

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 9/24

C12N 9/42 A23K 1/165



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96191607.9

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1165614C

[22] 申请日 1996.1.26 [21] 申请号 96191607.9

[30] 优先权

[32] 1995.1.26 [33] DK [31] 0094/1995

[86] 国际申请 PCT/DK1996/000046 1996.1.26

[87] 国际公布 WO1996/023062 英 1996.8.1

[85] 进入国家阶段日期 1997.7.25

[71] 专利权人 诺沃奇梅兹有限公司

地址 丹麦巴格司瓦德

[72] 发明人 P·K·汉森 P·瓦格尔

A·穆勒特茨 I·H·克纳普

审查员 于 群

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 张 闽

权利要求书 3 页 说明书 39 页 附图 7 页

[54] 发明名称 含有木聚糖酶的动物饲料添加剂

[57] 摘要

本发明涉及动物饲料添加剂，设添加剂含有一种单组分木聚糖酶，该木聚糖酶源于腐质霉属菌株、嗜热子囊菌属菌株、毛壳菌属菌株、毛霉属菌株、蓝霉菌属菌株、Malbranchea 属菌株、毁丝霉属菌株、梭孢壳属菌株、丝衣霉属菌株或拟青霉属菌株。本发明的其它方面涉及单组分木聚糖酶制剂、DNA 结构、重组表达载体、宿主细胞、以及生产单组分木聚糖酶制剂的方法。

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

1. 具有木聚糖酶活性的分离的多肽, 它包括:
  - i) SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列; 或
  - ii) 由 SEQ ID NO: 1 的木聚糖酶编码部分所编码的氨基酸序列; 或
  - iii) 由 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 nos.31-705 所编码的氨基酸序列; 或
  - iv) 由可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列的木聚糖酶编码部分所编码的氨基酸序列; 或
  - v) 由因遗传密码简并性而与 ii)-iv) 各序列不同的 DNA 序列所编码的氨基酸序列; 或
  - vi) 与 i)-v) 的任一氨基酸序列的同源性至少为 90% 的氨基酸序列;
  - vii) 由能与 ii)-v) 的任一 DNA 序列在下列条件下杂交的 DNA 序列所编码的氨基酸序列: 在 5 ×SSC、5 ×Denhardt's 液、50mM 磷酸钠, pH6.8, 及 50μg 变性超声的小牛胸腺 DNA 的溶液中 45℃ 杂交 18 小时, 在至少 55℃ 下用 2 ×SSC、0.2% SDS 洗三次, 30 分钟。
2. 如权利要求 1 的多肽, 它是用重组 DNA 技术制备的。
3. 如权利要求 1-2 任一项的多肽, 它源于高温霉属菌株。
4. 如权利要求 1-2 任一项的多肽, 它源于疏棉状高温霉菌株。
5. 如权利要求 1-2 任一项的多肽, 它源于疏棉状高温霉菌株 DSM 4109。
6. 如权利要求 1-2 任一项的多肽, 它在 pH 6.0 和 60℃ 下培养 60 分钟后的残余酶活性高于 96%。
7. 含有权利要求 1-6 任一项的多肽的酶制剂。
8. 如权利要求 7 的酶制剂, 它进一步包括载体和/或赋形剂。
9. 如权利要求 7-8 任一项的酶制剂, 它进一步包括稳定剂。
10. 如权利要求 7-8 任一项的酶制剂, 它包括一种或多种其它的饲料增强酶。
11. 如权利要求 10 的酶制剂, 其中的一种或多种其它的饲料增强酶选自 α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、植酸酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶

和蛋白酶。

12. 如权利要求 7-8 任一项的酶制剂, 它是动物饲料添加剂。

13. 用于动物饲料的预混物, 它含有权利要求 1-6 任一项的多肽或权利要求 7-12 任一项的酶制剂。

14. 一种动物饲料, 它含有权利要求 1-6 任一项的多肽或权利要求 7-12 任一项的制剂或权利要求 13 的预混物。

15. 一种编码具有木聚糖酶活性的多肽的 DNA 结构, 它包括:

i)SEQ ID NO: 1 的 DNA 序列; 或

ii)SEQ ID NO: 1 的木聚糖酶编码部分; 或

iii)SEQ ID NO: 1 的核苷酸 nos.31-705; 或

iv)可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列的木聚糖酶编码部分; 或

v)因遗传密码简并性而与 i)-iv)各序列不同的 DNA 序列; 或

vi)与 i)-v)任一序列的同源性至少为 90% 的 DNA 序列; 或

vii)能与 i)-v)的任一序列在下列条件下杂交的 DNA 序列: 在 5 ×SSC、5 ×Denhardt's 液、50mM 磷酸钠, pH6.8, 及 50μg 变性超声的小牛胸腺 DNA 的溶液中 45℃ 杂交 18 小时, 在至少 55℃ 下用 2 ×SSC、0.2% SDS 洗三次, 30 分钟。

16. 一种表达载体, 它含有权利要求 15 的 DNA 结构。

17. 一种宿主细胞, 它含有权利要求 15 的 DNA 结构或权利要求 16 的表达载体。

18. 一种生产具有木聚糖酶活性的分离的多肽的方法, 该方法包括: 在适于所述多肽产生的条件下培养权利要求 17 的宿主细胞, 然后从培养物中回收所述多肽。

19. 用于制备动物饲料的方法, 其中将饲料组分与下列物质混合:

i)权利要求 1-6 任一项的多肽; 或

ii)权利要求 7-12 任一项的酶制剂; 或

iii)权利要求 13 的预混物。

20. 制备权利要求 8-12 的酶制剂的方法, 其中将载体和/或赋形剂

和/或稳定剂加到所述多肽中。

21. 权利要求 1-6 任一项的多肽在降解木聚糖中的应用。

22. 权利要求 1-6 任一项的多肽在动物饲料、动物饲料添加剂或预混物中的应用。

23. 由疏棉状高温霉产生的天然木聚糖酶在动物饲料、动物饲料添加剂或预混物中的应用。

24. 权利要求 1-6 任一项的多肽或权利要求 23 的天然木聚糖酶在饲料组分的体外改良中的应用。

## 含有木聚糖酶的动物饲料添加剂

本发明涉及动物饲料添加剂，该添加剂含有一种单组分木聚糖酶，该木聚糖酶源于腐殖霉属(*Humicola*)的菌株、嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)菌株、毛壳菌属(*Chaetomium*)菌株、毛霉属(*Mucor*)菌株、蓝霉菌属(*Talaromyces*)菌株、*Malbranchea*属菌株、毁丝霉属(*Myceliophthora*)的菌株、梭孢壳属(*Thielavia*)菌株、丝衣霉属(*Byssochlamys*)菌株或拟青霉属(*Paecilomyces*)菌株。本发明的其它方面涉及单组分木聚糖酶制剂、DNA结构、重组表达载体、宿主细胞、以及生产单组分木聚糖酶制剂的方法。

可用作动物饲料的组分的植物原料的种类和数量通常受到动物消化该原料能力的制约。饲料增强酶通常为源于微生物的酶，它能够通过改善饲料的可消化性而提高其利用效率。

木聚糖分解酶(EC 3.2.1.8)是众所周知的饲料增强酶。曾报导过获自芽胞杆菌属(*Bacillus*)菌株、曲霉属(*Aspergillus*)菌株、木霉属(*Trichoderma*)菌株、枝顶孢属(*Acremonium*)菌株的木聚糖酶。另外，一种通过 *Humicola insolens* 的深层发酵而获得的一种酶制剂已经商品化(**Bio-Feed<sup>TM</sup> Plus**, 由 Novo Nordisk A/S 出售, Denmark)。

已报导了获自真菌疏绵状高温霉(*Thermomyces lanuginosus*) (同 *Humicola lanuginosa*) 的木聚糖酶制剂〔参见 Lischnig T, Purkarthofer H 和 Steiner W; *Biotechnology Letters* 1993 15(4) 411-414; Gomes J, Purkarthofer H, Hayn M, Kapplmüller J, Sinner M, 和 Steiner W, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, 39, 700-707〕。但是，从未披露过将疏绵状高温霉木聚糖酶用作饲料增强酶。

另外，现有技术中所披露的木聚糖酶制剂均涉及含有多种酶组分的复合酶制剂。也未见利用重组DNA技术由高温霉属获得单组分木聚糖酶制剂的报导。

对于很多种应用来说，复合酶制剂的使用被认为是有益的，因为多种组分的共同作用可产生协同作用。对于某些用途来说，例如，木素纤维素转化成液体贮存物或燃料，食品加工，特别是对于提高动物饲料的可消化性而言，木聚糖分解酶和纤维素分解酶的混合物被认为具有最佳性能(Alam M, Gomes I, Mohiuddin G, & Hoq MM; *Enzyme Microb. Technol.* 1994, 16, 298-302)。

根据本发明，业已发现源于疏绵状高温霉的木聚糖酶与常规饲料增强酶相比，是一种优良的饲料增强酶，当将其加入动物饲料中时可明显改善饲料的可利用性。此外，由于源于疏绵状高温霉的木聚糖酶制剂具有良好的热稳定性，特别适于在防止微生物感染，特别是沙门氏菌(*Salmonella*)感染的条件下将其加工成饲料添加剂。还发现，源于疏绵状高温霉的木聚糖酶能显著降低消化物粘度，这表明在鸡饲料的转化效率方面有明显改善。

最后，我们惊奇地发现，重组生产的高温霉属木聚糖酶的热稳定性明显高于天然木聚糖酶的，这使得重组生产的木聚糖酶特别适于在防止微生物感染，特别是沙门氏菌感染的条件下被加工成饲料添加剂。

因此，本发明的目的是提供一种单组分木聚糖酶制剂，该木聚糖酶组分是通过重组 DNA 技术从高温霉属或相关属的菌株获得的。

因此，本发明的第一方面提供了一种动物饲料添加剂，该添加剂含有一种单组分木聚糖酶，该木聚糖酶源于腐质霉属的菌株、嗜热子囊菌属的菌株、毛壳菌属菌株、毛霉属菌株、蓝霉菌属菌株、*Malbranchea* 属菌株、毁丝霉属菌株、梭孢壳属菌株、丝衣霉属菌株或拟青霉属菌株。

另一方面，本发明提供了一种单组分木聚糖酶制剂，在该制剂中，所述木聚糖酶组分源于腐殖霉属菌株、嗜热子囊菌属菌株、毛壳菌属菌株、毛霉属菌株、蓝霉菌属菌株、*Malbranchea* 属菌株、毁丝霉属菌株、梭孢壳属菌株、丝衣霉属菌株或拟青霉属菌株。

再一方面，本发明涉及一种含有编码一种木聚糖酶组分的 DNA 序列的 DNA 结构，该 DNA 序列包括：

a) 序列 1 所示的 DNA 序列的木聚糖酶编码部分，或可从酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 DSM10133 里的质粒获得的 DNA 序列；

或

b) 一个类似于序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分、或类似于可从酿酒酵母菌株 DSM10133 里的质粒获得的 DNA 序列的 DNA 序列, 该类似的 DNA 序列或

i) 同源于序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分, 或同源于可从酿酒酵母菌株 DSM10133 里的质粒获得的 DNA 序列; 或

ii) 能与和序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分相同的寡核苷酸探针杂交, 或与可从酿酒酵母菌株 DSM10133 里的质粒获得的 DNA 序列杂交; 或

iii) 能编码一种多肽, 该多肽与由序列 1 所示的 DNA 序列所编码的多肽或可从酿酒酵母菌株 DSM10133 里的质粒获得的 DNA 序列同源性至少为 70 %;

iv) 能编码一种多肽, 该多肽能与抗纯化木聚糖酶的抗体进行免疫反应, 该纯化木聚糖酶源于疏绵状高温霉菌株 DSM 4109 、或由序列 1 所示的 DNA 序列或可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 里的质粒获得的 DNA 序列编码。

又一方面, 本发明涉及一种具有本发明 DNA 结构的表达载体, 一种含有该 DNA 结构或表达载体的宿主细胞, 和一种生产本发明单组分木聚糖酶制剂的方法, 该方法包括: 在能产生所述木聚糖酶的条件下培养所述宿主细胞, 并从培养物中回收所述木聚糖酶。

将结合附图对本发明作进一步说明, 其中:

图 1 表示在 30 °C 下, 在 pH 2.5-9 的范围内测得的本发明单组分木聚糖酶的相对木聚糖分解活性 (%)。它表明该酶的最佳 pH 范围为 4.5-7.5, 尤其是在 5.0-6.5 的范围内, 在 pH 6 左右;

图 2 表示在 pH 5.5 和 30 - 80 °C 的温度范围内测得的本发明单组分木聚糖酶的相对木聚糖分解活性。图中显示该酶的最佳温度范围为 50 - 70 °C, 在 60 °C 左右;

图 3 表示本发明单组分木聚糖酶制剂 ( I ) 的相对残余活性 (%) 与天然疏绵状高温霉木聚糖酶制剂 ( II ) 的相对残余活性 (%) 的比较。残余活性是在 pH 6.0 和温度分别为 60、65、70 和 75 °C 的条件下测得;

图 4 表示天然疏绵状高温霉木聚糖酶 (●) 与通过培养 *Humicola insolens* 所获得的多组分酶制剂 (×) 对小麦粘度降低的效率的比较结果 (样品中剂量 (FXU/g 小麦));

