

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

A23K 1/00



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 9/16 C12N 9/24
C12N 15/82

[21] 申请号 96191368.1

[43]公开日 1997 年 12 月 17 日

[11] 公开号 CN 1168084A

[22]申请日 96.11.6

[30]优先权

[32]95.11.7 [33]EP[31]95203018.7

[32]95.11.14[33]US[31]08/006,723

[86]国际申请 PCT/EP96/04881 96.11.06

[87]国际公布 WO97/16981 英 97.5.15

[85]进入国家阶段日期 97.7.7

[71]申请人 吉斯特·布罗卡迪斯股份有限公司

地址 荷兰代尔夫特

[72]发明人 R·F·比德克尔

[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 1 页 说明书 9 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 包含转基因植物材料的稳定组合物

[57]摘要

本发明公开了包含作为有效成分的多肽的热变形处理的组合物。所说的组合物可以通过使包含转基因植物材料的原材料经受热变形处理（如造粒、挤压或膨胀）获得，由于在所说植物材料中转基因的表达，所说的多肽已经在该植物材料中生物合成。本发明的组合物较好地是用作动物饲料或其预混物。

权 利 要 求 书

1. 一种包含作为有效成分的多肽的热变形处理的组合物，所说的组合物可以通过使包含转基因植物材料的原材料经受热变形处理获得，由于在所说植物材料中转基因的表达，所说的多肽已经在该植物材料中生物合成。

2. 按照权利要求 1 的组合物，其中所说的热变形处理选自造粒、挤压和膨胀，或这些处理的结合。

3. 按照权利要求 1-2 任一之组合物，其中所说的转基因植物材料是种子。

4. 按照权利要求 1-3 任一之组合物，其中所说的多肽对于转基因植物是异源的。

5. 按照权利要求 1-4 任一之组合物，其中所说的多肽是酶。

6. 按照权利要求 5 的组合物，其中所说的酶选自磷酸酶、糖酶、蛋白酶以及脂酶。

7. 按照权利要求 6 的组合物，其中所说的酶是真菌肌醇六磷酸酶和/或真菌木聚糖酶。

8. 权利要求 1-7 任一所限定的组合物用作动物饲料或其预混物的用途。

9. 一种用于促进动物生长的方法，其特征在于用包含权利要求 1-7 任一所限定的组合物的饲料饲喂动物。

10. 一种制备包含作为有效成分的多肽的热变形处理的组合物的方法，其特征在于使包含转基因的植物材料的原材料受到热变形处理，由于在所说植物材料中转基因的表达，所说的多肽已经在该植物材料中生物合成，所说处理优选地选自造粒、挤压或膨胀。

说明书

包含转基因植物材料的稳定组合物

发明所属技术领域

本发明涉及在工业处理(如食品或饲料组合物的制造)中酶的应用。

发明背景

在家畜饲养中应用酶已成为极平常的措施。这些酶在由工业酶生产者操作的大规模发酵罐中生长的微生物产生。发酵期的最后,微生物的肉汤常经历一系列过滤步骤以从酶中分离生物量。酶溶液或是在添加各种稳定剂之后作为液体或是处理成干制剂后出售。

酶液和干制剂由饲料工业以商业规模利用。液体在造粒(pelleting)之后用于饲料以防止通过造粒处理引起的酶的热失活。问题是在最终饲料制剂中酶的数量十分小,这使实现酶分子在饲料中均质分布比较困难。液体明显地比干燥成分混合起来更困难。在造粒之后把液体加到饲料中需要特定的设备,而目前大多饲料制造厂中没有这些设备。

另一方面,酶的干制剂有在造粒过程中酶热失活的缺点。在造粒过程中,饲料通过模具压缩,形成的条块切割成不同长度的合适的小丸。当进入造粒设备时团块的湿度通常在大约18%到大约19%之间。在造粒之后,立即把温度升高到60-95℃。高含水量和高温的结合影响对大多数酶有害。这些缺点在饲料的其它类型的热变形处理中(如挤压(extrusion)和膨胀(expansion))也同样存在。

为了克服这些问题,有人发表了一种用于生产包含一种或多种酶的热稳定性酶预混物的方法,所说的酶在商业饲料造粒处理中保留了有效水平的活性(Haarakilta, A(1988)欧洲专利申请#0257 996 B1)。所说方法包括的步骤如下:

把生理上可接受的并能吸收含水的酶溶液的谷物载体和含水的酶溶液混合一段时间,这一时间足以把一种或多种酶吸附在载体上以形成载体/酶复合物;造粒载体/酶复合物;然后把造粒的载体/酶复合物干燥到

