还原酶和转移酶。该一种或多种另外的酶优选选自下组，该组由以下组成：乙酰木聚糖酯酶、酰基甘油脂肪酶、淀粉酶、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、 $\beta$ -葡糖苷酶、溶血磷脂酶、溶菌酶、 $\alpha$ -甘露糖苷酶、 $\beta$ -甘露糖苷酶(甘露聚糖酶)、植酸酶、磷脂酶A1、磷脂酶A2、磷脂酶D、蛋白酶、支链淀粉酶、果胶酯酶、三酰基甘油脂肪酶、木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶或其任何组合。

### [0256] 组合物

[0257] 本发明还涉及包含本发明的蛋白酶的组合物。优选地,这些组合物富集了这样一种蛋白酶。术语“富集”表示组合物的蛋白酶活性已增加,例如富集因子为至少1.1,例如至少1.2、至少1.3、至少1.4、至少1.5、至少2.0、至少3.0、至少4.0、至少5.0、至少10。

[0258] 这些组合物可以包含本发明的多肽作为主要酶组分,例如单组分组合物。这种组合物可以进一步包含如下所述的配制剂。可替代地,这些组合物可以包含多于一种本发明的多肽(例如单一活性型组合物)和/或多种酶活性,例如一种或多种(例如,几种)选自下组的酶,该组由以下组成:植酸酶、木聚糖酶、半乳聚糖酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、另外的蛋白酶、磷脂酶A1、磷脂酶A2、溶血磷脂酶、磷脂酶C、磷脂酶D、淀粉酶、溶菌酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、 $\beta$ -木糖苷酶、乙酰木聚糖酯酶、阿魏酸酯酶、纤维素酶、纤维二糖水解酶、 $\beta$ -葡糖苷酶、支链淀粉酶、和 $\beta$ -葡聚糖酶或其任何组合。

[0259] 在一个实施例中,组合物包含本发明第三方面的多肽和任选地配制剂。在一个实施例中,组合物包含本发明第四方面的多肽和任选地配制剂。在一个实施例中,组合物包含本发明第五方面的多肽和任选地配制剂。在一个实施例中,组合物包含本发明第六方面的多肽和任选地配制剂。

### [0260] 配制剂

[0261] 本发明的酶可以配制为液体或固体。针对液体配制品,配制剂可以包含多元醇(像例如,甘油、乙二醇或丙二醇)、盐(像例如,氯化钠、苯甲酸钠、山梨酸钾)或者糖或糖衍生物(像例如,糊精、葡萄糖、蔗糖和山梨醇)。因此,在一个实施例中,组合物是液体组合物,其包含本发明的多肽和一种或多种选自以下列表的配制剂,该列表由以下组成:甘油、乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、氯化钠、苯甲酸钠、山梨酸钾、糊精、葡萄糖、蔗糖和山梨醇。

[0262] 针对固体配制品,配制品可以是例如作为颗粒、喷雾干燥粉末或凝集物。配制剂可以包含盐(有机的或无机的锌、钠、钾或钙盐,像例如,如乙酸钙、苯甲酸钙、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、山梨酸钙、硫酸钙、乙酸钾、苯甲酸钾、碳酸钾、氯化钾、柠檬酸钾、山梨酸钾、硫酸钾、乙酸钠、苯甲酸钠、碳酸钠、氯化钠、柠檬酸钠、硫酸钠、乙酸锌、苯甲酸锌、碳酸锌、氯化锌、柠檬酸锌、山梨酸锌、硫酸锌)、淀粉或者糖或糖衍生物(像例如,蔗糖、糊精、葡萄糖、乳糖、山梨醇)。

[0263] 在一个实施例中,固体组合物是处于颗粒形式。颗粒可以具有基质结构(matrix structure),其中组分是均匀混合的。然而,颗粒典型地包含核心粒子和一种或多种包衣,该包衣典型地是盐的和/或蜡质的包衣。核心粒子可以是任选地与一种或多种另外的酶组合的本发明的蛋白酶并且任选地连同一种或多种盐的均匀共混物,或是惰性粒子(具有本发明的蛋白酶,该蛋白酶任选地与施加到其上的一种或多种另外的酶组合)。

[0264] 在一个实施例中,核心粒子的材料选自下组,该组由以下组成:无机盐(如乙酸钙、苯甲酸钙、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、山梨酸钙、硫酸钙、乙酸钾、苯甲酸钾、碳酸钾、氯化钾、柠檬酸钾、山梨酸钾、硫酸钾、乙酸钠、苯甲酸钠、碳酸钠、氯化钠、柠檬酸钠、硫酸钠、乙酸锌、苯甲酸锌、碳酸锌、氯化锌、柠檬酸锌、山梨酸锌、硫酸锌)、淀粉或者糖或糖衍生物(像例如,蔗糖、糊精、葡萄糖、乳糖、山梨醇)、糖或糖衍生物(像例如,蔗糖、糊精、葡萄糖、乳糖、山梨醇)、有机小分子、淀粉、面粉、纤维素和矿物质。

[0265] 盐包衣典型地至少是 $1\mu\text{m}$ 厚并且可以是一种特别的盐或多种盐的混合物,如

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>和/或柠檬酸钠。其他实例是在例如WO 2008/017659、WO 2006/034710、WO 1997/05245、WO 1998/54980、WO 1998/55599、WO 2000/70034中描述的那些,或是例如在WO 2001/00042中描述的聚合物包衣。

[0266] 在另一个实施例中,组合物是固体组合物,其包含本发明的蛋白酶和一种或多种选自以下列表的配制剂,该列表由以下组成:氯化钠、苯甲酸钠、山梨酸钾、硫酸钠、硫酸钾、硫酸镁、硫代硫酸钠、碳酸钙、柠檬酸钠、糊精、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、乳糖、淀粉和纤维素。在一个优选的实施例中,配制剂选自以下化合物中的一种或多种:硫酸钠、糊精、纤维素、硫代硫酸钠、和碳酸钙。在一个优选的实施例中,固体组合物是处于颗粒形式。在一个实施例中,固体组合物是处于颗粒形式,并且包括核心粒子、包含本发明的蛋白酶的酶层以及盐包衣。

[0267] 在另一个实施例中,配制剂选自以下化合物中的一种或多种:甘油、乙二醇、1,2-丙二醇或1,3-丙二醇、氯化钠、苯甲酸钠、山梨酸钾、硫酸钠、硫酸钾、硫酸镁、硫代硫酸钠、碳酸钙、柠檬酸钠、糊精、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、乳糖、淀粉和纤维素。在一个优选的实施例中,配制剂选自以下化合物中的一种或多种:1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、硫酸钠、糊精、纤维素、硫代硫酸钠和碳酸钙。

#### [0268] 动物饲料和饲料添加剂

[0269] 本发明还涉及动物饲料组合物和动物饲料添加剂。动物饲料组合物或饮食具有相对高的蛋白质含量。家禽和猪饮食可以如WO 01/58275的表B第2-3栏所示来表征。鱼饮食可以如表B第4栏所示来表征。此外,此类鱼饮食通常具有200-310g/kg的粗脂肪含量。

[0270] 根据本发明的动物饲料组合物具有50-800g/kg的粗蛋白含量,并且此外还包含如本文所述的至少一种蛋白酶或如本文所述的多于一种蛋白酶。

[0271] 此外或在(上述粗蛋白含量)的替代方案中,本发明的动物饲料组合物具有10-30MJ/kg的可代谢能量;和/或0.1-200g/kg的钙含量;和/或0.1-200g/kg的有效磷含量;和/或0.1-100g/kg的甲硫氨酸含量;和/或0.1-150g/kg的甲硫氨酸加半胱氨酸含量;和/或0.5-50g/kg的赖氨酸含量。

[0272] 在特定的实施例中,可代谢能量、粗蛋白、钙、磷、甲硫氨酸、甲硫氨酸加半胱氨酸和/或赖氨酸的含量落入WO 01/58275表B中的范围2、3、4或5(R.2-5)中的任何一个内。

[0273] 粗蛋白以氮(N)乘以系数6.25计算,即粗蛋白(g/kg)=N(g/kg)×6.25。通过凯氏定氮法(Kjeldahl method)测定氮含量(A.O.A.C.,1984,Official Methods of Analysis [官方分析方法]第14版,Association of Official Analytical Chemists[官方分析化学家集],华盛顿特区)。

[0274] 可代谢能量可根据如下进行计算:NRC出版物Nutrient requirements in swine [生猪的营养需求],第九次再版1988,subcommittee on swine nutrition,committee on animal nutrition,board of agriculture,national research council[美国国家研究委员会农业部动物营养协会猪营养分会].美国国家科学院出版社[National Academy Press],华盛顿特区,第2-6页;以及欧洲家禽饲养材料能量值表(European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs),斯克得霍特家禽研究与推广中心[Spelderholt centre for poultry research and extension],7361DA贝克贝亨,荷兰,Grafisch bedrijf Ponsen&looijen bv,瓦赫宁恩[Wageningen].ISBN 90-71463-12-5。

