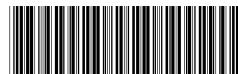


(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103003420 A

(43) 申请公布日 2013.03.27

(21) 申请号 201180028828.2

A23K 1/165 (2006.01)

(22) 申请日 2011.06.16

A23L 1/277 (2006.01)

(30) 优先权数据

10166495.1 2010.06.18 EP

61/356031 2010.06.17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012.12.11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2011/052623 2011.06.16

(87) PCT申请的公布数据

W02011/158203 EN 2011.12.22

(71) 申请人 杜邦营养生物科学有限公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 R. 米克尔森 T. L. 约根森 J. B. 索

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 李波 孟慧岚

(51) Int. Cl.

C12N 9/18 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 10 页

(54) 发明名称

方法

(57) 摘要

在一个方面，本发明提供处理含油种子的方法，所述方法包括使种子接触能够水解叶绿素或叶绿素衍生物的酶的步骤。还提供包括这种处理的用于从植物种子获得油的方法和用于制备精制植物油的工艺。还提供可从所述工艺和方法获得的粗制和精制植物油。

1. 一种处理含油种子的方法,所述方法包括使所述种子接触能够水解叶绿素或叶绿素衍生物的酶的步骤。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述种子在接触所述酶之前进行压片、去皮或破碎。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述种子包括具有约 0.1 至 0.5mm 的厚度的种子薄片。
4. 根据前述任一项权利要求所述的方法,其中将所述酶在水溶液中喷洒到所述种子上。
5. 根据前述任一项权利要求所述的方法,其中所述酶包括叶绿素酶、脱镁叶绿素酶、焦脱镁叶绿素酶或脱镁叶绿素脱镁叶绿酸水解酶。
6. 根据前述任一项权利要求所述的方法,其中所述酶包含 SEQ IDNO :1、2、4、6 或 8 至 15 中的任一个中所定义的多肽序列,或其功能性片段或变体。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述酶包含与 SEQ ID NO :1、2、4、6 或 8 至 15 中的任一个在至少 50 个氨基酸残基上具有至少 75% 序列同一性的多肽序列。
8. 根据前述任一项权利要求所述的方法,所述方法还包括使所述种子接触一种或多种其他酶,所述其他酶选自纤维素酶、内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、半纤维素酶、果胶酶、磷脂酶、脂质酰基转移酶、蛋白酶和植酸酶。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述种子接触磷脂酶 C。
10. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述种子接触脂质酰基转移酶。
11. 根据前述任一项权利要求所述的方法,其中所述种子选自大豆、花生、棉籽、向日葵籽和油菜籽,优选地大豆或油菜籽。
12. 一种从植物种子获得油的方法,所述方法包括 :
 - a) 通过前述任一项权利要求中定义的方法处理所述种子 ;
 - b) 压榨所述经处理的种子 ;并且
 - c) 从所述经压榨的种子回收油。
13. 一种制备精制植物油的方法,所述方法包括通过权利要求 12 中定义的方法获得粗制油,以及精制所述粗制油以获得精制的植物油。
14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述方法包括脱胶步骤,所述脱胶步骤包括向所述油中加入酸,然后用碱中和。
15. 根据权利要求 13 或权利要求 14 所述的方法,其中所述方法不包括粘土处理的步骤。
16. 根据权利要求 13 至 15 中任一项所述的方法,其中所述方法还包括进行脱臭步骤以产生脱臭油和馏出液。
17. 一种可通过权利要求 12 至 16 中任一项所定义的方法或工艺获得的粗制或精制的植物油。

方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物种子的油萃取领域。具体地讲，本发明涉及处理植物种子的方法，该方法可用于减少从种子获得的油中叶绿素和相关化合物的含量。

背景技术

[0002] 可以使用各种方法从植物种子萃取油。油通常从种子压榨而出或在破碎种子后用有机溶剂萃取而来。可使用压榨和有机萃取的组合，如在压榨步骤后，用有机溶剂萃取压榨种子中剩余的油组分。如果打算将压榨种子用作动物饲料，则不应使用有机溶剂。压榨种子饼优选地具有低残余油含量和高蛋白含量，使其尤其适于作为饲料原料。

[0003] 使用有机溶剂的萃取方法存在高成本及与使用化合物（例如己烷）相关的健康风险的缺此外，使用萃取方法获得的油通常含有高含量的磷脂，在用作食用油或生物柴油前必须采用脱胶方法将这些磷脂除去。萃取方法的另一个缺点是，油通常含有高含量的有色色素例如叶绿素，在油加工期间也必须将其除去。

[0004] 出于这些原因，油可以从例如油菜籽通过螺旋式压榨器压榨种子来制备，而无需有机萃取。尽管与有机萃取相比，压榨方法通常会使粗制油中叶绿素（和磷脂）含量更低，但仍然需要在加工期间将叶绿素和相关有色色素从油中除去。

[0005] 例如，得自含油种子（例如大豆、棕榈种子或油菜籽（卡诺拉油菜）、棉籽）的粗制植物油以及花生油通常含有一些叶绿素。叶绿素使油带上不希望的绿色，并且可在储存期间引起油的氧化，从而导致油的变质。

[0006] 已采用各种方法以除去植物油中的叶绿素。在油生产过程的多个阶段，包括种子破碎、油萃取、脱胶、碱处理和漂白步骤，都可除去叶绿素。然而，漂白步骤通常对于将叶绿素残留量降至可接受含量是最有意义的。在漂白期间，加热油并使其通过吸附剂以除去叶绿素和其他影响成品油外观和 / 或稳定性的有色化合物。用于漂白步骤的吸附剂通常为粘土。