图 5 表示重组生产的单组分疏绵状高温霉木聚糖酶 (I) 与天然疏绵状高温霉木聚糖酶 (II) 的小麦粘度降低效率的比较结果 (样品中剂量(FXU/g 小麦));

图 6 表示作为木聚糖酶加入量(FXU/kg 饲料)函数的小麦 AMEn 值 (MJ/kg); (A) 疏绵状高温霉单组分木聚糖酶制剂; (B) 天然疏绵状高温霉木聚糖酶制剂; (C) 参比物(Bio-Feed Plus CT, Novo Nordisk A/S 的一种产品, Denmark; 通过培养 *Humicola insolens* 而获得的一种多组分酶制剂); 和

图 7 以木聚糖酶加入量(FXU/kg 饲料)的函数形式表示实验食物中脂肪消化率 (%); (A)疏绵状高温霉单组分木聚糖酶制剂; (B) 天然疏绵状高温霉木聚糖酶制剂; (C) 参比物(Bio-Feed Plus CT, Novo Nordisk A/S 的一种产品, Denmark; 通过培养 *Humicola insolens* 而获得的一种多组分酶制剂)。

### 动物饲料添加剂

当把饲料增强酶加入动物饲料中时, 其可以改善对植物细胞壁的体内分解能力, 部分原因是, 其可以降低肠道粘度(Bedford 等, *Proceedings of the 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition*, 1993, pp.73-77), 从而实现动物对植物养分的较好利用。从而改善了动物的生长速度和/或饲料转化率(即: 摄入的饲料重量与体重增加之比)。

在本文中, 动物饲料添加剂是一种酶制剂, 它含有一种或几种饲料增强酶, 以及合适的载体和/或赋形剂, 该酶制剂以适于加入动物饲料中的形式提供。本发明的动物饲料添加剂可以用本领域公知的方法制备, 可以制成干燥或液体制剂形式。对于待加入所述制剂中的酶来说, 可选择性地用本领域公知的方法进行稳定化。

在本文中, 一种含有单组分木聚糖酶的动物饲料添加剂是以一种适于加入动物饲料中的形式提供的酶制剂, 在该酶制剂中, 基本上所有的木聚糖分解活性(即可检测到的木聚糖分解活性)是由一种单一的木聚



糖酶组分产生的。

本发明的动物饲料添加剂可以是一种颗粒化的酶制品，它可以与饲料组分方便地混合，或者，更理想的是形成一种预混组分。所述颗粒化酶制品可以是包衣的或非包衣的。理想的是，酶颗粒的粒度与饲料和预混组分的粒度相当。这样可以为将酶掺入饲料中提供一种安全而又方便的方式。

另外，本发明的动物饲料添加剂可以是一种稳定化液体组合物，它可以是一种水基或油基浆体。

本发明的动物饲料添加剂可以在体外（通过对饲料组分改性）或体内发挥其作用。本发明的饲料添加剂特别适于加入含有大量阿拉伯糖基木聚糖和葡糖醛木聚糖的动物饲料组合物中，如含有诸如大麦、小麦、黑麦或燕麦或玉米之类的谷物的饲料。

#### 单组分木聚糖酶制剂

本发明提供了一种动物饲料添加剂，该添加剂含有一种单组分木聚糖酶，该木聚糖酶源于腐殖霉属菌株、嗜热子囊菌属菌株、毛壳菌属菌株、毛霉属菌株、蓝霉菌属菌株、*Malbranchea* 属菌株、毁丝霉属菌株、梭孢壳属菌株、丝衣霉属菌株或拟青霉属菌株。

在一种优选实施方案中，本发明的动物饲料添加剂含有一种单组分木聚糖酶，该酶源于一种高温霉属菌株，特别是一种疏绵状高温霉菌株，最好是疏绵状高温霉菌株 DSM 4109，或该菌株的突变体或突变型。

在一种更具体的实施方案中，所述木聚糖酶是有相同于或部分相同于（即：至少部分相同于）一种纯化木聚糖酶的免疫化学特性，所述纯化木聚糖酶或

- a) 源于疏绵状高温霉菌株 DSM 4109；或
- b) 由序列 1 所示的 DNA 序列的木聚糖酶编码部分编码；或
- c) 由可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

理想的是，所述单组分木聚糖酶是源于一种携带一个编码该木聚糖酶组分的基因的宿主细胞。具体地讲，所述单组分木聚糖酶可以是

- a) 由序列 1 所示的 DNA 序列编码，或由可从酿酒酵母菌株 DSM

10133 中的质粒获得的 DNA 序列编码; 或

b) 由一个类似于序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分的 DNA 序列或类似于可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列的 DNA 序列编码, 该类似的 DNA 序列或

i) 与序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分同源, 或与可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列同源; 或

ii) 能与和序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分相同的寡核苷酸探针杂交, 或与可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列杂交; 或

iii) 能编码一种多肽, 这种多肽与由序列 1 所示 DNA 序列编码的多肽的同源性或与可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列的同源性至少为 70 %; 或

iv) 能编码一种多肽, 该多肽能与一种抗纯化的木聚糖酶抗体进行免疫反应, 该纯化木聚糖酶源于疏绵状高温霉菌株 DSM 4109, 或由序列 1 所示 DNA 序列或可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

在更好的优选实施方案中, 所述单组分木聚糖酶还具有以下特征:

a) 在 pH 6.0 和 60 °C 温度下温育 60 分钟后, 其残余酶活性高于 96 %;

b) 在 pH 6.0 和 65 °C 温度下温育 60 分钟后, 其残余酶活性高于 83 %;

c) 在 pH 6.0 和 70 °C 温度下温育 60 分钟后, 其残余酶活性高于 20 %; 和/或

d) 在 pH 6.0 和 75 °C 温度下温育 60 分钟后, 其残余酶活性高于 10 %。

类似的 DNA 序列

在本文中, 类似于序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分的 DNA 序列是指编码一种木聚糖分解酶的任何 DNA 序列, 该酶具有上文(i) - (iv) 所述特征中的一种或几种。

理想的是, 所述类似的 DNA 序列可从其它的或相关的 (如相同的)

能产生木聚糖酶组分的生物中提取，所提取的序列基于序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分或其合适的序列（如 20-500bp），例如可以用本文所述的方法进行提取，而且，所述类似序列可以是含有本文所示 DNA 序列的等位突变型或种突变型。

另外，可以根据序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分或其任何亚序列构建所述类似的 DNA 序列，例如，通过引入核苷酸置换，这种置换不会产生由所述 DNA 序列所编码的另一种木聚糖分解酶的氨基酸序列，但它相关于用于生产这种酶的宿主生物的密码子使用，或者通过引入能产生不同氨基酸序列的核苷酸置换。

当进行核苷酸置换时，氨基酸的变化最好是微不足道的，即保守的氨基酸置换，不会对蛋白的折叠或活性造成明显影响，小的缺失，一般为 1 - 大约 30 个氨基酸；小的氨基 - 或羧基 - 末端延伸，如一个氨基末端蛋氨酸残基，一个最多为约 20 - 25 个残基的小的连接肽，一个有利于提纯的小的延伸部分，如一个聚组氨酸片段、一个抗原表位或一个结合域。保守置换的例子是在碱性氨基酸（如精氨酸、赖氨酸、组氨酸）、酸性氨基酸（如谷氨酸和天冬氨酸）、极性氨基酸（如谷氨酰胺和天冬酰胺）、疏水氨基酸（如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸）、芳香氨基酸（如苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸）和小的氨基酸（如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸）组内进行置换。关于核苷酸置换的一般性描述，参见 Ford 等，*Protein Expression and Purification*, 2, 1991, 95-107。

本领域技术人员十分清楚的是，上述置换可以在对该分子功能很关键的部分以外进行，因此，仍然能得到活性木聚糖分解酶。最好不要对由本发明 DNA 结构编码的木聚糖酶的活性所必需的氨基酸进行置换，这些氨基酸可以按照本领域公知的方法进行确定，如定点诱变或丙氨酸扫描诱变（例如，参见 Cunningham and Wells, *Science*, 1989, 244, 1081-1085）。在后一种技术中，将突变引入分子的每一个残基，并测定所得突变型分子的生物学（即蛋白分解）活性，以确定对该分子的活性关键的氨基酸。通过分析晶体结构可以测定底物 - 酶互作位点，如通过诸如核磁共振分析技术、晶体学技术或光亲和标记技术（例如，参见 de Vos 等，*Science* 1992, 255, 306-312; Smith 等，*J. Mol. Biol.* 1992, 224,

899-904; Wlodaver 等, FEBS Lett. 1992, 309, 59-64) 进行测定。

可以理解, 序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分或其任何亚序列, 均可用作分离编码木聚糖分解酶的完整 DNA 序列, 如序列 1 所示 DNA 序列的探针。

在上文 i) 所提及的同源性是以两种序列之间的相同程度来确定的, 表示第一个序列是由第二个序列衍生而来。理想的是, 用本领域已知的计算机程序, 如在 GCG 程序包里所提供的 GAP 进行测定(Needleman SB & Wunsch CD; J. Mol. Biol. 1970, 48, 443-453)。利用 GAP 及以下参数进行 DNA 序列比较: GAP 产生损失 5.0, GAP 延伸损失 0.3, 该 DNA 序列的编码部分与序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分或可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列的相同程度以至少 70 % 为宜, 特别是至少为 80 %、至少 85 %、至少 90 % 或者至少为 95 %。

上文(ii)部分所提及的杂交是指在某种特定条件下, 所述类似的 DNA 序列能与和编码木聚糖酶组分的 DNA 序列相同的寡核苷酸探针杂交, 杂交条件在下文的材料和方法部分将作详细说明。所采用的探针可以序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分或其能编码该酶的至少 6 - 7 个氨基酸的亚序列为基础或以序列 2 所示的推定氨基酸序列为基础方便地进行构建。在后一种情形下, 所述探针是由一种相当于大量低简并密码子的氨基酸亚序列制备的。

通常, 类似的 DNA 序列与所述 DNA 序列高度同源, 如与编码本发明木聚糖酶组分的序列 1 所示序列的同源性至少为 70 %, 以至少 80 % 为宜, 尤其是至少 85 %、至少 90 %、或者甚至与序列 1 所示序列的同源性至少为 95 %。

在上文(iii)部分所提及的同源程度是以两种序列间的相同程度进行确定的, 它表示第一种序列由第二种序列衍生而来。理想的是, 用本领域已知的计算机程序, 如在 GCG 程序包里所提供的 GAP 进行测定(Needleman SB & Wunsch CD; J. Mol. Biol., 1970, 48, 443-453)。利用 GAP 及以下参数进行多肽序列比较: GAP 产生损失 3.0, GAP 延伸损失 0.1, 由一种类似的 DNA 序列编码的多肽与由含有序列 1 所示 DNA 序列的编码部分的 DNA 结构或可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得

的 DNA 序列编码的酶的同源性以 70 % 为宜，尤其是至少为 80 %，至少为 85 %，甚至至少为 90 %。

按照本发明上述方法，本发明木聚糖酶与大多数已有木聚糖酶的 DNA 同源性是用计算机程序 GAP 测定的。本发明木聚糖酶与获自 *Trichoderma reessi* 的木聚糖酶 I 的 DNA 同源性仅为 63 % (Torronen A 等, *Biotechnology* 1992, 10, 11, 1461-1465)，而与源于碳黑旋孢腔菌 (*Cochliobolus carbonum*) 的木聚糖酶 I 的 DNA 同源性为 63 % (Apel PC 等; *Mol. Plant Microb. Interact.*, 1993, 6, 467-473)。

上文特征(iv)所提及的“源于”不仅是指由疏绵状高温霉菌株 DSM 4109 所产生的木聚糖酶组分，而且还指由从该菌株中提取的 DNA 序列编码并在由该 DNA 序列转化的宿主细胞中产生的木聚糖酶组分。免疫反应性可以用在下文的材料和方法部分所述的方法测定。

#### 饲料增强酶

在另一种优选实施方案中，本发明的饲料添加剂可以包括额外的饲料增强酶。

在本发明的内容中，饲料增强酶包括，但不限于  $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶，特别是乳糖酶、植酸酶、 $\beta$ -葡聚糖酶，特别是内- $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶和内- $\beta$ -1, 3(4)-葡聚糖酶、木聚糖酶、木糖苷酶、半乳聚糖酶，特别是阿拉伯半乳聚糖内-1, 4- $\beta$ -半乳糖苷酶和阿拉伯半乳聚糖内-1, 3- $\beta$ -半乳糖苷酸、内葡聚糖酶，特别是内-1, 2- $\beta$ -葡聚糖酶、内-1, 3- $\alpha$ -葡聚糖酶、和内-1, 3- $\beta$ -葡聚糖酶、果胶降解酶，特别是果胶酶、果胶酯酶、果胶裂解酶、聚半乳糖醛酶、阿聚糖酶、鼠李半乳糖醛酶、鼠李半乳糖醛乙酰酯酶、鼠李半乳糖醛- $\alpha$ -鼠李糖苷酶、果糖酸盐裂解酶、和 $\alpha$ -半乳糖醛酸苷酶、甘露聚糖酶、 $\beta$ -甘露糖苷酶、甘露聚糖乙酰酯酶、木聚糖乙酰酯酶、蛋白酶和脂解酶，如脂肪酶和角质酶。