[0275] 根据诸如Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7等饲料表计算在动物全饮食中的钙、有效磷和氨基酸的膳食含量。

[0276] 在一个特定的实施例中,本发明的动物饲料组合物包含如上定义的至少一种植物性蛋白质。

[0277] 本发明的动物饲料组合物还可以含有动物性蛋白质,例如肉和骨粉、羽毛粉和/或鱼粉,通常量为0-25%。本发明的动物饲料组合物还可以包含具有可溶物的干酒糟(Dried Distillers Grains with Solubles, DDGS),通常量为0-30%。

[0278] 在仍另外的特定的实施例中,本发明的动物饲料组合物含有0-80%玉蜀黍;和/或0-80%高粱;和/或0-70%小麦;和/或0-70%大麦;和/或0-30%燕麦;和/或0-40%大豆粉;和/或0-25%鱼粉;和/或0-25%肉和骨粉;和/或0-20%乳清。

[0279] 动物饲料可包含植物性蛋白质。在特定的实施例中,植物性蛋白质的蛋白含量是至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90% (w/w)。植物性蛋白质可以衍生自植物性蛋白质源,例如豆类和谷类,例如得自蝶形花科(豆科)、十字花科、藜科和早熟禾科植物的材料,如大豆粉、羽扇豆粉、油菜籽粉及其组合。

[0280] 在一个特定的实施例中,植物性蛋白质源是来自蝶形花科的一种或多种植物(例如大豆、羽扇豆、豌豆或菜豆)的材料。在另一个特定的实施例中,植物性蛋白质源是来自藜科的一种或多种植物(例如甜菜、糖甜菜、菠菜或藜麦)的材料。植物性蛋白质源的其他实例是油菜籽和卷心菜。在另一个特定的实施例中,大豆是优选的植物性蛋白质源。植物性蛋白质源的其他实例是谷物,例如大麦、小麦、黑麦、燕麦、玉蜀黍(玉米)、稻和高粱。

[0281] 可以将动物饮食制成例如粉状饲料(非丸粒化)或丸粒化饲料。通常,混合研磨的饲料并根据所讨论的种类的说明添加充足量的必需维生素和矿物质。作为固体或液体酶配制品添加酶。例如,对于粉状饲料,在成分混合步骤前或期间可以添加固体或液体酶配制品。对于丸粒化饲料,在饲料成分步骤前或期间还可添加该(固体或液体)蛋白酶/酶制剂。典型地,液体蛋白酶/酶制剂包含本发明的蛋白酶,任选地伴随着多元醇(例如甘油、乙二醇或丙二醇),并且是在造粒步骤后添加,例如通过将该液体配制品喷涂至丸粒上。也可以将该酶掺入饲料添加剂或预混物中。

[0282] 可替代地,可以通过冷冻液体酶溶液与膨胀剂(例如研磨的大豆粉)的混合物,并且然后冻干该混合物,来制备蛋白酶。

[0283] 在一个实施例中,组合物包含一种或多种另外的酶。在一个实施例中,组合物包含一种或多种微生物。在一个实施例中,组合物包含一种或多种维生素。在一个实施例中,组合物包含一种或多种矿物质。在一个实施例中,组合物包含一种或多种氨基酸。在一个实施例中,组合物包含一种或多种其他饲料成分。

[0284] 在另一个实施例中,组合物包含一种或多种本发明的多肽、一种或多种配制剂和一种或多种另外的酶。在一个实施例中,组合物包含一种或多种本发明的多肽、一种或多种配制剂和一种或多种微生物。在一个实施例中,组合物包含一种或多种本发明的多肽、一种或多种配制剂和一种或多种维生素。在一个实施例中,组合物包含一种或多种本发明的多肽和一种或多种矿物质。在一个实施例中,组合物包含本发明的多肽、一种或多种配制剂和



一种或多种氨基酸。在一个实施例中,组合物包含一种或多种本发明的多肽、一种或多种配制剂和一种或多种其他饲料成分。

[0285] 在另一个实施例中,组合物包含一种或多种本发明的多肽、一种或多种配制剂和一种或多种选自以下组成的列表的组分:一种或多种另外的酶;一种或多种微生物;一种或多种维生素;一种或多种矿物质;一种或多种氨基酸;以及一种或多种其他饲料成分。

[0286] 饮食中的最终蛋白酶浓度在0.01-200mg蛋白酶蛋白/kg饮食的范围内,优选地在0.5-100mg/kg饮食之间,更优选地2-50mg,甚至更优选地5-25mg蛋白酶蛋白/kg动物饮食。

[0287] 目前预期按一个或多个以下量(剂量范围)施用蛋白酶:0.01-200;0.01-100;0.5-100;1-50;5-100;5-50;10-100;0.05-50;5-25;或0.10-10-所有这些范围都是以mg蛋白酶蛋白/kg饲料(ppm)。

[0288] 为了确定每kg饲料中蛋白酶蛋白的mg数,从饲料组合物中纯化蛋白酶,并且使用相关试验(参见蛋白酶活性)确定纯化的蛋白酶的比活性。使用相同试验测定该饲料组合物的蛋白酶活性,并且在这两次测定的基础上计算出以每kg饲料中蛋白酶蛋白的mg数计的剂量。

[0289] 在一个特定的实施例中,本发明的动物饲料添加剂意欲以0.01%至10.0%,更特别地0.05%至5.0%或0.2%至1.0%(%意指g添加剂/100g饲料)的水平包含(或规定为必须包含)在动物饮食或饲料中。特别地,对预混物也是如此。

[0290] 使用相同的原理测定饲料添加剂中的蛋白酶蛋白mg数。当然,如果可获得制备饲料添加剂或饲料所用蛋白酶的样品,可由该样品测定比活性(无需从饲料组合物或添加剂中纯化蛋白酶)。

[0291] 另外的酶

[0292] 在另一个实施例中,本文描述的组合物任选地包含一种或多种酶。可以根据handbook Enzyme Nomenclature[酶命名手册](来自NC-IUBMB,1992)对酶进行分类,还参见因特网上的ENZYME网站:<http://www.expasy.ch/enzyme/>。ENZYME是相对于酶命名法的信息储库。它主要基于国际生物化学和分子生物学联合会命名委员会(IUB-MB),学术出版社公司(Academic Press,Inc.),1992的推荐并且描述了所表征的酶的每种类型,为所述酶提供EC(酶委员会)编号(Bairoch,2000,The ENZYME database[酶数据库],Nucleic Acids Res.[核酸研究]28:304-305)。这种IUB-MB酶命名法是基于它们的底物特异性,有时基于它们的分子机制;这种分类不反映这些酶的结构特征。

[0293] Henrissat等人在“The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 [2013年的碳水化合物活性酶数据库(CAZy)]”,Nucl.Acids Res.[核酸研究](2014年1月1日)42(D1):D490-D495中描述了某些糖苷水解酶(如内切葡聚糖酶、半乳聚糖酶、甘露聚糖酶、葡聚糖酶、溶菌酶和半乳糖苷酶)的另一种分类;还参见[www.cazy.org](http://www.cazy.org)。

[0294] 因此,本发明的组合物还可以包含至少一种选自下组的其他酶,该组由以下组成:乙酰木聚糖酯酶(EC 3.1.1.23)、酰基甘油脂肪酶(EC 3.1.1.72)、 $\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.1)、 $\beta$ -淀粉酶(EC 3.2.1.2)、阿拉伯呋喃糖苷酶(EC 3.2.1.55)、纤维二糖水解酶(EC 3.2.1.91)、纤维素酶(EC 3.2.1.4)、阿魏酸酯酶(EC 3.1.1.73)、半乳聚糖酶(EC 3.2.1.89)、 $\alpha$ -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22)、 $\beta$ -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)、 $\beta$ -葡聚糖酶(EC 3.2.1.6)、 $\beta$ -葡糖苷酶(EC 3.2.1.21)、三酰基甘油脂肪酶(EC 3.1.1.3)、溶血磷脂酶(EC

3.1.1.5)、溶菌酶(EC 3.2.1.17)、 $\alpha$ -甘露糖苷酶(EC 3.2.1.24)、 $\beta$ -甘露糖苷酶(甘露聚糖酶)(EC 3.2.1.25)、植酸酶(EC 3.1.3.8、EC 3.1.3.26、EC 3.1.3.72)、磷脂酶A1(EC 3.1.1.32)、磷脂酶A2(EC 3.1.1.4)、磷脂酶D(EC 3.1.4.4)、蛋白酶(EC 3.4)、支链淀粉酶(EC 3.2.1.41)、果胶酯酶(EC 3.1.1.11)、木聚糖酶(EC 3.2.1.8、EC 3.2.1.136)、 $\beta$ -木糖苷酶(EC 3.2.1.37)或其任何组合。