[0007] 在食用油加工行业中，采用上述步骤通常可将加工油中的叶绿素含量降至介于 0.02 至 0.05ppm 之间。然而，漂白步骤会增加加工成本并且由于漂白粘土的夹带作用会降低油产量。粘土的使用可能会将许多想要的化合物（例如类胡萝卜素和生育酚）也从油中除去。此外，最近研究表明，漂白粘土可使油污染上氯离子。这会导致形成毒性非常大的 3- 氯 -1,2- 丙二醇 (3-MCPD)。另外，粘土的使用也很昂贵，这尤其是因为用过的粘土（即废料）的处理困难、危险（易于自燃），因而处理成本高。因此，已进行了用其他办法从油中除去叶绿素的尝试，例如使用叶绿素酶。

[0008] 在植物中，叶绿素酶 (chlorophyllase 或 chlase) 被认为参与叶绿素降解，其催化叶绿素中酯键的水解而生成脱植基叶绿素和叶绿醇。WO2006009676 描述了一种通过用叶绿素酶处理可降低组合物（如植物油）中的叶绿素污染的工业方法。此方法中产生的水溶性脱植基叶绿素也是绿色，但是可通过水萃取或二氧化硅处理除去。

[0009] 叶绿素通常在用于生产油的种子中以及在从种子提取油的过程中部分降解。一种

常见的修饰为卟啉（二氢卟酚）环失去镁离子而形成称为脱镁叶绿素的衍生物（参见图1）。卟啉环上高极性镁离子的丢失导致脱镁叶绿素与叶绿素相比在理化性质上显著不同。通常在加工过程中，油中的脱镁叶绿素比叶绿素含量更丰富。脱镁叶绿素呈淡绿色，可通过与用于叶绿素的方法类似的方法从油中除去，例如 WO 2006009676 中所述通过由具有脱镁叶绿素酶活性的酶催化的酯酶反应来去除。在某些条件下，一些叶绿素酶能够水解脱镁叶绿素以及叶绿素，因此适于除去这两种污染物。脱镁叶绿素水解的产物为红色 / 褐色的脱镁叶绿酸和叶绿醇。脱镁叶绿酸也可由脱植基叶绿素（即叶绿素水解之后）失去镁离子生成（参见图1）。WO 2006009676 教导了通过与脱植基叶绿素类似的方法（例如通过水萃取或二氧化硅吸附）除去脱镁叶绿酸。

[0010] 脱镁叶绿素还可通过含油种子收获和储存期间植物酶的活性或者通过油精制期间的加工条件（即热）进一步降解为焦脱镁叶绿素（参见“卡诺拉油加工过程中叶绿素衍生物的行为”（“Behaviour of Chlorophyll Derivatives in Canola Oil Processing”），《美国油脂化学协会杂志》(JAOCS)，第9卷，1993年9月，第837-841页）。一种可能的机制是脱镁叶绿素的碳环的甲酯键发生酶促水解，然后不稳定中间体非酶促转化为焦脱镁叶绿素。据报道，来自藜 (Chenopodium album) 的名为脱镁叶绿酸酶的 28-29kDa 酶能够催化类似的对脱镁叶绿酸的反应，产生不含叶绿醇的焦脱镁叶绿素衍生物，称为焦脱镁叶绿酸。焦脱镁叶绿酸比脱镁叶绿酸极性低，导致焦脱镁叶绿酸与脱镁叶绿酸相比水溶解度降低而油溶解度提高。

[0011] 取决于加工条件，在加工期间植物油中焦脱镁叶绿素可比脱镁叶绿素和叶绿素含量都更为丰富（参见（由 Fereidoon Shahidi 编辑、约翰威立父子出版公司 (John Wiley&Sons) 于 2005 年出版的《贝雷工业油脂产品》(Bailey's Industrial Oil and Fat Products)，第 6 版，第 2.2 卷的表 9)）。这部分地是由于在植物材料的收获和储存期间叶绿素中镁的丢失所致。如果使用 90°C 或更高温度下的长时间热处理，油中焦脱镁叶绿素的量可能会增加并且可能高于脱镁叶绿素的量。也可通过在压榨和萃取之前加热含油种子以及在精制过程中进行油脱胶和碱处理来降低叶绿素含量。还观察到油中的磷脂可与镁络合，从而降低叶绿素的量。因而，在许多植物油中，叶绿素与焦脱镁叶绿素（和脱镁叶绿素）相比是相对微量的污染物。

[0012] 因此仍然需要改进的方法以从植物油中除去叶绿素和叶绿素衍生物，如脱镁叶绿素和焦脱镁叶绿素。尤其需要一种能以更高的效率除去叶绿素和叶绿素衍生物同时降低油中其他想要的化合物的损失的方法。

发明内容

[0013] 因此，在一个方面，本发明提供一种处理含油种子的方法，该方法包括使种子接触能够水解叶绿素或叶绿素衍生物的酶的步骤。

[0014] 在一个实施方案中，种子在接触酶之前进行压片、去皮或破碎。优选地，种子包括厚度为约 0.1 至 0.5mm 的种子薄片。

[0015] 在一个实施方案中，将酶的水溶液喷洒到种子上。

[0016] 该酶可包括（例如）叶绿素酶、脱镁叶绿素酶、焦脱镁叶绿素酶或脱镁叶绿素脱镁叶绿酸水解酶。在具体实施方案中，酶包含 SEQ ID NO :1、2、4、6 或 8 至 15 中的任一者定义

的多肽序列,或其功能性片段或变体。优选地,该酶包含与 SEQ ID NO :1、2、4、6 或 8 至 15 中的任一者在至少 50 个氨基酸残基上具有至少 75% 的序列同一性的多肽序列。