#### 微生物源

本发明涉及一种动物饲料添加剂，该添加剂包括一种木聚糖酶，该酶源于属于嗜热真菌类的菌株，即高温霉属或相关的属。

高温霉属包括几个种 [ Appinis & Eggins; 1966 ]，特别是疏绵状

高温霉（同疏绵状腐质霉）的种，这些种通常与嗜热真菌类相关[Cooney & Emerson; 1964]。有几个属属于这一类型，例如，业已证实腐质霉属、嗜热子囊菌属、毛壳菌属、毛霉属、蓝霉菌属、*Malbranchea* 属、毁丝霉属、梭孢壳属的种是很有潜力的酶生产菌。而且，丝衣霉属和拟青霉属也与这一类型相关。

一般认为高温霉属的分类关系不确定。不过，the National Institute of Health database Entrez（最近为1996年1月）将高温霉属分类为有丝分裂核菌类(Pyrenomycete)（即一种仅对其做过不全面鉴定的核菌，缺乏足够的资料将其与具体的目或具体的科联系在一起）。

最近的分子研究试图阐明高温霉属的18S - RNA的序列，以利用该资料进一步澄清该属的系统发育关系。对现有资料的暂时的解释表明，高温霉属与不整囊菌纲(Plectomycetes)下面的真菌类，特别是散囊菌目(Erotiales)密切相关。通过对数据库所做的同源性分析发现，丝衣霉属18S - RNA的序列与所公开的疏绵状高温霉的序列最为相关(Novo Nordisk 1996, 资料未发表)。如果对属于高温霉属的分离种群所作的研究支持最初的发现，则有理由将高温霉属转移到不整囊菌的目下面。因此，本发明还涉及源于不整囊菌纲、特别是散囊菌目的木聚糖酶制剂。

对本发明的木聚糖酶的核苷酸和蛋白的资料进行了同源性分析。同源性分析表明，最相关的木聚糖酶是源于 *Trichoderma reesei* 的木聚糖酶 I 和源于碳黑旋胞腔菌的木聚糖酶 I。两种木聚糖酶均属于糖基水解酶的家族 II(Henrissat B; Biochem. J. 1991, 280, 309-316)，这表明，本发明的木聚糖酶也属于该科。

已对疏绵状高温霉的几种样品进行了保藏，并要从被布达佩斯条约所认可的国际保藏机构公开获得，这些保藏机构如美国模式培养物保藏所(ATCC)，12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA。已根据国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约将疏绵状高温霉属菌株保存在德国微生物和培养物保藏所(DSM)，Mascheroder Weg 16, DE-3300 Braunschweig, Germany, 保存日为1987年5月4日，保藏号为DSM 4109。

已根据国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约将酿酒酵

母菌株 DSM 10133 保存在德国微生物和培养物保藏所 ( DSM ) , Mascheroder Weg 1b, DE-3300 Braunschweig, Germany, 保存日为 1995 年 7 月 19 日, 保藏号为 DSM 10133。该菌株含有包括序列 1 所示全长 DNA 序列的质粒 DNA, 该 DNA 编码本发明的内切葡聚糖酶, 并结合在酵母载体 pYES 2.0 上。

#### DNA 结构

另一方面, 本发明提供了一种含有编码一种木聚糖酶组分的 DNA 序列的 DNA 结构, 该 DNA 序列包括:

a) 序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分, 或可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列; 或

b) 一个类似于序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分的 DNA 序列, 或类似于可从酿酒酵母菌株 10133 中的质粒获得的 DNA 序列的 DNA 序列, 该类似 DNA 序列或

i) 同源于序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分, 或同源于可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列; 或

ii) 能与和序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分相同的寡核苷酸探针杂交, 或与可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列杂交; 或

iii) 能编码一种多肽, 该多肽与由序列 1 所示的 DNA 序列编码的多肽或可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列的同源性至少为 70 %; 或

iv) 能编码一种多肽, 该多肽能与抗纯化木聚糖酶的抗体进行免疫反应, 所述纯化木聚糖酶源于疏绵状高温霉菌株 DSM 4109 或由序列 1 所示 DNA 序列或可从酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

在本文中, “DNA 结构”是指来源于 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA 或 RNA 的任何核酸分子。“结构”一词是指单链或双链核酸片段, 它可以是以完整的或部分的编码感兴趣的木聚糖酶的核苷酸序列为基础。所述结构可选择性地含有其它核酸片段。

本发明的编码木聚糖分解酶的 DNA 结构以来源于基因组 DNA 或

cDNA 为宜,例如,可以用标准技术(例如,参见 Sambrook 等, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)获得这种 DNA 结构:制备基因组或 cDNA 文库,并用合成寡核苷酸探针通过杂交筛选编码全部或部分木聚糖分解酶的 DNA 序列。

也可以用已建立的标准方法合成本发明编码木聚糖分解酶的核酸结构,例如,由 Beaucage 和 Caruthers 所披露的亚磷酰胺法(*Tetrahedron Letters*, 1981, 22, 1859-1869),或由 Matthes 等所披露的方法(*EMBO Journal*, 1984, 3, 801-805)。按照亚磷酰胺法,在诸如自动 DNA 合成仪之类的仪器上合成寡核苷酸,纯化、退火、连接并克隆到合适的载体上。

另外,所述核酸结构可以是按照标准技术通过连接合成的、基因组或 cDNA 来源的片段(合适的话)、相当于完整核酸结构的各部分的片段而制成的混合的合成和基因组结构、混合的合成和 cDNA 结构、或混合的基因组和 cDNA 结构。

所述核酸结构还可以用特殊的引物通过聚合酶链式反应制成,例如,在 US4, 683, 202 中披露的或由 Saiki 等(*Science* 1988, 239, 487-491)所披露的方法进行。

编码木聚糖酶组分的 DNA 序列可源于腐质霉菌株、嗜热子囊菌属菌株、毛壳菌属菌株、毛霉属菌株、蓝霉菌属菌株、*Malbranchea* 属菌株、毁丝霉属菌株、梭孢壳属菌株或拟青霉属菌株。

在一种优选实施方案中,编码木聚糖酶组分的 DNA 序列源于高温霉属菌株,特别是疏绵状高温霉菌株。在一种最佳实施方案中,所述 DNA 序列源于或者是由疏绵状高温霉的 DNA 文库或其突变体或突变型产生。

可以用常规方法分离编码木聚糖分解酶的 DNA 序列,该方法一般包括:

- 将例如源于疏绵状高温霉菌株 DSM 4109 或源于酿酒酵母菌株 DSM 10133 中的质粒的 cDNA 文库克隆在一种合适的载体上,
- 用所述载体转化一种合适的宿主细胞,
- 在适于表达由所述 cDNA 文库中的一个或几个克隆编码的目的木聚糖分解酶的条件下培养所述宿主细胞,



- 通过测定由所述克隆所产生的酶的任何木聚糖酶分解活性筛选阳性克隆, 和

- 从所述克隆中分离编码目的木聚糖酶的 DNA。

在 WO 93/11249 中披露了一种一般方法, 该文献的内容被作为本发明背景技术。对筛选方法的更详细的说明参见下文的例 1。

例如, 编码一种木聚糖酶组分的 DNA 序列可以用以下方法分离: 筛选疏松状高温霉菌的一个 cDNA 文库, 和选择表达木聚糖酶的克隆 (如, 通过该酶水解 1, 4 -  $\beta$  木聚糖中 1, 4 -  $\beta$  - 木糖苷连键的能力确定)。然后用标准方法, 如例 1 中所述的方法从该克隆中分离合适的 DNA 序列。

在本文的优选实施方案中, 本发明的核酸结构包括序列 1 所示的 DNA 序列的木聚糖酶编码部分, 或其任何亚序列, 但它由于遗传密码的简并而又不同于序列 1 所示的 DNA 序列。本发明还包括能在下述条件下与编码序列 2 所示氨基酸序列或其任何亚序列的核酸分子 (基因组、合成的或 cDNA 或 RNA) 杂交的核酸序列。

#### 重组表达载体

另一方面, 本发明提供了一种含有本发明 DNA 结构的重组表达载体。

本发明的重组表达载体可以是任何可以方便地用于重组 DNA 技术的载体, 而载体的选择通常取决于该载体有待导入其中的宿主细胞。因此, 所述载体可以是自主复制的载体, 即作为染色体外的实体存在的载体, 其复制独立于染色体的复制, 如质粒。另外, 所述载体也可以是这样的: 当它被导入宿主细胞后, 整合到宿主细胞基因组上, 并与其所整合的染色体一起复制。

在本发明的表达载体中, 编码木聚糖分解酶的 DNA 序列最好是可操作地连接于该 DNA 转录所需的其它片段上。一般, 所述表达载体源于质粒或病毒 DNA, 或者含有以上两种因子。“可操作地连接”这一用语表示所述片段被设计成能发挥其预定的功能, 例如在一个启动子中启动转录, 并实现编码木聚糖酶的 DNA 序列的转录。

因此, 在本发明的表达载体中, 编码木聚糖分解酶的 DNA 序列应

当可操作地连接于合适的启动子和终止序列上。

所述启动子可以是能在所选择的宿主细胞中表现出转录活性的任何 DNA 序列，而且，可源于编码与宿主细胞同源或异源的蛋白的基因。

适于在细菌宿主细胞中指导编码本发明木聚糖酶的 DNA 转录的启动子的例子包括嗜热脂肪芽胞杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)生麦淀粉酶基因，地衣型芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) $\alpha$ -淀粉酶基因、解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amylolique faciens*) BAN 淀粉酶基因、枯草杆菌碱性蛋白酶基因或短小芽胞杆菌木聚糖酶或木糖苷酶基因的启动子，或入噬菌体 P<sub>R</sub> 或 P<sub>L</sub> 启动子或大肠杆菌 lac、trp 或 tac 启动子。

适用于酵母宿主细胞的启动子的例子包括源于酵母糖解基因 (Hitzman 等, *J. Biol. Chem.* 255(1980), 12073-12080; Alber 和 Kawasaki, *J. Mol. Appl. Gen.* 1 (1982), 419-434) 或醇脱氢酶基因 (Young 等, *Genetic Engineering of Microorganism for chemicals* (Hollaender 等著), Plenum Press, New York, 1982) 或 TPI 1 (US4, 599, 311) 或 ADH2 - 4C (Russell 等, *Nature* 304(1983), 652-654) 的启动子。

适用于丝状真菌宿主细胞的启动子的例子有，例如，ADH 3 启动子 (Mcknight 等, *The EMBO J.*, 4 (1985), 2093-2099) 或 tpi A 启动子。其它有用启动子的例子有源于以下基因的启动子：编码米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) TAKA 淀粉酶、米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 中性 $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉酸穗 $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) 葡糖淀粉酶 (gluA)、米黑根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸三糖异构酶或构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 乙酰胺酶的基因。优选 TAKA 淀粉酶和 glu A 启动子。

本发明的表达载体还可以包括一个使得该载体能够在相关的宿主细胞中表达的 DNA 序列。该表达载体还可以包括一个选择标记，如一个一基因，其产物可弥补宿主细胞的某种缺陷，如编码二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的基因或酿酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) TPI 基因 (由 Russell PR, *Gene* 1985, 40, 125-130 公开)，或能对某种药物，如氨基青霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素、新霉素、潮霉素或氨基喋呤

产生抗性的基因。对于丝状真菌来说，选择标记包括 **amd S**、**pyrG**、**ArgB**、**niaD** 和 **sC**。

为了引导木聚糖分解酶进入宿主细胞的分泌通道，可以在表达载体上设置一个分泌信号序列（又被称作前导序列、前原序列或前序列）。所述分泌信号序列以正确读框与编码木聚糖分解酶的 DNA 序列连接。分泌信号序列通常位于编码木聚糖分解酶的 DNA 序列的 5' 末端。所述分泌信号序列可以是与木聚糖分解酶正常结合的，或是源于一种编码另一种分泌蛋白的基因。

在一种优选实施方案中，本发明的表达载体可以包括一个分泌信号序列，其与地衣型芽胞杆菌  $\alpha$  - 淀粉酶基因的分泌信号编码序列大致相同，如在 WO 86/05812 中所披露的。

另外，扩增表达的方法可以用诸如串联扩增技术之类的方式进行，该技术涉及单交换或双交换，或通过多拷贝技术进行，如在 US4, 959, 316 或 91/09129 中披露的技术。另外，所以表达载体可以包括一个对温度敏感的复制起点，如在 EP283, 075 中所披露的。

用于分别连接编码木聚糖分解酶的 DNA 序列、启动子和选择性地连接终止序列和/或分泌信号序列的方法，以及将其插入含有复制所需信息的合适载体上的方法为本领域技术人员所熟知（例如，参见 Sambrook 等，*molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, 1989）。

#### 宿主细胞

在本发明的又一方面，提供了一种含有本发明 DNA 结构和/或本发明重组表达载体的宿主细胞。

本发明的 DNA 结构可以与相关的宿主同源或异源。如果与宿主细胞同源，即由宿主细胞天然产生，它一般会与另一个启动子序列可操作地连接，或者，如果可能，与另一个分泌信号序列和/或终止序列在其非自然的环境中连接。在本文中，“同源”一词意在包括有关宿主生物所固有的编码木聚糖分解酶的 cDNA 序列。“异源”意在包括一种不是由宿主细胞天然表达的 DNA 序列。因此，所述 DNA 序列可来自其它生物或是一种合成序列。