含水量在 7%到 15%之间, 优选地是小于大约 10%(重量比)。
这种方法很费工, 而且就我们所知没有产生提高的造粒抗性。

各种酶制造厂商开发了不同的制剂方法以在饲料造粒和存储期间提高干酶产品的稳定性。已有人提出, 例如, 特征在于产品颗粒被涂上一层粒子的制剂会提高对造粒条件的抗性(WO 92/12645)。这些努力强调了这一问题的重要性和工业上对解决这一应用问题的需要。

发 明 概 述

现在, 我们令人惊奇地发现: 当酶以转基因植物材料的形式添加到饲料中时, 酶对热变形处理(如造粒)更具抵抗力, 在植物材料中这些酶通过转基因的表达产生。这样, 本发明公开了包含作为有效成分的多肽的热变形处理的组合物, 所说的组合物可以通过使包含转基因植物材料的原材料经受热变形处理获得, 由于在所说植物材料中转基因的表达, 所说的多肽已经在该植物材料中生物合成。优选的热变形处理是造粒、挤压和膨胀。

本发明公开了这些组合物作为动物饲料或其预混物的用途。具体地说, 在促进动物的生长的过程中, 使用本发明的组合物, 其中给动物饲喂包含这些组合物的饲料。

本发明进一步公开了包含作为有效成分的多肽的热变形处理的组合物的制备方法。

发 明 详 述

在本发明中应用的热变形处理经常在商业饲料处理中使用, 其中处理方法以许多形式存在, 如膨胀、挤压和造粒, 或这些方法的结合。所有这些处理的特征在于热能(通常以蒸汽的形式)和机械能(例如, 通过螺旋驱动饲料)的输入。

在饲料生产中, 造粒是经典的处理方法, 它也可以如任何原材料一样应用热变形处理。混合原材料, 并在加上几巴的低压蒸汽之后把原材料转移到旋转模具上。模具通常包含几百个洞, 产物通过洞。通过模具里的旋转滚筒挤压。

挤压是一种用于饲料生产的替代方法, 它可以如用于任何原材料一样用作热变形地处理。

原材料放在通常由几个较小的模具的压力环组成的一个无底的螺丝

上。此螺丝把产物推进模具中。温度升高是通过螺丝和外套之间的产物摩擦和压力增加造成的。挤压机的内部和外部的压力不同导致部分水在出口汽化，这样就使产物膨胀。

膨胀是十分类似于挤压但不以限制的方式使材料成型的方法，因为它通常不通过模具。

产生用于动物饲料中的酶的替代方法已通过在植物和植物种子中表达编码饲料酶(如微生物肌醇六磷酸酶)的基因发明出来(Pen 等， EP-A-0 449 375)。直接的或是在处理后植物或植物种子表达的这些酶的使用与动物饲料中的使用是协调的。

本发明的转基因植物材料优选地包含一种或多种所需的多肽，这种多肽是包含在衍生植物材料的植物中的转基因的表达产物。这通过把包含编码所需的多肽的 DNA 序列的表达构建体导入植物来达到，其中多肽具有相应的活性，例如肌醇六磷酸酶(其中详尽的描述可在 Pen 等， EP-A-0 449 375 中找到)。本文中的转基因植物和转基因植物材料定义为包括植物(以及所说植物的部分和细胞)及其后代，这些后代利用重组 DNA 技术遗传改良以在植物或植物器官中产生、增强或改变所需的多肽的产生。在本文中，转基因可理解为指在转基因植物中的特定的遗传修饰，即核苷酸序列。在本发明的组合物中，多肽用作活性成分，由此，活性成分被限定为由转基因编码的。

在本发明中使用的多肽在转基因植物中可在所有组织、所有发育阶段组成性地产生。在某些情况下，如在植物细胞壁降解酶存在的情况下，可能需要限制转基因表达到植物的特定部分，在此部分中，表达的所需的多肽不干扰宿主植物的发育。因此，编码所需多肽的基因也可以以阶段和/或组织特异性的方式表达，或者可替代的是，可把这些基因置于可诱导的启动子的控制之下。在一个优选的实施方案中使用了完整的或磨碎(milling or gringing)之后的种子，其中所需的多肽使用种子特异性启动子特异性表达。然而，本领域技术人员知道：多肽在其它植物器官中表达是同样切实可行的，而且如在本发明中公开的应用中可以产生类似的优点。

