



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 94192698.2

[43] 授权公告日 2003 年 4 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1105184C

[22] 申请日 1994.7.5 [21] 申请号 94192698.2

[30] 优先权

[32] 1993.7.6 [33] DK [31] 0811/1993

[86] 国际申请 PCT/DK94/00274 1994.7.5

[87] 国际公布 WO95/02044 英 1995.1.19

[85] 进入国家阶段日期 1996.1.8

[71] 专利权人 诺沃奇梅兹有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 H·达伯格 S·克里斯高

L·N·安德森 L·V·考福德

M·S·高品恩 J·B·尼尔森

C·达姆曼

[56] 参考文献

US3492204A 1970.01.27 C12K1/10

US3509024A 1970.04.28 C07G7/02

审查员 王朋飞

[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 李 瑛

权利要求书 3 页 说明书 49 页 附图 8 页

[54] 发明名称 一种具有蛋白酶活性的酶

[57] 摘要

一种 DNA 构建体包含编码表现出蛋白酶活性的酶的 DNA 序列之 DNA 构建体, 其中的 DNA 序列包含 SEQ ID NO.1 或 2 所示的 DNA 序列或与 SEQ ID NO.1 或 2 所示 DNA 序列具有至少 80% 同源性的这些序列的任一类似物。由该 DNA 序列编码的蛋白酶具有酸性的最适 pH 值。

1. 一种 DNA 构建体, 包含编码表现出蛋白酶活性的酶的 DNA 序列, 该 DNA 序列包含 SEQ ID NO. 1 所示 DNA 序列或具有与 SEQ ID No. 1 所示 DNA 序列存在至少 80% 同源性的类似序列。

2. 根据权利要求 1 的 DNA 构建体, 其中所述类似序列与 SEQ ID NO: 1 所示 DNA 序列存在至少 90 % 同源性。

3. 根据权利要求 1 的 DNA 构建体, 其中所述类似序列与 SEQ ID NO: 1 所示 DNA 序列存在至少 95 % 同源性。

4. 根据权利要求 1 的 DNA 构建体, 其中编码表现出蛋白水解活性的酶的 DNA 序列可从微生物中获得。

5. 根据权利要求 4 的 DNA 构建体, 其中的 DNA 序列可从丝状真菌或酵母中获得。

6. 根据权利要求 5 的 DNA 构建体, 其中的 DNA 序列可从曲霉属 (*Aspergillus*)、根霉属 (*Rhizopus*)、木霉属 (*Trichoderma*), 青霉属 (*Penicillium*), 镰孢属 (*Fusarium*), *Schytalidium* 或腐质霉属 (*Humicola*) 的菌株中获得。

7. 根据权利要求 6 的 DNA 构建体, 其中的 DNA 序列可从曲霉属菌株中获得。

8. 根据权利要求 7 的 DNA 构建体, 其中的 DNA 序列可从棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 或米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 菌株中获得。

9. 根据权利要求 8 的 DNA 构建体, 其中的 DNA 序列以棘孢曲霉 CBS 101.43 DNA 文库为基础分离或产生。

10. 一种重组表达载体, 包含根据权利要求1—9任一项的DNA构建体。

11. 一种细胞, 包含根据权利要求1—9任一项的DNA构建体或根据权利要求10的重组表达载体。

12. 根据权利要求11的细胞, 它是一种真核细胞。

13. 根据权利要求12的细胞, 它是真菌细胞。

14. 根据权利要求13的细胞, 它是酵母细胞或丝状真菌细胞。

15. 根据权利要求14的细胞, 其中的细胞属于曲霉属菌株。

16. 根据权利要求15的细胞, 其中的细胞属于黑曲霉或米曲霉菌株。

17. 一种生产表现出蛋白水解活性的酶的方法, 该方法包含在能使酶产生的条件下培养根据权利要求11—16任一项的细胞, 并从培养物中回收该酶。

18. 一种表现蛋白水解活性的酶, 该酶由根据权利要求1—9任一项的DNA构建体编码或由根据权利要求17的方法生产。

19. 根据权利要求18的酶, 它与抗棘孢曲霉 CBS 101.43 中得到的, 由 SEQ ID NO.1 所示 DNA 序列编码的纯化蛋白酶的抗体可发生免疫反应。

20. 根据权利要求18或19的酶, 它可以从微生物中获得。

21. 根据权利要求20的酶, 它可从细菌或真菌中获得。

22. 根据权利要求21的酶, 它可从曲霉属, 根霉属、木霉属、青霉属、镰孢属、Schytalidium 或腐质霉属的菌株中获得。

23. 根据权利要求22的酶, 它可从棘孢曲霉菌株中获得。

24. 可用于降解植物细胞壁成份的酶制品, 所说的制品富含根

据权利要求 18-23 任一项的表现出蛋白酶活性的酶。

25. 根据权利要求 24 的制品，它还包含一种或多种其它植物细胞壁降解酶。

26. 根据权利要求 25 的酶制品，其中所述其它植物细胞壁降解酶选自下述中的一种或多种：果胶裂解酶，果胶酸盐裂解酶，葡聚糖内部裂解酶，阿拉伯聚糖酶，木聚糖酶、葡聚糖酶、半乳聚糖酶，甘露聚糖酶， α -半乳糖苷酸，鼠李半乳糖醛酸酶，果胶乙酰酯酶，多聚半乳糖醛酸酶，蛋白酶，肽链端解酶或果胶甲酯酶。

27. 根据权利要求 18-23 任一项的酶或根据权利要求 24-26 任一项的酶制品在含蛋白质物质的降解或修饰中的应用。

28. 根据权利要求 18-23 中任一项的酶或根据权利要求 24-26 任一项的酶制品在隐形眼镜清洁中的应用。

29. 根据权利要求 28 的应用，其在 H_2O_2 存在的条件下进行。

30. 根据权利要求 29 的应用，其在 3% H_2O_2 存在的条件下进行。

31. 根据权利要求 29 或 30 的应用，其中与过氧化氢酶组合以中和 H_2O_2 。

32. 根据权利要求 18-23 任一项的酶或根据权利要求 24-26 任一项的酶制品在烘烤产品制备中的应用。

33. 根据权利要求 18-23 任一项的酶或根据权利要求 24-26 任一项的酶制品在动物饲料制备中的应用。

一种具有蛋白酶活性的酶

本发明是关于一种 DNA 构建体—它编码一种具有蛋白酶活性的酶、一种生产此酶的方法、一种具有蛋白酶活性的酶以及一种含有此酶的酶制品。

蛋白酶是能够分解肽键的酶。发现酸性蛋白酶(即具有酸性最适 pH 的蛋白酶)由包括哺乳动物和微生物的许多不同生物体产生。例如,发现微生物酸性蛋白酶由细菌菌株,如芽孢杆菌属之种(*Bacillus* sp.)菌株(JP 01240184),真菌菌株,如根霉属之种(*Rhizopus* sp.) (EP 72978)、*Schytalidium* SP. (JP 48091273)、*Sulpholobus* sp.和 *Thermoplasma* sp. (WO/90 10072)以及曲霉属之种(*Aspergillus* sp.) (JP 50121486、EP 82 395)产生。

JP 305879 公开了一种编码来自雪白根霉(*R. niveus*)的一种酸性蛋白酶的基因克隆及其重组表达。来自 *Cryphonectira parasitica* 编码一种天冬氨酸蛋白酶的一种基因的克隆和表达被 Choi 等(1993)、Takahashi 等(1991)、Inoue 等(1991)描述过。而 JP 407 5586 公开了来自黑曲霉(*Aspergillus niger*)的编码一种酸性蛋白酶(蛋白酶 A)的基因克隆。

Berka 等(1990)公开了编码来自泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)的天冬氨酸蛋白酶曲霉菌素胃蛋白酶 A 的基因。编码来自米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的天冬氨酸蛋白酶曲霉菌素胃蛋白酶 O 的基因克隆被 Berka 等(1993)描述过。编码来自米曲霉的酸性蛋白酶(PEPA)的基因克隆

被 Gomi 等 (1993) 公开了。酸性蛋白酶在工业上被广泛地应用, 例如用于制备食品和饲料、制革工业 (如给皮革除毛)、蛋白水解物生产、以及酿酒工业。

在许多不同的应用上, 尤其在食品和饲料工业中, 需要单一成份的酸性蛋白酶。

本发明的目的是制备单一成份的蛋白酶。

因此, 首先本发明是有关于编码具有蛋白酶活性的酶的 DNA 序列的 DNA 构建体, 这段 DNA 序列含有显示于 SEQ ID No. 1 中的 DNA 序列或者含有与此序列 (SEQ ID No. .1) 至少有 80% 同源性的类似序列。

其次, 本发明是关于含有编码具有蛋白酶活性的酶的 DNA 序列的 DNA 构建体、这段 DNA 序列含有 SEQ ID No. .2 中的 DNA 序列或者含有与此序列 (SEQ ID No. .2) 至少 80% 同源性的类似序列。

SEQ ID No. 1 中的 DNA 序列编码一种酶, 此酶在以下叙述公开中被称为蛋白酶 I。而被 SEQ ID No. 2 中的 DNA 序列编码的酶被称为蛋白酶 II。

通过数据库的同源性搜寻, 已发现 SEQ ID No. 1 和 No. 2 中的 DNA 序列通常是新的。发现, SEQ ID No. 1 中 DNA 序列与已知蛋白酶基因的最高同源性是与 **黑曲霉** 酸性蛋白酶 A 有 74.7% 的同源性, 据测定两者有 538 个核苷酸的重叠。据测定蛋白酶 II 基因与 **米曲霉** 曲霉菌素胃蛋白酶 O 基因的同源性最高, 为 75.5%, 两者有 343 个核苷酸重叠。

第三本发明是关于含有本发明的 DNA 构建体的表达载体、一种含有该 DNA 构建体或表达载体的细胞和一种生产具有蛋白酶活性

的酶的方法，此方法包括在允许酶的产生的条件下培养所述的细胞并从培养基中回收酶。

第四，本发明是关于一种具有蛋白酶活性的酶，这种酶由上述定义的 DNA 构建体所编码，或由本发明吉的方法所生产。

第五个重要方面，本发明是关于一种具有蛋白酶活性的酶，这种酶在 pH 值小于 7.0 和高于 3% 的过氧化氢存在的条件下具有活性。在本文中，有关这种酶所使用的术语“有活性”是指这种酶在上述条件下能水解底物，如在本实施例五所叙述的那样。

本发明的酶是在 pH 值小于 7.0 和高于 3% 的过氧化氢存在条件下有活性，并且它在实施例五所特定的条件下能从透镜中除去至少 80% 的溶菌酶。在下列公开中本发明的这种酶被叫做“对过氧化氢稳定的蛋白酶”。通常认为这种酶是新的。

并且，本发明提供了一种具有蛋白酶活性的酶，它在 pH 值小于 7.0 条件下有活性并且它对苯丙氨酸—缬氨酸或者赖氨酸—酪氨酸中的肽键具有专一性。术语“专一性”是指在底物是牛胰高血糖素条件下此酶主要断裂这些肽键。在此叙述的蛋白酶 I 和蛋白酶 II 是本发明酶的优选实施例。这些酶已被发现是酸性蛋白酶，即具有酸性最适 pH 值的蛋白酶。

通过本发明就有可能提供高度纯化的蛋白酶，即纯度大于 70%，优选大于 90%，这正如通过本文的材料与方法部分所叙述的 SDS 凝胶电泳所测定的那样。

最后，本发明是关于含有本发明酶的酶制品和适于不同目的的酶或酶制品的使用，其中对含蛋白质物质的修饰或降解是理想的。

本发明的 DNA 构建体、载体和方法

在本文中关于本发明中定义的 DNA 构建体的术语“类似物”理解为包括任何如下 DNA 序列,它编码具有蛋白酶活性的酶并且分别与显示于 SEQ ID No. 1 或 No. 2 的 DNA 序列至少有 80% 的同源性。类似的 DNA 序列可以是一段在下列条件下同与编码蛋白酶 DNA 具有相同序列的探针进行杂交的 DNA 序列。在 5XSSC 中预浸泡并在 5XSSC、5X Denhardt' s 溶液、50mM 磷酸钠、pH6.8 和 5 μ g 变性声处理过的小牛胸腺 DNA 的溶液在 -55 $^{\circ}$ C 下预杂交 1 小时,然后在添加了 50 μ Ci 32—P—dcTP 标记探针的上述溶液中于 -55 $^{\circ}$ C 杂交 18 小时,接着在 2XSSC、0.2% SDS 中于 55 $^{\circ}$ C 洗三次,每次 30 分钟。类似 DNA 序列优选地与 SEQ ID No. 1 或 No. 2 所示的序列至少有 90% 的同源性。而与所棕序列优选地至少有 95% 的同源性。

类似 DNA 序列可以是从小生物体中分离的,也可以是在 SEQ ID No. 1 或 No. 2 中所示 DNA 序列基础上制备的,例如通过引进不会产生蛋白酶的另一种氨基酸序列的而只相应于宿主生物体选用密码子的核苷酸取代基,或者通过引进会产生不同的氨基酸序列并进而可能产生不同的蛋白质结构,这种结构能产生具有野生的酶所没有的特性的蛋白酶突变型的构建体或核苷酸取代基。其它可能的修饰例子是在序列中插入一个或多个核苷酸、在序列中的两端之一增加一个或多个核苷酸、或者在序列的两端之一或中间缺失一个或多个核苷酸。