本发明的 DNA 结构或重组表达载体有待导入其中的本发明的宿主细胞可以是任何能够产生木聚糖分解酶的细胞，包括细菌、酵母、真菌和高等真核细胞。

在培养时能产生本发明木聚糖分解酶的细菌宿主细胞的例子包括革兰氏阳性细菌，如芽胞杆菌属菌株，特别是枯草杆菌、地衣型芽胞杆菌、迟缓芽胞杆菌 (*Bacillus lentus*)、短芽胞杆菌(*Bacillus brevis*)、嗜热脂肪芽胞杆菌、嗜碱芽胞杆菌(*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽胞杆菌、凝结芽胞杆菌(*Bacillus coagulans*)、环状芽胞杆菌(*Bacillus circulans*)、*Bacillus lautus*、巨大芽胞杆菌(*Bacillus megatherium*)、短小芽胞杆菌、苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)或 *Bacillus agaradherens* 菌株，或链霉菌属菌株，特别是变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)或鼠灰链霉菌(*Streptomyces murinus*)菌株，或革兰氏阴性细菌，如大肠杆菌。细菌的转化可以通过原生质体转化或用感受态细胞以本身已知的方式进行(参见 Sambrook 等, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)。

当在诸如大肠杆菌之类的细菌中表达所述木聚糖分解酶时，该木聚糖酶可能存留在该细胞质中，通常为不溶性颗粒(被称为包含体)，或者被一种细菌分泌序列引导至外周质间隙。在前一种情况下，将细胞裂解，回收颗粒并变性，此后，通过稀释变性剂对木聚糖分解酶进行重折叠。在后一种情况下，可以通过裂解细胞从外周质间隙中回收木聚糖分解酶，例如，通过超声或渗透休克以释放出外周质间隙的内含物，并回收木聚糖分解酶。

合适的酵母细胞的例子包括酵母菌细胞，特别是酿酒酵母菌株、克鲁维酵母(*Saccharomyces kluyveri*)菌株、和葡萄汁酵母菌株，裂殖酵母菌细胞，如粟酒裂殖酵母菌，克鲁维酵母菌属细胞，如乳酸克鲁维酵母(*Kluveromyces lactis*)，汉逊酵母菌属细胞，如多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)，毕赤酵母细胞，如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (参见 Gleesen 等, *J. Gen. Microbiol.* 132, 1986, pp. 3459-3465; US4,992,279)和 *Yarrowia* 菌细胞，如 *Yarrowia lipolytica* 细胞。用异源 DNA 转化酵母细胞的方法，以及由转化的细胞生产异源多肽的方法披露

于诸如 US4, 599, 311、US4, 931, 373、US4, 870, 008、US5, 037, 743 和 US 4, 845, 075 的文献中, 以上文献均被收作本文的背景资料。转化的细胞是根据由一种选择标记决定的表型进行选择, 选择标记通常为药物抗性或在缺乏某种特殊营分, 如亮氨酸的条件下生长的能力。用于酵母中的一种优选载体是披露于 US4, 931, 373 中的 POT1 载体。编码本发明木聚糖分解酶的 DNA 序列可以一个信号序列为前导, 并选择性地有一个前导序列, 如上文所述。

其它真菌细胞的例子有丝状真菌细胞, 如曲霉菌, 特别是日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*) 菌株、米曲霉菌株、构巢曲霉菌株或黑曲霉菌株, 链孢霉菌, 镰孢菌, 特别是尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 或禾本科镰孢 (*Fusarium graminearum*), 或木霉菌。真菌细胞可用如下方法转化, 该方法包括原生质体生成和原生质体转化, 接着是细胞壁再生, 该方法本身是已知的。将曲霉菌用于表达蛋白的方法披露于诸如 EP272, 277 和 EP230, 023 之类的文献中。例如, 尖镰孢的转化可以按照 Malardier 等披露的方法 (Gene, 1989, 78, 147-156) 进行。在 EP238023 中披露了将曲霉属用作宿主微生物的构思, 该专利的内容被收作本文的背景资料。

在一种优选实施方案中, 宿主细胞是米曲霉菌株。

生产单组分制剂的方法

再一方面, 本发明提供了一种生产本发明木聚糖分解酶的方法, 其中, 用编码木聚糖分解酶的 DNA 序列转化过的一种合适的宿主细胞在能够产生所述酶的条件下培养, 并从培养物中回收所得到的酶。

又一方面, 本发明涉及一种生产一种单组分木聚糖酶制剂的方法, 其中, 用编码所述酶的 DNA 序列转化过的一种合适的宿主细胞在能够产生所述木聚糖酶组分的条件下培养, 并从培养物中回收该木聚糖酶组分。

在一种优选实施方案中, 编码所述酶的 DNA 序列是一种按上述方法获得的 DNA 结构。

在另一种优选实施方案中, 所述 DNA 结构与一个合适的表达信号在上述表达载体里结合。

在另一种优选实施方案中, 宿主细胞是上述细胞中的一种。

用于培养转化的宿主细胞的培养基可以是适合于所述宿主细胞生长的任何常规培养基。所表达的木聚糖分解酶可以方便地分泌到培养基中，并可通过纯化方法从培养基中回收。众所周知的纯化方法包括：通过离心或过滤从培养基中分离细胞，用诸如硫酸铵之类的盐沉淀培养基里的蛋白类组分，以及诸如离子交换层析、亲和层析之类的层析方法。

#### 实施例

将结合以下实施例对本发明作进一步说明，这些实施例与权利要求不同，其意图不在于限定本发明的范围。

#### 材料和方法

##### 供体生物

从疏松状高温霉 DSM 4109 中分离 mRNA，所述微生物生长于含有木聚糖的发酵培养基中，在培养期间进行振动，以保证通气充分。生长 3 - 5 天后收获菌丝体，迅速冰冻于液氮中并储存在 - 80 °C 下。

##### 酵母菌株

下面用到的酿酒酵母菌株为 JG169 (MAT $\alpha$ ; ura 3-52; Leu2-3, 112; his 3-D200; pep 4-113; prc 1: HIS3; prb 1:: LEU 2; cir+).

##### 质粒

将市售酵母质粒 pYES 2.0(invitrogen)用于表达。

曲霉属表达载体 pHD 414 是质粒 p775 的衍生物，披露于 EP238023 中。在 WO 93/11249 中对 pHD 414 有进一步描述。

##### 提取全 RNA

全 RNA 的提取是用硫氰酸胍进行的，随后超速离心通过 5.7M CsCl 垫层，并通过 oligo (dT) - 纤维素亲和层析分离 poly (A)<sup>+</sup> RNA，所用方法披露于 WO 93/11249 中。

##### cDNA 合成与修饰

通过 RNase H 方法(Gubler U, Hoffman BJ, Gene 1983, 25, 263-269; Sambrook 等, Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, 1989)利用发夹修饰方法由 5 $\mu$ g poly (A)<sup>+</sup> RNA 合成双链 cDNA。该方法进一步披露于 WO 93/11249 中。

在用绿豆核酸酶处理过以后,用 T4 DNA 聚合酶(Invitrogen)将所述 ds cDNA 补成平端,并按照生产商的说明将该 cDNA 连接于非回文型 Bst XI 衔接子(1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Invitrogen)上。

#### cDNA 文库的构建

离心回收衔接后的 ds cDNA,用 70% EtOH 洗涤,并重新悬浮于 25ml H<sub>2</sub>O 中。在进行大规模文库连接之前,在 10  $\mu\text{l}$  连接缓冲液(同上)中进行 4 次试验连接,每次连接用缓冲液中含有 1  $\mu\text{l}$  ds cDNA (反应试管#1-#3), 2 单位 T4 连接酶(Invitrogen)和 50ng (试管#1), 100ng (试管#2) 和 200ng (试管#3 和#4) BstXI 切过的酵母表达载体(或为 pYES 2.0 载体, Invitrogen,或为 yHD13)。

采用合适条件在 40 $\mu\text{l}$  连接缓冲液中进行大规模连接。将 1 $\mu\text{l}$  样品转化到电感受态大肠杆菌 1061 细胞中,对转化细胞进行滴定,并将文库置板于 LB + 氨苄青霉素的培养皿上,菌落形成单位为 5000 - 7000c.f.u./皿。向每个培养皿中加 3ml 培养基。刮取细菌,加入 1ml 甘油,并作为原料库于 -80  $^{\circ}\text{C}$  下保存。其余 2ml 用于 DNA 分离。有关该方法的进一步细节,参见 WO 94/14952。

#### 构建酵母文库

为了保证所有细菌克隆是在酵母中检验的,将酵母转化体数为细菌克隆数的 5 倍定为原始材料库的极限。将自单个库中提取的 1  $\mu\text{l}$  纯化质粒 DNA(140ng/ $\mu\text{l}$ )样品通过电击法(200  $\Omega$ , 1.5KV, 25 $\mu\text{F}$ )转移到 40  $\mu\text{l}$  感受态酿酒酵母 JG169 细胞中在 500ml YPD 中 OD<sub>600</sub> = 1.5, 用冷 DIW 洗 2 次,用冷的 1M 山梨醇洗 1 次,重新悬浮于 0.5ml 1M 山梨醇(Becker D M, Guarante L, Methods Enzymol. 1991, 194, 182-187)中。在加入 1ml 1M 冷山梨醇后,将 80 $\mu\text{l}$  的样品置板于 SC + 葡萄糖 - 尿嘧啶上,使菌落形成单位为 250 - 400c.f.u./皿,并在 30  $^{\circ}\text{C}$  下培养 3 - 5 天。

#### 鉴定阳性菌落

在生长 3 - 5 天以后,将琼脂板复制铺板于 SC - 尿嘧啶板上,其含有 0.2% 天青蛋白交联的桦木聚糖 (AZCL<sup>TM</sup> 桦木聚糖, Megazyme<sup>TM</sup>, Australia), 和 2% 半乳糖,然后在 30  $^{\circ}\text{C}$  下培养 2 - 4 天以检验木聚糖分解活性。培养以后,将周围有蓝色晕圈的菌落确定为

木聚糖分解酶阳性菌落。

将来自酶阳性菌落的细胞展开，以便在琼脂上进行单菌落分离，选择能产生酶的菌落分别进行木聚糖分解酶产生菌落的鉴定。

#### 阳性克隆的鉴定

以单菌落形式获得阳性克隆。从用两个阳性酵母克隆制备的细胞培养物中分离质粒 DNA。将质粒 DNA 导入（转化）大肠杆菌中，分离，并对各 cDNA 克隆的 5'-末端测序进行个别鉴定，测序采用链终止法 (Sanger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1977, 74, 5463-5467) 和 Sequenase<sup>TM</sup> System (United States Biochemical)。

#### 分离用于在曲霉属中表达的 cDNA 基因

将 1 个或多个木聚糖分解酶产生酵母菌落接种到盛于 50ml 玻璃试管的 20ml YNB - 1 培养液中。在 30℃ 下振动该试管 2 天。3000rpm 离心 10 分钟收集细胞。

按 WO 94/14952 所述分离的 DNA 被溶解在 50 $\mu$ l 水中。按 WO 94/14952 中所述方法用 DNA 样品转化大肠杆菌。用标准方法从大肠杆菌中分离质粒 DNA，并用限制酶分析法进行分析。用合适的限制酶切下 cDNA 插入片段，并连接到曲霉属表达载体上。

#### 转化米曲霉或黑曲霉

##### 一般方法

用米曲霉或黑曲霉孢子接种 100ml YPD (Sherman 等, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981)，并在 37℃ 下摇动培养约 2 天。过滤收集菌丝体，并用 200ml 0.6M MgSO<sub>4</sub> 洗涤。将菌丝体悬浮于 15ml 1.2M MgSO<sub>4</sub> 和 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，pH 5.8 的溶液中。在冰上冷却悬浮液，并加入 1ml 含有 120mg Novozym<sup>TM</sup> 234，批号 1687 的缓冲液。5 分钟后加入 1ml 12mg/ml BSA (Sigma, type H25)，并在 37℃ 下培养 1.5-2.5 小时，同时伴以轻微振动，直至在显微镜下检查样品时可见到大量原生质体。

通过 miracloth 过滤悬浮液，将滤液转移到消毒试管中，并在其上堆叠 5ml 0.6M 山梨醇，100mM Tris-HCl, pH 7.0。在 100g 下离心 15 分钟，从 MgSO<sub>4</sub> 垫层上部收集原生质体。将 2 倍体积的 STC(1.2M 山梨



醇、10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM CaCl<sub>2</sub>)加入该原生质体悬浮液中, 在 1000g 下离心该混合物 5 分钟。将原生质体沉淀重新悬浮于 3ml STC 中并进行再沉淀。重复以上过程。最后将原生质体重新悬浮在 0.2-1ml STC 中。

将 100  $\mu$ l 原生质体悬浮液与 5 - 25 $\mu$ g 合适的 DNA 在 10 $\mu$ l STC 中混合。将原生质体与 p3SR2 (一种带有构巢曲霉 amdS 基因的质粒)。该混合物在室温下放置 25 分钟。加入 0.2ml 60% PEG 4000 (BDH29576)、10mM CaCl<sub>2</sub> 和 10mM Tris-Hcl, pH 7.5, 并小心混合(2次), 最后加入 0.85ml 相同的溶液, 并小心混合。将混合物在室温下放置 25 分钟, 2500g 离心 15 分钟, 将沉淀重新悬浮于 2ml 1.2M 山梨醇中。再经过一次沉淀之后, 将原生质体涂布在适当的培养皿上。将原生质体涂布在含有 1.0M 蔗糖, pH 7.0, 10mM 乙酰胺作为氮源和 20mM CsCl 抑制背景生长的极限培养皿(Cove, Biochem. Biophys. Acta 1966, 113, 51-56)上。在 37  $^{\circ}$ C 下培养 4 - 7 天后, 挑取孢子, 并展布成单菌落。重复以上过程, 再次分离单菌落的孢子, 然后作为确定的转化体进行保存。