[0017] 优选地,该方法还使用一种或多种另外的酶接触种子,所述酶选自纤维素酶、内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、半纤维素酶、果胶酶、磷脂酶、脂质酰基转移酶、蛋白酶和植酸酶,如使用磷脂酶 C 或脂质酰基转移酶。

[0018] 在一些实施方案中,种子选自大豆、花生、棉籽、向日葵籽和油菜籽,优选地大豆或油菜籽(卡诺拉油菜)。

[0019] 在一个另外的方面,本发明提供从植物种子中获得油的方法,该方法包括 a) 通过如上定义的方法处理种子;b) 压榨所处理的种子;以及 c) 从压榨的种子回收油。

[0020] 在一个另外的方面,本发明提供制备精制植物油的方法,该方法包括通过如上定义的方法获得粗制油,以及精制该粗制油以获得精制的植物油。

[0021] 上述方法优选地包括脱胶步骤,该步骤包括向油中加入酸,然后用碱中和。优选地,该方法不包括粘土处理步骤。在一个实施方案中,该方法还包括进行脱臭步骤,以产生脱臭油和馏出液。

[0022] 在又一个的方面,本发明提供粗制或精制植物油,或可通过上述定义的方法或工艺获得的馏出液。

附图说明

[0023] 图 1 示出涉及叶绿素和衍生物以及本发明中所用的酶的各反应。

[0024] 图 2 示出拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 叶绿素酶的氨基酸序列 (SEQID NO :1)。

[0025] 图 3 示出小麦 (*Triticum aestivum*) 叶绿素酶的氨基酸序列 (SEQ IDNO :2)。

[0026] 图 4 示出编码小麦叶绿素酶的核苷酸序列 (SEQ ID NO :3)。

[0027] 图 5 示出莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 叶绿素酶的氨基酸序列 (SEQ ID NO :4)。

[0028] 图 6 示出编码莱茵衣藻叶绿素酶的核苷酸序列 (SEQ ID NO :5)。

[0029] 图 7 示出来自拟南芥的脱镁叶绿素脱镁叶绿酸水解酶 (PPH) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :6)。叶绿体转运肽以粗体示出。

[0030] 图 8 示出来自拟南芥的编码脱镁叶绿素脱镁叶绿酸水解酶的 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :7)。SEQ ID NO :6 的 PPH 由 SEQ ID NO :7 的残基 173 至 1627 编码。

[0031] 图 9 示出毛果杨 (*Populus trichocarpa*) PPH 的多肽序列 (SEQ IDNO :8)。

[0032] 图 10 示出葡萄 (*Vitis vinifera*) PPH 的多肽序列 (SEQ ID NO :9)。

[0033] 图 11 示出蓖麻 (*Ricinus communis*) PPH 的多肽序列 (SEQ ID NO :10)。

[0034] 图 12 示出水稻 (*Oryza sativa*) (粳稻栽培种组) PPH 的多肽序列 (SEQID NO :11)。

[0035] 图 13 示出玉米 (*Zea mays*) PPH 的多肽序列 (SEQ ID NO :12)。

[0036] 图 14 示出烟草 (*Nicotiana tabacum*) PPH 的多肽序列 (SEQ IDNO :13)。

[0037] 图 15 示出水稻粳稻组 PPH 的多肽序列 (SEQ ID NO :14)。

[0038] 图 16 示出 (a) 小立碗藓 (*Physcomitrella patens* subsp. *patens*) PPH 的多肽序列 (SEQ ID NO :15)

[0039] 图 17 示意性地示出小麦 (*Triticum aestivum*) 叶绿素酶基因与 aprE 信号序列的

融虫合。

[0040] 图 18 示意性地示出包含小麦 (*Triticum aestivum*) 叶绿素酶基因的质粒 pBN-TRI_CHL。

[0041] 图 19 示意性地示出莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 叶绿素酶基因与 aprE 信号序列的融合。

[0042] 图 20 示意性地示出包含莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 叶绿素酶基因的质粒 pBN-CHL_CHL。

[0043] 图 21 为根据本发明的一个实施方案的精制油方法的图示。

[0044] 图 22 示出突变型杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 成熟脂质酰基转移酶 (GCAT) 的氨基酸序列, 其中在进行翻译后修饰之后发生 Asn80Asp 突变 (SEQ ID No. 23)。

具体实施方式

[0045] 在一个方面, 本发明涉及处理含油种子的方法, 该方法包括使种子接触能够水解叶绿素或叶绿素衍生物的酶的步骤。通常, 该方法用于减少从种子萃取的油中叶绿素和 / 或叶绿素衍生物的含量。

含油种子

[0047] 所谓“含油种子”通常是指任何产油的植物种子, 包括大豆、谷物 (包括麸皮)、果核、果实、坚果等等。种子可来源于任何类型的植物, 尤其是高等植物, 包括被子植物 (单子叶植物和双子叶植物) 和裸子植物。

[0048] 例如, 美国国家可持续农业信息服务中心 (National Sustainable Agriculture Information Service) 列出了如下植物作为食用油、特种油或工业用油的来源: 杏仁、杏果仁、鳄梨、山毛榉坚果、欧洲越橘、黑醋栗、琉璃苣、巴西坚果、金盏花、页蒿籽、腰果、蓖麻籽、柑橘种子、丁香、可可粉、咖啡、椰子干 (干燥的椰子)、芫荽、玉米种子、棉籽、接骨木、月见草、葡萄籽、落花生、榛子、大麻籽、霍霍巴、亚麻籽、澳洲坚果、肉豆蔻衣、甜瓜籽、芥菜籽、印楝种子、黑芝麻籽、肉豆蔻、棕榈仁、西番莲果、山核桃、阿月浑子、罂粟籽、南瓜籽、油菜籽、悬钩子种子、红辣椒、玫瑰果、橡胶籽、红花籽、沙棘、芝麻籽、大豆、大戟、荨麻、向日葵籽、营养植物 (tropho plant)、番茄籽或胡桃。来源于各种这样的植物的种子等也可用于本发明, 所述植物的油含量对于作为燃料 (例如“生态燃料”、生物柴油等) 的用途而言是令人感兴趣的。此类植物包括 (但不限于): 麻疯树 (如麻疯树 (*Jatropha curcas*)、麻疯树 (*J. mahafalensis*) 和它们的栽培种)、油棕 (*Elaeis guineensis*) (如油棕)、油桐 (*Aleurites fordii*) (桐油树或木油树)、蓖麻 (*Ricinus communis*) (蓖麻籽树)、苦配巴 (*Copaifera langsdorffii*) (柴油树) 和水黄皮 (*Pongamia pinnata*) (Honge 油树或 Pongam 树和它们的栽培种)。