再者,优选地,由类似 DNA 序列编码的蛋白酶会与针对 SEQ ID No. 1 或 No. . 2 所示 DNA 编码的纯化蛋白酶而产生的抗体具有免疫交叉反应。

能够与 SEQ ID No. 1 所示序列类似的 DNA 序列杂交的核苷酸

探针例如可以根据以下 DNA 序列之一或其组合制备：

(a) AATTAAGCAT CCTCCATCTT
 (b) CAAAGCTCAA TCTCGCTAAC
 (c) TCCCGCTCTT CTCTCGATCT
 (d) CATCATCCCA ATAACTCGGA
 (e) CAAAATGAAG ACCTCTGCTC
 (f) TCTTGACCGC TGGCCTGTTG
 (g) GCACCGCTGC TATTGCTGCT
 (h) CCTCTCACCG CGAAGCGCGC
 (i) ACGTGCTCGC GCTGCCAAGC
 (j) TGGCACCAGC CGCAAGAGCA
 (k) AGGGGGGTCT CAAGCCCGGC
 (l) ACCCAGCGAG GCCATAACCT
 (m) GACCGGCTCC AAGAACACCG
 (n) GAGGTACTCG TCCAACTGGG
 (o) CCGGCGCCGT GCCAT
 (p) AATTAAGCAT CCTCCATCTT CAAAGCTCAA TCTCGCTAAC TCCCGCTCTT
 CTCTCGATCT CATCATCCCA ATAACTCGGA CAAAATGAAG ACCTCTGCTC
 TCTTGACCGC TGGCCTGTTG GCACCGCTGC TATTGCTGCT CCTCTCACCG
 CGAAGCGCGC ACGTGCTCGC GCTGCCAAGC TGGCACCAGC CGCAAGAGCA
 AGGGGGGTCT CAAGCCCGGC ACCCAGCGAG GCCATAACCT GACCGGCTCC
 AAGAACACCG GAGGTACTCG TCCAACTGGG CCGGCGCCGT GCCAT

这些序列构成了 SEQ ID No. 1 显示的 DNA 序列或如此序列的类似物。

能够与 SEQ ID No. 2 所示 DNA 序列类似物杂交的核苷酸探针
 可以是根据以下 DNA 序列之一或其组合制备：

(p1) CTGCTTCTCC TTCTCTTCCT
 (q) CCTCGTGATA TCTGCTTGAA
 (r) CATCTCCTCA TCATGGTCGT
 (s) CCTCAACAAG GTGCAGCCTT
 (t) CTTCTGGGTC TGACCACCGC
 (u) CGCCACTGGT CCCCTGGCCG
 (v) AGCCGCAGGC TTCTGTCCGG
 (w) TCAAGAACTT CTCCGTCAAG
 (x) CAGGTCGAGA AGGCGGGCAG
 (y) CAAGGGACGT ACCGTTAACC
 (z) TGCCGGGTCT GTATGCGAAT
 (aa) GCGCTGGCCA AGTATGGCGC
 (bb) CCAGGTGCGG CCAGCGTCAA
 (cc) GGCCGCCGCC GTCAGTGGCA
 (dd) GCGTCGTGAC CACCCGCAGG CCAACGACG
 (ee) CTGCTTCTCC TTCTCTTCCT CCTCGTGATA TCTGCTTGAA CATCTCCTCA
 TCATGGTCGT CCTCAACAAG GTGCAGCCTT CTTCTGGGTC TGACCACCGC
 CGCCACTGGT CCCCTGGCCG AGCCGCAGGC TTCTGTCCGG TCAAGAACTT
 CTCCGTCAAG CAGGTCGAGA AGGCGGGCAG CAAGGGACGT ACCGTTAACC
 TGCCGGGTCT GTATGCGAAT GCGCTGGCCA AGTATGGCGC CCAGGTGCGG
 CCAGCGTCAA GGCCGCCGCC GTCAGTGGCA GCGTCGTGAC CACCCGCAGG CCAACGACG

这些序列构成 SEQ ID No. 2 显示的 DNA 序列或如此序列的类似物。

本发明中的 DNA 序列可以通过有关的一般方法分离出。

—在合适的载体中克隆来自棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 中的 DNA 文库，

—用所述的载体转化合适的酵母宿主细胞，

—在合适的条件下培养宿主细胞以表达由 DNA 文库中克隆所编码的感兴趣的酶，并且

—通过测定由这些克隆所产生的酶的蛋白酶活性来筛选阳性克隆。

有关此筛选方法的更详细的描述在下面的实施例 1 和 WO 93/11249 中给出了，其内容在此列入仅供参考。

例如编码此酶的 DNA 序列可以通过筛选 **棘孢曲霉** 和 CBS 101.43 菌株，它可公开地从 the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, NL 得到—的 cDNA 文库和选择能表达适当酶活性的克隆而分离出（此酶活性如所定义的，也即酶水解蛋白质和肽中的肽键的能力）。因而合适的 DNA 序列可以通过标准方法从克隆中分离出，正如实施例 1 中所描述的。

可期待的是，编码同源酶的 DNA 序列，即同源 DNA 序列可以类似地通过筛选另一微生物尤其是真菌的一个 cDNA 文库而得到，例如另一种曲霉属菌株尤其是棘孢曲霉或黑曲霉菌株，或者一种木霉属之种 (*Trichoderma* sp.) 菌株，尤其是 *T. harzianum* 或者 *T. reesie* 菌株，或者一种镰孢属之种 (*Fusarium* sp.) 菌株，尤其是尖镰孢 (*F. oxysporum*) 菌株，或者一种根霉属之种的菌株，例如雪白根霉菌株，或者一种 *Schytalidium*

sp. 菌株, 或者一种腐质霉属之种(*Humicola* sp.) 菌种。

另一选择是, 与众所周知的程序一致, 本发明的 DNA 序列可以方便地利用在此说明书中的 DNA 序列基础上制备的人工合成的寡聚核苷酸探针从合适的生物体的 DNA 中分离出来。例如, 合适的寡聚核苷酸探针可以在上面所示的核苷酸序列之一的基础上制备。

随后, 该 DNA 序列可以被插入到重组表达载体中。这可以是任何方便地适于重组 DNA 程序的载体, 并且载体的选择常常依赖于被引入的宿主细胞。因此, 该载体可以是自主复制载体, 即以染色体外的实体形式存在并且其复制不依赖于染色体而复制的载体, 例如质粒。该载体也可以是被引入宿主细胞时会整合到宿主细胞基因组中并且随着被整合入染色体的复制而复制的载体。

在载体中, 编码蛋白酶的 DNA 序列应该合并地连接到一个合适的启动子和终止子序列上。启动子可以是任一在选用的宿主细胞中显示转录活性并且可以从编码与宿主细胞同源或异源的蛋白质的基因中得到的 DNA 序列。分别把编码蛋白酶的 DNA 序列、启动子和终止子连接起来并把它插入到合适的载体中的程序是为本领域的技术人员所熟悉的。(例如, 参见 Sambrook 等的分子克隆, 一本实验手册, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。被转化编码本发明酶 DNA 序列的宿主细胞最好是真核细胞, 尤其是真菌细胞例如酵母或丝状真菌细胞。特别地, 该细胞可以属于 **曲霉属** 的一个种, 最好是

米曲霉或黑曲霉。真菌细胞可被如下有关过程转化: 形成原生质体并转化原生质体, 然后以本质上已知的方式再生细胞壁。使用 **米曲霉** 作为宿主微生物的方法在 EP 238 023 (在 Noro Noridisk A/S 中) 描述过。其内容在此列入仅供参考。宿主细胞

也可以是酵母细胞,例如一种酵母属(*Saccharomyces*)菌株尤其是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、克鲁弗酵母(*Saccharomyces Kluyveri*)或葡萄汁酵母(*Saccharomyces uvarum*),一种裂殖酵母属之种(*Schizosaccharomyces* sp.)菌株例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*),一种汉逊酵母属之种(*Hansenula* sp.)菌株,毕赤酵母属之种(*Pichia* sp.)菌株, *Yarrowia* sp. 菌株如 *Yarrowia lipolytica*, 或者克鲁维酵母属之种(*Kluyveromyces* sp.)菌株如乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)。

再者,本发明是关于生产具有蛋白酶活性的酶的一种方法,其中被转化编码该酶的本发明吉 DNA 构建体的合适的宿主细胞是在允许该酶的产生条件下得到培养,并从培养基中回收产生的酶。

被用来培养被转化的宿主细胞的培养基可以是适于所研究的宿主细胞生长的任何常规培养基。表达的蛋白酶可以主便地分泌到培养基中并且可以从那通过已知的操作程序回收,这些程序包括通过离心或过滤从培养基中分离细胞、利用如硫酸铵的盐沉淀培养基中的蛋白质成份、然后再进行层析,如离子交换层析、亲和层析或类似的过程。

本发明中的酶

本发明中的蛋白酶(如对过氧化氢稳定的蛋白酶或者对肽键赖氨酸—酪氨酸或苯丙氨酸—缬氨酸具有专一性的蛋白酶)的活性范围在 pH 值为 2—7 为好,例如在 pH 值小于 6.0,再如在 pH 值 2—6,并且大多数情况下在 pH4—6 范围内更好。

可以理解,两种酸性蛋白酶在 0.01—5% 的过氧化氢,如 0.1—5%、0.5—4%、1—4% 或 2—3% 的过氧化氢存在的条件下具有活性,并且它们可应用于隐形眼镜的清洗。

本发明中对过氧化氢稳定的蛋白酶的一个优选实施例是被 SEQ ID No. .1 所示 DNA 序列或者上述的与其具有至少 80% 同源性的同

源序列所编码的酶。

本发明中对赖氨酸—酪氨酸或苯丙氨酸—缬氨酸具有专一性的蛋白酶的优选实施例是被 SEQ ID No. .2 所示序列或上述的与其至少具有 80% 同源性的同源序列所编码的酶。

本发明中的酶更好地是与针对来自 **棘孢曲霉**，CBS 101.43 并且被 SEQ ID No. .1 或 No. .2 所示的 DNA 序列所编码的纯化蛋白酶而培育的抗体具有免疫反应。本文中术语“来自”不仅指蛋白酶由 CBS 101.43 菌株产生，而且指蛋白酶被从 CBS 101.43 菌株分离的 DNA 序列所编码并且在被转化了该 DNA 序列的宿主体中产生。

尽管本发明中对过氧化氢稳定的蛋白酶和对赖氨酸—酪氨酸或苯丙氨酸—缬氨酸有专一性的蛋白酶都是从真菌种 **棘孢曲霉**

中的一种菌株中获取，但是要考虑到这些酶也可以从其它生物体，尤其是微生物中获取。

因此，本发明中的酶最好从细菌中或真菌如曲霉属、根霉属、木霉属（如 *T.reesei* 或 *T.harzianum*）、青霉属、镰孢属、*Schytalidium* 或腐质霉属（如 *H.insolens* 或 *H.lanuginosa*）等菌株或者芽孢杆菌属菌株中获取。

曲霉属之种的例子包括黑曲霉、米曲霉或棘孢曲霉如棘孢曲霉 CBS 101.43。

再者，本发明是关于一种用来降解或修饰包括材料的蛋白酶的酶制品，该酶制品经浓缩而富含上述具有蛋白酶活性的酶。

已被浓缩而富含本发明酶的酶制品可以含有多种酶活性，尤其是含有多种降解植物细胞壁的酶如 Pectinex^R、Pectinex Ultra SP^R、

Gamanase、Celluclast、纤维素水解酶或者蛋白酶和/或者含外肽酶的酶制品如 Neutrase^R、Alcalase^R 或者 Havourzyme^R (这些都可从 Novo Nordisk A/s 获取)。在本文,术语“浓缩而富含”是指酶制品的蛋白酶活性已经增强了,如具有至少 1.1 的浓缩因子,这可方便地加入经上述方法制备的本发明酶的加入而达到。

作为选择富含具有蛋白酶活性的酶的酶制品可以是含有作为主要酶成份的本发明中的一种酶,如单一成份酶制品。

酶制品可以根据本领域中已知的方法制备而且可以制成液体形式干制品。例如,酶制品可制成颗粒状或微小颗粒状。酶制品所含的酶可以根据本领域已知的方法而稳定化。

根据本发明而得的酶制品可以作为用来降解或改变植物细胞壁的试剂。象伸展蛋白之类的某些蛋白是组成植物细胞壁的成份。蛋白酶因而会加速植物细胞壁的降解和改变。象这样的含蛋白酶的植物细胞壁降解酶制品能应用于许多不同的方面,如林橄榄和油菜之类的植物材料中提炼油或者从不同水果如苹果、梨、柠檬等中生产果汁。