植物物种的选择主要由植物或其部分的预期的用途和对转化的适应性确定。在本发明内，所选择的植物包括(但不限于)以下作物：生产可食用

花的作物，如花椰菜类(如甘蓝)、朝鲜蓟(洋蓟)，生产水果的作物，如苹果类(苹果属，例如 *Malus domestica*)、香蕉类(芭蕉属，例如，小果野蕉)、浆果类(如葡萄干，茶藨子属，例如，红醋栗)、樱桃类(如甜樱桃，梅，例如，欧洲甜樱桃)、黄瓜类(黄瓜属，例如，黄瓜)、葡萄类(葡萄属，例如，葡萄)、柠檬类(柠檬)、甜瓜类(甜瓜)、坚果类(如核桃，核桃属，例如，核桃；花生，落花生)、桔子类(柑桔属，例如，*Citrus maxima*)、桃类(梅属，例如，桃)、梨类(梨属，例如，洋梨)、梅类(李属，例如，欧洲李)、草莓类(草莓属，例如，*Fragaria moschata*)、番茄类(番茄属，例如，番茄)，叶用作物，如苜蓿类(苜蓿属，例如，紫苜蓿)、甘蓝类(例如，甘蓝)、菊苣类(菊苣属，例如，*Cichorium endivia*)、韭类(葱属，例如，葱)、莴苣类(莴苣属，例如，生菜)、菠菜类(菠菜属，例如，菠菜)、烟草类(烟草属，例如，烟草)，根用作物，如葛类(竹芋属，例如，竹芋)、甜菜类(甜菜属，例如，甜菜)、胡萝卜类(*Daucus*，例如，*carota*)、木薯类(*Manihot*，例如，*esculenta*)、萝卜类(芸苔属，例如，芜菁)、小萝卜类(萝卜属，例如，蓝花子)、薯蓣类(薯蓣属，例如，有刺甘薯)、甘薯(*Ipomoea batatas*)以及生产种子的作物，如豆类(菜豆属，例如，菜豆)、豌豆类(豌豆，例如，豌豆)，大豆类(大豆属，例如，大豆)、小麦类(小麦属，例如，小麦)、大麦类(大麦属，例如，大麦)、玉米类(玉蜀黍属，例如，玉蜀黍)、稻类(稻属，例如，稻)、欧洲油菜、小米(稷属)、向日葵类(向日葵)、燕麦类(燕麦)，生产块茎的作物，如大头菜类(芸苔属，例如，甘蓝)，土豆类(茄属，例如，马铃薯)等等。

本发明的优点是：当多肽以有效成分添加到组合物中并以转基因植物材料的形式存在时，与常规的多肽添加到组合物中的方式相比，多肽在热变形处理步骤期间(如造粒)对灭活具有更大的抗性。很明显，这些优点不必要限制在本申请的特定实施例的特定实施方案中，即造粒并用作动物饲料的酶(如添加到组合物中的肌醇六磷酸酶或木聚糖酶)。相对地，本发明的优点使用于任何受热变形处理并包含一种或多种多肽作为有效成分的组合物。在多肽有敏感的生物学活性的情况下(如对热灭活敏感)，本发明的优点就更突出。在本文中，热敏感的多肽定义为这样的多肽，即在受到本发明中使用的热变形处理时这些多肽失去主要的生物活性。

在本发明的一个优选的实施方案中，多肽和/或编码它们的 DNA 序列相对于 DNA 序列在其中表达的转基因宿主植物是异源的。本文中的异源可理解为 DNA 序列和/或多肽对宿主有机体不是天然的，即它们源于其它植物种类、哺乳动物或微生物，如真菌或细菌。当糖基化的蛋白质在转基因植物中表达时，本发明尤其是有优势的，它们的糖基化可能和这些蛋白质的天然存在的对应物不同。

包括在本发明中的优选的酶是在动物饲料中使用的酶。本文中的动物饲料可理解为也包括宠物饲料。这些酶的功能是提高饲料转化率，例如，通过降低粘性或通过降低一定的饲料化合物的抗营养影响。另外，可以使用饲料酶(例如，肌醇六磷酸酶)以减少粪便中对环境有害的化合物的量。用于这些目的优选的酶有：磷酸酶，其中优选地是肌醇六磷酸酶和/或酸性磷酸酶；糖酶，如淀粉分解酶和植物细胞壁降解酶(其中优选地是纤维素酶、半纤维素酶或半乳聚糖酶)；蛋白酶(优选的蛋白酶是中性和/或酸性 pH 值最优的蛋白酶)；脂酶(其中优选的是磷脂酶，如哺乳动物的胰磷脂酶 A2)。此外，包括在本发明中的多肽也包括非酶促生物活性物，如用作疫苗和/或多肽的、用工程方法使其具有加大含量的必需氨基酸的抗原决定簇。