[0295] 在一个实施例中,本发明的组合物包含半乳聚糖酶(EC 3.2.1.89)和 $\beta$ -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)。

[0296] 在一个实施例中,本发明的组合物包含植酸酶(EC 3.1.3.8或3.1.3.26)。可商购的植酸酶的实例包括Bio-Feed™植酸酶(诺维信公司(Novozymes))、**Ronozyme®**P、**Ronozyme®**NP和**Ronozyme®**HiPhos(帝斯曼营养产品公司(DSM Nutritional Products))、Natuphos™(巴斯夫公司(BASF))、Natuphos™ E(巴斯夫公司)、**Finase®**和**Quantum®**Blue(AB酶公司(AB Enzymes))、**OptiPhos®**(浩卫制药公司(Huvepharma))、**AveMix®**Phytase(Aveve Biochem公司)、**Phyzyme®**XP(范恩尼姆/杜邦公司(Verenium/DuPont))以及**Axtra®**PHY(杜邦公司(DuPont))。其他优选的植酸酶包括描述于例如W0 98/28408、W0 00/43503、和W0 03/066847中的那些。

[0297] 在一个实施例中,本发明的组合物包含木聚糖酶(EC 3.2.1.8)。可商购的木聚糖酶的实例包括**Ronozyme®**WX(帝斯曼营养产品公司)、**Econase®**XT和Barley(AB Vista公司(AB Vista))、**Xylathin®**(范恩尼姆公司(Verenium))、**Hostazym®**X(浩卫制药公司)、**Axtra®**XB(木聚糖酶/ $\beta$ -葡聚糖酶,杜邦公司)和**Axtra®**XAP(木聚糖酶/淀粉酶/蛋白酶,杜邦公司)、**AveMix®**XG 10(木聚糖酶/葡聚糖酶)和**AveMix®**02CS(木聚糖酶/葡聚糖酶/果胶酶,Aveve Biochem公司)、Naturgrain(巴斯夫公司)。

[0298] 在一个实施例中,本发明的组合物包含蛋白酶(EC 3.4)。可商购的蛋白酶的实例包括**Ronozyme®**ProAct(帝斯曼营养产品公司)、Winzyme Pro**Plus®**(圣泰国际有限公司(Suntaq International Limited)) and **Cibenza®**DP100(诺伟司国际公司(Novus International))。

[0299] 在一个实施例中,本发明的组合物包含 $\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.1)。可商购的 $\alpha$ -淀粉酶的实例包括**Ronozyme®**A和**RONOZYME®**RumiStar™(帝斯曼营养产品公司)。

[0300] 在一个实施例中,本发明的组合物包含多组分酶产品,例如**FRA®**Octazyme(弗拉曼科公司(Framelco))、**Ronozyme®**G2、**Ronozyme®**VP和**Ronozyme®**MultiGrain(帝斯曼营养产品公司)、**Rovabio®**Excel或**Rovabio®**Advance(安迪苏公司(Adisseo))、**Endofeed®**DC(内切-1,3(4)- $\beta$ -葡聚糖酶和内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶,安德烈斯皮特鲁巴公司(Andres Pinaluba SA))或**Amylofeed®**(内切-1,3(4)- $\beta$ -葡聚糖酶和内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶和 $\alpha$ -淀粉酶,安德烈斯皮特鲁巴公司(Andres Pinaluba SA))。

[0301] 摄生品

[0302] 摄生品 (eubiotic) 是意欲在胃肠道中提供微生物菌群的健康平衡的化合物。摄生品包括许多不同的饲料添加剂,例如益生菌、益生元、植生素(精油)和有机酸,其在下面更详细地描述。

[0303] 益生菌

[0304] 在一个实施例中,该动物饲料组合物进一步包含一种或多种另外的益生菌。在一个实施例中,该动物饲料组合物进一步包含来自以下一个或多个属的细菌:乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属、芽孢杆菌属、片球菌属、肠球菌属、明串珠菌属、肉食杆菌属、丙酸杆菌属、双歧杆菌属、梭菌属和巨型球菌属或其任何组合。

[0305] 在一个实施例中,该动物饲料组合物进一步包含来自以下一个或多个菌株的细菌:枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、屎肠球菌、肠球菌属物种和片球菌属物种、乳杆菌属物种、双歧杆菌属物种、嗜酸乳杆菌、乳酸片球菌、乳酸乳球菌、两歧双歧杆菌、特氏丙酸杆菌、香肠乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、丁酸梭菌、动物双歧杆菌动物亚种 (*Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*)、罗伊氏乳杆菌、唾液乳杆菌唾液亚种 (*Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*)、埃氏巨型球菌、丙酸杆菌属物种。

[0306] 在另一个实施例中,组合物、动物饲料添加剂或动物饲料进一步包含来自以下一种或多种枯草芽孢杆菌菌株的细菌:3A-P4 (PTA-6506)、15A-P4 (PTA-6507)、22C-P1 (PTA-6508)、2084 (NRRL B-500130)、LSSA01 (NRRL-B-50104)、BS27 (NRRL B-50105)、BS 18 (NRRL B-50633)、BS 278 (NRRL B-50634)、DSM 29870、DSM 29871、DSM 32315、NRRL B-50136、NRRL B-50605、NRRL B-50606、NRRL B-50622以及PTA-7547。

[0307] 在另一个实施例中,组合物、动物饲料添加剂或动物饲料进一步包含来自以下一种或多种短小芽孢杆菌菌株的细菌:NRRL B-50016、ATCC 700385、NRRL B-50885或NRRL B-50886。

[0308] 在另一个实施例中,组合物、动物饲料添加剂或动物饲料进一步包含来自以下一种或多种地衣芽孢杆菌菌株的细菌:NRRL B 50015、NRRL B-50621或NRRL B-50623。

[0309] 在另一个实施例中,组合物、动物饲料添加剂或动物饲料进一步包含来自以下一种或多种解淀粉芽孢杆菌菌株的细菌:DSM 29869、DSM 29869、NRRL B 50607、PTA-7543、PTA-7549、NRRL B-50349、NRRL B-50606、NRRL B-50013、NRRL B-50151、NRRL B-50141、NRRL B-50147或NRRL B-50888。

[0310] 该动物饲料组合物中的每种细菌菌株的细菌计数在 $1 \times 10^4$ 和 $1 \times 10^{14}$ CFU/kg的干物质之间,优选在 $1 \times 10^6$ 和 $1 \times 10^{12}$ CFU/kg的干物质之间,并且更优选在 $1 \times 10^7$ 至 $1 \times 10^{11}$ CFU/kg的干物质之间。在另一个实施例中,该动物饲料组合物中的每种细菌菌株的细菌计数在 $1 \times 10^8$ 和 $1 \times 10^{10}$ CFU/kg的干物质之间。

[0311] 该动物饲料组合物中的每种细菌菌株的细菌计数在 $1 \times 10^5$ 和 $1 \times 10^{15}$ CFU/动物/天之间,优选在 $1 \times 10^7$ 和 $1 \times 10^{13}$ CFU/动物/天之间,并且更优选在 $1 \times 10^8$ 和 $1 \times 10^{12}$ CFU/动物/天之间。在另一个实施例中,该动物饲料组合物中的每种细菌菌株的细菌计数在 $1 \times 10^9$ 和 $1 \times 10^{11}$ CFU/动物/天之间。在一个实施例中,益生菌的量按重量计为组合物的0.001%至10%。

[0312] 在另一个实施例中,该一种或多种细菌菌株以稳定的孢子形式存在。

[0313] 商业产品的实例是 **Cylactin®** (帝斯曼营养产品公司)、Alterion (安迪苏公司)、Enviva PRO (杜邦动物营养公司 (DuPont Animal Nutrition))、**Syncra®** (混合酶+益生菌, 杜邦动物营养公司)、**Ecobiol®**和**Fecinor®** (Norel/Evonik) 以及 **GutCare®** PY1 (赢创公司 (Evonik))。

#### [0314] 益生元

[0315] 益生元是诱导微生物 (例如, 细菌和真菌) 生长或活动的物质, 其有助于宿主的健康。益生元通常是不可消化的纤维化合物, 其未消化地通过胃肠道的上部并刺激通过充当它们的底物而定殖大肠的有利细菌的生长或活动。通常, 益生元增加胃肠 (GI) 道中双歧杆菌和乳酸菌的数量或活动。

[0316] 酵母衍生物 (灭活的整个酵母或酵母细胞壁) 也可以被认为是益生元。它们通常包含甘露寡糖、酵母 $\beta$ -葡聚糖或蛋白质内容物, 并且通常衍生自酵母 (酿酒酵母) 的细胞壁。