酶制品另外还可含有一种或多种其它降解植物细胞壁的酶,如 pectin lyase、pectate lyase、endoglucanase、arabinanase、xylanase、glucanase、galactanase、mannanase、 α -galactosidase、rhamnogalacturonase、pectin acetylsterase、polygalacturonase、蛋白酶、肽链端解酶或果胶甲基酯酶。酶制品甚至可以含有一种或多种具有针对上述内切酶所起作用的底物而起作用的外切酶活性的酶。根据本发明,蛋白酶在与许多其它细胞壁降解酶起作用的相同的 pH 值和温度条件下起作用,因而特别适用于上面应用。

其它酶也通过曲霉属，最好是黑曲霉、棘孢曲霉、泡盛曲霉或米曲霉或者木霉属的微生物生产出来。

本发明的酶制品也可在酿酒工业中被用来防止酒霉或者溶解酒霉，因为蛋白质常参与讨厌的酒霉的形成。本发明的蛋白酶在发酵和成酒的条件具有活性，因而在此方面特别有用。

本发明中的酶或酶制品可应用于烤制行业中如用来软化面粉中的面筋成份以便从所谓的硬面粉中得到软化面粉。软化面粉在需具有很很大伸展性但无弹性的生粉制作中是重要的，例如在对外烤制品、饼干和其它在运输和烤制中必须保持其本来形状的产品等的制作中。本发明蛋白酶优选地被通常用来软化面粉的试剂如焦亚硫酸钠(SMS)，作为理想的选择。因为SMS对健康有潜在的危害性，SMS的使用被认为是不理想的。

蛋白酶制品也可在食品和饲料工业中被用来提高蛋白质的可消化率。例如，酶或酶制品可被加入动物饲料中或者被用来加工动物饲料，尤其是仔猪或禽类饲料。因而，饲料成份的可消化率可被提高，进而动物的生长速度和其对饲料的利用效率都被提高。参见Brenes等(1993)。

而且，本发明的酶或酶制品可用来从蔬菜蛋白如大豆、花生、羽扇豆或油菜籽蛋白、牛奶如酪蛋白、肉蛋白或鱼类蛋白等中制作蛋白水解产物。蛋白酶可被用来制作蛋白水解产物以便提高可溶性、稠度、口味或发酵能力，降低抗原性，或因其它目的而制作食品、饲料或医用产品。本蛋白酶可单独使用，也可与其它蛋白酶或象外肽酶之类的其它酶共同使用。本发明的蛋白酶与富含外肽解酶的酶制

品共同使用会提高蛋白质水解产物的品味。

本蛋白酶制品也可用来改变蛋白质，如减少全部或部分由蛋白质引起的粘性。这种粘性问题的已闻名于对象大豆、花生之类的植物材料所含蛋白质的加工行业中。

甚至，本酶或酶制品可用于对鱼肉或兽肉的加工中以改变其结构和/或者粘性。

本蛋白酶制品也可用来加速发酵过程，例如为了生产啤酒而对大麦、麦芽及其它原料进行的酵母发酵。

再者，本发明的酶或酶制品可用在制革工业中从毛皮中除毛。由于随后的鞣革是在酸性条件下进行，因此本蛋白酶的最低最适 pH 值是一大优点。本蛋白酶制剂有助于从蛋白质中生产肽，在此它的优点是使用克隆的酶而不受其它蛋白水解活性的影响。

而且，本蛋白酶制品能用于降解蛋白质以利于提高不同产品的纯度或质量，如提高 guar gum、Xanthan gum 之类橡胶的纯度和质量，给丝脱胶或者提高毛物质量。

由于它们对过氧化氢的稳定性，本发明的两种蛋白酶在清洗隐形眼镜或其它涉及过氧化氢又必须去除含蛋白物质的应用方面都特别有用。

针对以上各种用途，本发明的酶制品的使用量和其它使用条件可以在本领域已知方法的基础上确定下来。

本发明也在进一步附图中加以描述，其中，

图 1 分别说明了蛋白酶 I 和 II 的 pH 值活性曲线，

图 2 分别为蛋白酶 I 和 II 的温度一活性曲线，

图 3 和图 4 分别为蛋白酶 I 和 II 对 pH 值的稳定性曲线，

图 5 和图 6 分别为蛋白酶 I 和 II 对温度的稳定性曲线,

图 7 表示各种蛋白酶在隐形眼镜清洗中的作用,

图 8 表示本发明的一种酶对面筋伸展的效应。

在下列实施例中更为详细地加以描述了本发明,但无论如何,不
只限于权利要求书的本发明范围。

材料和方法:

供体生物体: mRNA 从 **棘孢曲霉** CBS 101.43 中分离,
后者生长在常搅拌以保证足够氧气的含大豆的发酵培养基中。生长
3 至 5 天后收集菌丝体,立即在液氮中冰冻并保存于 -80°C 。

酵母菌株: 使用的 **酿酒酵母** 菌株是 yNG231 (MAT
alpha, leu2, ura 3-52, his 4-539, pep4-delta 1, Cir⁺) 或者 JG 169
(MAT α ; ura 3-52; leu2-3, 112; his 3-D200; pep4-113; prc 1
HIS 3; prb1 LUE2; cir⁺)。

质粒: 含酵母 TPI 启动子的表达质粒 pYH17 是从市面上可买到的
pYES II 质粒 (Invitrogen) 中制备的。这种质粒及其构建在 WO 93/
11249 中描述了, 在此其内容列入仅供参考。

曲霉表达载体 pHD 414 是质粒 p775 的衍生物 (在 EP 238 023
中被描述)。pHD 414 还在 WO 93/11249 中被描述。pHD414 含有 A.-
niger 葡萄糖淀粉酶终止子和 A. oryzae TAKA 淀粉酶启动子。

总 RNA 提取: 先用 **硫氰酸胍** (guanidinium thiocyanate) 抽提,
然后通过 5.7M CsCl 垫超速离心而得, 这正如 Chirgwin 等, 1979 和
WO 93/11249 中所描述的一样。

poly (A)⁺ RNA 的分离: poly (A)⁺RNA 是经寡聚 dT—纤维素亲
和层析 (Aviv & Leder, 1972) 而分离出。典型地, 0.2g 寡聚 dT 纤

纤维素 (Boehringer Mannheim) 预溶胀于 10ml 1x 柱填充缓冲液 (20mM Tris—Cl, pH7.6, 0.5M NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS) 中, 装入经 DEPC 处理的、塞好的塑料柱 (Poly Prep 层析柱, Bio Rad) 并用 20ml 1x 填充缓冲液平衡。总 RNA 在 65℃ 加热 8 分钟, 在冰上冷却 5 分钟, 加入 1 体积 2X 柱填充缓冲液到 RNA 样品中后装入柱中。收集洗脱物并重装 2—3 次, 但装样前要象上面一样给样品加热并在冰上冷却。寡聚 dT 柱先用 10 体积 1X 填充缓冲液, 再用了体积培养基盐缓冲液 (20mM Tris—Cl, pH7.6, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS) 洗, 然后用 3 体积洗脱缓冲液 (10mM Tris—Cl, pH7.6, 1mM EDTA, 0.05% SDS) 洗脱 poly (A)⁺RNA, 预热至 +65℃, 每次收集 500μl 洗脱物。测定每次收集的洗脱物的 OD₂₆₀ 值, 将各次含 mRNA 洗脱物合并并且在一 20℃ 用乙醇沉淀 12 小时。离心收集 poly (A)⁺RNA, 重新悬浮于 DEPC—DIW 中并以 5—10μg 等分试样形式在一 80℃ 贮存。

Northern 印迹分析: 从各种菌丝体分离的 poly (A)⁺RNA (5μg/样品) 在 1.2 琼脂糖—2.2M 甲醛胶 (Sambrook 等, 1989) 中电泳, 并以 10XSSC (Sambrook 等, 1989) 作为转移缓冲液将其印迹到尼龙膜 (Hybond—N, Amersham) 上。在各次杂交中使用了三种随机引物 (Feinberg 和 Vogelstein, 1983) ³²P—标记的 cDNA 探针: 1) 来自 **棘孢曲霉** 的多聚半乳糖苷酶 I 的 1.3kb 的 Not I—Spe I 片段, 2) 来自 **棘孢曲霉** 编码葡萄糖内切酶 I 的 1.3kb Not i—Spe 片段, 3) 来自 **棘孢曲霉** 编码半乳聚糖酶 I 的 1.2kb Eag I 片段。Northern 杂交是在 5XSSC (Sambrook 等, 1989)、5X Denhardt' s 溶液 (Sambrook 等, 1989)、0.5% SDS (W/V) 和 100μg/ml 变性鲑精子 DNA 中与浓度为

Ca. 2 ng/ml 的探针在 65℃ 杂交 16 小时，在 65℃ 杂交 16 小时，在 65℃ 用 5XSSC 漂洗二次，每次 15 分钟，在 2XSSC、0.5% SDS 中漂洗一次 30 分钟，在 0.2XSSC、0.5% SDS 中漂洗一次 30 分钟，再用 5XSSC 漂洗 2 次每次 15 分钟。在 -80℃ 放射自显影 12 小时，之后根据制造商的说明书将 1 号探针从滤膜上除掉，重新与 2 号探针杂交，最后与 3 号探针杂交。以来自 Bethesda 研究实验室的梯度 RNA 作为分子量大小标记物。

cDNA 合成：

第一条链的合成：使用发夹修饰用 RNA 聚合酶 H 方法 (Gubler 和 Hoffman 1983, Sambrook 等 1989) 从 5μg 来自 **棘孢曲霉** 的 poly (A)⁺RNA 中合成双链 cDNA。poly (A)⁺RNA (5μg 溶于 5μl DEPC 处理过的水中) 在 70℃ 加热 8 分钟，在冰上冷却，然后与如下试剂混合，最终体积为 50μl：含有 1mM 每种 dNTP (Pharmacia) 的逆转录酶缓冲液 (50mM Tris-Cl、pH 8.3、75mM KCl、3mM MgCl₂、10mM DTT、Bethesda 研究实验室)、40 单位的人胎盘核糖核酸酶抑制因子 (RNasin, Promega)、10μg 位寡聚 (dT)₁₂₋₁₈ 引物 (Pharmacia) 和 1000 单位 SuperScript II RNase H—逆转录酶 (Bethesda 研究实验室)。反应混合物在 45℃ 保温 1 小时即可合成第一条链 cDNA。

第二条链的合成：待合成后，加入 30μl 10mM Tris-Cl、pH 7.5、1mM EDTA，加入 40μg 糖原载体 (Boehringer Mannheim)、0.2 体积 10M NH₄Ac 和 2.5 体积 96% EtOH (乙醇) 让 mRNA: cDNA 杂交分子经在 -20℃ 乙醇沉淀 12 小时。离心回收杂交分子，用 70% 的乙醇洗涤，干燥，并且重悬浮于含有 100μM 各种 dNTP、44 单位大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (Amersham)、6.25 单位核糖核酸酶 H (Bethesda 研

究实验室)和 10.5 单位大肠杆菌 DNA 连接酶 (New England Biolabs)的 250 μ l 第二条链缓冲液(20mM Tris—Cl、pH7.4、90mM KCl、4.6mM MgCl₂、10mM (NH₂)₂SO₄、16 μ M BNAD⁺)中。在 16℃将上述反应管温育 3 小时,加入 EDTA 使终浓度为 20mM 就可中止反应,然后用酚抽提即可合成第二条链 cDNA。

Mung 菜豆核酸酶处理:加入 2 体积 96%乙醇、0.1 体积 3M NaAc、pH5.2,在 -20℃用乙醇沉淀双链 cDNA 12 小时,经离心回收,70%乙醇洗涤,干燥(真空干燥),并重新悬浮于 30 μ l Mung 菜豆核酸酶缓冲液(30mM NaAc、pH4.6、300mM NaCl、1mM ZnSO₄、0.35 mM DTT,2%甘油)内含 36 单位 Mung 菜豆核酸酶(Bethesda 研究实验室)中。将该反应物在 30℃温育 30 分钟,然后经加入 70 μ l 10mM Tris—Cl、pH7.5、1mM EDTA、酚抽提物,并用 2 体积 96%乙醇、0.1 体积 3M NaAc、pH5.2 在 -20℃下乙醇沉淀 12 小时,这样就可对单链发夹 DNA 进行修剪。

用 T₄DNA 聚合酶平末端化:将含有 0.5mM 各种 dNTP 和 7.5 单位 T₄DNA 聚合酶(Invitrogen)的 50 μ l T₄DNA 聚合酶缓冲液(20mM Tris—乙酸、pH7.9、10mM MgAc、50mM KAc、1mM DTT)于 +37℃温育反应混合物 15 分钟,就可将双链 cDNA 平末端化。加 EDTA 使最终浓度为 20mM 即可终止反应,然后用酚抽提和乙醇沉淀。

连接接头的连接和大小筛选:将含有 600pmol BstX I 连接接头和含 5 单位 T₄连接酶(Invitrogen)的 30 μ l 连接缓冲液(50mM Tris—Cl、pH7.8、10mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATP、25 μ g/ml 小牛血清蛋白质)在 +16℃温育 12 小时,在此填充反应之后,cDNA 就被连接到非回文的 BstX I 接头(1 μ g/ μ l, Invitrogen)上。在 +70℃加热