[0049] 合适种子的优选例子包括大豆、卡诺拉油菜 (油菜籽)、棕榈、橄榄、棉籽、米糠、玉米、棕榈仁、椰子、花生、芝麻或向日葵。本发明的方法可结合萃取和加工精油 (例如来自果实种子油如葡萄籽、杏、琉璃苣等的那些精油) 的方法使用。本发明的方法可结合萃取和加工高磷油 (例如大豆油) 的方法使用。

叶绿素和叶绿素衍生物

[0051] 所谓“叶绿素衍生物”通常是指包含卟啉 (二氢卟酚) 环和叶绿醇基团 (尾) 的

化合物，包括不含镁含叶绿醇的衍生物，如脱镁叶绿素和焦脱镁叶绿素。叶绿素和（含叶绿醇的）叶绿素衍生物通常为绿色，这是因为分子中存在卟啉（二氢卟酚）环。镁从卟啉环的丢失意味着脱镁叶绿素和焦脱镁叶绿素在颜色上比叶绿素更偏褐色。因而，油中叶绿素和叶绿素衍生物的存在可使此类油带上不想要的绿色、淡绿色或褐色。在一个实施方案中，可执行本发明方法以除去或降低从种子萃取的油中存在的绿色或褐色。因此，本发明方法可称为漂白或脱色方法。

[0052] 该方法中所用的酶可水解叶绿素和含叶绿醇的叶绿素衍生物以从二氢卟酚环切割叶绿醇尾。叶绿素和叶绿素衍生物的水解通常得到诸如脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和焦脱镁叶绿酸的化合物，它们是不含叶绿醇的叶绿素衍生物。这些化合物仍包含有色卟啉环，脱植基叶绿素呈绿色而脱镁叶绿酸和焦脱镁叶绿酸呈红棕色。在一些实施方案中，也可能期望除去这些不含叶绿醇的衍生物以及降低萃取油中的绿色 / 红色 / 褐色。因此，在本发明的一个实施方案中，该方法还可包括除去或降低从种子萃取的油中不含叶绿醇的叶绿素衍生物含量的步骤。该方法可涉及漂白或脱色以除去萃取油的绿色和 / 或红色 / 褐色。

[0053] 叶绿素或叶绿素衍生物可为 a 形式或 b 形式。因而，如本文所用，术语“叶绿素”包括叶绿素 a 和叶绿素 b。类似地，当提及脱镁叶绿素、焦脱镁叶绿素、脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和焦脱镁叶绿酸时，包括 a 和 b 形式。

[0054] 种子中的叶绿素和叶绿素衍生物

[0055] 叶绿素和 / 或叶绿素衍生物（例如叶绿素、脱镁叶绿素和 / 或焦脱镁叶绿素）可作为污染物天然存在于种子中，或作为不期望的组分存在于加工产品中。叶绿素和 / 或叶绿素衍生物（例如叶绿素、脱镁叶绿素和 / 或焦脱镁叶绿素）可以任何含量存在于种子中。通常，叶绿素、脱镁叶绿素和 / 或焦脱镁叶绿素可作为天然污染物存在于种子中，浓度按种子的总重量计为 0.001 至 1000mg/kg (0.001 至 1000ppm, 10⁻⁷ 至 10⁻¹ 重量 %)。在另一些实施方案中，叶绿素和 / 或叶绿素衍生物可存在于种子中，浓度按种子的总重量计为 0.1 至 100、0.5 至 50、1 至 50、1 至 30 或 1 至 10mg/kg。

[0056] 不含叶绿醇的叶绿素衍生物也可存在于种子中。例如，脱植基叶绿素、焦脱镁叶绿酸和 / 或焦脱镁叶绿酸可以任何含量存在于种子中。通常，脱植基叶绿素、焦脱镁叶绿酸和 / 或焦脱镁叶绿酸在根据本发明方法采用酶处理前或处理后可存在于种子中，浓度按种子的总重量计为 0.001 至 1000mg/kg (0.001 至 1000ppm, 10⁻⁷ 至 10⁻¹ 重量 %)。在另一些实施方案中，脱植基叶绿素、焦脱镁叶绿酸和 / 或焦脱镁叶绿酸可存在于组合物中，浓度按组合物的总重量计为 0.1 至 100、0.5 至 50、1 至 50、1 至 30 或 1 至 10mg/kg。

[0057] 水解叶绿素或叶绿素衍生物的酶

[0058] 本发明的方法包括使种子与能够水解叶绿素或叶绿素衍生物的酶接触的步骤。通常，“水解叶绿素或叶绿素衍生物”是指水解叶绿素或（含叶绿醇的）叶绿素衍生物中的酯键，例如从叶绿素或叶绿素衍生物中的二氢卟酚环切割叶绿醇基团。因此，该酶通常具有酯酶或水解酶活性。优选地，该酶在油相中和水相中均具有酯酶或水解酶活性。