#### 检验米曲霉转化体

将各种转化体接种到 10ml YPM (见下文)中, 并进行繁殖。在 30  $^{\circ}$ C 下培养 2 - 5 天, 然后除去上清液。将 10 $\mu$ l 上清液加至在含有 0.2% AZCL<sup>TM</sup> 桦木聚糖(Megazyme<sup>TM</sup>, Australia)的琼脂皿上打出的直径为 4mm 的孔中, 以鉴定木聚糖分解活性。用蓝色晕圈确定木聚糖分解活性。

#### 杂交条件

可以按下述方法确定寡核苷酸探针与本发明“类似的”DNA 序列杂交的合适条件。用于杂交的合适寡核苷酸探针可以基于序列 1 所示 DNA 序列的木聚糖酶编码部分或其任何亚序列或基于序列 2 所示的推定氨基酸序列进行制备。一种合适探针的例子是相当于序列 1 所示木聚糖编码部分的 DNA 序列, 即序列 1 中 31 位至 705 位的核苷酸。

在 5  $\times$  SSC 中对待杂交的含有 DNA 片段的滤膜进行预浸, 并在 50  $^{\circ}$ C 左右预杂交 1 小时, 预杂交溶液中含有 5  $\times$  SSC、5  $\times$  Denhardt's 溶液, 50mM 磷酸钠, pH 6.8, 和 50 $\mu$ g 变性的超声波处理的小牛胸腺

DNA。在 45 °C 左右，在补充了 50 $\mu$ Ci 32-P-d CTP 标记的探针的相同溶液中杂交 18 小时，在 2 × SSC、0.2% SDS 的溶液中洗涤该制品 3 次、30 分钟、温度优选至少 55 °C，尤其是至少 60 °C、至少 65 °C、至少 70 °C、至少 75 °C，优选至少 80 °C。

在上述条件下能与所述寡核苷酸探针杂交的分子可以用 X 光片进行检测。

#### 免疫交叉反应性

可以用纯化的木聚糖分解酶制备用于测定免疫交叉反应性的抗体。更具体地讲，可以按照 Axelsen 等的方法(A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, 特别是第 23 章)或 Johnson 和 Thorpe 的方法(Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982, 特别是 pp.27-31)通过免疫兔(或其它啮齿类动物)制备抗本发明酶的抗血清。

可以从抗血清中获得纯化的免疫球蛋白，例如，通过盐沉淀((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，接着进行透析和离子交换层析，例如，在 DEAE - Sephadex 上进行层析。可以通过 Ouchterlony 双扩散分析(Ouchterlony O; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir 著), Blackwell Scientific publications, 1967, pp. 655-706; 或 Roitt I; Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, 1984, pp.145-147)、交叉免疫电泳(Axelsen 等, 同上, 第 3、4 章)或火箭免疫电泳(Axelsen 等, 同上, 第 2 章)进行蛋白的免疫化学鉴定。

#### 培养基

YPM 培养基: 10g 酵母提取物, 20g 胨, 加水至 810ml。对 90ml 麦芽糖糊精进行高压灭菌和灭菌过滤, 然后加入上述溶液中。

YPD 培养基: 10g 酵母提取物, 20g 胨, 加水至 810ml。对 90ml 20%葡萄糖进行高压灭菌和灭菌过滤, 然后加入上述溶液中。

10X 基础盐培养基: 66.8g 酵母氮碱, 100g 琥珀酸, 60g NaOH, 加水 1000ml, 灭菌过滤。

SC - URA: 90ml 10 × 基础盐, 22.5ml 20%水解酪蛋白氨基酸, 9ml 1%色氨酸, 加水 806ml, 高压灭菌, 加入 3.6ml 5%苏氨酸和 90ml

20%葡萄糖或 20 % 半乳糖。

SC - H 液: 7.5g/l 无氨基酸的酵母氮碱, 11.3g/l 琥珀酸, 6.8g/l NaOH, 5.6g/l 无维生素的水解酪蛋白氨基酸, 0.1g/l 色氨酸。在 121 °C 下高压灭菌 20 分钟。高压灭菌以后向每 100ml 培养基中加入 10ml 30% 半乳糖溶液, 5ml 30% 葡萄糖溶液和 0.4ml 5% 苏氨酸溶液。

SC - H 琼脂: 7.5g/l 无氨基酸的酵母氮碱, 11.3g/l 琥珀酸, 6.8g/l NaOH, 5.6g/l 无维生素的水解酪蛋白氨基酸, 0.1g/l 色氨酸, 和 20g/l 琼脂(Bacto™)。在 121 °C 下高压灭菌 20 分钟。灭菌以后向每 450ml 琼脂中加入 55ml 22% 半乳糖溶液和 1.8ml 5% 苏氨酸溶液。

YNB - 1 琼脂: 3.3g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16.7g/l 琼脂, 调 pH 至 7。在 121 °C 下高压灭菌 20 分钟。高压灭菌以后向每 450ml 琼脂中加入 25ml 13.6% 的无氨基酸酵母氮碱, 25ml 40% 葡萄糖溶液, 1.5ml 1% L-亮氨酸溶液和 1.5ml 1 % 组氨酸溶液。

YNB - 1 液: 配方同 YNB - 1 琼脂, 只是没有琼脂。

木聚糖分解活性

木聚糖分解活性可以 FXU - 单位表示, 是在 pH 6.0 下以 remazol-木聚糖 (4 - O - 甲基 - D - 葡糖醛 - D - 木聚糖, 用 Remazol Brilliant Blue R, Fluka 染色) 为底物测定的。

将木聚糖酶样品与 remazol-木聚糖底物一起培养。用乙醇沉淀非降解染色底物的背景。上清液中残余蓝色 (在 585nm 进行分光光度法测定) 与木聚糖酶活性成比例, 然后与酶标准进行比较测定木聚糖酶单位, 测定是在标准反应条件下进行, 即: 50.0 °C, pH6.0, 30 分钟反应时间。

一份编号为 AF 293.6/l 的文件对该分析方法有更详细的说明, 可以向 Novo Nordisk A/S, Denmark 索取该文件, 该文件被收作本文的背景资料。

例 1

基因分离

构建一个疏松状高温霉文库, 该文库由在 150 个库中的大约  $1.5 \times 10^6$  个单一克隆组成。从该文库的 20 个单一克隆中分离 DNA, 并进行

cDNA 插入分析。发现插入的频率>90%，平均插入大小约为 1400bp。

将得自上述一些库的 DNA 转化到酵母中，由每个库获得 50 - 100 块含有 200 - 500 个酵母菌落的培养皿。生长 3 - 5 天，然后将所述琼脂板复制置板到几组琼脂板上。然后在 30℃ 下将一组合有 0.1% AZCL™ 木聚糖(Megazyme™, Australia)的板培养 3 - 5 天，以检测木聚糖酶的活性。将由蓝色晕圈环绕的菌落确认为阳性菌落。用含有 0.1% AZCL™ 木聚糖和 1% 琼脂糖的由具有合适 pH 的缓冲液制成的木聚糖叠层凝胶叠层之前将一组板在 30℃ 下培养 3 - 5 天。在 30℃ 下培养 1 - 2 天后即可将由蓝色晕圈环绕的菌落确定为阳性菌落。

将来自酶阳性菌落的细胞涂布在琼脂上进行单菌落分离，选择能产生酶的单菌落进行木聚糖酶产生菌落鉴定。

#### 阳性克隆的鉴定

以单菌落形式获得阳性克隆。用生物素酰化的多接头引物直接由酵母菌落扩增 cDNA 插入片段，用磁珠(Dynabead™ M-280, Dynal)系统进行纯化并用链终止法(Sanger F, Nicklen S & Coulson AR; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1977, 74, 5463-5467)和 Sequenase™ System (United States Biochemical)对各个 cDNA 克隆的 5'-末端测序而分别进行鉴定。

DNA 序列如序列 1 所示，它与序列 2 所示的氨基酸序列相应。

#### 酵母 DNA 的分离

为了避免在待克隆的基因上出现 PCR 失误，用标准方法从酵母质粒中分离 cDNA，例如，用 WO 93/11249 的例 1 中所披露的方法，该文献的内容被收作本文的背景资料。将酵母 DNA 溶于 50μl 水中，使终浓度大约为 100μl/ml。

用标准方法将所述 DNA 转化到大肠杆菌中。从每次转化中分离 2 个大肠杆菌菌落，并用以能裂解 DNA 插入片段的限制酶 Hind III 和 XbaI 进行分析。将来自上述克隆之一的 DNA 再次转化到酵母菌株 JG169 中。

对几个阳性克隆的 DNA 序列进行部分测定。本发明木聚糖酶的 DNA 序列如序列 1 所示，该序列相应于序列 2 所示的氨基酸序列。

#### 例 2

在曲霉属中表达

为了在曲霉属中表达该基因，通过用 Hind III/XbaI 或其它合适的限制酶消化从上述克隆之一中分离 cDNA，在凝胶上进行大小分级和纯化，然后连接到 pHD 414 上，得到质粒 pA2XITI。在大肠杆菌中扩增以后，将质粒转化到米曲霉菌株中，转化按照在上文的材料和方法部分中所披露的一般方法进行。

#### 检验米曲霉转化体

将各转化体接种到 10ml YPM 培养基中。在 30 ℃ 和 250rpm 的转速下培养 3 - 5 天，然后除去上清液。将 10 $\mu$ l 上清液加入在琼脂板上打出的直径为 4mm 的孔中，以测定木聚糖分解活性，在 40 ℃ 下培养过夜，琼脂板中含有 0.2% AZCL™ 木聚糖(Megazyme™, Australia)，用具有合适 pH 的缓冲液配制而成。按上述方法鉴定木聚糖酶活性。某些转化体的晕圈明显大于米曲霉背景，这证实了木聚糖酶在米曲霉中能有效表达。选择 8 个具有最大木聚糖酶活性的转化体，接种并维持在 YPG - 琼脂上。

将所选择的 8 个转化体的每一个从 YPG - 琼脂斜面接种到装有 FG - 4 和 MDU - 2 培养基的 500ml 摇瓶中。发酵 3 - 5 天，充分振动以保证良好的通气性，然后 2000g 离心培养液 10 分钟，并分析上清液。

将体积为 15 $\mu$ l 的每种上清液加入在 0.1% AZCL™ 木聚糖叠层凝胶（在直径 13cm 的培养皿中盛有 25ml）上打出的直径为 4mm 的孔中。根据在培养中蓝色晕圈的形成鉴定木聚糖酶活性。

然后，在一种培养基中对木聚糖酶进行发酵，培养基中含有作为碳源的麦芽糖糊精、作为氮源的尿素和酵母提取物。发酵是这样进行的：将米曲霉宿主细胞的摇瓶培养物接种到含有 3.5% 碳源和 0.5% 氮源的培养基中。在 pH 5.0 和 34 ℃ 下培养 24 小时，然后开始连续补充额外的碳源和氮源。保持碳源为限制因子并确保有过量的氧气。继续培养 4 天，然后通过离心、超滤、澄清过滤和细菌过滤回收所述酶。

### 例 3

#### 纯化实施例

对来自例 2 所述表达重组酶的米曲霉发酵的培养上清液进行离心，并通过 0.2 $\mu$ m 的滤膜过滤，以除去菌丝体。

在配有 3kDa 膜的 Filtron™ Ultracette 或 Amicon™ 超滤装置上对 100ml 过滤的上清液进行超滤，得到 10 倍浓缩液。在同一装置上所进行的连续两轮超滤中用 20mM TRIS, pH 8.0 将浓缩物稀释 100 倍。以 2ml/分的速度将上述超滤样品加注到一个 Pharmacia XK 26/20 Fast Flow Q Sepharose™ 阴离子交换柱上，该交换柱在 20mM TRIS, pH 8.0 中平衡。

上样以后，用 2 倍柱体积的 25mM TRIS, pH 8.0 洗柱，并用 25mM TRIS, pH 8.0 中配制的从 0 到 0.5M NaCl 的线性增加的 NaCl 梯度洗脱结合蛋白。收集各级分，并按上述方法测定所述级分中的木聚糖酶活性。

合并含有木聚糖酶的级分，并超滤浓缩于 10mM 柠檬酸钠，pH4.0 中。以 1.5ml/分的速度将该材料加注到一个 XK 16/20 Fast Flow S Sepharose™ 柱上。用 0 - 0.4M NaCl 的线性梯度洗脱所述酶，并合并含有木聚糖酶的级分，浓缩并用于鉴定和下述其它实验。

#### 例 4

##### 酶鉴定

对按照例 3 方法得到的木聚糖酶进行以下的酶鉴定。

##### SDS - PAGE 电泳

SDS - PAGE (十二烷基硫酸钠/聚丙烯酰胺凝胶电泳) 在一台 Mini-Leak4 电泳装置(Kem-En-Tec., Copenhagen)上进行，该方法为 Laemmli 方法(Laemmli UK; Nature 1970, 227, 680-685; Christgau 等, 1991, J. Biol. Chem. 1991, 266p. 21157-212664)的改进形式。