本领域技术人员明白：本发明同样地适用于所需的多肽的组合，其中所说的组合包括表达各种所需多肽的不同转基因植物的组合，另外还包括在一种转基因植物中共表达的各种所需多肽的组合。

在本发明的一个具体实施方案中，当黑曲霉肌醇六磷酸酶包含在欧洲油菜(*Brassica napus*)的磨碎的种子中，而且酶的基因在其中表达时，试验了黑曲霉肌醇六磷酸酶的造粒稳定性。黑曲霉肌醇六磷酸酶基因的克隆在其它文献中有描述(van Gorcom 等 EP-A-0 420 358)。在本发明的另一个具体实施方案中，曲霉属内源木聚糖酶(endoxylanase)的对造粒稳定的制剂通过编码这种酶的真菌基因在烟草种子中表达提供。曲霉属内源木聚糖酶基因的克隆由 de Graaff 等在 EP-A-0 463 706 中详细描述。

实施例 1

黑曲霉肌醇六磷酸酶基因在 cruciferin 启动子控制下 在欧洲油菜中稳定的种子特异性表达

应用于真菌肌醇六磷酸酶在欧洲油菜中的种子特异性表达的方法之细节由 Pen 等在 EP-A-0 449 375 中描述(1991)，本文一并参考。实质上，二元载体 pMOG23(以大肠杆菌 K12 DH5 α 于 1990 年 1 月 29 日保藏在 Centraal Bureau voor Schimmel Cultures，保藏号为 CBS 102.90)用作肌醇六磷酸酶的种子特异性表达载体的构建起点。种子特异性肌醇六磷酸酶的表达盒在 pMOG23 的多接头中装配，并包含下列必需成分。肌醇六磷酸酶 cDNA 的种子特异性转录与其终止分别通过衍生自编码欧洲油菜 12S 贮藏蛋白 cruciferin 的基因的 5'-和 3' 调节序列控制(cruA 基因；Ryan 等，1989，核酸研究. 17: 3584)。用苜蓿花叶病毒 RNA4 前导序列来稳定 mRNA(Bredero 等，1980，核酸研究. 8: 2213)，同时为了实现肌醇六磷酸酶的胞外表达，烟草 PR-S 信号肽(Cornelissen 等，1986，自然，321: 531)符合读框地偶联到编码成熟蛋白质的肌醇六磷酸酶的 cDNA 部分。在和大肠杆菌 K-12 菌株 RK2013(包含质粒 pRK2013)的三亲交配时(Ditta 等，1980，美国科学院学报，77: 7347)，把这个包含嵌合的肌醇六磷酸酶基因的二元载体转移进土壤杆菌属菌株 LBA4404(Hoekema 等，1983，自然，303: 179)，此菌株包含带有对 T-DNA 转移进植物必须的毒性基因的质粒。用此菌株转化油菜种子(欧洲油菜)。为了这个目的，从 5 至 6 周的植物(正好在开花前)采取的表面灭菌的茎段事先在 MS 培养基上培养 24 小时(Fry 等(1987)，植物细胞报道，6，321)，然后在有同样培养基的新鲜平板上和土壤杆菌共培养 48 小时。转基因小植物从在选择培养基(500 mg/l 羧苄青霉素，40mg/l 巴龙霉素)中生长的茎段上再生，然后进一步通过 Pen 等在 EP-A-0 449 375 中描述的方法分析。

使用上述方法，在欧洲油菜中肌醇六磷酸酶的表达水平达到了与大约 500FTU/g 相对应的多达 10%的可溶性蛋白质的水平。肌醇六磷酸酶活性物的一个单位(FTU)定义为在 37℃和 pH 5.5 时以 1 μ mol/分钟的速率从 1.5 mM 肌醇六磷酸钠释放无机磷的酶的量。

实施例 2

造粒过程中欧洲油菜中的肌醇六磷酸酶的稳定性

造粒条件如下：造粒在 55℃之后和造粒之后 75℃的温度下获得。进行了两个独立的试验，一个以实验室规模进行，另一个以工业规模进行。

令人惊奇的是，我们发现在欧洲油菜中产生的黑曲霉肌醇六磷酸酶实质上比目前市售的黑曲霉肌醇六磷酸酶制剂对造粒条件更具抵抗力。由于使用了磨碎的种子，酶的稳定性明显地不依赖于种子的完整性。