[0317] 在一个实施例中, 益生元的量按重量计为组合物的0.001%至10%。酵母产品的实例是 **Yang®**和Agrimos (拉曼动物营养公司 (Lallemand Animal Nutrition))。

#### [0318] 植生素

[0319] 植生素是一组来自草药、香料或其他植物的用作饲料添加剂的天然生长促进剂或非抗生素生长促进剂。植生素可以由精油/提取物、精油/提取物、单一植物和植物混合物 (草药产品) 或精油/提取物/植物的混合物 (专门产品) 制备的单一物质。

[0320] 植生素的实例是迷迭香、鼠尾草、牛至、百里香、丁香和柠檬草。精油的实例是百里酚、丁香酚、间甲酚、香草醛、水杨酸酯、间苯二酚、邻甲氧基苯酚 (guajacol)、姜酚、薰衣草油、紫罗酮、鸢尾酮、桉叶油素、薄荷醇、薄荷油、 $\alpha$ -蒎烯、柠檬烯、茴香脑、芳樟醇、二氢茉莉酸甲酯、香芹酚、丙酸/丙酸酯、乙酸/乙酸酯、丁酸/丁酸酯、迷迭香油、丁香油、香叶醇、萜品醇、香茅醇、水杨酸戊酯和/或水杨酸苄酯、肉桂醛、植物多酚 (单宁)、姜黄和姜黄提取物。

[0321] 在一个实施例中, 植生素的量按重量计为组合物的0.001%至10%。商业产品的实例是 **Crina®** (帝斯曼营养产品公司)、Cinergy™、Biacid™、ProHacid™ Classic和ProHacid™ Advance™ (all Promivi公司/嘉吉公司 (Cargill)) 以及Envivo E0 (杜邦动物营养公司)。

#### [0322] 有机酸

[0323] 有机酸 (C1-C7) 在自然界中作为植物或动物组织的正常成分广泛分布。它们也通过主要在大肠中的碳水化合物的微生物发酵形成。它们通常在生猪和家禽生产中用作抗生素生长促进剂的替代品, 因为它们对鸡的坏死性肠炎和仔猪的大肠杆菌感染等肠道问题具有预防作用。有机酸可以作为单组分或通常2或3种不同有机酸的混合物出售。有机酸的实例为短链脂肪酸 (例如甲酸、乙酸、丙酸、丁酸)、中链脂肪酸 (例如己酸、辛酸、癸酸、月桂酸)、二/三羧酸 (例如反丁烯二酸)、羟基酸 (例如乳酸)、芳香酸 (例如苯甲酸)、柠檬酸、山梨酸、苹果酸、酒石酸或其盐 (通常为钠或钾盐, 如二甲酸钾或丁酸钠)。

[0324] 在一个实施例中, 有机酸的量按重量计为组合物的0.001%至10%。商业产品的实例是 **VevoVital®** (帝斯曼营养产品公司)、

**Amasil®**、**Luprisil®**、**Lupro-Grain®**、**Lupro-Cid®**、**Lupro-Mix®** (巴斯夫

公司)、正丁酸AF (OXEA) 以及Adimix Precision (Nutriad公司)。

[0325] 预混物

[0326] 在一个实施例中,该动物饲料可以包括预混物,该预混物例如包含混合到动物饲料中的维生素、矿物质、酶、氨基酸、防腐剂、抗生素、其他饲料成分或其任何组合。

[0327] 氨基酸

[0328] 本发明的组合物可以进一步包含一种或多种氨基酸。用于动物饲料的氨基酸的实例是赖氨酸、丙氨酸、β-丙氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸和色氨酸。在一个实施例中,氨基酸的量按重量计为组合物的0.001%至10%。

[0329] 维生素和矿物质

[0330] 在另一个实施例中,该动物饲料可以包含一种或多种维生素,如一种或多种脂溶性维生素和/或一种或多种水溶性维生素。在另一个实施例中,该动物饲料可以任选地包含一种或多种矿物质,如一种或多种痕量矿物质和/或一种或多种常量矿物质。

[0331] 通常,脂溶性维生素和水溶性维生素以及痕量矿物质形成所谓的旨在添加到饲料中的预混物的一部分,而常量矿物质通常被分开地添加到饲料中。

[0332] 脂溶性维生素的非限制性实例包括维生素A、维生素D3、维生素E和维生素K,例如维生素K3。

[0333] 水溶性维生素的非限制性实例包括维生素B12、生物素和胆碱、维生素B1、维生素B2、维生素B6、烟酸、叶酸和泛酸盐,例如Ca-D-泛酸盐。

[0334] 痕量矿物质的非限制性实例包括硼、钴、氯化物、铬、铜、氟化物、碘、铁、锰、钼、硒和锌。

[0335] 常量矿物质的非限制性实例包括钙、镁、钾和钠。

[0336] 这些组分的营养需求(以家禽和小猪/猪为例)列于WO 01/58275的表A中。营养需求意指应在饮食中提供指定浓度的这些组分。

[0337] 在替代方案中,本发明的动物饲料添加剂包含WO 01/58275的表A中指定的单独组分中的至少一种。至少一种意指一种或两种或三种或四种等直至所有十三种或直至所有十五种单独组分中的任一种、一种或多种。更具体地,此至少一种单独组分以提供在表A的第四栏或第五栏或第六栏说明的范围内的饲料中浓度(in-feed-concentration)的量包含在本发明的添加剂内。

[0338] 在一个仍另外的实施例中,本发明的动物饲料添加剂包含至少一种以下维生素,优选以提供落入下表1中所限定的范围之内(分别针对小猪饮食和肉鸡饮食)的饲料中浓度。

[0339] 表1:典型维生素推荐

	维生素	小猪饮食	肉鸡饮食
[0340]	维生素 A	10,000-15,000 IU/kg 饲料	8-12,500 IU/kg 饲料
	维生素 D3	1800-2000 IU/kg 饲料	3000-5000 IU/kg 饲料
	维生素 E	60-100 mg/kg 饲料	150-240 mg/kg 饲料
	维生素 K3	2-4 mg/kg 饲料	2-4 mg/kg 饲料
[0341]	维生素 B1	2-4 mg/kg 饲料	2-3 mg/kg 饲料
	维生素 B2	6-10 mg/kg 饲料	7-9 mg/kg 饲料
	维生素 B6	4-8 mg/kg 饲料	3-6 mg/kg 饲料
	维生素 B12	0.03-0.05 mg/kg 饲料	0.015-0.04 mg/kg 饲料
	烟酸 (维生素 B3)	30-50 mg/kg 饲料	50-80 mg/kg 饲料
	泛酸	20-40 mg/kg 饲料	10-18 mg/kg 饲料
	叶酸	1-2 mg/kg 饲料	1-2 mg/kg 饲料
	生物素	0.15-0.4 mg/kg 饲料	0.15-0.3 mg/kg 饲料
	氯化胆碱	200-400 mg/kg 饲料	300-600 mg/kg 饲料

[0342] 其他饲料成分

[0343] 本发明的组合物可以进一步包含着色剂、稳定剂、生长改善添加剂和芳香化合物/调味品、多不饱和脂肪酸 (PUFA) ; 活性氧产生物质、抗微生物肽、和抗真菌多肽。

[0344] 着色剂的实例是类胡萝卜素, 例如 $\beta$ -胡萝卜素、虾青素和叶黄素。

[0345] 芳香化合物/调味品的实例是甲氧甲酚, 茴香脑, 十、十一和/或十二内酯、紫罗酮、鸢尾酮、姜酚、哌啶、亚丙基苯酞 (propylidene phthalide)、亚丁基苯酞 (butylidene phthalide)、辣椒素和单宁。

[0346] 抗微生物肽 (AMP) 的实例是 CAP18、林可霉素 (Leucocin) A、三色肽 (Tritrptcin)、Protegrin-1、死亡素 (Thanatin)、防卫素、乳铁蛋白、乳铁蛋白肽和奥维司匹林 (Ovispirin) 如诺维司匹林 (Novispirin) (Robert Lehrer, 2000)、菌丝霉素 (Plectasin) 和他汀 (包括在 WO 03/044049 和 WO 03/048148 中披露的化合物和多肽) 以及以上的保留抗微生物活性的变体或片段。

[0347] 抗真菌多肽 (AFP) 的实例是巨大曲霉和黑曲霉的肽连同其保留抗真菌活性的变体和片段, 如在 WO 94/01459 和 WO 02/090384 中披露的。

[0348] 多不饱和脂肪酸的实例为 C18、C20 和 C22 多不饱和脂肪酸, 例如花生四烯酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸和  $\gamma$ -亚油酸。