5 分钟使反应终止,用琼脂糖胶 (0.8% HSB—琼脂糖, FMC) 电泳将被连接的 cDNA 按大小分开以便分离没有连接上的接头和小的 cDNA。切 T. 0.7kb 对 cDNA 进行大小筛选,并在 10mM Tris—Cl、pH7.5、1mM EDTA 中,100 伏将琼脂糖胶电洗脱 1 小时,用酚抽提并同上面一样于 -20℃ 经乙醇沉淀 12 小时。

cDNA 文库的构建:被连接的双链 cDNA 经离心回收、用 70% 乙醇洗涤并重新悬浮于 25ml DIW 中。在大规模文库连接之前,4 种检测连接在各含如下物质的 10μl 连接缓冲液 (同上) 中进行:每种含 1μl 双链 DNA (1—3 号反应管)、2 单位 T₄ 连接酶 (Invitrogen) 和 50ng (1 号管)、100ng (2 号管) 和 200ng (3 号和 4 号管) BstXI 切割的酵母表达载体 (或 Invitrogen 的 PYES 2.0 载体或 yHD17)。将上述反应物在 +16℃ 温度 12 小时,在 70℃ 加热五分钟即完成连接反应,1μl 各种连接液经电穿孔 (200Ω, 2.5KV, 25μF) 进入 40μl 感受态大肠杆菌 1061 细胞 (OD₆₀₀=0.9, 每升 LB—broth, 在冷 DIW 中洗二次, 20ml 10% 甘油中洗一次, 重悬于 2ml 10% 甘油)。在每种转化混合物中加入 1ml SOC 后,让细胞在 +37℃ 生长 1 小时,取 50μl 涂布于 LB+ampicillin 平板上 (100μg/ml) 并在 +37℃ 生长 12 小时。

使用上述实验中的最佳条件,大量连接在含有 9 单位 T₄ 连接酶的 40μl 连接缓冲液中进行,并且反应液在 +16℃ 温育 12 小时。在 70℃ 加热 5 分钟以终止连接反应,在 -20℃ 经乙醇沉淀 12 小时,经离心回收并重悬于 120μl DIW 中。使用同上的电穿孔条件将 1μl 分装的各种样品转化到电感受态的大肠杆菌 1061 细胞中,测定转化细胞的滴度并将文库涂布于 LB+ampicillin 平板上 (5000—7000c. f. u. / 平板)。每个平板加 3ml 培养基。到下细菌,加 1ml 甘油并一起在 -

80℃贮存作为贮存库。余下的 2ml 用作 DNA 分离。如果 DNA 的数量不足以产生所需数量的酵母转化体,大量 DNA 从已接种上 50μl—80℃贮存的过夜繁殖了的细菌贮存液的 500ml 培养基(TB)中制备。

酵母文库的构建:为了保证所有细菌克隆在酵母中被检测,酵母转化体的数量要五信倍于原库中的细菌克隆数,以此作为最低限度。

来自贮备库中的各 1μl 分装的纯化的质粒 DNA (100mg/μl) 经电穿孔转化 (200Ω1, . 5KV, 25μF) 经 40μl 感受态 *S. cerevisiae* JG 169 细胞中 (OD600=1. 5, 每 500ml YPD, 在冷 DIW 中洗二次, 在冷的 1M 山梨醇中洗一次, 重悬于 0.5ml 1M 山梨醇中, Becker 和 Guarate, 1991)。加入 1ml 1M 冷的山梨醇后, 80μl 分装的样品铺板于 SC+葡萄糖—尿嘧啶培养基上以达到 250—400c. f. u/板, 并在 30℃培育 3—5 天。

在曲霉菌中表达的 cDNA 基因的分离:一个或多个产生蛋白酶的菌溶接于 20ml 含 YNB—1 肉汤培养基的 50ml 玻璃试管中。在 30℃摇荡 2 天。以 3000 rpm 离心 10 分钟收集细胞。

细胞被重悬于 1ml 0. 9M 山梨醇、0. 1M EDTA、pH7. 5 的溶液中。将其沉淀物转移到一个 Eppendorf 管中, 全速旋转 30 秒。将细胞沉淀重悬于 0. 4ml 0. 9M 山梨醇、0. 1M EDTA、14mM β—巯基乙醇中。加入 100μl 2mg/ml Zymolase 将其在 37℃温育 30 分钟并离心 30 秒。沉淀物(球芽)被重悬于 0. 4ml TE 中。加入 90μl 溶液 (1. 5ml 0. 5M EDTA pH8. 0、0. 6ml 2M Tris—Cl pH8. 0、0. 6ml 10% SDS) 并在 65℃温育 30 分钟。加入 80μl 5M KOAc 并冰育至少 60 分钟, 全速离心 15 分钟。将上清液转移到装满乙醇(室温)的新试管中, 然

后轻轻地使其充分混匀，离心 30 秒。用 70% 的冷乙醇洗涤沉淀，离心 30 秒并在室温下干燥。将沉淀重悬于 50 μ l TE 中并离心 15 分钟。将上清转移到一新试管中。加入 2.5 μ l 10mg/ml 的核糖核酸酶，然后在 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟并缓缓加入 500 μ l 异丙醇，轻轻将其混匀。离心 30 秒，弃去上清。用 96% 乙醇洗涤沉淀并于室温干燥。该 DNA 溶于 50 μ l 水中使其终浓度约为 100 μ l/ml。

米曲霉或黑曲霉的转化（一般步骤）：

在 100ml YPD (Sherman 等，酵母遗传学方法，冷泉港实验室，1981) 中接种上 *A. oryzae* 或 *A. niger* 的孢子并在 37 $^{\circ}$ C 摇荡培育约 2 天。用细布 (miracloth) 过滤收集菌丝体并用 200ml 0.6M $MgSO_4$ 洗涤。将菌丝体悬浮于 15ml 1.2M $MgSO_4$ 、10mM NaH_2PO_4 、pH=5.8 溶液中。将悬浮在冰上冷却，加入 1ml 含有 120mg Novozym^R 234、批号 1687 的缓冲液。5 分钟后，加入 1ml 12mg/ml BSA (Sigma 型号 H25) 并在 37 $^{\circ}$ C 下轻轻摇荡温育 1.5—2.5 小时，直至经检查的样品在显微镜下可见到大量原生质体。

用细布过滤悬浊液，将滤液转移到一个灭菌过程的试管中并加上一层 5ml 0.6M 山梨醇、100ml Tris-HCl、pH=7.0。在 100g 离心 15 分钟，收集 $MgSO_4$ 上层的原生质体。加工体积的 STC (1.2M 山梨醇、10mM Tris-HCl、pH=7.5、10mM $CaCl_2$) 于原生质体悬浮液中并在 1000g 离心 5 分钟。将原生质沉淀重悬于 3ml STC 并重新离心沉淀，再重复一次。最后将原生质体悬浮于 0.1—2ml 的 STC 中。

100 μ l 原生质体悬液与含有 5—25 μ g 合适 DNA 的 10 μ l STC 相混合。原生质体与 p3SR2 (一种携带 **构巢曲霉** *amds* 基因的质粒) 相混合。混合物于室温放置 25 分钟。加入 0.2ml 60% PEG 4000 (BDH

29576)、10mM CaCl_2 、10mM Tris—HCl、 $\text{pH}=7.5$ 的溶液并仔细混匀(2次),最后加入 0.85ml 如上溶液并仔细混匀。混合物在温室放置 25 分钟、2500g 离心 15 分钟并将沉淀重悬于 2ml 1.2M 山梨醇中。再沉淀一次后,涂布原生质体于合适的平板上。原生质体被涂布于含有 1.0M 蔗糖、 $\text{pH}7.0$ 、10mM 作为氮源的乙酰胺和 20mM 用来抑制背景生长的氯化铯的小平板上 [Cove Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51—56]。于 37°C 培育 4—7 天后,收集和涂布孢子以获取单菌落。重复此步骤并将第二次重复分离后的单菌落孢子作为指定的转化体而贮存起来。

免疫交叉反应:利用纯化的蛋白酶可制备用来检测免疫交叉反应的抗体。更具体地,根据 N. Axelson 等在 A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, 第二十三章或者 A. Johnstone 或 R. Thorpe 的 Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982 (尤其第 27—31 页) 中所描述的步骤,抗本发明蛋白酶的抗血清可经免疫兔(或其它啮齿动物)培育出。从这些抗血清中可获取纯化免疫球蛋白,例如通过盐沉淀($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$),然后经透析和离子交换层析如 DEAE—葡聚糖层析等制备。可通过如下方法之一来分析蛋白的免疫化学特性:Ouchterlony 双扩散分析法 [O. Ouchterlony: Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir 编辑), Blackwell Scientific Publications, 1967, 第 655—706 页]、交叉免疫电泳法 (N. Axelsen 等,同上,第 3、4 章) 和火箭免疫电泳法 (N. Axelsen 等,第 2 章)。

培养基:

YPD: 10g 酵母提取物、20g 胰蛋白胨、加水至 810ml,高压灭菌,

加入 90ml 20% 葡萄糖（灭菌过滤）。

10X 基础盐：66.8g 酵母氮基质、100g 琥珀酸、60g NaOH、加水至 1000ml，灭菌过滤。

SC—URA：90ml 10X 基础盐、22.5ml 20% 酪蛋白氨基酸、9ml 1% 胰蛋白胨、加水至 806ml、高压灭菌、加 3.6ml 5% 苏氨酸、和 90ml 20% 葡萄糖或者 20% 半乳糖。

SC—H 肉汤培养基：7.5g/l 无氨基酸的酵母氮基质、11.3g/l 琥珀酸、6.8g/l NaOH、5.6g/l 无维生素的酪氨酸、0.1g/l 胰蛋白胨。在 121℃ 高压灭菌 20 分钟。高压后每 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 去氨基酸的酵母氮基质、11.3g/l 琥珀酸、6.8g/l NaOH、5.6 g/l 无维生素的酶氨酸、0.1g/l 胰蛋白胨和 20g/l 琼脂 (Bact)。于 121℃ 高压灭菌 20 分钟。高压后，每 450ml 琼脂加入 55ml 22% 半乳糖溶液和 1.8ml 5% 苏氨酸溶液。

YNB—1 琼脂：3.3g/l KH_2PO_4 、16.7 g/l 琼脂、调 pH 值至 7.0，在 121℃ 高压灭菌 20 分钟。高压后，每 450ml 琼脂胶加入 25ml 13.6% 无氨基酸的酵母氮基质、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 肉汤：组成同 YNB—1 琼脂一样，但无琼脂。

FG—4—琼脂：35g/l 琼脂、30g/l 大豆粉、15g/l 麦芽糖糊精 (Glucidex 6)、5g/L 细菌蛋白胨、pH7.0，在 121℃ 下高压灭菌 40 分钟。

FG—4 培养基：30g/L 大豆粉、15g/L 麦芽糖糊精 (Glucidex 6)、5g/L 细菌蛋白胨。在 121℃ 高压灭菌 40 分钟。

MDU—2 培养基: 45g/L 麦芽糖、1g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1g/L NaCl、2g/L K_2SO_4 、12g/L KH_2PO_4 、0.1 ml/L Pluronic 61L、0.5ml/L 微量金属溶液, pH5.0, 在 121℃ 高压灭菌 20 分钟高压后加入 15ml/L 50% 灭菌过滤的尿素。

酪蛋白薄胶: 1% 琼脂糖、0.5% 的溶于 pH 值为 5.5 缓冲液中的酪蛋白。将胶煮沸, 冷却至 55℃, 再将薄胶倒在琼脂平板上。

原料批量发酵

从 *A. Oryzae* 获取蛋白酶 I 和 II 的原料批量发酵所用的培养基是由作为碳源的麦芽糖糊精、作为氮源的尿素和酵母提取物组成。

原料批量发酵是这样进行的: 把一摇瓶有关 **米曲霉** 宿主细胞的培养物接种在含有 3.5% 碳源和 0.5% 氮源的培养基中。在 pH5.0 和 34℃ 条件下培养, 每 24 小时后重新补充碳源和氮源。以碳源作为限制因子而保证氮的充分供应。原料批量培养持续 4 天之后即可回收所需酶。

酶的特性

蛋白水解活性

1 个血红蛋白酶单位 (hpu) 是指在如下描述的标准条件下释放 1 毫摩尔基本氨基 (通过与丝氨酸标准比较来测定) 所需的酶量:

用 Britton 和 Robinson 在 *J. Chem. Soc.*, 1931 中第 1451 页所描述的通用缓冲液调节 pH 值至 5.5 从而制备 2% (W/V) 血红蛋白 (牛的, 由 Sigma 供应) 溶液。将 2ml 底物溶液在 25℃ 水浴预培育 10 分钟, 相应加入 1ml 含 6g/ml 酶制品的酶溶液——于约 0.2—0.3hpu/ml 通用缓冲液 (pH5.5)。在 25℃ 培育 30 分钟后, 加入一种冷却剂 (将 5ml 含 17.9 克三氯乙酸、29.9 克乙酸钠和 19.8 克乙酸的溶液, 用