Natuphoso 是一种包含黑曲霉肌醇六磷酸酶的市售产品，它可以从 BASF, Ludwigshafen, 德国获得。

表 1

造粒对不同酶制剂的稳定性影响。

	保留活性的百分比	保留活性的百分比
产品	实验室规模	工业规模
市售的 Natuphos 粉剂	43	38
表达 100FTU/g 的欧洲油菜磨碎的种子	62	95

实施例 3

种子磨碎过程中欧洲油菜中的肌醇六磷酸酶的稳定性

在欧洲油菜中肌醇六磷酸酶的商业开发意味着种子的磨碎。因而，比较了不同的磨碎条件以评价在磨碎过程中在欧洲油菜中表达的肌醇六磷酸酶活性的稳定性。所使用的磨碎条件是本领域的熟练技术人员熟知的。结果表明：磨碎的方法(表 2)不强烈影响酶的稳定性。

表 2

磨碎条件对在欧洲油菜中表达的肌醇六磷酸酶的稳定性的影响。

磨碎方法	保留活性的百分比
压成薄片	79
压成薄片/再压成薄片	90
压成薄片/用锤打碎	91%
压成薄片/压碎	90
压成薄片/冷冻压碎	89
用锤打碎	75

实施例 4

内源木聚糖酶在 CaMV 35S 启动子控制下在烟草种子中稳定表达

如 de Graaff 等在 EP-A-0 463 706 中的详尽描述克隆了曲霉属内源木聚糖酶基因。包含曲霉属内源木聚糖酶基因的大肠杆菌质粒 pLM100 在 1990 年 7 月 7 日保藏在 Centraal bureau voor Schimmel cultures, 定名为 CBS322.90。用 pLM100 作为模板使用融合 PCR, 除去木聚糖酶基因中的单一内含子。这个人工 cDNA 在类似于详尽描述的在烟草中的肌醇六磷酸酶的表达过程之后 (Pen 等, 1993, 生物技术, 10: 811) 在烟草种子中表达。实质上, 编码成熟酶的 cDNA 片段在二元表达载体 pMOG29 中 (Pen 等, 1992, 生物技术, 10: 292) 符合读框地融合到编码烟草 PR-S 蛋白质的信号肽序列上 (Cornelissen 等, 1986, 自然, 321: 531)。在 pMOG29 中的表达盒由下列成分组成: 有两个增强子的组成型花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子 (Guilley 等, 1982, 细胞, 30: 763); 稳定 mRNA 的合成苜蓿花叶病毒 RNA4 前导序列 (Bredero 等, 1980, 核酸研究, 8: 2213); 根癌土壤杆菌胭脂氨酸合酶 (NOS) 终止子 (Bevan, 1984, 核酸研究, 12: 8711)。这种包含嵌合内源木聚糖酶基因的二元载体在和 大肠杆菌 K-12 菌株 RK2013 (包含质粒 pRK2013) 的三亲交配时 (Ditta 等, 1980, 美国科学院学报, 77: 7347) 转移进土壤杆菌属菌株 LBA4404 (Hoekema 等, 1983, 自然, 303: 179) 中, 此菌株中包含带有对 T-DNA 转移进植物必需的毒性基因的质粒。用此菌株按 Horschal 等的方法 (1985, 科学, 227: 1229) 转化烟草 (烟草 cv Petit Havana SR1) 叶圆片。转基因植物在包含 100 mg/l 的卡那霉素的培养基上选择。

这种内源木聚糖酶基因在烟草中的部分表达产生了最大表达水平为 1.5% 的可溶性蛋白质, 在种子中相当于大约 1625 EXU/克种子。内源木聚糖酶的一个活性单位 (EXU) 定义为在 40 °C 和 pH 3.5 下释放 3.346 μmol 还原糖的酶的量, 其中还原糖作为来自燕麦属德国小麦的 1% 木聚糖的木糖等价物测定。

实施例 5

造粒过程中烟草种子内源木聚糖酶的稳定性

造粒条件如下：饲料在处理期间的 65 °C 和造粒之后的 75 °C 的温度下获得。试验以实验室规模进行。

磨碎的以 Lyxasan Forte 商标出售的种子和微生物酶产品(可从 BASF, Ludwigshafen, 德国获得)添加到饲料中至最终浓度为 6500EXU/kg 饲料。

由此可知，在种子中产生的内源木聚糖酶实质上比目前包含微生物酶的制剂对造粒更具抵抗力。

表 3

造粒对内源木聚糖酶不同制剂的稳定性的影响

	保留活性的百分比
市售的 Lyxasan Forte 粉剂	15
磨碎的表达内源木聚糖酶的烟草种子	50