[0349] 活性氧产生物质的实例为例如过硼酸盐、过硫酸盐或过碳酸盐等化学品; 以及例

如氧化酶、氧合酶或合酶等酶。

[0350] 本发明的组合物可以进一步包括至少一种氨基酸。用于动物饲料的氨基酸的实例是赖氨酸、丙氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸和色氨酸。

[0351] 用途

[0352] 本发明还针对用于使用具有蛋白酶活性的多肽或其组合物(用于例如动物饲料)的方法。

[0353] 在动物饲料中的用途

[0354] 本发明的蛋白酶还可以在动物饲料中使用。在一个实施例中,本发明提供了一种用于制备动物饲料组合物的方法,该方法包括将本发明的一种或多种蛋白酶添加至一种或多种动物饲料成分中。

[0355] 根据WO 00/21381和WO 04/026334,还可以将本发明的一种或多种蛋白酶在动物饲料中用作改善饲料消化率以增加其利用效率的饲料增强酶。

[0356] 在另一个实施例中,可以将本发明的蛋白酶用于动物饲料中或用作饲料添加剂,其中它对动物消化道可以提供积极作用并且以此方式根据体重增加、饲料转化率(FCR)、欧洲生产效率因子(EPEF)、欧洲生产效能因子(EFF)改善动物生产性能,或改善动物健康,例如降低的死亡率。将FCR计算为相对于以g/动物计的体重增加的以g/动物计的饲料摄入。

[0357] 在根据本发明的用途中,可在饮食之前、之后或同时给动物饲喂蛋白酶。优选后者。

[0358] 在一个特定的实施例中,明确限定了将蛋白酶添加至饲料中时或将其包括在饲料添加剂中时蛋白酶的形式。明确限定指的是如经大小排阻色谱法(参见WO 01/58275的实例12)测定的,蛋白酶制剂至少为50%纯。在其他特定的实施例中,如经此方法测定的,蛋白酶制剂为至少60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、94%、或至少95%纯。

[0359] 明确限定的蛋白酶制剂是有利的。例如,对于实质上不受其他蛋白酶干扰或污染的蛋白酶而言,更容易确定它在饲料中的正确剂量。术语正确地给料(dose correctly)特别是指得到一致且恒定的结果的目标,和基于所希望的效果优化剂量的能力。

[0360] 然而,为了在动物饲料中使用,蛋白酶不必是纯的;可以例如包括其他酶,此时可将其称为蛋白酶制剂。

[0361] 该蛋白酶制剂可以(a)直接添加至饲料,或者(b)它可以用于随后添加至饲料(或者用于处理过程中)的一种或多种中间组合物,如饲料添加剂或者预混物的生产。不论是否根据上述(a)或(b)来使用,上文所述的纯度指的都是原始蛋白酶制剂的纯度。

[0362] 特别地,使用重组生产方法即可获得纯度为上述数量级的蛋白酶制剂,然而,当通过传统的发酵方法生产蛋白酶时,要想获得这些蛋白酶制剂却并非易事,而且,批次与批次之间会有较高的差异。

[0363] 这类蛋白酶制剂当然可以与其他酶混合。

[0364] 该蛋白质可以是动物性蛋白质,如肉和骨粉、羽毛粉、和/或鱼粉;或者它可为植物性蛋白质。

[0365] 如本文所用的术语植物性蛋白质是指包括至少一种衍生自或源自植物的蛋白质的任何化合物、组合物、制剂或混合物,该蛋白质包括经修饰的蛋白质和蛋白质衍生物。在特定的实施例中,植物性蛋白质的蛋白含量是至少10%、20%、30%、40%、50%或60%(w/

w)。

[0366] 植物性蛋白质可以衍生自植物性蛋白质源,如豆类和谷类,例如得自蝶形花科(豆科)、十字花科、藜科和早熟禾科植物的材料,如大豆粉、羽扇豆粉和油菜籽粉。

[0367] 在一个特定的实施例中,植物性蛋白质源是来自蝶形花科的一种或多种植物(例如大豆、羽扇豆、豌豆或菜豆)的材料。

[0368] 在另一个特定的实施例中,植物性蛋白质源是来自藜科的一种或多种植物(例如甜菜、糖甜菜、菠菜或藜麦)的材料。

[0369] 植物性蛋白质源的其他实例为油菜籽、向日葵籽、棉籽和卷心菜。

[0370] 大豆为优选的植物性蛋白质源。

[0371] 植物性蛋白质源的其他实例为谷类,如大麦、小麦、黑麦、燕麦、玉蜀黍(玉米)、稻、黑小麦和高粱。

[0372] 在处理过程的一个特定的实施例中,所讨论的这种或这些种蛋白酶影响这些蛋白质如植物性蛋白质或蛋白质源(或对其发挥作用或施加水解或降解影响)。为了达到此目的,一般将蛋白质或蛋白质源悬浮于溶剂,例如含水溶剂,如水中,并适当关注所讨论的酶的特征,以调节pH和温度值。例如,可在能使实际蛋白酶的活性至少为5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或至少为90%的pH值下进行处理。类似地,例如,可在能使实际蛋白酶的活性至少为5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或至少为90%的温度下进行处理。上述活性百分比指示是相对于最大活性而言的。持续进行酶解反应直至获得所需结果,然后通过例如热-处理步骤灭活酶来终止反应,或者也可以不终止反应。

[0373] 在本发明处理过程的另一个特定的实施例中,蛋白酶作用被维持,这意味着例如将蛋白酶添加至这些蛋白质,但其水解影响可以说尚未开启,直到后来当有此需求时,一旦建立了适当的水解条件,或一旦灭活了任何酶抑制剂,或不论使用何种其他方式延迟了酶的作用,才会开启其水解影响。

[0374] 在一个实施例中,处理是预-处理动物饲料或用于动物饲料的蛋白质,即这些蛋白质是在摄入之前被水解的。

[0375] 术语改善动物饲料的营养价值意指提高饲料中营养素的可利用性。在本发明中,改善营养价值特别是指改善饲料的蛋白质部分的可利用性,从而导致蛋白质提取的增加,较高的蛋白质产量,和/或蛋白质利用的改善。当饲料的营养价值增加时,蛋白质和/或氨基酸消化率增加,并且该动物的生长速率和/或体重增加量和/或饲料转化(即相对于体重增加的饲料摄取量)可被改善。

[0376] 能以任何形式将蛋白酶添加至饲料中,如它是相对纯的蛋白酶,或与欲添加至动物饲料的其他组分的混合物,即以动物饲料添加剂的形式,例如所谓的动物饲料预混物。

[0377] 另一个方面涉及本发明的多肽的用途。

[0378] (a) 在动物饲料中;

[0379] (b) 在动物饲料添加剂中;

[0380] (c) 在用于在动物饲料中使用的组合物的制备中;

[0381] (d) 用于改善动物饲料的营养价值;

[0382] (e) 用于增加动物饲料中的可消化和/或可溶性蛋白质;



[0383] (f) 用于增加动物饮食中的蛋白质的水解程度;和/或

[0384] (g) 用于处理蛋白质。

[0385] 本发明的另一个方面涉及用于改善动物饲料的营养价值的方法。

[0386] 改善动物饲料的营养价值,并且增加动物饲料中的可消化和/或可溶性蛋白质,以及增加动物饮食中的蛋白质的水解程度,可以为农民节省饲料成本。

[0387] 本发明的另一个方面涉及本发明的多肽在猪、生猪或家禽中支持健康消化系统的用途。

[0388] 本发明的另一个方面涉及本发明的多肽减少磷和氮向环境中释放的用途。

[0389] 制备方法

[0390] 在一个实施例中,本发明还涉及用于制备动物饲料或饲料添加剂的方法,该方法包括制备动物饲料或包含动物饲料和本发明第一方面的蛋白酶的饲料添加剂。

[0391] 在一个实施例中,本发明还涉及用于制备动物饲料或饲料添加剂的方法,该方法包括制备动物饲料或包含动物饲料和本发明第二方面的蛋白酶的饲料添加剂。

[0392] 在一个实施例中,本发明还涉及用于制备动物饲料或饲料添加剂的方法,该方法包括制备动物饲料或包含动物饲料和本发明第三方面的蛋白酶的饲料添加剂。

[0393] 在一个实施例中,本发明还涉及用于制备动物饲料或饲料添加剂的方法,该方法包括制备动物饲料或包含动物饲料和本发明第四方面的蛋白酶的饲料添加剂。

[0394] 在一个实施例中,本发明还涉及用于制备动物饲料或饲料添加剂的方法,该方法包括制备动物饲料或包含动物饲料和本发明第五方面的蛋白酶的饲料添加剂。

[0395] 在一个实施例中,本发明还涉及用于制备动物饲料或饲料添加剂的方法,该方法包括制备动物饲料或包含动物饲料和本发明第六方面的蛋白酶的饲料添加剂。

[0396] 信号肽

[0397] 本发明还涉及编码信号肽的分离的多核苷酸,该信号肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸1至25或由其组成。多核苷酸可以进一步包含编码蛋白质的基因,该蛋白质与信号肽和/或前肽可操作地连接。优选地该蛋白质对于该信号肽和/或前肽来说是异源的。