去离子水稀释至 500ml) 终止反应。空白对照溶液的制备与检测溶液基本一致, 只是要先加冷却剂再加酶溶液。将反应物在水浴中保持 20 分钟。此后用 Whatman 42 滤纸过滤。

基本氨基可通过它们与 O—phthaldialdehyde (OPA) 的颜色反应来测定。方法如下: 将 7.62 克 disodium tetraborate decahydrate 和 2.0 克 Sodium dodecylsulfate 溶于 150ml 水中。同时加入溶于 4ml 甲醇的 160mg OPA 溶液和 400 μ l β -巯基乙醇, 之后加水至 200ml。每 3ml OPA 反应物加入 400 μ l 上面所获的滤液, 混匀。约 5 分钟后测定 340nm 处光密度 (OD)。OPA 检验也可在含 10mg 苏氨酸的 100ml 通用缓冲液 (pH5.5) 制成的苏氨酸标准液中进行。不含苏氨酸的通用缓冲液用作空白对照。根据如下公式, 蛋白酶的活性可由 OD 测量值算出:

$$\text{hpu/每毫升酶溶液} = \frac{(\text{OD}_1 - \text{OD}_6) \times \text{Cser} \times Q}{(\text{OD}_{\text{ser}} - \text{OD}_B) \times \text{MWser} \times t_i}$$

$$\text{hpu/每克酶制品} = \text{hpu/ml} \times b$$

其中, OD_1 、 OD_6 、 OD_{ser} 和 OD_B 分别是检测溶液、对照溶液、丝氨酸标准液和缓冲液的光密度值, Cser 是标准液中丝氨酸浓度 (mg/ml) (在此处为 0.1mg/ml), MWser 是丝氨酸的分子量 (105.0g), Q 是酶溶液的稀释因子 (在此处为 8), 而 t_i 是培养时间的分钟数 (在此为 30 分钟)。

抑制

检测下列抑制因子:

Pepstatin (天冬氨酸抑制因子) (1mM) PMSF (丝氨酸蛋白酶抑制因子) (0.1%)

PEFABLOC (丝氨酸蛋白酶抑制因子) (0.1%)

EDTA (金属蛋白酶抑制因子) (0.1M)

PEFABLOC 可从 Pentapharm, Basel, 瑞士买到, 其它的都可以 Sigma 公司买到。

残余活性可通过 pH5.5 下的 HPU/L 来测定。

pH 值活性曲线是由不同 pH 值下的 HPU/L 值来确定。

对 pH 值的稳定性是按以下方式测定: 在 50℃和各种不同 pH 值 (4—5—6—7—8) 下分别让酶溶液停留 30 分钟、60 分钟和 120 分钟, 并测定放置前后酶的水解蛋白质活性。

温度活性曲线是由不同温度 (15—70℃) 下的 HPU/l 来确定。

温度稳定性按如下方式测定: 在 pH 值为 5.0 和各种不同温度下 (25—40—50—60℃) 分别让酶溶液 (0.3 HPU/l) 放置 30 分钟、60 分钟和 120 分钟, 并测定放置前后其水解蛋白质活性。

SDS 凝胶电泳和等电聚焦是根据制造商的说明书分别在 8—25 浓度梯度的来自 Pharmacia 公司的 Phast 系统和 IEF 3—9 上进行。

专一性

本发明蛋白酶的专一性按如下方式测定:

0.5ml 1mg/ml 人胰岛素或牛胰高血糖素的通用缓冲液, pH5.5 (参考上文) 分别和 75μl 的蛋白酶 I 和 II (0.6hpu/l) 的同样通用缓冲液溶液在 37℃温育 120 分钟。加 50μl 1N 盐酸可使反应中止。

人胰岛素分子或牛胰高血糖素被切为许多肽片段。利用合适的 C—18 柱 (Hibar Lichrosorb RP—18, Merck AG, Darmstadt, FRG 提供了 5μm 颗粒) 反相 HPLC 分离提取各片段。这些片段可通过下列溶液:

A. 0.2M 硫酸钠和 0.1M 磷酸, pH2.5;

B. 乙腈/水, 50%;

在从 90% A/10B 到 80% A/20% B 的线性梯度上先洗脱 0—5 分钟再用 80% A/20% B 洗脱 50 分钟。使用 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) Model 470 A 气相测序仪通过自动 Edman 降解对分离提取的片段进行测序, 并且这些乙内酰苯硫脲 (PTH—) 氨基酸再通过高效液相色谱进行分析, 这正如 L. Thim 等的“通过转化酵母细胞分泌人胰岛素”, FEBS Letters 212 (2), 1987, 第 307 页所描述的那样, 据此胰岛素或胰高血糖素分子的酶切位点加以确定。

实施例 1

在 150 个库中构建了由大约 1.5×10^6 个单一克隆组成的 *A. aculeatus* 文库。

从文库的 20 个单一克隆中分离 DNA 并分析其 cDNA 插入。发现插入频率 >90% 且平均插入子大小大约为 1400bp。

将一些库中的 DNA 转化进酵母中, 从每个库中获得含 200—500 个酵母菌落的 50—100 个平板。生长 3—5 天后, 琼脂板复制涂布到几组琼脂板上。然后, 一组平板在 30℃ 培养 2—4 天并用一层酪蛋白覆盖凝胶覆盖以检测蛋白酶活性。30℃ 培养过夜后, 鉴定蛋白酶阳性菌落, 为被白色晕圈包围的菌落。

涂布酶阳性菌落的细胞使其在琼脂上分布成单个菌落。挑选生产酶的单个菌落, 用于鉴定每个生产蛋白酶的菌落。

以单个菌落的形式获得阳性克隆, 使用生物素标记的多聚接头引物直接从酵母菌落中扩增 cDNA 插入子, 用磁珠 (Dynabead m-280, Dynal) 系统纯化, 并使用链末端终止法 (Sanger et al., 1977) 和测序酶系统 (United states Biochemical) 分别对每个 cDNA 克

隆的5'端测序来鉴定。两个酶基因的DNA序列分别在SEQ ID Nos. 1和2中显示。

接着,按上面所述分离用于在**曲霉**中表达的编码蛋白酶的cDNA并使用标准程序转化进大肠杆菌中。从每次转化中分离2个大肠杆菌菌落并用剪切DNA插入子的限制性酶Hind III和XbaI分析。将这些克隆中的一个的DNA重新转化进酵母菌株JG 169中。

测定了几个阳性克隆的DNA序列。编码蛋白酶的2个DNA序列分别在SEQ ID Nos. 1和2中显示。

实施例2

为了在**曲霉**中表达基因,使用上述程序,经用HindIII/XbaI或其它合适的限制性酶消化,在凝胶上进行大小分离和纯化从每个家族的一个或多个代表物中分离cDNA,接着连接到pHD414上,产生质粒pA1P1和pA1P2。在大肠杆菌中扩增后,根据上面所述的一般程序将质粒转化进**米曲霉**或**黑曲霉**中。

米曲霉 转化子试验:

将每个转化子接种到含FG—4琼脂的培养皿中央。30℃下培养5天后,用木栓旋孔装置从菌落中心取出4mm直径的琼脂栓,将琼脂栓包括于含0.5%酪蛋白和1%琼脂糖,溶于pH5.5的缓冲液中的酪蛋白覆盖凝胶中,40℃下培养过夜。按上面所述鉴定蛋白酶活性。有些转化子的晕圈明显要比**米曲霉**背景大。这证实了蛋白酶在**米曲霉**中的有效表达。挑选具有最高蛋白酶活性的8个转化子并在YPG琼脂上接种和保存。

分别将8个选出的转化子从YPG琼脂斜面接种到含FG—4和MDU—2培养基的500ml摇瓶中。充分搅拌以保证通气良好,发酵

3—5 天后，以 2000g 将培养液离心 10 分钟并分析上清液。

从每份上清液中取 15 μ l 的体积加入在酪蛋白覆盖凝胶 (25ml 铺于 13cm 直径的培养皿中) 上挖出的 4mm 直径的孔中。以培养后白色晕圈的形成来鉴定蛋白酶活性。

饲养批量发酵：

随后，使用上面所述的程序经过对表达酶的 **米曲霉** 进行饲养批量发酵来分别生产蛋白酶 I 和 II。

实施例 3

蛋白酶 I 和 II 的鉴定：

从上面饲养批量发酵产生的上清液用于接上面材料和方法部分所述进行鉴定。使用上面所述程序在 pH5.5 的条件下测定蛋白水解活性 (HPU/l)。

抑制试验得到下面的结果：

	% 残余活性			
	EDTA	胃酶抑制剂	PEFABLOC	PMSF
蛋白酶 I	104	91	83	92
蛋白酶 II	97	9	90	108

胃酶抑制剂对蛋白酶 II 的抑制表明它是一种胃蛋白酶型天冬氨酸蛋白酶。蛋白酶 I 不受胃酶抑制剂的抑制，因此不能鉴定为天冬氨酸蛋白酶阳性。另一方面，它在 pH5 的最佳活性表明它是一种酸性蛋白酶。

图 1 显示了 pH 活性曲线。可见两种酶都在 pH5 具有最佳活性，并且蛋白酶 I 比蛋白酶 II 在更窄的范围内有活性。因此，蛋白酶 I 在

pH4—6 的范围内表现出超过 60% 的活性,而蛋白酶 II 在 pH4—7 的范围内表现出超过 60% 的活性。

以 SDS 凝胶分析分别估计了蛋白酶 I 和 II 的分子量,分别为 23,000 和 37,000 KD。经过 IEF 分析,估计两种酶的 PI 都大约为 4。

图 2 显示了温度活性曲线。两种酶非常相似,但最适温度略有区别、蛋白酶 I 为 50℃,蛋白酶 II 为 45℃。

图 3 和 4 显示了 pH 稳定性。对于每个 pH,假定零时活性为 100%,因此获得的绝对值是不同的。两种蛋白酶在 pH4 和 5 都稳定,在 pH6 时,蛋白酶 I 不稳定,而蛋白酶 II 具有一定程度的稳定性(30 分钟后保留 40% 的活性)。两种酶在 pH7 都不稳定。

图 5 和图 6 显示了温度稳定性。对于每一温度、假定零时活性为 100%,且获得的绝对值是不同的。两种蛋白酶在 50℃ 仍稳定,但在 60℃ 不稳定。

根据蛋白酶 I 和蛋白酶 II 水解胰岛素和胰高血糖素获得的结果发现:蛋白酶 II 不与胰岛素反应,而两种蛋白酶都水解胰高血糖素。可得出结论:蛋白酶 I 是一种相当无特异性的蛋白酶,而蛋白酶 II 具有更高的特异性。发现蛋白酶 II 能分解在中胰高血糖素中发现的 Lys—Tyr 和 Phe—Val 键(这一序列见 Bromer, Sinn, and Behrens, J. Amer. Chem. Soc., Vol. 79, P2807, 1958)。

实施例 4

本发明的蛋白酶用于降低粘度

将大豆粉(脱脂和去皮的大豆制成)在 95℃ 做成小球并随后磨碎。将大豆粉悬浮于去离子水中使含 15% 的干物质。向豆浆中分别

加入 5mg 蛋白酶 I 的酶蛋白质/每克干物质和 5mg 蛋白酶 II 的酶蛋白质/每克干物质。豆浆在 40℃ 和 pH5—6 的条件下培养。培养 1, 2 和 24 小时后使用带转轴 #31 的小样品接合器在 Brookfield LV DV III 粘度计上以 250rpm 测定豆浆的粘度。剩下的粘度如下:

	蛋白酶 I	蛋白酶 II
1 小时	73%	47%
2 小时	59%	38%

实施例 5

本发明的蛋白酶用于清洁隐形眼镜

在隐形眼镜清洁领域中,一般对隐形眼镜具有有效的消毒和清洁作用是必须的。消毒隐形眼镜最有效的方法之一是将它们浸入含 3% H_2O_2 , pH3.5 的溶液中至少 20 分钟。在将透镜插入眼中前用例如过氧化氢酶或铂片中和 H_2O_2 。令人遗憾的是到现在为止没有令人感兴趣的商用蛋白酶在这些苛刻的条件下表现出有良好的效果,因此在 H_2O_2 中和后需要有较麻烦的第二步,即经加入蛋白酶来去掉隐形眼镜上的蛋白沉积物。猪胃蛋白酶优于目前使用的丝氨酸蛋白酶 (Subtilisin carlsberg)。但讨厌的是病毒常与哺乳动物产物相联。

分别试验了本发明的蛋白酶 I 和 II 在去掉隐形眼镜上的变性蛋白质方面的能力。将它们与目前所用的丝氨酸蛋白酶及猪胃蛋白酶进行了比较,尽管猪胃蛋白酶从技术前景上而不是商用前景上令人感兴趣。

实验方案如下:

材料: 母鸡溶菌酶 (Hen Lysozyme)、L—6878, 来自 Sigma; “Rythmic” 隐形眼镜来自 Essilor (II 型透镜, 高水, 无离子); 蛋白酶

I 按上述生产；蛋白酶 II 按上述生产；猪胃蛋白酶，P—6887 来自 Sigma；枯草杆菌蛋白酶 carlsberg，清洁透镜蛋白酶（clear—Lens pro^R）（Novo Nordisk A/S）