测得其分子量 ( MW ) 大约为 26kDa。

##### 等电点聚焦

等电点聚焦是在一台 Multiphor™ 电泳装置中，在 Ampholine™ PAG 板上，pH 3.5-9.5 (Pharmacia, Sweden)按照生产商的推荐进行的。电泳以后，按照本领域公知的方法进行考马斯亮蓝染色。

测得等电点 ( PI ) 大约为 4.5。

##### pH 和温度最佳值

根据从 AZCL™ 桦木聚糖(Megazyme, Australia)中释放的蓝色测定酶促活性。

将 0.5ml 0.4% AZCL™ 底物与 0.5ml 合适 pH 的 0.1M 柠檬酸盐/

磷酸盐缓冲液混合，并加入 10 $\mu$ l 适当稀释的酶溶液。在 30  $^{\circ}$ C 下，在 Eppendorph Thermomixer 中培养 15 分钟，然后在 95  $^{\circ}$ C 下加热 20 分钟灭活。酶的培养做 3 个重复。作一个空白对照，其中加过酶但立即灭活。离心以后在 620nm 波长下在微量滴定板上测光吸收，并扣除空白对照的吸收值。

将 0.1M 的不同 pH 的柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液用于测定最佳 pH 值。将 0.1M, pH 5.5 的柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液在不同温度下培养 15 分钟，以便测定最佳温度值。结果如图 1 - 2 所示。

图 1 表示在 30  $^{\circ}$ C 下，在 pH 2.5-9 范围内测得的相对木聚糖分解活性 (%)。从图中可以看出，该酶的最佳 pH 值范围为 4.5-7.5，特别是在 5.0-6.5 的范围内，pH 6 左右。

图 2 表示在 pH 5.5 和 30 - 80  $^{\circ}$ C 的温度范围内测得的相对木聚糖分解活性 (%)。从图中可以看出，温度最佳值在 50 - 70  $^{\circ}$ C 范围内，60  $^{\circ}$ C 左右。

#### 例 5

##### 热稳定性比较

在该实施例中，对按照例 1 - 3 所述方法获得的单组分木聚糖酶制剂的热稳定性和天然疏绵状高温霉的木聚糖酶制剂的热稳定性进行了比较。

天然疏绵状高温霉木聚糖酶按如下方法制备。

将疏绵状高温霉菌株 DSM 4109 在 2001 YPG 培养基中接种 24 小时，该培养基的配方如下(g/l):

酵母提取物, 50 %	10
葡萄糖	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2
FeSO <sub>4</sub>	0.25
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2
Pluronic	0.7
调 pH 至 6.0	

接种以后，将接种物加至 2000l 下列培养基中(g/l)，并再发酵 3 天：

酪蛋白酸钠	10
大豆粉	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	3
木聚糖	3
木糖	500
调 pH 至 7.5	

离心除去细胞，并通过超滤（用 10，000MW 的截断膜）浓缩上清液，通过冷冻干燥将 UF 浓缩物转化成粗制粉状物。

用 pH 6.0 的 100mM 柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液稀释上述制剂，以便在用于进行下述酶促活性分析时该酶的活性在线性分析范围内。稀释的样品等分成 2ml 试样，分别置于 60、65、70 和 75 °C 的水浴中。对照保持在冰水中。培养 60 分钟后将样品取出并放入冰水中。

将获自山毛榉的 remazol-木聚糖作为底物（4 - O - 甲基 - D - 葡萄糖醛 - D - 木聚糖，用 Remazol Brilliant Blue R, Fluka 染色）。用 pH 6.0 的 100mM 柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液溶解上述底物，制成 0.5% (W/V) 的溶液。

为了测定残余酶活性，将 0.9ml 底物加入 4 支试管（2 个主值，2 个空白）中，并在 50 °C 的水浴中预热 5 分钟。t=0 时，将 0.1ml 的酶样品加至所有组成主值的试管中并混合。60 分钟后，加入 5ml 乙醇试剂（150ml 99.9% 的乙醇与 1ml 2NHCl 的混合物）终止培养，接着在 Whirlimixer 上摇 10 秒钟。先向所有组成空白的试管中加入 5ml 乙醇试剂，接着再加入 0.1ml 酶样品，并在 Whirlimixer 上摇 10 秒钟。将所有试管在环境温度下放置约 15 分钟，然后以 4，000rpm 的速度离心 10 分钟。最后，在 585nm 光波长下测光密度，将两次测定的结果加以平均，并扣除空白值。

作为培养温度和培养时间的函数测定的相对残余酶活性，以对照值的百分比形式计算（对照值被定为“100%”）。结果如图 3 所示。

在图中，对比给出了本发明单组分木聚糖酶制剂的残余活性（空白柱）和天然疏松状高温霉菌木聚糖酶制剂的残余活性（影线柱）。给出了



在 pH 6.0 下，在 60、65、70 和 75 °C 温度下分别培养 30 和 60 分钟以后的残余活性。

从图中可以看出，本发明的木聚糖酶组分在 pH 6.0 和 60 °C 下培养 60 分钟以后的残余酶活性高于 96 %，尤其是高于 97 %，大致为 100 %。

本发明的木聚糖酶组分在 pH 6.0 和 65 °C 下培养 60 分钟后的残余酶活性高于 83 %，特别是高于 85 %，尤其是高于 90 %，大致为 100 %。

本发明的木聚糖酶组分在 pH 6.0 和 70 °C 下培养 60 分钟以后的残余酶活性高于 20 %，高于 30 % 较好，高于 40 % 更好，高于 50 % 还要好，约为 63 %。

本发明的木聚糖酶组分在 pH 6.0 和 75 °C 下培养 60 分钟后的残余酶活性高于 9 %，特别是高于 10 %，高于 20 % 更好，高于 30 % 还要好，约为 48 %。

从图中还可以看出，与天然疏松状高温霉木聚糖酶制剂相比，本发明单组分木聚糖酶制剂的热稳定性明显改善。本发明单组分木聚糖酶制剂在热稳定性方面出人预料的改善，除了使其可以作为优良的饲料增强酶之外，还特别适于加入动物饲料添加剂中。当加入动物饲料添加剂中时，该酶的热稳定性在防止微生物感染饲料方面起着重要作用。

## 例 6

### 降低体外粘度

业已证实前肠消化物粘度是影响小麦和大麦基烤鸡饲料可消化性的主要营养制约因素。业已发现消化物粘度降低结果与鸡饲料转化效率之间的密切相关的关系（例如，参见 Graham H, Bedford M 和 Choct M; *Feedstuffs*, 1993, 65(5) 14-15）。

在该实验中，分别检验了用(i)按例 1 - 3 方法获得的重组生产的单组分疏松状高温霉木聚糖酶制剂，(ii)按例 5 方法培养获得的天然疏松状高温霉木聚糖酶制剂和(iii)通过培养 *Humicola insolens* 获得的市售多组分酶制剂(Bio-Feed Plus CT, Novo Nordisk A/S 的一种产品，Denmark)获得的小麦粘度的降低。

在  $t=0$  时，将 12g 细度为 1mm 的磨碎的干小麦(“Statens Husdyrbrugsforsøg”, Foulum, Denmark)与 38ml 萃取缓冲液混合，该缓

冲液为 pH 1.5 的 0.5M HCl-KCl, 保持在 40 ℃ 并伴以持续搅拌。在培养期间, 用锡箔覆盖样品。t=89 分钟时, 用 1M NaOH 调 pH 至 6.0(±0.15)。当 t=90 分钟时, 加入总体积为 40ml 的酶溶液。

对上述(i)-(iii)的酶制剂进行稀释, 使酶的终浓度为 0.16-5.19 FXU/g 小麦。所有的实验都作两次, 即, 未加入任何酶的溶液总是包括在两次实验内。

培养 30 分钟之后, 取样进行粘度测定。采用一台 Brookfield LVDV - III 粘度计, 其装配有一个小型样品接头和型号为 SC4 - 31 的转子, 在 250rpm 时相当于剪切速度为  $85 \text{ S}^{-1}$ 。在每次测定时, 将约 13ml 悬浮液迅速注入所述小型样品接头中, 该接头被置于水套管中, 由恒温水将其加热至 40 ℃。进行 3 次独立的 cP 读数, 每次 15 秒, 采用平均值。

在任何情况下加酶所获得的结果资料都是以相对粘度形式表示, 即相对于在对照样品中测得的粘度, 将其定为“1”。

在图 4 中, 给出了(ii)天然疏绵状高温霉木聚糖酶, 剂量为 0.16、0.32、0.65、1.29 和 2.58 FXU/g 小麦的小麦粘度降低效率(●)和(iii)通过培养 *Humicola insolens* 获得的多组分酶制剂, 剂量为 0.32、0.65、1.29、2.58 和 5.19 FXU/g 小麦的小麦粘度降低效率(×)的对比。以图中可以看出, 与通过培养 *Humicola insolens* 获得的多组分酶制剂(iii)相比, 天然疏绵状高温霉木聚糖酶(ii)能明显降低小麦悬浮液的粘度, 以 FXU 为基础计算。

另外, 在图 5 中, 对(i)重组生产的单组分疏绵状高温霉木聚糖酶(I)和(ii)天然疏绵状高温霉木糖酶(II)之间的小麦粘度降低效率进行了比较。结果是基于两种类似的剂量, 0.65 和 2.58 FXU/g 小麦。从图中可以看出, 对小麦悬浮液粘度的影响十分相似。

纵观该实施例, 可以明显看出, 与现有饲料添加剂相比, 源于疏绵状高温霉的木聚糖酶具有卓越的降低小麦悬浮液粘度的能力, 因此, 具有作为饲料增强酶的巨大潜力。

#### 例 7

疏绵状高温霉木聚糖酶作为饲料增强酶

在该实施例中, 将疏绵状高温霉单组分木聚糖酶制剂加入动物饲料

中并与常规消化性增强酶制剂进行比较。

按例 1 - 3 的方法获得单组分木聚糖酶制剂。参比制剂为现有的饲料添加剂，即一种通过培养 *Humicola insolens* 而获得的多组分酶制剂 (Bio-Feed Plus CT, Novo Nordisk A/S 的一种产品, Denmark)。

用有和没有酶的实验饲料饲养适于烤制的小鸡 3 周。饲料的配方如下列表 1 所示。

将动物分成 5 个大组，并进行 5 种不同的处理。每一大组又分成由 30 只小鸡(每种性别各 15 只)组成的 8 个小组(笼)。分别对每小组(笼)称重。

5 种不同的处理中包括无酶的对照处理和如下的加酶处理：参比制剂为 400 和 800FXU/kg 饲料(Ref)，本发明的单组分木聚糖酶制剂为 200 和 400FXU/kg 饲料(Inv.)。

表 1

饲料配方

成分	%
小麦, 去壳, 烘烤	73.10
鱼粉, 低灰分	12.50
肉骨粉, 低灰尘	4.00
动物脂肪	4.00
蛋氨酸 ( 40 % )	4.00
石灰石	0.45
磷酸二钙	0.60
维生素/微量矿物质预混物	0.75
胆碱盐酸盐	0.26
	0.04
总计	100
ME/公斤饲料, MJ	12.85
蛋白, %	19.77
每 10MJME, g	

蛋白	154
赖氨酸	7.26
苏氨酸	5.17
蛋氨酸 + 胱氨酸	6.31
精氨酸	8.77
钙	7.27
可用磷	3.48
钠	1.53
氯化物	2.21

对初生的小鸡开始进行处理。处理3周以后测定重量增加和饲料的消耗，并计算饲料转化率（FCR），参见下面的表2（其中，给出了3周龄小鸡的重量和饲料的摄入量）。

从表2中可以看出，在接受200FXU/kg饲料的本发明酶制剂(Inv.)的组中FCR降低，其参比对象为对照组和接受400FXU参比制剂(Ref.)的组。不过，使用200FXU的本发明酶制剂后计算出的FCR与使用800FXU参比制剂后计算出的FCR处于同一水平，这表明，与参比制剂相比，本发明的酶制剂在其1/4FXU的剂量水平上有相同的效果。

因此，本发明的酶被认为在改善饲料的可消化性方面比参比制剂的效果好。尽管本发明的制剂是一种单组分制剂，但它与现有饲料添加剂相比具有卓越的提高可消化性的能力，它能产生多种酶组分的作用。

表2

0 - 3周的产量参数

	重量/鸡(g)	摄入饲料/鸡(g)	饲料转化率(g/g)	
对照	612	870	1.42	100
Ref. 400	587	839	1.42	100
800	634	878	1.38	97
Inv. 200	623	861	1.38	97
400	597	820	1.37	96

## 例 8

### 提高鸡饲料中小麦的可代谢能量

该实施例对本发明的两种动物饲料添加剂和现有饲料添加剂对小麦的表现可代谢能 (AME) 值进行了比较。

本发明的两种动物饲料添加剂为 (A) 按照例 1 - 3 中所述的重组 DNA 技术所获得的疏松状高温霉单组分木聚糖酶制剂, 和 (B) 通过例 5 方法获得的天然疏松状高温霉木聚糖酶制剂。现有的饲料添加剂为通过培养 *Humicola insolens* 获得的一种多组分酶制剂 (C) (Bio-Feed Plus CT, Novo Nordisk A/S 的一种产品, Denmark)。