[0059] 因此，该酶可为例如叶绿素酶、脱镁叶绿素酶或焦脱镁叶绿素酶。优选地，该酶能够水解叶绿素、脱镁叶绿素和焦脱镁叶绿素中的至少一者、至少两者或全部三者。在一个特别优选的实施方案中，该酶具有叶绿素酶、脱镁叶绿素酶和焦脱镁叶绿素酶活性。在另一些实施方案中，两种或更多种酶可用于该方法中，每种酶具有不同的底物特异性。例如，该方

法可包括选自叶绿素酶、脱镁叶绿素酶和焦脱镁叶绿素酶的两种或三种酶的组合使用。

[0060] 任何具有可水解叶绿素或叶绿素衍生物的活性的多肽可用作本发明方法中的酶。所谓“酶”意指涵盖任何对叶绿素或叶绿素衍生物具有水解活性的多肽，包括例如酶片段等。任何分离的、重组的或合成的或嵌合的（或合成和重组的组合）多肽均可使用。

[0061] 酶（叶绿素酶、脱镁叶绿素酶或焦脱镁叶绿素酶）活性测定

[0062] 可使用任何合适的测定技术，例如基于本文所述的测定法，来检测对叶绿素或叶绿素衍生物的水解活性。例如，可使用基于荧光的技术检测水解活性。在一个合适的测定法中，将待检测其对叶绿素或叶绿素衍生物的水解活性的多肽在存在底物的情况下温育，并且通过荧光测量法监测产物或底物含量。合适的底物包括例如叶绿素、脱镁叶绿素和/或焦脱镁叶绿素。可检测的产物包括脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸、焦脱镁叶绿酸和/或叶绿醇。

[0063] 用于检测叶绿素或叶绿素衍生物的水解的测定方法在例如以下文献中公开：Ali Khamessan 等人，1994 年，《化学技术与生物技术杂志》(Journal of Chemical Technology&Biotechnology)，第 60 卷第 1 期，第 73–81 页；Klein 和 Vishniac，1961 年，《生物化学杂志》(J. Biol. Chem.)，第 236 卷，第 2544–2547 页；以及 Kiani 等人，2006 年，《分析生物化学》(Analytical Biochemistry)，第 353 卷，第 93–98 页。

[0064] 作为另外一种选择，合适的测定法可在加入推定的酶后基于底物或产物含量的 HPLC 检测和定量，例如基于如下所述的技术。在一个实施方案中，测定可按 Hornero-Mendez 等人，2005 年，《国际食品研究》(Food Research International)，第 38 卷，第 8–9 期，第 1067–1072 页) 中所述进行。在另一个实施方案中，可使用以下测定法：

[0065] 将 pH 7.0 的 170 μl 50mM HEPES 添加到 20 μl 溶解于丙酮中的 0.3mM 叶绿素、脱镁叶绿素或焦脱镁叶绿素。将酶溶解于 pH 7.0 的 50mMHEPES 中。将 10 μl 酶溶液添加到 190 μl 底物溶液以引发反应，并在 40°C 下温育不同时间。通过添加 350ul 丙酮终止反应。离心（在 18,000g 下离心 2min）后，通过 HPLC 分析上清液，确定 (i) 叶绿素和脱植基叶绿素 (ii) 脱镁叶绿素和脱镁叶绿酸或者 (iii) 焦脱镁叶绿素和焦脱镁叶绿酸的量。

[0066] 在一个另外的实施方案中，对叶绿素或叶绿素衍生物的水解活性可以使用 EP10159327.5 中描述的方法确定。

[0067] 一单位酶活性定义为例如采用本文所述的测定方法，在 40°C 下每分钟水解一微摩尔底物（例如叶绿素、脱镁叶绿素或焦脱镁叶绿素）的酶的量。

[0068] 在优选的实施方案中，本发明方法中所用的酶按例如通过本文所述测定方法确定的每克纯化酶的活性单位计，具有至少 1000U/g、至少 5000U/g、至少 10000U/g 或者至少 50000U/g 的叶绿素酶、脱镁叶绿素酶和/或焦脱镁叶绿素酶活性。

[0069] 叶绿素酶

[0070] 在一个实施方案中，该酶至少能够水解叶绿素。任何能催化叶绿素酯键水解以生成脱植基叶绿素和叶绿醇的多肽都可用于该方法。例如，叶绿素酶 (Chlorophyllase)、叶绿素酶 (chlase) 或叶绿素脱植基叶绿素水解酶或具有相似活性的多肽（例如，叶绿素 - 脱植基叶绿素水解酶 1 或叶绿素酶 1(chlase 1)，或者叶绿素 - 脱植基叶绿素水解酶 2 或叶绿素酶 2(chlase 2)，分别参见例如 NCBI P59677-1 和 P59678）可用于该方法。

[0071] 在一个实施方案中，该酶在酶命名分类下归类为叶绿素酶 (E. C. 3. 1. 1. 14)。任何

分离出的、重组的或合成的或嵌合的(合成和重组的组合)多肽(例如酶或催化性抗体)均可使用,参见例如Marchler-Bauer,2003年,《核酸研究》(Nucleic Acids Res.),第31卷,第383-387页。在一个方面,叶绿素酶可为如WO 0229022或WO 2006009676中所述的酶。例如,可使用拟南芥叶绿素酶,例如NCBI条目NM_123753中所述。因而,叶绿素酶可为包含SEQ ID NO :1序列的多肽(参见图2)。在另一个实施方案中,叶绿素酶来自藻类,例如来自三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)。