标准缓冲液：0.05M Na₂HPO₄，0.9% NaCl，pH7.5。

试剂缓冲液：0.05M Na₂HPO₄，0.9% NaCl，3% H₂O₂，pH3.5。

闪烁液：Optiphase “Hisafe III”。

来自 Sigma 的母鸡溶菌酶通过还原甲基化用¹⁴C 来标记并纯化。

配制含 0.05M Na₂HPO₄，0.9% NaCl 和 0.2mg/ml 溶菌酶 pH7.5 的溶液。加入一定量的¹⁴C 标记的溶菌酶，使 CPM（每分钟计数值）大约为 200,000。将 1.0ml 溶液转移到闪烁玻璃管中，加入隐形眼镜并将玻璃管放入 85℃ 水浴中处理 30 分钟。

然后将隐形眼镜在 3×3ml 的试剂缓冲液中漂洗。用解剖刀将它切成四块，每块转移到含 3ml 试剂缓冲液的新闪烁玻璃管中。

加入不同量的试验蛋白酶使终浓度为 0.1, 0.5, 2.5, 5, 12.5, 50 和 200μg 酶蛋白/ml 试剂缓冲液。

反应在 25℃ 进行超过 4 小时。在 2×3ml 标准缓冲液中清洗 1/4 的透镜。加入 12ml 闪烁液并在 Packard 2500TR 液闪计数器中测量 CPM。

每种蛋白酶需要 4 个透镜来评估：在 2 天内进行 2 次测量，每个透镜需要一个空白对照。

计算质量相等的每个 1/4 块透镜中，在消毒/清洁过程中去掉的溶菌酶相对量。图 7 给出了不同蛋白酶的效果图。

两种蛋白酶都非常适于隐形眼镜的清洁目的。发现蛋白酶 I 与其它蛋白酶相比非常优越。蛋白酶 II 的效果与猪胃蛋白酶非常相

近，而目前使用的比氨酸蛋白酶表现出较差的效果。本发明的酸性蛋白酶的进一步的优势在于在泪液中发现的中性 pH 下活性较低。这降低了由于消毒/清洁后未完全洗净时透镜引起刺激的危险。

实施例 6

本发明的蛋白酶在烘烤中的应用

程序：

向 10 克糕粉中加入 5.9g 水。水中含有不同浓度的蛋白酶 I、蛋白酶 II 和 Neutrase^R（从 Novo Nordisk A/S 获得）。将生面在 Glutamic 22000 混合器中混合一分钟。然后将它放入塑料代中在 32℃ 下温育 25 分钟。

然后使用 Glutamic 混合器以 2% NaCl（水溶液）洗涤生面以去掉淀粉并留下生面中的面筋。

用手滚动面筋团直到匀质并将它压入一个大约 0.5cm 高、直径为 2.5cm、中央有一孔的环形模子中。面筋团在 25℃ 压 30 分钟使成形。接着，将面筋环悬挂在钩上并在孔中放入 2g 砝码。所有物质放入 25℃ 的水下。

然后每 15 分钟测量面筋环的伸展直到断裂。

酶的用量根据 Anson 单位 (AU) 开始尝试为 7.5 mAU/kg 粉，这一用量是 Neutrase^R 的最佳剂量。（在用于测定蛋白水解活性的 Anson—血红蛋白方法中，在温度为 25℃、pH7.5，反应时间为 10 分钟条件下消化变性的血红蛋白。用三氯乙酸 (TCA) 沉淀未消化的血红蛋白，用酚试剂测定 TCA 可溶性产物的量，酚试剂与酪氨酸和色氨酸产生蓝色。1 AU 是指以起始速率消化血红蛋白时每分钟释放的 TCA 可溶产品的量与酚试剂产生的颜色和 1 毫当量的酪氨酸相同

时的酶量)。

图 8 显示了不含酶和含有 Neutrase^R，蛋白酶 I 及蛋白酶 II 的面筋的伸长曲线。曲线意味着用相同剂量的酶测定 6—7 次，正如所见，所有 3 种蛋白酶的加入都导致面筋伸长得更快。

7.5mAU/kg 粉剂量的蛋白酶 I 使面筋脆弱的程度不及相同剂量的 Neutrase^R。在它断裂前，面筋环伸得更长且伸长速率较慢。

2.3mAU/kg 粉的蛋白酶 II 的加入(在这一系统中这是可能的最大量)使面筋脆弱的程度几乎与 7.5 mAU/kg 的 Neutrase^R 一样。面筋断裂稍迟，且曲线的形状不同。这表明蛋白酶 II 在使面筋脆弱中，其以 AU 为基础的效力大约是 Neutrase^R 的 3 倍。

总之，对于通常用于使面筋脆弱的化学制剂(广泛使用的一个例子是 SMS (Sodium metabisulphite))而言，本发明的蛋白酶是理想的选择。

实施例 7

本发明的蛋白酶在动物饲料中的应用

在下面所述条件下将基本上脱脂的饲料规格大豆与去离子水混合。水解分两步进行以模拟胃和小肠的 pH 条件。比较了本发明的蛋白酶 II 与 Bio—Feed Pro 的效果，后者由 Brenes 等 1993 证实当用于烘焙饮食时引起重量收益改进和饲料效率提高。

水解条件：

水解混合物：70g 基本上脱脂的大豆

330g 去离子水

温度：40℃

pH：第一步 4.0

第二 6.5

时间：第一步 180 分钟

第二步 180 分钟

酶：第一步：I) 胃蛋白酶 1.92g (Merckart. 7190)

II) I+Bio—Feed Pro 3. 0L 5. 5AU/kg 大豆

III) I+蛋白酶 II 0.19 AU/kg 大豆

第二步：I) 胰酶 6g (Sigma P1750)

II) I+Bio—Feed Pro 3. 0L 5. 5AU/kg 大豆

III) I+蛋白酶 II 0.19 AU/kg 大豆

Bio—Feed Pro^R 可从 Novo Nordisk A/S 获得。蛋白酶 II 按上面所述获得。

酶在开始 0 分钟时加入。在水解过程中，随着反应的进程测定白利糖度 (Brix) 和渗透压。根据 Adler—Nissen (1986)，渗透压值可用于以下面的等式计算水解程度 (DH)：

$$DH = \frac{\Delta C}{S\% \times f_{osm}} \times \frac{1}{\omega} - \frac{1}{h_{tot}} \times 100\%$$

其中 Δ 是渗透压 mOSM 的增加，s% 是蛋白质浓度， ω 是渗透压计的校准系数， h_{tot} 是蛋白质底物中肽键的总数 (mequv/g 蛋白质)， f_{osm} 是将 % 转化为 g/kg H₂O 的系数。

$$f_{osm} = \frac{1000}{100 - DM\%} =$$

进一步分析了 90 分钟 (第一步) 和 0.15 和 180 分钟 (第二

步)后水解混合物N—成份磺基水杨酸可溶相的平均分子量。用下面方法进行分子量分析:

1. 原理:

样品经稀释,过滤并注射到液相色谱系统中,以凝胶透过色谱(GPC)的方式操作。这种分离技术使液体流过填有孔直径被精确限定的多孔颗粒的柱子。当具有不同分子大小的肽溶液通过柱时,小肽能流进孔中而大肽被孔排除。于是,由于大肽从柱中洗脱比小肽快,因此根据分子大小(和重量)将溶液中的肽分离。用检测器在柱的出口连续测量流出物,用具有已知分子量的肽来校准色谱系统。

2. 色谱装置

2.1 HPLC 系统由下列部分组成:

高压泵, WATERS M 510, 流速为 0.7ml/分钟。

注射器, Waters WISP M 710

检测器, Waters M 440, 波长延伸到 214nm。

2.2. GPC 柱, 3×TSK G 2000 SWXL, 7.8mm×300mm, 以一系列相连并在环境温度下操作。

2.3. 综合/数据处理, 选择 810/820 GPC 的 Waters 820 MAXIMA SIM 色谱数据系统。

3. 试剂

3.1. 磷酸盐缓冲液, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

3.2. 氯化铵, NH_4Cl

3.3. 三氟乙酸 (TFA), CF_3COOH

3.4: 乙腈, CH_3CN

3.5 移动相:

0.05M 磷酸盐缓冲液/含 0.1% TFA 和 25%乙腈的 0.5M 氯化铵溶液。

4. 描述

4.1. 校准:

经注射已知分子量的为数众多的多肽标准品的方法来校准色谱系统。给出每个标准品分子量对为从柱上洗脱该多肽观察到的所需移动相体积的半对数。经计算最小值平方计算最适第 3 项多项式。曲线代表校准曲线。

4.2. 分析

样品稀释/溶解于移动相中达到大约 5mg/ml。通过 22μm 滤膜过滤溶液并取 20μl 用于注射到色谱中。记录检测器读数与洗脱体积。记录的曲线(色谱图)表示了样品实际分子量的分布。为了便于计算(如计算累加的重量分布和平均分子量),将色谱图分成小的时间(和洗脱体积)片段,每个片段的特征为具有洗脱体积和在该时间间隔内的色谱图面积。

5. 计算:

以重量和数目平均分子量形式给出结果。

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i (A_i * M_{w,i})}{\sum_i A_i}, \quad \bar{M}_n = \frac{\sum_i A_i}{\sum_i (A_i / M_{w,i})}, \quad \text{其中}$$

$\bar{M}_w$: 重量平均分子量

$\bar{M}_n$: 数目平均分子量

A_i : 每片段色谱图的面积, 以在每段时间间隔内累加的检测器读数来测量。

$Mw. i$: 每个片段相应的分子量。以校准曲线的方法使用该时间间隔内的平均洗脱体积来计算该值。

结果:

OBrix, mOSM 和 %DH 的值在下面表中列出:

用胃蛋白酶, BIO-FEED PRO, 蛋白酶 II 和胰酶水解饲料大豆

参数 : °BRIX											
步骤 I, 分钟											
酶	0	5	10	15	30	45	60	90	120	180	
胃蛋白酶	5.09	6.135	6.505	6.625	6.9275	7.345	7.745	8.175	8.695	9.195	
BIO-FEED PRO	5.09	6.125	6.325	6.545	7.245	7.465	7.565	8.185	8.545	9.105	
蛋白酶 II	5.09	6.505	6.845	7.105	7.825	8.405	8.605	9.305	9.705	10.205	

参数 : °BRIX											
步骤 II, 分钟											
酶	180	185	190	195	210	225	240	270	300	360	
胃蛋白酶	12.965	15.135	15.4025	15.637	16.135	16.415	16.705	17.075	17.437	18.075	
BIO-FEED PRO	12.965	15.165	15.165	15.725	16.105	16.4	16.525	16.885	17.285	17.805	
蛋白酶 II	13.605	15.605	15.925	16.025	16.365	16.685	16.885	17.105	17.505	18.145	

参数 步骤 I, 分钟												
酶	0	5	10	15	30	45	60	90	120	180		
胃蛋白酶	347	362	362	360.5	363.5	366	368	370.5	373	381.5		
110-FEED PRO	347	365	364	366	367	371	373	379	380	385		
蛋白酶 II	347	371	382	391	411	421	427	439	447	463		

参数 步骤 II, 分钟												
酶	180	185	190	195	210	225	240	270	300	360		
胃蛋白酶	468	996	1009	1015.5	1037.5	1054.5	1068.5	1087.5	1111	1148		
110-FEED PRO	468	1013	1017	1033	1048	1058	1069	1094	1113	1145		
蛋白酶 II	548	1118	1127	1135	1152	1161	1176	1201	1227	1284		

参数 : mOSM 增加 步骤 I, 分钟											
酶	0	5	10	15	30	45	60	90	120	180	
胃蛋白酶	0	15	15	13.5	16.5	19	21	23.5	26	34.5	
BIO-FEED PRO	0	18	17	19	20	24	26	32	33	38	
蛋白酶 II	0	24	35	44	64	74	80	92	100	116	

参数 : mOSM 增加 步骤 II, 分钟											
酶	180	185	190	195	210	225	240	270	300	360	
胃蛋白酶	0	328	541	547.5	569.5	586.5	600.5	619.5	643	680	
BIO-FEED PRO	0	545	549	565	578	590	601	626	645	677	
蛋白酶 II	0	570	579	587	604	613	628	653	679	736	

参数 : % DH 步骤 I, 分钟											
酶	0	5	10	15	30	45	60	90	120	180	
胃蛋白酶	0	2.86	2.86	2.57	3.14	3.62	4.00	4.47	4.95	6.57	
BIO-FEED PRO	0	3.43	3.24	3.62	3.81	4.57	4.95	6.09	6.28	7.24	
蛋白酶 II	0	4.57	6.66	8.38	12.19	14.09	15.23	17.52	19.04	22.09	

下面列出了分子量分析的结果：

	步骤 I	步骤 II		
	90 分钟	0 分钟	15 分钟	180 分钟
胃蛋白酶	960	1070	680	520
Bio-Feed Pro	880	1020	690	510
蛋白酶 II	650	630	530	480