使用从市售孵化器中输出的初生雄性 Ross 烤鸡。第 1 - 16 天用一种市售幼雏饲料饲养。在第 16 天时单独称重。将体重太大或太小的小鸡剔除, 并将其余的安置到成组的笼中。第 16 - 23 天在笼中饲养。

从第 24 - 28 天进行平衡试验, 试验按照体内测定可代谢能 AME 的 European Reference Method 进行 (Bourdillon 等, Br. Pouly. Sci. 1990, 31, 557-565)。该试验包括 9 种处理的 5 个重复, 每个重复 4 只烤鸡。

基础饲料中含有 56% 高粱、32.5% 大豆粉、6% 动物脂肪、1% 大豆油和 5% 矿物质、维生素、微量元素和氨基酸。在实验饲料中, 1/2 基础饲料被小麦所取代。用醪液含量为 90% 的饲料饲养这些鸡, 让鸡任意摄食。

每日定量收集排泄物。分析饲料样品和冻干的排泄物中的脂肪、总能量 (GE) 和氮。由其相应的排泄物/饲料比及其相应的 GE 含量计算饲料的 AME 含量。用保留的 34.36kJ/gN 的能量当量将 N - 保留量校正为 0 (AMEn)。从饲料和冻干的排泄物中提取脂肪测定脂肪的可消化性, 考虑了排泄物/饲料比。

通过对用 LSD - 多范围试验确认为显著差异的方差进行单因子分析, 分析所述结果, 采用 Statgraphics 5 版。结果示于下面的表 3 和图 6 - 7 中。

图 6 表示作为木聚糖酶加入量 (FXU/kg 饲料) 函数的小麦 AMEn 值 (MJ/kg): (A) 疏松状高温霉单组分木聚糖酶制剂; (B) 天然

疏绵状高温霉菌聚糖酶制剂；(C)参比物(Bio-Feed Plus CT, Novo Nordisk A/S的一种产品, Denmark;一种通过培养 *Humicola insolens* 获得的多组分酶制剂)。

图7表示实验饲料中的脂肪消化率(%),其作为木聚糖酶添加量(FXU/kg饲料)的函数;(A)疏绵状高温霉菌单组分木聚糖酶制剂;(B)天然疏绵状高温霉菌聚糖酶制剂;(C)参比物(Bio-Feed Plus CT, Novo Nordisk A/S的一种制品, Denmark;一种通过培养 *Humicola insolens* 获得的多组分酶制剂)。

用200FXU/kg饲料的(A)或(B)补充基础饲料,会导致AMEn平均值以及脂肪消化率的较小的增加和无明显增加(见表3)。结果,在计算小麦的AMEn值时,无须对木聚糖酶对基础成分的活性进行校正。

在实验饲料中,(A)和(B)的剂量为100和200FXU/kg饲料,而(C)的剂量为400FXU/kg饲料。

从表3中可以看出,与仅用实验饲料相比,两种剂量的本发明动物饲料添加剂都能明显提高AMEn。加入本发明的酶后,可将小麦的AMEn值提高4.9-8.6%。参比添加剂(C)能将小麦的AMEn提高4.9%。

通过比较本发明的动物饲料添加剂和现有添加剂可以清楚地看出,以FXU基重为剂量计,本发明动物饲料添加剂的表现明显优于参比添加剂的。200FXU/kg(B)明显好于400FXU/kg(C)。

实验饲料的脂肪消化率与AMEn值的变化形式类似。

表 3

处理	饲料					小麦	
	脂肪消化率(%)	AME(MJ/kg)	N-保留量(kJ/kg)	AMEn(MJ/kg)	AMEn(MJ/kg)	AMEn(MJ/kg)	差值(%)
基础饲料(D)	73.6ab	13.14±0.47a	607±6a	12.53±0.05ab	-	-	-
D+(A) 200 FXU/kg	73.1ab	13.19±0.13a	604±7a	12.59±0.12a	-	-	+0.66
D+(B) 200 FXU/kg	72.7abc	13.15±0.13a	620±20a	12.53±0.12ab	-	-	+
50%D+50%小麦(DW)	69.1ef	12.32±0.15d	427±9ef	11.89±0.15e	11.25	11.25	-
DW+(C) 400 FXU/kg	72.4bcd	12.62±0.25c	455±20bcd	12.16±0.24d	11.80	11.80	+4.85
DW+(A) 100 FXU/kg	72.1bcd	12.60±0.07c	441±18cde	12.16±0.06d	11.80	11.80	+4.89
DW+(A) 200 FXU/kg	73.5ab	12.75±0.17bc	463±12b	12.29±0.17cd	12.05	12.05	+7.11
DW+(B) 100 FXU/kg	72.6abc	12.64±0.10bc	437±14de	12.21±0.09cd	11.89	11.89	+5.65
DW+(B) 200 FXU/kg	74.3a	12.84±0.12b	460±14bc	12.38±0.11bc	12.22	12.22	+8.64

## 序列表

### 序列 1 资料:

#### (i) 序列特征:

(A) 长度: 983bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

#### (ii) 分子类型: cDNA

#### (vi) 起源:

(A) 生物: 疏绵状高温霉

(B) 菌株: DSM4109

#### (ix) 特征:

(A) 名称/关键词: CDS

(B) 位置: 31..705

#### (xi) 序列描述: 序列 1:

TCGGCCCGAC GTCTTGCAAT CCTTGCAAGTG ATG GTC GGC TTT ACC CCC GTT GCC	54
Met Val Gly Phe Thr Pro Val Ala	
1 5	
CTT GCG GCC TTA GCC GCG ACT GGG GCC CTG GCC TTC CCG GCA GGG AAT	102
Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Leu Ala Phe Pro Ala Gly Asn	
10 15 20	
GCC ACG GAG CTC GAA AAG CGA CAG ACA ACC CCC AAC TCG GAG GGC TGG	150
Ala Thr Glu Leu Glu Lys Arg Gln Thr Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp	
25 30 35 40	
CAC GAT GGT TAT TAC TAT TCC TGG TGG AGT GAC GGT GGA GCG CAG GCC	198
His Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ser Trp Trp Ser Asp Gly Gly Ala Gln Ala	
45 50 55	
ACG TAC ACC AAC CTG GAA GGC GGC ACC TAC GAG ATC AGC TGG GGA GAT	246
Thr Tyr Thr Asn Leu Glu Gly Gly Thr Tyr Glu Ile Ser Trp Gly Asp	
60 65 70	
GGC GGT AAC CTC GTC GGT GGA AAG GGC TGG AAC CCC GGC CTG AAC GCA	294
Gly Gly Asn Leu Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Leu Asn Ala	
75 80 85	



AGA GCC ATC CAC TTT GAG GGT GTT TAC CAG CCA AAC GGC AAC AGC TAC	342
Arg Ala Ile His Phe Glu Gly Val Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr	
90 95 100	
CTT GCG GTC TAC GGT TGG ACC CGC AAC CCG CTG GTC GAG TAT TAC ATC	390
Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile	
105 110 115 120	
GTC GAG AAC TTT GGC ACC TAT GAT CCT TCC TCC GGT GCT ACC GAT CTA	438
Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asp Pro Ser Ser Gly Ala Thr Asp Leu	
125 130 135	
GGA ACT GTC GAG TGC GAC GGT AGC ATC TAT CGA CTC GGC AAG ACC ACT	486
Gly Thr Val Glu Cys Asp Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Gly Lys Thr Thr	
140 145 150	
CGC GTC AAC GCA CCT AGC ATC GAC GGC ACC CAA ACC TTC GAC CAA TAC	534
Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Thr Gln Thr Phe Asp Gln Tyr	
155 160 165	
TGG TCG GTC CGC CAG GAC AAG CGC ACC AGC GGT ACC GTC CAG ACG GGC	582
Trp Ser Val Arg Gln Asp Lys Arg Thr Ser Gly Thr Val Gln Thr Gly	
170 175 180	
TGC CAC TTC GAC GCC TGG GCT CGC GCT GGT TTG AAT GTC AAC GGT GAC	630
Cys His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Ala Gly Leu Asn Val Asn Gly Asp	
185 190 195 200	
CAC TAC TAC CAG ATC GTT GCA ACG GAG GGC TAC TTC AGC AGC GGC TAT	678
His Tyr Tyr Gln Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Tyr	
205 210 215	
GCT CGC ATC ACC GTT GCT GAC GTG GGC TAAGACGTAA CCTGGTGGTG	725
Ala Arg Ile Thr Val Ala Asp Val Gly	
220 225	
ATCTCGCGAG GCAACAGCCA AGAATGTCGT CAGATGTGCC GGTTGAAGGT ATTCAATCAG	785
CATATCTGTC TGCCCTTGCG AGTGATACTT TGGAGGACTG TGGAGAACTT TGTGCGAGCC	845
TGGCCAGGAT CAGTAGTTGC TTTGCGGTGT TTTGCTCCCT ATTCTCGTGA AAAAATTGTT	905
ATTGCTTCGT TGTCTAGTGT ACATAGCCGA GCAATTGAGG CCTCACGCTT GGGAAAAAAA	965
AAAAAAAAA AAAAAAAA	983

## 序列 2 资料:

### (i) 序列特征

(A) 长度: 225 个氨基酸

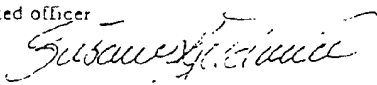
(B) 类型: 氨基酸

**(D) 拓扑结构; 线性****(ii) 分子类型: 蛋白质****(xi) 序列描述: 序列 2:**

Met Val Gly Phe Thr Pro Val Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Ala Phe Pro Ala Gly Asn Ala Thr Glu Leu Glu Lys Arg Gln  
 20 25 30  
 Thr Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp His Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ser Trp  
 35 40 45  
 Trp Ser Asp Gly Gly Ala Gln Ala Thr Tyr Thr Asn Leu Glu Gly Gly  
 50 55 60  
 Thr Tyr Glu Ile Ser Trp Gly Asp Gly Gly Asn Leu Val Gly Gly Lys  
 65 70 75 80  
 Gly Trp Asn Pro Gly Leu Asn Ala Arg Ala Ile His Phe Glu Gly Val  
 85 90 95  
 Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg  
 100 105 110  
 Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asp  
 115 120 125  
 Pro Ser Ser Gly Ala Thr Asp Leu Gly Thr Val Glu Cys Asp Gly Ser  
 130 135 140  
 Ile Tyr Arg Leu Gly Lys Thr Thr Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Gln Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Asp Lys Arg  
 165 170 175  
 Thr Ser Gly Thr Val Gln Thr Gly Cys His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 180 185 190  
 Ala Gly Leu Asn Val Asn Gly Asp His Tyr Tyr Gln Ile Val Ala Thr  
 195 200 205  
 Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Tyr Ala Arg Ile Thr Val Ala Asp Val  
 210 215 220  
 Gly  
 225

## INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>13</u> , lines <u>19-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT <span style="float: right;">Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/></span>	
Name of depositary institution DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELL- KULTUREN GmbH	
Address of depositary institution (including postal code and country)  Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Federal Re- public of Germany	
Date of deposit 19 July 1995	Accession Number DSM 10133
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) <span style="float: right;">This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/></span>	
In respect of those designations in which a European and/or Australian patent is sought, during the pendency of the patent application a sample of the deposited microorganism is only to be provided to an independent expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC / Regulation 3.25 of Australia Statutory Rules 1991 No 71).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer 	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1992)