[0398] 本发明还涉及包含此类多核苷酸的核酸构建体、表达载体和重组宿主细胞。

[0399] 本发明还涉及产生蛋白质的方法,该方法包括:(a) 培养包含这种多核苷酸的重组宿主细胞;和任选地(b) 回收该蛋白质。

[0400] 该蛋白质对于宿主细胞来说可以是天然的或异源的。术语“蛋白质”在此不意图是指特定长度的编码产物,并且因此涵盖肽、寡肽及多肽。术语“蛋白质”还涵盖了组合形成编码产物的两个或更多个多肽。这些蛋白质还包括杂合多肽和融合多肽。

[0401] 优选地,该蛋白质是激素、酶、受体或其部分、抗体或其部分,或报告基因。例如,该蛋白质可以是水解酶、异构酶、连接酶、裂解酶、氧化还原酶、或转移酶,例如 $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、氨肽酶、淀粉酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -木糖苷酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、内切葡聚糖酶、酯酶、葡糖淀粉酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、变聚糖酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶。

[0402] 该基因可以从任何原核、真核或其他来源获得。

[0403] 实施例

[0404] 1. 一种具有蛋白酶活性的分离的或纯化的多肽, 该分离的或纯化的多肽选自由以下组成的组:

[0405] (a) 与SEQ ID NO:1的成熟多肽具有至少95%序列同一性的多肽;

[0406] (b) (a) 的多肽的片段, 该片段具有蛋白酶活性。

[0407] 2. 根据实施例1所述的多肽, 该多肽与SEQ ID NO:1的成熟多肽具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0408] 3. 根据实施例1或2所述的多肽, 该多肽是在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:1的成熟多肽的变体。

[0409] 4. 根据实施例1-3中任一项所述的多肽, 该多肽包含SEQ ID NO:1或其成熟多肽, 基本上由其组成或由其组成。

[0410] 5. 根据实施例1-4中任一项所述的多肽, 该多肽是SEQ ID NO:1或其成熟多肽的片段, 其中该片段具有蛋白酶活性。

[0411] 6. 根据实施例1-5中任一项所述的多肽, 该多肽获得自或可获得自海泥芽孢杆菌多肽。

[0412] 7. 一种融合多肽, 其包含根据实施例1-6中任一项所述的多肽和第二多肽。

[0413] 8. 一种颗粒, 其包含:

[0414] (a) 含有根据实施例1-6中任一项所述的多肽的核心, 和任选地

[0415] (b) 由包围该核心的一个或多个层组成的包衣。

[0416] 9. 一种组合物, 其包含根据实施例1-6中任一项所述的多肽。

[0417] 10. 根据实施例1-6中任一项所述的至少一种多肽的用途:

[0418] 在动物饲料中;

[0419] 在动物饲料添加剂中;

[0420] 在用于在动物饲料中使用的组合物的制备中;

[0421] 用于改善动物饲料的营养价值;

[0422] 用于增加动物饲料中的可消化和/或可溶性蛋白质;

[0423] 用于增加动物饮食中的蛋白质的水解程度; 和/或

[0424] 用于处理蛋白质。

[0425] 11. 一种用于改善动物饲料的营养价值的方法, 该方法包括向该饲料中添加根据实施例1-6中任一项所述的至少一种多肽。

[0426] 12. 一种动物饲料添加剂, 其包含:

[0427] 根据实施例1-6中任一项所述的至少一种多肽; 以及

[0428] 至少一种脂溶性维生素, 和/或

[0429] 至少一种水溶性维生素, 和/或

[0430] 至少一种痕量矿物质。

[0431] 13. 根据实施例11所述的动物饲料添加剂, 其进一步包含一种或多种淀粉酶; 植酸酶; 木聚糖酶; 半乳聚糖酶;  $\alpha$ -半乳糖苷酶; 蛋白酶、磷脂酶、 $\beta$ -葡聚糖酶或其任何混合物。

[0432] 14. 一种动物饲料, 其包含根据实施例11或12所述的动物饲料添加剂。

[0433] 15. 根据实施例13所述的动物饲料, 其具有50至800g/kg的粗蛋白含量。

- [0434] 16. 一种用于处理蛋白质的方法,该方法包括将根据实施例1-6中任一项所述的至少一种多肽添加到至少一种蛋白质或蛋白质源中的步骤。
- [0435] 17. 根据实施例16所述的方法,其中大豆包含在该至少一种蛋白质源中。
- [0436] 18. 根据实施例1-6中任一项所述的至少一种多肽在动物饲料中的用途。
- [0437] 19. 一种动物饲料组合物,其包含根据实施例1-6中任一项所述的至少一种多肽。
- [0438] 20. 根据实施例19所述的动物饲料组合物,其中该组合物包含一种或多种另外的酶。
- [0439] 21. 根据实施例20所述的动物饲料组合物,其中这些另外的酶选自以下组成的组:淀粉酶、过氧化氢酶、纤维素酶、角质酶、内切葡聚糖酶、卤代过氧合酶、脂肪酶、甘露聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、过氧化物酶、蛋白酶、黄原胶酶和木葡聚糖酶,或其任何混合物。
- [0440] 22. 一种分离的或纯化的多核苷酸,该分离的或纯化的多核苷酸编码根据实施例1-6中任一项所述的多肽。
- [0441] 23. 一种核酸构建体或表达载体,该核酸构建体或表达载体包含根据实施例22所述的多核苷酸,其中该多核苷酸优选地可操作地连接至指导该多肽在表达宿主中的产生的一个或多个控制序列。
- [0442] 24. 一种重组宿主细胞,其包含根据实施例22所述的多核苷酸,该多核苷酸可操作地连接至指导该多肽的产生的一个或多个控制序列。
- [0443] 25. 根据实施例24所述的重组宿主细胞,其中该多肽与该重组宿主细胞是异源的。
- [0444] 26. 根据实施例24或25所述的重组宿主细胞,其中该一个或多个控制序列中的至少一个与编码该多肽的多核苷酸是异源的。
- [0445] 27. 根据实施例24-26中任一项所述的重组宿主细胞,其包含根据实施例22所述的多核苷酸的至少两个拷贝,例如三个、四个或五个。
- [0446] 28. 根据权利要求24-27中任一项所述的重组宿主细胞,该重组宿主细胞是酵母重组宿主细胞,例如,假丝酵母属、汉逊酵母属、克鲁维酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属或耶氏酵母属细胞,如乳酸克鲁维酵母、卡尔酵母、酿酒酵母、糖化酵母、道格拉氏酵母、克鲁弗酵母、诺地酵母、卵形酵母或解脂耶氏酵母细胞。
- [0447] 29. 根据实施例24-27中任一项所述的重组宿主细胞,该重组宿主细胞是丝状真菌重组宿主细胞,例如,枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管霉属、拟蜡菌属、金孢子菌属、鬼伞属、革盖菌属、隐球菌属、线黑粉菌科、镰孢属、腐质霉属、梨孢菌属、毛霉属、毁丝霉属、新美鞭菌属、链孢菌属、拟青霉属、青霉属、平革菌属、射脉菌属、瘤胃壶菌属、侧耳属、裂褶菌属、篮状菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳属、弯颈霉属、栓菌属或木霉属细胞,特别是,泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、黑刺烟管霉、干拟蜡菌、卡内基拟蜡菌、浅黄拟蜡菌、潘诺希塔拟蜡菌、环带拟蜡菌、微红拟蜡菌、虫拟蜡菌、狭边金孢子菌、嗜角质金孢子菌、卢克诺文思金孢子菌、粪状金孢子菌、租金孢子菌、女王杜香金孢子菌、热带金孢子菌、褐薄金孢子菌、灰盖鬼伞、毛革盖菌、杆孢状镰孢、谷类镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾谷镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖孢镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、拟分枝孢镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢、镶片镰孢、特异腐质霉、疏棉状腐质霉、米黑根毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙链孢菌、产紫青霉、黄孢平革菌、射脉菌、刺芹侧耳、埃默森篮状菌、土生梭孢霉、长域毛栓菌、变色栓菌、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里