由于未消化的大豆蛋白质在 pH6.5 的可溶性比在 pH4.0 时更强，因此当 pH 调到 6.5 时表观分子量增加。

可见蛋白酶 II 与 Bio-Feed Pro 相比释放更多的蛋白质和多肽，并降解更多的蛋白质，因此可得出结论：蛋白酶 II 优于 Bio-Feed Pro。

由于本发明的蛋白酶 II 在酶性 pH 范围具有最佳活性，因而该酶在动物胃中已开始作用，因此当它用于幼年动物饲料中时，与 Bio-Feed Pro 相比会使饲料效率得到综合提高。上面结果证实了这一结论。

序列描述

(1) 一般资料

(i) 申请人:

(A) 姓名: NOVO NOROISK A/S

(B) 街道: NOVO Alle

(C) 城市: Bagsvaerd

(E) 国家: 丹麦

(F) 邮编(邮编号): DK-2880

(G) 电话: +45 44448888

(H) 电传: +45 44493256

(I) 电报: 37304

(ii) 发明题目: 棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)蛋白酶

(iii) 序列数: 2

(iv) 计算机可读形式

(A) 媒体类型: Floppy disk

(B) 计算机: IBM PC 兼容性

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: Patent In Release #1.0. Version # 1.25

(EPO)

(2) SEQ ID NO:1:资料:

(i)序列特征:

(A)长度:1124 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单链

(D)拓扑:线型

(ii)分子类型:cDNA

(iii)假定的:非

(iv)反义:非

(v)原始来源:

(A)微生物:棘孢曲霉

(xi)序列描述:SEQ ID NO:1:

AATTAAGCAT CCTCCATCTT CAAAGCTCAA TCTCGCTAAC TCCCGCTCTT CTCTCGATCT	60
CATCATCCCA ATAACCTCGGA CACAATGAAG ACCTCTGCTC TCTTGACCGC TGGCCTGTTG	120
GCCACCGCTG CTATTGCTGC TCCTCTCACC GAGAAGCGCG CAGCTGCTCG CGCTGCCAAG	180
CGTGGCACCA GCCGCAAGAG CAACCCCCCT CTCAAGCCCG GCACCAGCGA GGCCATCAAC	240
CTGACCGGCT CCAAGAACAC CGAGTACTCG TCCAAGTGGG CCGGCGCCGT GCTCATCGGC	300
ACCGGCTACA CTGCCGTCAC CGCCGAGTTC ACCATTCCCA CCCCCTCTCT CCCCTCCGGT	360
GCCTCCAGCC GCGAGCAGTA CTGTGCCTCC GCCTGGGTCG GTATCGACGG TGACACCTGC	420
GACACCGCCA TCCTGCAGAC CGGTCTCGAC TTCTGTATCG AGGGCAGCAC CGTTAGCTAC	480
GACGCCTGGT ACGAGTGGTA CCCCAGTAT GCCTACGACT TCAGCGGCAT CAGCTTCTCC	540
GCCGGCGACG TTGTCAAGGT CACCGTCGAC GCCACCAGCA AGACCGCCGG TACCGCCACC	600
GTCGAGAACG TCACCAAGGG CACCACCGTC ACCCACCACCT TCAGCGGTGG TGTGATGGT	660
GATCTCTGGG AGTACAACGC CGAGTGGATC GTCGAGGACT TCGAGGAGAA CTCCTCCCTC	720
GTCCCTTCG CCGACTTCGG CACCGTCACC TTCTCCAGCG CCTACGCCAC CAAGAGCGGC	780
TCCACCGTTG GTCCCTCCGG CGCCACCATC ATCGACATCG AGCAGAACAA CAAGGTTCTC	840
ACCTCCGTCT CGACCTCCAG CAGCTCCGTC ACCGTCGAGT ATGTTTGAAG GGGACTCCTG	900
GGGATGTGAA GCGAGAATGC GGCTTGGGTG GTTGGAGGTC CTTTGGGACG TCGAACGCCT	960
AGGATTCAAC GGGATGAGAT CATTGGAAAT GAAGACGAGA ATGAGCGAAT ACTGTCACTG	1020
ATTGAGATTG TGCTTTGTTG ATTGTGTTAG GGGCTTGCCT CTGAAAATTG AGCTTAGTGT	1080
TGCTGCAATA TGATTGCTGT GGTGAGAAA AAAAAAAAAA AAAA	1124

(2) SEQ ID NO:2:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1425 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线型

(ii)分子类型:cDNA

(iii)假定的:非

(iii)反义:非

(v1) 原始来源:

(A) 棘孢曲霉

(xi)序列描述:SEQ ID NO:2:

```

CTGCTTCTCC TTCTCTTCTT CCTCGTGATA TCTGCTTGAA CATCTCCTCA TCATGGTCGT      60
CCTCAACAAG GCTGCAGCCC TTCTTCTGGG TCTGACCACC GCCGCCACTG CGGCTCCCT      120
GGCCGAGAAG CAGGCTTCTG TCCCGGTCAA GAACTTCTCC GTCAAGCAGG TCGAGAAGGA      180
GGGCAGCAAG GGACGTACCG TTAACCTGCC GGGTCTGTAT GCGAATGCGC TGGCCAAGTA      240
TGGCGCCCAG GTGCCGCCCA CCGTCAAGGC CGCCGCCGTC AGTGGCAGCG TCGTGACCAC      300
CCCGCAGGCC AACGACGTCT CCTACCTGAC CCCCGTCACC GTGGGCAGCT CGACCTTGAA      360
CCTGGACTTC GACACCGGAT CCGCCGATCT CTGGGTCTTC TCCTCGGAGC TGGCCGCCTC      420
CTCGCGCACC GGCCACAGCA TCTACACCCC CGGCAGCACC GCCCAGAAGC TGTCCGGCTA      480
CAGCTGGAGC ATCTCCTACG GCGACGGCAG CTCGCCCAGC GCGGACGTCT ACAAGGACAA      540
GGTCACCGTC GGCACGGTGA CGGCCAGCAG CCAGGCCGTC GAGGCCGCCA GCCGCATCAG      600
CTCCGAGTTC GTCCACGACA CCGACACCGA CCGTCTGTTG GGTCTGGCCT TCAGCTCGAT      660
CAACACGGTC TCCCCCGGG CCCAGACCAC CTTCTTCGAC ACCGTCAAGT CCAGCCTGGA      720
CAGCCCCCTC TTCGCCGTCG ACCTGAAGTA CCACGCCGCC GGTACCTACG ATTTCGGGTT      780
CATCGACTCC TCCAAGTACA CCGGCTCCCT GACCTACGCC AACGTCGACG ACTCCCAGGG      840

```

CTTCTGGCAA TTCACCGCCA GCGGCTACAG CGTGGGCTCG GCCTCCCACT CCTCCTCTTT	900
CTCCGCCATT GATGACACCG GCACCACCCT CATCCTCCTC GACGACTCCA TCGTCTCCAC	960
CTACTACAAG AGCGTCAGCG GCGCCTCCTA CAGCTACAAC TACGGCGGCT ACGTCTTCTC	1020
CTGCTCCGCC AGCCTGTCCA ACTTCAGCGT CAAGATCGGC TCCTACACCG CCGTCGTCCC	1080
CGGCAAGTAC ATCAACTACG CCCCCATCTC CACCGGCAGC TCCACCTGCT ACGGCGGCAT	1140
CCAGTCCAAC GAGGGCCTCG GTCTGTCCAT CCTGGGTGAT GTCTTCCTCA AGAGCCAGCA	1200
CGTGGTCTTT GACTCGCAGG GTCCGAGAAT CGGGTTCGCC GCGCAGGCCT AGATCGTTTG	1260
ATTGGGGTTG TGGATGTGGG TGATGCTTGG TGGTGGTCTG AGTCGTGGTC TATGTGGGCG	1320
TGAATATAGT ACTGTATATA GTACTGTACA TAGGGGGGTG GTGAACATAT GGTCTGGTCG	1380
ATGAATATAT GTCTTTGATG TTATGCTTCT GTGCAAAAAA AAAAA	1425

参考文献

Aviv, H. & Leder, P. 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69: 1408-1412.

Becker, D. M. & Guarante, L. 1991. Methods Enzymol. 194: 182-187.

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. 1979. Biochemistry 18: 5294-5299.

Gubler, U. & Hoffman, B. J. 1983. Gene 25: 263-269.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74: 5463-5467.

Brenes, A. et al., Poultry Science, 72, 2281-2293, 1993.

Adler-Nissen, J. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins, Elsevier Applied Science Publishers London and New York, 1986.

Takahashi, K. et al., 1991, The Primary Structure of *Aspergillus niger* Acid Proteinase A*, The Journal of Biol. Chemistry, Vol. 266, No. 29, pp. 19480-19483.

Choi, G.H. et al., Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapepsin, an aspartic protease from *Cryphonectria parasitica*, 1993, Gene 125:135-131.

Gomi, K. et al., 1993, Cloning and Nucleotide Sequence of the

Acid Protease-encoding Gene (*pepA*) from *Aspergillus oryzae*,
Biosci. Biotech. Biochem., 57(7):1095-1100.

Inoue, H. et al., 1991, The Gene and Deduced Protein Sequences
of the Zymogen of *Aspergillus niger* Acid Proteinase A*, The
Journal of Biological Chemistry, Vol. 266, No. 29, pp. 19484-
19489.

Berka, R.M. et al., 1993, Isolation and characterization of the
Aspergillus oryzae gene encoding aspergillopepsin O, Gene,
125:195-198.

Berka, R.M. et al., 1990, Molecular cloning and deletion of the
gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*, Gene
86:153-162.

Berka, R.M. et al., 1990, Corrigendum, Molecular cloning and
deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from
Aspergillus awamori, Gene 96:313.