[0072] 在另一个实施方案中,叶绿素酶来自小麦,例如来自小麦属(*Triticumspp.*),尤其是来自小麦(*Triticum aestivum*)。例如,叶绿素酶可为包含SEQID NO :2序列的多肽(参见图3),或可由SEQ ID NO :3核苷酸序列编码(参见图4)。

[0073] 在另一个实施方案中,叶绿素酶来自衣藻属(*Chlamydomonas spp.*),尤其是来自莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)。例如,叶绿素酶可为包含SEQ ID NO :4序列的多肽(参见图5),或可由SEQ ID NO :5核苷酸序列编码(参见图6)。

[0074] 脱镁叶绿素脱镁叶绿酸水解酶

[0075] 在一个实施方案中,该酶能够水解脱镁叶绿素和焦脱镁叶绿素。例如,该酶可为脱镁叶绿素酶或脱镁叶绿素脱镁叶绿酸水解酶(PPH),例如在Schelbert等人,《植物细胞》(The Plant Cell),第21卷,第767-785页,2009年中所述的酶。

[0076] PPH和相关酶除了能够水解脱镁叶绿素之外,也能够水解焦脱镁叶绿素。然而,PPH对叶绿素无活性。如在Schelbert等人的文献中所述,PPH直向同源物通常存在于真核光合作用生物体中。PPH代表确定的 α/β 水解酶亚族,其在系统发生学上与叶绿素酶不同,这两个族在序列同源性和底物方面有区别。

[0077] 在本发明的具体实施方案中,该酶可为来自任何物种的任何已知PPH或它们的功能性变体或片段,或可衍生自任何已知的PPH酶。例如,在一个实施方案,该酶为来自拟南芥的PPH,例如包含SEQ ID NO :6氨基酸序列的多肽(参见图7),或由SEQ ID NO :7核苷酸序列编码的多肽(参见图8,NCBI登录号NP_196884,GenBank ID No. 15240707),或者它们的功能性变体或片段。

[0078] 在另一些实施方案中,该酶可为来自以下任何一种物种的PPH:拟南芥、毛果杨、葡萄、水稻、玉米、烟草、团藻(*Ostreococcus lucimarinus*)、青绿藻(*Ostreococcus taurii*)、小立碗藓、三角褐指藻、莱茵衣藻或微单胞菌(*Micromonas sp.*)RCC299。例如,该酶可为包含氨基酸序列的多肽,或由核苷酸序列编码的多肽(在以下表1中所示的数据库条目之一中定义),或者它们的功能性片段或变体:

[0079] 表1

[0080]

生物	登录号	Genbank ID
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_196884	15240707
毛果杨(<i>Populus trichocarpa</i>)	XP_002314066	224106163
葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	CAO40741	157350650
水稻(粳稻) (<i>Oryza sativa (japonica)</i>)	NP_001057593	115467988
玉米(<i>Zea mays</i>)	ACF87407	194706646
烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)	CAO99125	156763846
团藻(<i>Ostreococcus lucimarinus</i>)	XP_001415589	145340970
青绿藻(<i>Ostreococcus tauri</i>)	CAL50341	116000661
小立碗藓(<i>Physcomitrella patens</i>)	XP_001761725	168018382
三角褐指藻(<i>Phaeodactylum tricornutum</i>)	XP_002181821	219122997
菜茵衣藻(<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	XP_001702982	159490010
微单胞菌(<i>Micromonas sp.</i>) RCC299	ACO62405	226516410

[0081] 例如,该酶可为在 SEQ ID NO :8 至 15 任何一个中所定义的多肽(图 9 至 16),或者它们的功能性片段或变体。

[0082] 变体和片段

[0083] 水解叶绿素或叶绿素衍生物的已知序列的功能性变体和片段也可用于本发明。所谓“功能性”是指所述片段或变体保留着对叶绿素或叶绿素衍生物的可检测水解活性。通常,此类变体和片段显示出与已知叶绿素酶、脱镁叶绿素酶或焦脱镁叶绿素酶序列具有同源性,例如与已知叶绿素酶、脱镁叶绿素酶或焦脱镁叶绿素酶氨基酸序列,如与 SEQ IDNO :1 或 SEQ ID NO :1、2、4、6 或 8 至 15 的任何一者,例如在序列的至少约 10、20、30、50、100、200、300、500 或 1000 或更多个残基的区域上或整个长度上具有至少约 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的序列同一性。

[0084] 序列同一性的百分比可以用序列比较算法分析或通过目视检查确定。在一个方面,序列比较算法是 BLAST 算法,例如 BLAST 2.2.2 版算法。

[0085] 其他适用于本发明方法的具有叶绿素酶、脱镁叶绿素酶和 / 或焦脱镁叶绿素酶活性的酶,可以通过确定存在于例如已知叶绿素酶、脱镁叶绿素酶或焦脱镁叶绿素酶序列中的保守序列基序的存在性来鉴定。例如,存在于 PPH 酶中的保守序列基序包括以下序列: LPGFGVG (SEQ IDNO :16)、DFLGQG (SEQ ID NO :17)、GNSLGG (SEQ ID NO :18)、LVKGVTLLNATPFW (SEQ ID NO :19)、HPAA (SEQ ID NO :20)、EDPW (SEQ ID NO :21) 和 SPAGHCPH (SEQ ID NO :22)。在一些实施方案中,用于本发明的酶可包含这些序列中的一者或多者。GNSLGG (SEQ IDNO :18) 基序包含活性位点丝氨酸残基。具有合适活性的多肽序列可以通过搜索基因组数据库,例如微生物组宏基因组数据库(美国能源部联合基因组研究所 (JGI-DOE, USA)) 中这些基序的存在来鉴定。

[0086] 酶的分离和制备

[0087] 用于本发明的酶可以从它们的天然来源分离,或可以例如使用重组 DNA 技术制备。编码具有叶绿素酶、脱镁叶绿素酶和 / 或焦脱镁叶绿素酶活性的多肽的核苷酸序列可以分离或构建并且用于产生相应的多肽。