氏木霉或绿色木霉细胞。

[0448] 30. 根据实施例24-27中任一项所述的重组宿主细胞,该重组宿主细胞是原核重组宿主细胞,例如,选自下组的革兰氏阳性细胞,该组由以下组成:芽孢杆菌属、梭菌属、肠球菌属、土芽孢杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、大洋芽孢杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属或链霉菌属细胞,或者选自下组的革兰氏阴性细菌,该组由以下组成:弯曲杆菌属、大肠杆菌、黄杆菌属、梭杆菌属、螺杆菌属、泥杆菌属、奈瑟氏菌属、假单胞菌属、沙门氏菌属、以及脲原体属细胞,例如嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚硬芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、似马链球菌、酿脓链球菌、乳房链球菌和马链球菌兽疫亚种、不产色链霉菌、除虫链霉菌、天蓝链霉菌、灰色链霉菌、以及浅青紫链霉菌细胞。

[0449] 31. 一种产生根据实施例1-6中任一项所述的多肽的方法,该方法包括在有益于产生该多肽的条件下培养细胞,该细胞以其野生型形式产生该多肽。

[0450] 32. 根据实施例30所述的方法,该方法进一步包括回收该多肽。

[0451] 33. 一种产生具有蛋白酶活性的多肽的方法,该方法包括在有益于产生该多肽的条件下培养根据实施例24-30中任一项所述的重组宿主细胞。

[0452] 34. 根据实施例33所述的方法,该方法进一步包括回收该多肽。

[0453] 35. 一种产生亲本细胞的突变体的方法,该方法包括灭活编码根据实施例1-6中任一项所述的多肽的多核苷酸,这导致与亲本细胞相比,该突变体产生的多肽少。

[0454] 36. 一种突变体细胞,其通过根据实施例35所述的方法产生。

[0455] 37. 根据实施例36所述的突变体细胞,其进一步包含编码天然或异源蛋白的基因。

[0456] 38. 一种产生蛋白质的方法,该方法包括在有益于产生该蛋白质的条件下培养根据实施例36或37所述的突变体细胞。

[0457] 39. 根据权利要求37所述的方法,该方法进一步包括回收该蛋白质。

[0458] 40. 一种编码信号肽的分离的或纯化的多核苷酸,该信号肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸1至25或由其组成,该多核苷酸可操作地连接至编码与该信号肽异源的多肽的多核苷酸。

[0459] 41. 一种核酸构建体或表达载体,该核酸构建体或表达载体包含根据实施例40所述的多核苷酸。

[0460] 42. 一种重组宿主细胞,其包含根据实施例41所述的核酸构建体或表达载体。

[0461] 43. 一种产生蛋白质的方法,该方法包括在有益于产生该蛋白质的条件下培养根据实施例42所述的重组宿主细胞。

[0462] 44. 根据实施例43所述的方法,该方法进一步包括回收该蛋白质。

[0463] 45. 一种全培养液配制品或细胞培养组合物,该全培养液配制品或细胞培养组合物包含根据实施例1-6中任一项所述的多肽。

[0464] 46. 一种动物饲料添加剂,其包含一种或多种具有蛋白酶活性的多肽,其中该多肽是S8蛋白酶,并且其中该S8蛋白酶选自由以下组成的组:

[0465] (a) 与SEQ ID NO:1具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性的多肽;

[0466] (b) 由如下多核苷酸编码的多肽,该多核苷酸与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性;

[0467] (c) SEQ ID NO:1中任一种的变体,其中该变体具有蛋白酶活性并且在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个位置中包含一个或多个取代、和/或一个或多个缺失、和/或一个或多个插入或其任何组合;

[0468] (d) 包含(a)、(b)或(c)的多肽以及N-末端和/或C-末端His-标签和/或HQ-标签的多肽;

[0469] (e) 包含(a)、(b)或(c)的多肽以及多至10个氨基酸,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的N-末端和/或C-末端延伸的多肽;以及

[0470] (f) (a)、(b)或(c)的多肽的片段,该片段具有蛋白酶活性并且具有成熟多肽的至少90%的长度。

[0471] 通过以下实例进一步描述本发明,这些实例不应理解为对本发明的范围进行限制。

[0472] 实例

[0473] 实例1:来自海泥芽孢杆菌的S8蛋白酶的表达

[0474] 编码来自海泥芽孢杆菌的S8蛋白酶(SEQ ID NO:1)的基因通过整合DNA技术(Interleuvenlaan 12A,B-3001鲁汶,比利时)经密码子优化并合成。制备表达构建体,其将该基因表达为分泌酶。在该构建体中,将天然信号肽替代为克劳氏芽孢杆菌信号肽(具有以下氨基酸序列:MKKPLGKIVASTALLISVAFSSSIASA(来自SEQ ID NO:1的信号肽))。

[0475] 将该构建体制备为线性整合构建体,其中该合成基因通过在两个枯草芽孢杆菌同源染色体区域之间连同一个强启动子与氯霉素抗性标记进行PCR融合。通过SOE PCR进行融合(Horton等人,1989,Gene[基因]77:61-68)。专利申请W0 2003/095658中也描述了SOE PCR方法。在三联启动子系统(如W0 99/43835中所述)的控制下表达该基因,该启动子系统由包含稳定化序列的地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因(amyL)启动子、解淀粉芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因(amyQ)启动子和苏云金芽孢杆菌cryIIIA启动子组成。将线性PCR构建体转化到枯草芽孢杆菌中。在每ml补充有6 $\mu$ g氯霉素的LB板上选择转化体。将重组枯草芽孢杆菌克隆在液体培养基中进行生长。该重组酶在经自然细胞裂解的上清液中积累。采集含有酶的上清液并如实例2中所述将这些酶进行纯化。

[0476] 实例2:来自海泥芽孢杆菌的S8蛋白酶的纯化

[0477] 将培养液离心(20000x g,20分钟)并且将上清液小心地与沉淀物倾析分开。将上清液通过耐洁(Nalgene)0.2 $\mu$ m过滤装置过滤以去除剩余的芽孢杆菌属宿主细胞。将固体(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>添加至0.2 $\mu$ m滤液中达到1.4M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的最终浓度,并且将S8蛋白酶溶液施加至在20mM HEPES、1mM CaCl<sub>2</sub>、1.4M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(pH 8.0)中平衡的苯基-SEPHAROSE®FF柱(来自GE医疗公司(GE Healthcare))上。在用平衡缓冲液充分地洗涤柱之后,将S8蛋白酶用75%(20mM HEPES、1mM CaCl<sub>2</sub>(pH 8.0))和25%2-丙醇的混合物洗脱。使用G25 SEPHADEX®柱(来自GE医疗公司),将洗脱的S8蛋白酶峰转移至10mM CH<sub>3</sub>COOH/NaOH、

1mM CaCl<sub>2</sub> (pH 5.0) 中。将经G25SEPHADEX®转移的S8蛋白酶施加至在10mM CH<sub>3</sub>COOH/NaOH、1mM CaCl<sub>2</sub> (pH 5.0) 中平衡的SOURCE™ 30S柱 (来自GE医疗公司)。在将柱用平衡缓冲液充分地洗涤之后,将蛋白酶用在平衡缓冲液与10mM CH<sub>3</sub>COOH/NaOH、1mM CaCl<sub>2</sub>、500mM NaCl (pH 5.0) 之间的线性梯度经五个柱体积洗脱。分析来自该柱的级分的蛋白酶活性 (在pH 9下的Suc-AAPF-pNA活性测定),并且通过SDS-PAGE进一步分析活性级分。将级分 (在考马斯蓝染色的SDS-PAGE凝胶上可见到一条38kDa的主要带) 合并。合并物是纯化的制剂并且用于进一步表征。

[0478] 实例3:与基准 (Cibenza和XAP蛋白酶) 相比,肉鸡中新蛋白酶同源物的表观空肠氮消化率试验

[0479] 动物和饲喂

[0480] 使用从商业孵化场 (Accouvoir multiplicateur Grelier, La Bohardière, 法国) 获得的一天龄的鸡 (Cobb500)。鸡被饲养在缆线底层架式鸡笼中 (0.75m<sup>2</sup>/笼, 6只鸡/笼)。向鸡提供可自由获取的饲料和水,直到第7天。第7天将鸡进行称重,并以体重为标准分配至6个处理中的一个。以类似的饮食饲喂鸡,直到第16天。实验期从鸡生命的第16天至21天进行。在实验期间,向鸡喂养阴性对照饮食 (NC) 或NC+测试酶 (表5)。酶以液体形式提供,并通过使用与Forberg F60混合器偶联的超低压系统偶联进行喷雾施加到处理上。所有饮食均含有TiO<sub>2</sub>作为消化率标记。

[0481] 表5:饮食的组成和化学分析

成分 g/100 g 饲料	NC	NC + 蛋白酶
玉米	55.73	55.73
大豆粉	37.30	37.30
大豆蛋白浓缩物	-	-

[0482]