图 1

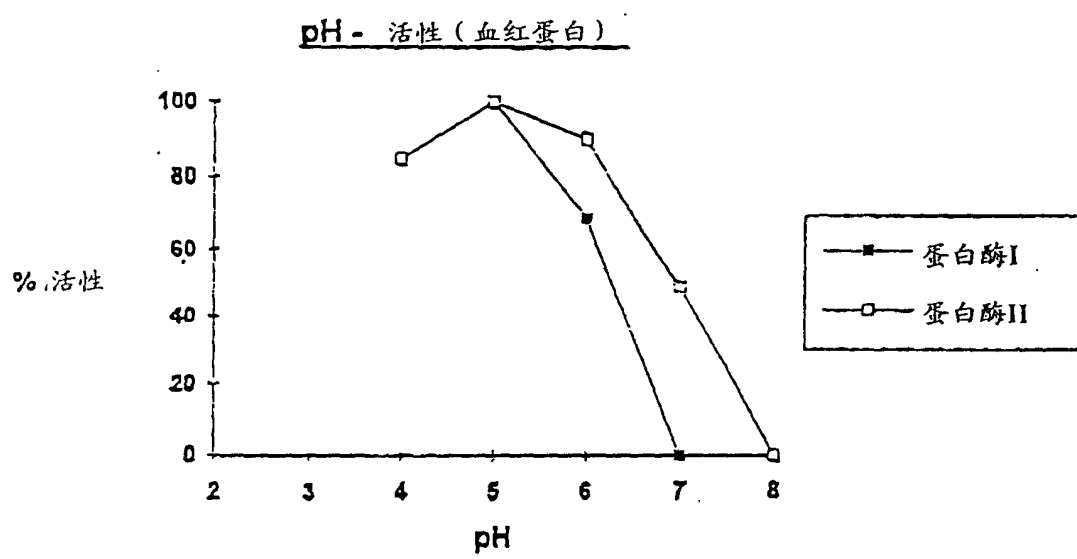


图 2

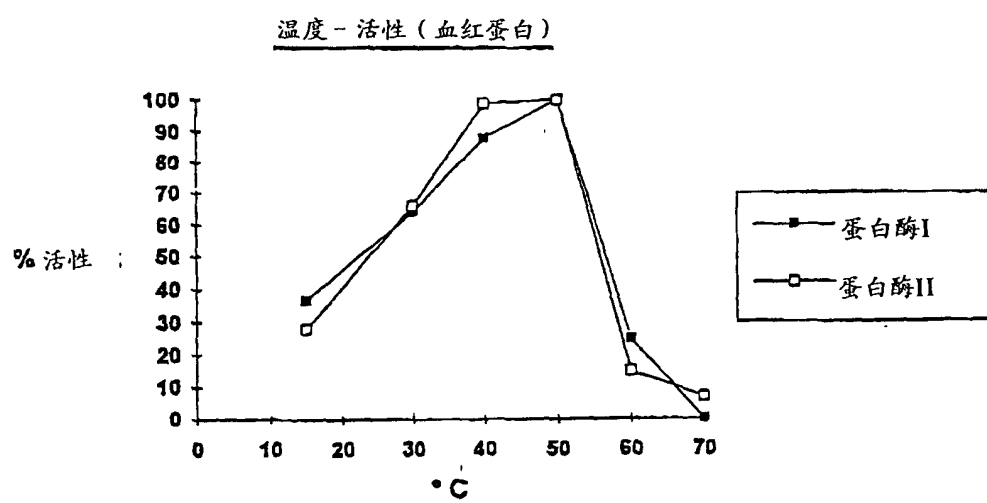
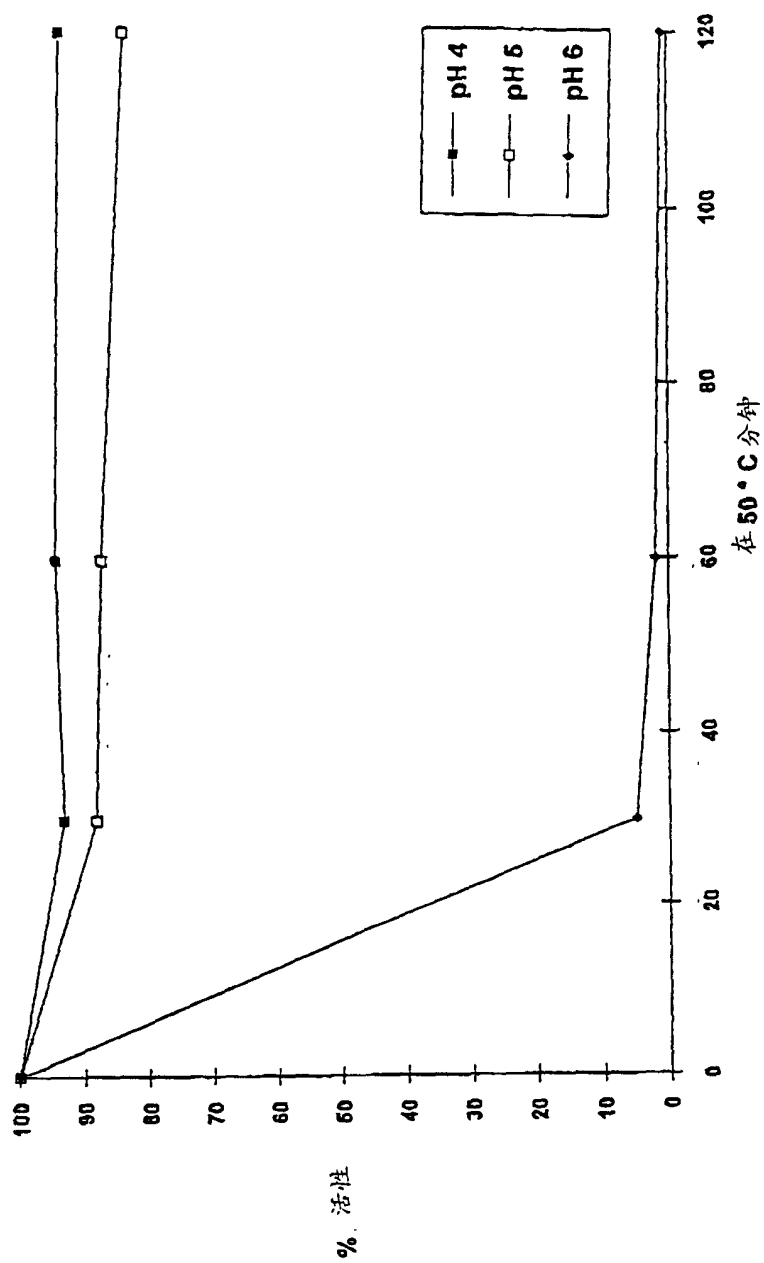


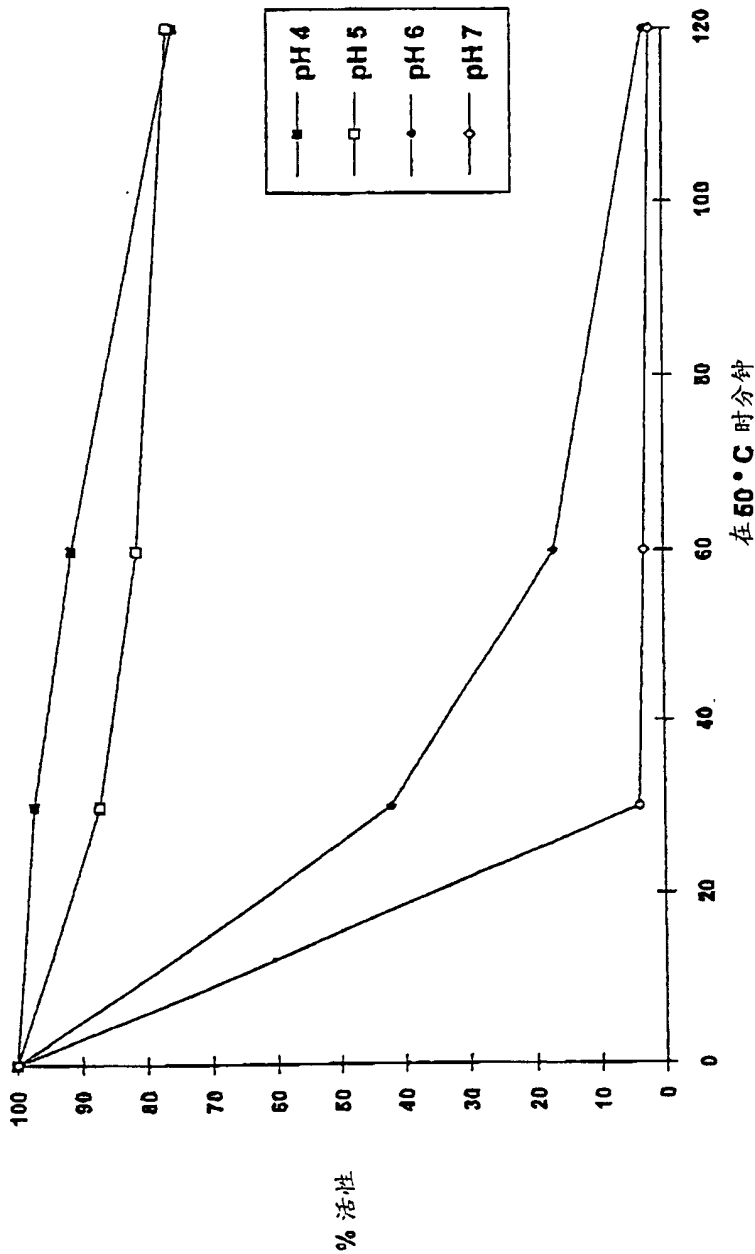
图 3

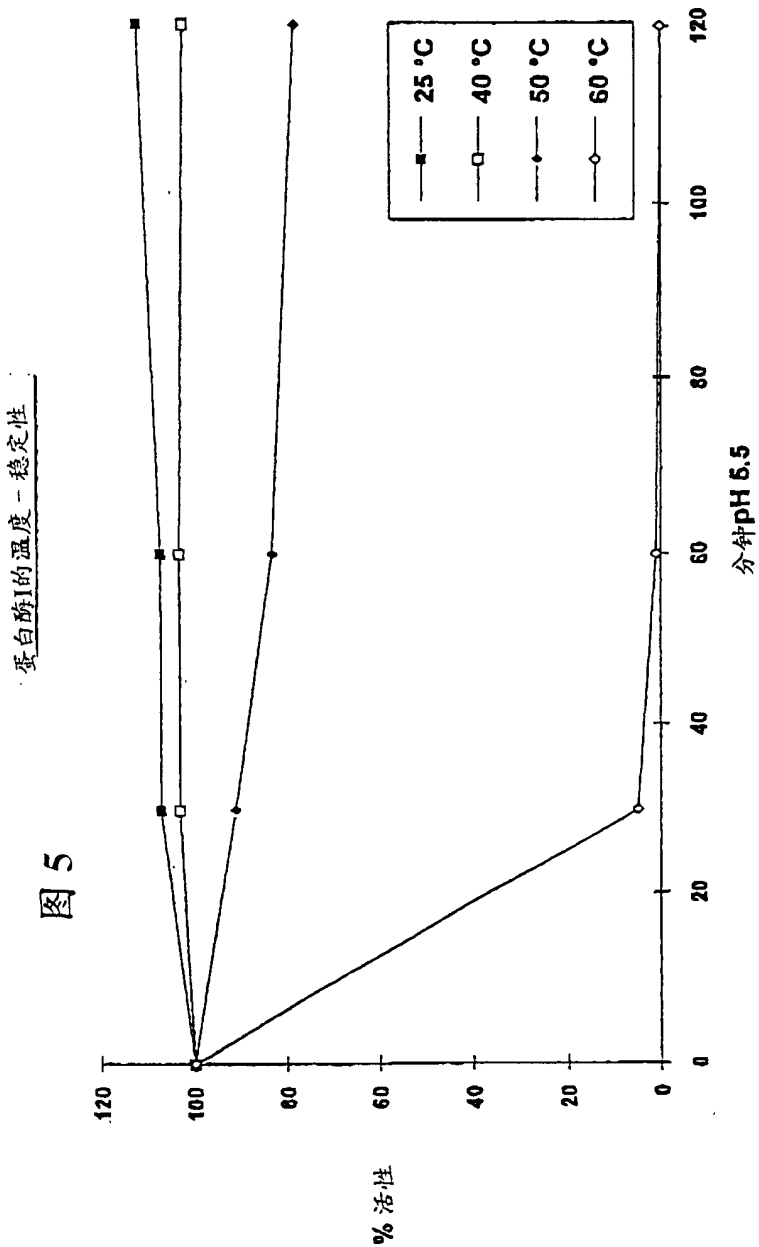
蛋白酶I的pH-稳定性



蛋白酶II的pH-稳定性

图 4





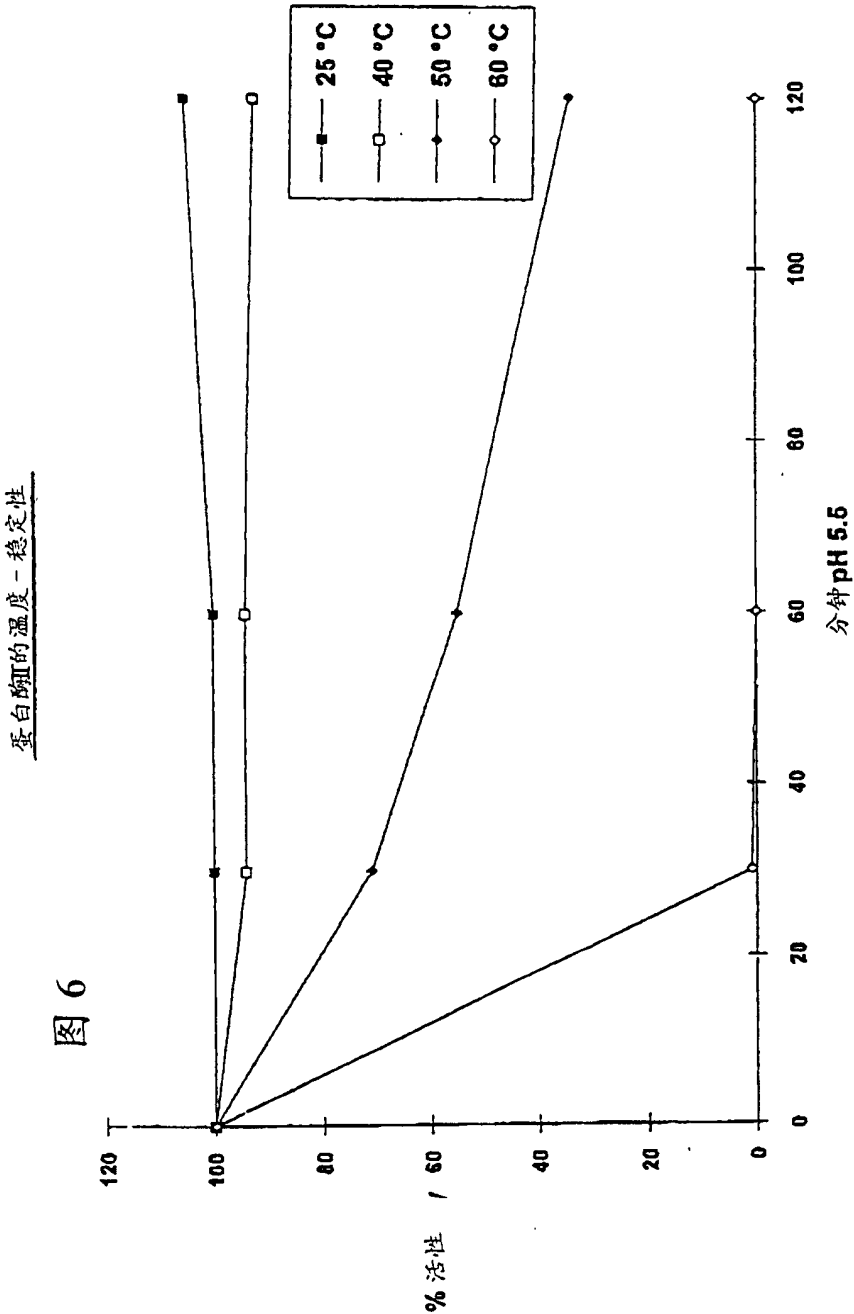


图 7
在 3% H₂O₂ pH 3.5 时的蛋白酶效果