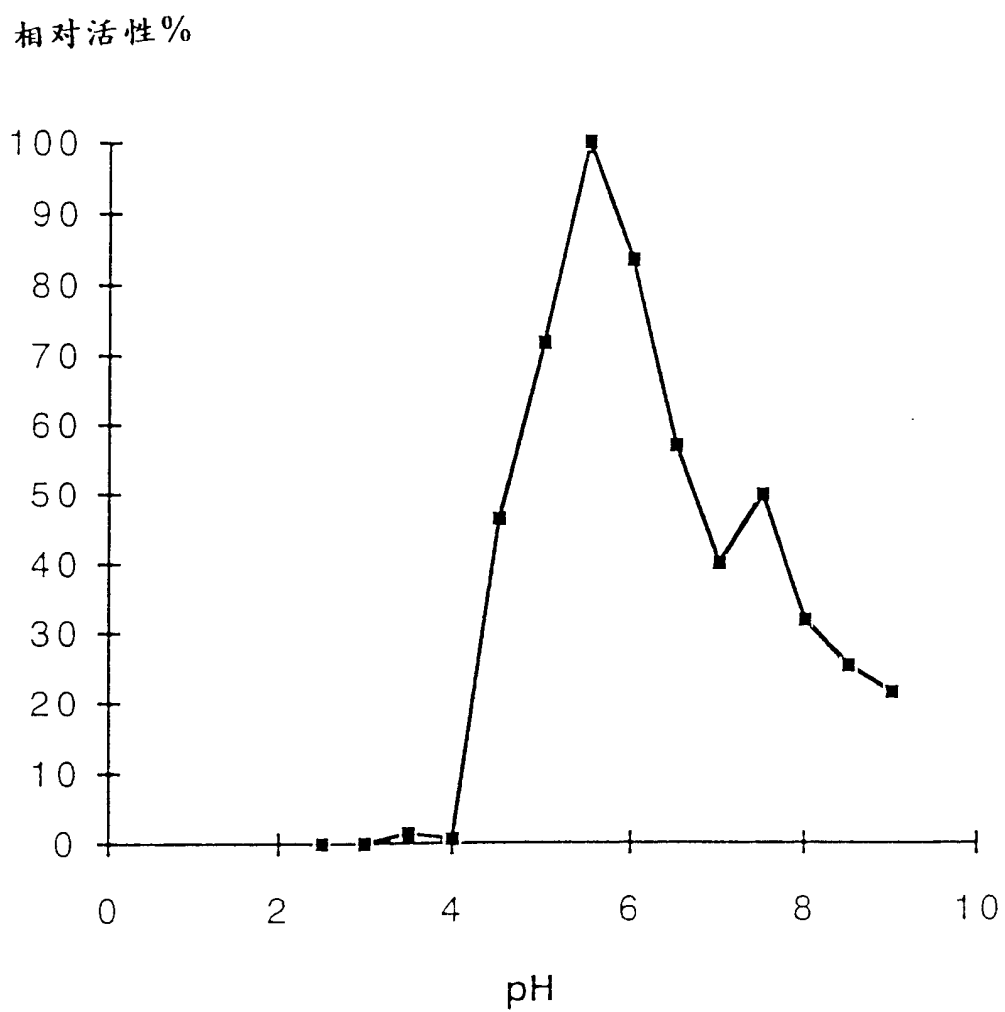


图 1

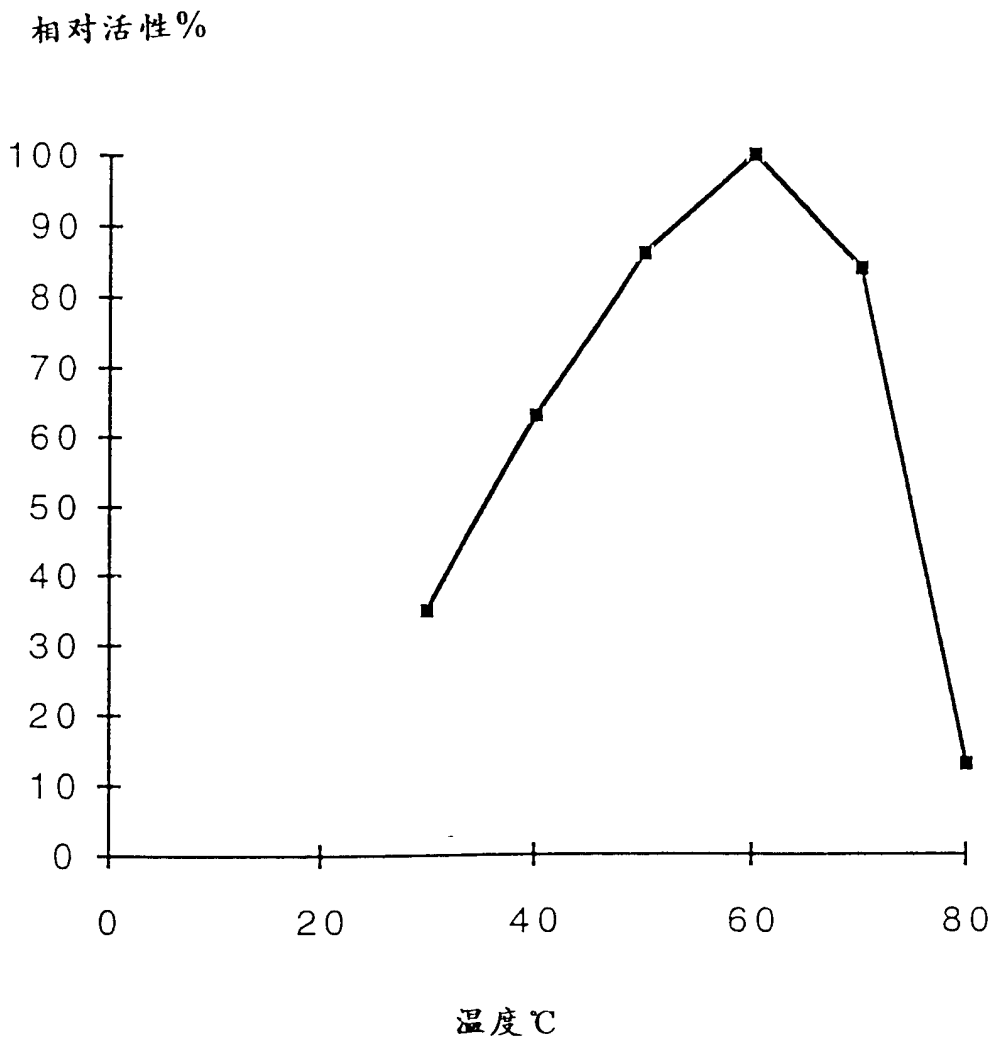
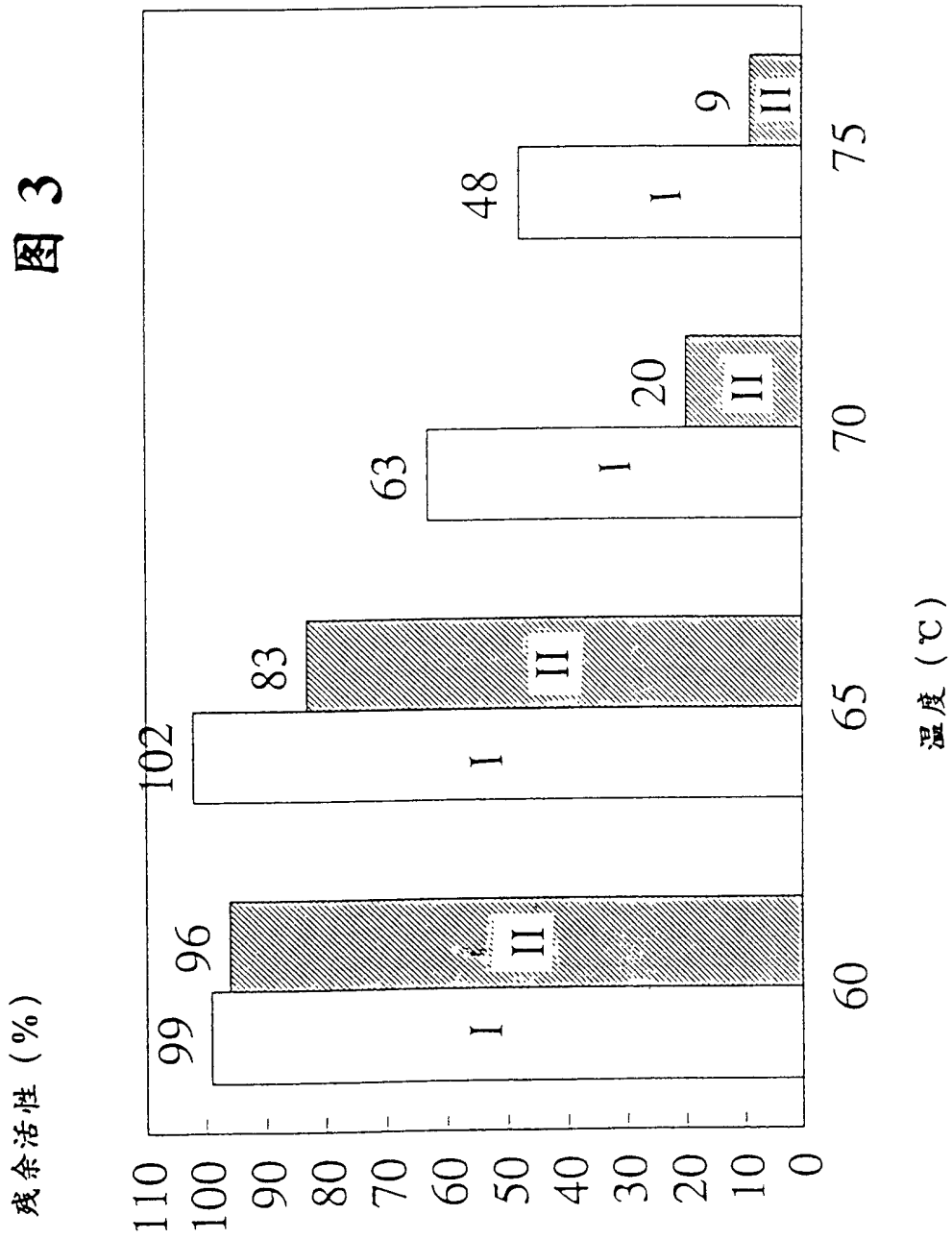


图 2

图 3



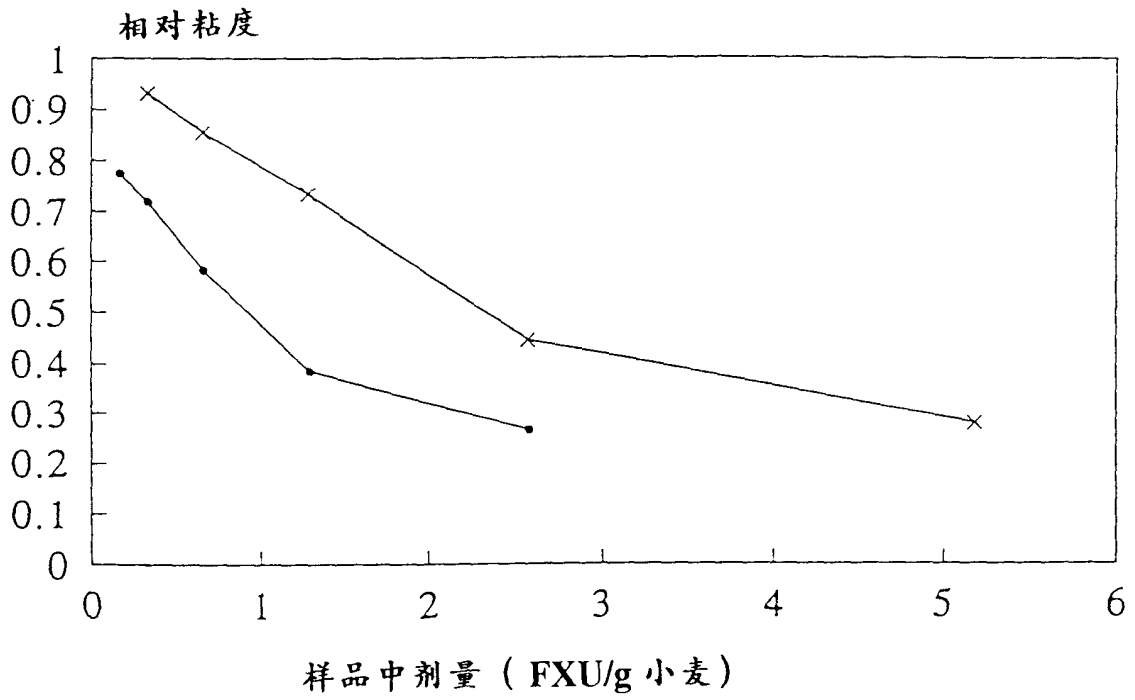


图 4

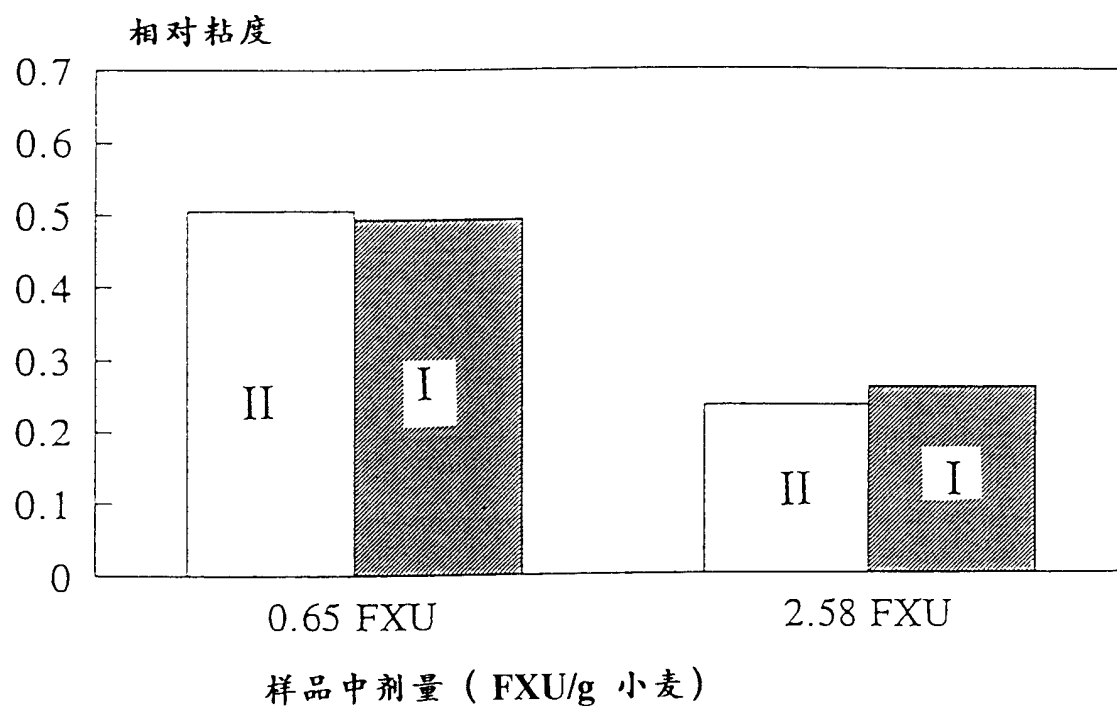


图 5



图 6