	植物油	2.00	2.00
	石灰石	1.00	1.00
	磷酸二钙	1.86	1.86
	维生素预混物	1.00	1.00
	TiO <sub>2</sub>	0.10	0.10
	Avatec® (抗球虫药)	0.06	0.06
	NaCl	0.50	0.50
	DL-甲硫氨酸	0.28	0.28
	盐酸赖氨酸	0.15	0.15
[0483]	苏氨酸	0.01	0.01
	蛋白酶, ppm	-	15
	目标能量值、氨基酸值和矿物质值		
	ME, Kcal/kg 饲料	3085	3085
	CP	22.0	22.0
	D 赖氨酸	1.19	1.19
	D 甲硫氨酸	0.55	0.55
	钙	0.90	0.90
	磷	0.75	0.75
	有效磷	0.45	0.45

[0484] 数据和样品收集

[0485] 在第16天和第21天之间,获得每笼和每个处理中的平均体重和饲料消耗。在第21天,所有鸡均经颈椎脱位处死。将鸡进行解剖并收集空肠内容物。空肠被定义为开始于胰腺环状(十二指肠)的末端,并在梅克尔憩室的近端1cm处远端结束的小肠区段。将空肠消化物合并在一个笼子里,冻干,并研磨用于化学分析。在消化物和饲料样品中确定粗蛋白和TiO<sub>2</sub>浓度,用于随后估计表6中给出的表观空肠氮消化率AJDN(%):

$$[0486] \quad \text{AJDN}(\%) = 100 - [(\text{CMf}/\text{CMe}) \times (\text{CNe}/\text{CNf})] \times 100$$

[0487] CMf = 饲料中标记的浓度; CMe = 空肠消化物中标记的浓度;

[0488] CNf = 饲料中营养素的浓度; CNe = 空肠消化物营养素的浓度

[0489] 根据Dumas法 (Dumas, J.B.A., Procédes de l'Analyse Organique [有机分析方法], Ann. Chim. Phys. [化学与物理年鉴] 247:198-213 (1831)), 通过LECO装置FP-528 (LECO<sup>®</sup>公司) 来确定氮含量。使用6.25的因子将氮含量转化为粗蛋白。

[0490] 根据DIN EN ISO 11885:1997 (DIN EN ISO 1998), 在样品的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>矿化后, 通过电感耦合等离子体 (ICP) 装置ICP-OES 5100 (安捷伦科技公司 (Agilent Technologies)) 确定饲料和消化物中的二氧化钛浓度。

[0491] 表6: 体内试验的结果

处理	%表观空肠氮消化率, 平均值
NC	53,50
SEQ ID NO: 1	53,83
XAP	53,60
Cibenza	53,82

[0493] 与NC和阳性基准 (Cibenza和XAP) 两者相比, 蛋白酶增加了表观空肠氮消化率。Cibenza是 **Cibenza<sup>®</sup>** DP100 (诺伟司公司 (Novus)), 即地衣芽孢杆菌 (ATCC 53757) 的制剂, 并且其蛋白酶 (EC 3.4.21.19) 是S1肽酶 (胰蛋白酶家族)。它以推荐剂量 (0.25-0-5kg/公吨) 给予并且最小活性为6000,000U/g。XAP (杜邦公司) 是木聚糖酶 (X)、淀粉酶 (A)、蛋白酶 (P) 的组合, 可提供2,000U的X、200U的A和4,000U的P/kg饮食。

[0494] 本文描述和要求保护的本发明不限于本文披露的特定方面的范围, 因为这些方面旨在作为本发明若干方面的说明。任何等同方面旨在处于本发明的范围之内。实际上, 除了本文所示和描述的那些之外, 本发明的各种修改对于本领域的技术人员会从前述说明变得显而易见。此类修改也旨在落入所附权利要求书的范围内。在冲突的情况下, 以包括定义的本披露为准。



## 序列表

<110> 诺维信公司 (Novozymes A/S)  
 <120> 具有蛋白酶活性的多肽以及编码它们的多核苷酸  
 <130> 14860-WO-PCT  
 <160> 2  
 <170> PatentIn 3.5 版  
 <210> 1  
 <211> 425  
 <212> PRT  
 <213> 海泥芽孢杆菌

[0001]

<220>  
 <221> 肽  
 <222> (1)..(425)  
 <220>  
 <221> 肽  
 <222> (1)..(425)  
 <223> 信号肽: 残基 1-25  
 <400> 1

Met Lys Lys Lys Arg Val Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ser Met Thr Met  
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Val Phe Thr Ala Gly Ala Phe Ala Lys Gly Pro Glu Ala  
 20 25 30

Asn Glu Ser Tyr Arg Val Leu Ile Gln Gly Pro Ala Ala Glu Arg Ala  
 35 40 45

Asn Val Lys Ala Gln Ile Glu Glu Arg Trp Asp Phe Gly Lys Asp Gly  
 50 55 60



Glu Ala Val Arg Thr Gly Ser Lys Val Val Ile Asn Met Ser Leu Gly  
 245 250 255

Ser Ser Gly Lys Asp Ser Leu Ile Ala Ser Ala Val Asp Tyr Ala Tyr  
 260 265 270

Ser Lys Gly Val Leu Ile Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Tyr Ser  
 275 280 285

Ala Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Gly Ala Leu Thr Asn Ala Ile Ala Val  
 290 295 300

Ala Ala Leu Glu Asn Val Gln Gln Asn Gly Thr Tyr Arg Val Ala Asn  
 305 310 315 320

[0003]

Phe Ser Ser Arg Gly Asn Pro Asn Thr Asp Gly Asp Tyr Tyr Ile Gln  
 325 330 335

Glu Arg Asp Val Glu Val Ser Ala Pro Gly Ala Ser Ile Glu Ser Thr  
 340 345 350

Trp Tyr Asn Gly Gly Tyr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr  
 355 360 365

Pro His Val Ala Gly Leu Ala Ala Lys Ile Trp Ser Ser Asn Pro Tyr  
 370 375 380

Met Ser His Thr Gln Leu Arg Thr Glu Leu Arg Asn Arg Ala Lys Gln  
 385 390 395 400

Tyr Asp Ile Lys Gly Gly Tyr Gly Ala Ala Thr Gly Asp Asp Tyr Ala  
 405 410 415

Ser Gly Phe Gly Tyr Pro Arg Val Arg  
 420 425

- <210> 2
- <211> 1278
- <212> DNA
- <213> 海泥芽孢杆菌

<400> 2  
 atgaagaaga agcgcgtact tggcgcagct cttctttcaa tgacaatggg cctttcagta 60  
 ttcacagctg gcgcatttgc taaaggtcct gaggctaacg agtettaccg cgtacttatac 120  
 caaggacctg cggctgaacg cgctaacggt aaagcccaaa tcgaggagcg ctgggacttt 180  
 ggtaaagacg gtcttacggc tgaggttaac tctaaacagt accaggctct tcttaagaac 240  
 aaaaacatca ctatcgagaa agtttcagag gttacgtag acacagctcg cactgaggct 300  
 tcatcaagca aaaacgactc aatctcactt gaggcagctg gctatccttc agaccaaact 360  
 ccttggggca tcgagtcaat ctacaacaac tcttacatct catcaacatc aggaggctca 420  
 ggtatcaaag ttgcagtttt agacactggc gtttacacaa accacatcga ccttgagggc 480  
 tctgcagagc agtgcaaaga ctttactcag tcttactcat caatggttaa cggtagctgc 540  
 acagaccgcc agggccatgg cacacacgta gcaggcacag ttcttgcgca cggtagctac 600  
 gacggccttg gtgtatatgg cgttgcacct caagccaaac tttgggctta caaagttctt 660  
 ggcgacaacg gatcaggcta ttcagacgac atcgcaggcg ctatccgcca cgtagctgac 720  
 gaggctgttc gcacaggatc aaaagtagta atcaacatgt cacttgaag ctcaggtaaa 780  
 gactcactta tcgcgtcagc tgttgactat gcttattcaa aaggcgttct tategttget 840  
 gcggetggta actcaggtta ttcagcaaac acaatcgget accctgggtgc gcttacgaac 900  
 gcaatcgctg ttgccgctct tgagaacgta caacagaacg gcaettatcg cgttgcgaac 960  
 ttttcatcac gcggaaacct taacacagac ggcgactact atatccagga gcgcgacgtt 1020

[0004]

---

	gaggtttcag ctctggtgc ttcaatcgag tcaacgtggt acaatggtgg ctacaacact	1080
	atctcaggca cgtcaatggc tacgcctcac gttgctggcc ttgctgcgaa aatctggtct	1140
[0005]	tcaaaccctt acatgtcaca cactcaactt cgcaactgagc ttgcaatcg cgctaaacaa	1200
	tacgacatca aagtgata tggagctgct actggtgacg actacgcatc aggttttgg	1260
	tatcctcgcg ttcgctaa	1278