[0088] 例如,可使用来自产生该多肽的生物的染色体 DNA 或信使 RNA,来构建基因组 DNA

和 / 或 cDNA 文库。如果该多肽的氨基酸序列已知，则可合成出经标记的寡核苷酸探针，并用它从自该生物制备的基因组库鉴定编码多肽的克隆 (polypeptide-encoding clones)。或者，可使用含有与另一已知多肽基因同源的序列的经标记的寡核苷酸探针来鉴定编码多肽的克隆。在后一种情况中，使用较低严格性的杂交和洗涤条件。

[0089] 或者，可如下鉴定编码多肽的克隆：将基因组 DNA 的片段插入到表达载体（如质粒）中，用所得的基因组 DNA 文库转化酶阴性细菌，然后将经转化的细菌接种到含有被该多肽抑制的酶的琼脂上，从而让表达该多肽的克隆得以鉴定出来。

[0090] 在又一个另选方案中，编码该多肽的核苷酸序列可以通过已确立的标准方法以合成方式制备，例如 Beu cage S. L. 等人，1981 年，《四面体通讯》(Tetrahedron Letters)，第 22 卷，第 1859–1869 页所描述的亚磷酸酰胺方法，或 Matthes 等人，1984 年，《欧洲分子生物学学会杂志》(EMBO J.)，第 3 卷，第 801–805 页所述的方法。在亚磷酸酰胺方法中，寡核苷酸例如在自动 DNA 合成仪中合成，将其纯化、退火、连接并克隆进适当的载体中。

[0091] 核苷酸序列可以为混合的基因组起源和合成起源、混合的合成起源和 cDNA 起源或混合的基因组起源和 cDNA 起源，根据标准技术通过连接合成起源、基因组起源或 cDNA 起源的片段制备（视情况而定）。每一连接的片段对应整个核苷酸序列的各个部分。DNA 序列还可使用特异性引物通过聚合酶链反应 (PCR) 制备，例如 US 4,683,202 或 Saiki R K 等人，《科学》(Science)，1988 年，第 239 卷，第 487–491 页所描述。

[0092] 本文所用的术语“核苷酸序列”指寡核苷酸序列或多核苷酸序列，以及其变体、同源物、片段和衍生物（如其部分）。该核苷酸序列可以为基因组起源或者合成起源或者重组起源，无论代表正义链还是反义链都可以是双链或单链。

[0093] 通常，编码具有叶绿素酶、脱镁叶绿素酶和 / 或焦脱镁叶绿素酶活性的多肽的核苷酸序列使用重组 DNA 技术制备。然而，在本发明的一个另选实施方案中，可以使用本领域熟知的化学方法来合成该核苷酸序列的全部或部分（参见 Caruthers MH 等人，1980 年，《核酸研究论文集系列》(Nuc Acids Res Symp Ser)，第 215–23 页和 Horn T 等人，1980 年，《核酸研究论文集系列》(Nuc Acids Res Symp Ser)，第 225–232 页）。

[0094] 酶序列的修饰

[0095] 一旦分离了酶编码核苷酸序列，或者鉴定了推定的酶编码核苷酸序列，可能需要修饰选定的核苷酸序列，例如可能需要将该序列突变以制备本发明的酶。

[0096] 可用合成的寡核苷酸引入突变。这些寡核苷酸含有位于所需突变位点的旁侧的核苷酸序列。合适的方法在 Morinaga 等人，《生物技术》(Biotechnology)，1984 年，第 2 卷，第 646–649 页中公开。向酶编码核苷酸序列引入突变的另一种方法在 Nelson 和 Long，《分析生物化学》(Analytical Biochemistry) (1989)，180，第 147–151 页中有描述。

[0097] 可以例如使用市售的试剂盒，如来自 Stratagene 的 GeneMorph PCR 诱变试剂盒或者来自 Clontech 的 Diversify PCR 随机诱变试剂盒，来随机引入突变，而不是如上所述进行定点诱变。EP 0583265 提到了优化基于 PCR 的诱变的方法，也可将这些方法与诱变 DNA 类似物 (mutagenic DNA analogue)（如 EP 0866796 中描述的那些）组合使用。易错 PCR 技术适用于产生具有优选特性的水解叶绿素和 / 或叶绿素衍生物的酶变体。WO0206457 提到了脂肪酶的分子进化。

[0098] 第三种获得新序列的方法是，用多种限制性内切核酸酶或者诸如 Dnase I 的酶将

不相同的核苷酸序列片段化，然后重新组装出编码功能蛋白的完全核苷酸序列。或者，可以使用一条或多条不相同的核苷酸序列，并在完全核苷酸序列的重新组装过程中引入突变。DNA 改组和家族改组技术适用于产生具有优选特性的酶变体。进行“改组”的合适方法可在 EP0752008、EP1138763、EP1103606 中找到。也可将改组与其他形式的 DNA 诱变进行组合，如 US 6,180,406 和 WO 01/34835 中所描述。

[0099] 因此，有可能在体内或体外对核苷酸序列作出多个定点突变或随机突变，并且随后通过各种方法筛选所编码的多肽的改进的功能性。例如，采用计算机和 exo 介导的 (in silico and exo mediated) 重组方法（参见 WO00/58517、US 6,344,328、US 6,361,974），可进行分子进化，其中所产生的变体保留很低的与已知酶或蛋白质的同源性。由此获得的此类变体可以与已知叶绿素酶、脱镁叶绿素酶或焦脱镁叶绿素酶具有显著的结构相似性，但是具有非常低的氨基酸序列同源性。

[0100] 另外，作为一个非限制性例子，可将多核苷酸序列的突变或自然变体与野生型或其他突变或自然变体进行重组，以产生新的变体。也可以针对所编码的多肽的功能性改善对这种新的变体进行筛选。

[0101] 上述的和类似的分子进化方法的应用，使得可以在事先不知道蛋白质结构或功能的情况下鉴定和选择具有优选特性的本发明酶的变体，并使得可以产生非可预测但有利的突变或变体。在本领域中有许多将分子进化应用于优化或改变酶活性的例子，这些例子包括（但不限于）如下中的一种或多种：优化在宿主细胞中或体外的表达和 / 或活性，增加酶活性，改变底物和 / 或产物特异性，增加或减少酶稳定性或结构稳定性，改变优选环境条件如温度、pH、底物下的酶活性 / 特异性。

[0102] 本领域技术人员会明白，使用分子进化工具，可对酶进行改变以改进其功能性。合适地，编码用于本发明的酶（例如叶绿素酶、脱镁叶绿素酶和 / 或焦脱镁叶绿素酶）的核苷酸序列可以编码变体酶，即当与亲本酶比较时，该变体酶可以包含至少一个氨基酸置换、缺失或插入。变体酶保留至少 1%、2%、3%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97% 或 99% 的与亲本酶的同一性。合适的亲本酶可以包括任何具有对叶绿素和 / 或叶绿素衍生物的水解活性的酶。

[0103] 多肽序列

[0104] 本发明还涵盖由能编码供在本发明的方法和 / 或用途的任一者中使用的焦脱镁叶绿素酶的核苷酸序列所编码的氨基酸序列的用途。

[0105] 如本文所用，术语“氨基酸序列”与术语“多肽”和 / 或术语“蛋白质”同义。在某些情况下，术语“氨基酸序列”与术语“多肽”同义。氨基酸序列可以从合适的来源制备 / 分离，或可以合成方式制备或可以使用重组 DNA 技术制备。合适地，氨基酸序列可通过标准的技术从本文教导的分离多肽获得。

[0106] 一种从分离多肽确定氨基酸序列的合适方法如下。可将纯化的多肽进行冷冻干燥，并可将 100 μg 的冷冻干燥材料溶于 50 μl 的 8M 尿素和 0.4M 碳酸氢铵 (pH 8.4) 混合物中。可将溶解的蛋白质变性，并在覆盖氮气和加入 5ul 的 45mM 二硫苏糖醇后在 50°C 下还原 15 分钟。冷却到室温后，可加入 5ul 的 100mM 碘代乙酰胺，以让半胱氨酸残基在氮气下在暗处室温下衍生化 15 分钟。

[0107] 可向以上反应混合物加入 135 μl 水和溶于 5 μl 水的 5 μg 内切蛋白酶 Lys-C，然

后可在氮气、37°C下进行消化 24 小时。所得的多肽可以在 VYDAC C 18 柱 (0.46×15cm ; 10 μ m ; 美国加利福尼亚州分离集团 (The Separation Group, California, USA)) 上使用溶剂 A :0.1% TFA/ 水和溶剂 B :0.1% TFA/ 乙腈通过反相 HPLC 分离。可将选定的肽在 Develosil C18 柱上用相同的溶剂体系再进行色谱分离,然后进行 N 末端测序。可根据厂商说明书 (Applied Biosystems, 美国加利福尼亚州) 使用 Applied Biosystems 476A 测序仪,采用脉冲液体快速循环进行测序。

[0108] 序列比较

[0109] 在此,术语“同源物”意指与主题氨基酸序列和主题核苷酸序列具有一定同源性的实体。在此,术语“同源性”可以等同于“同一性”。同源氨基酸序列和 / 或核苷酸序列应能提供和 / 或编码保留着功能活性和 / 或能增强该酶的活性的多肽。

[0110] 在本说明书的语境中,同源序列意指包括这样的氨基酸序列,其可与主题序列有至少 75、85 或 90% 同一性、优选至少 95 或 98% 同一性。通常,同源物将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等等。尽管同源性也可以根据相似性 (即氨基酸残基具有类似的化学性质 / 功能) 来考虑,但在本说明书的语境中优选根据序列同一性来表示同源性。

[0111] 在本说明书的语境中,同源序列意指包括这样的核苷酸序列,其可与编码本发明多肽的核苷酸序列 (主题序列) 有至少 75、85 或 90% 同一性、优选至少 95 或 98% 同一性。通常,同源物将包含与主题序列相同的编码活性位点等的序列。尽管同源性也可以根据相似性 (即氨基酸残基具有类似的化学性质 / 功能) 来考虑,但在本说明书的语境中优选根据序列同一性来表示同源性。

[0112] 同源性比较可通过眼,或更通常地,借助于容易获得的序列比较程序来进行。这些可商购获得的计算机程序可计算两个或更多个序列之间的同源性百分数。可以对连续序列计算同源性百分数,即一个序列与另一序列比对,并且一个序列中的每个氨基酸直接与另一序列中相应的氨基酸比较,每次一个残基。这称为“无空位 (ungapped)”比对。通常,这种无空位比对仅在相对较少数目的残基上进行。

[0113] 尽管这是十分简单和可靠的方法,但其未考虑到,例如在原本相同的一对序列中,一个插入或缺失将引起后面的氨基酸残基不再对齐,从而在进行全局比对时可能导致同源性百分数大为降低。因此,大多数序列比较方法被设计产生最佳的比对,该最佳比对考虑可能的插入和缺失,从而不会不当地减损整体同源性分数。这通过在序列比对中插入“空位”以试图使局部同源性最大化来实现。

[0114] 然而,这些更复杂的方法给比对中出现的每一个空位赋给“空位罚分”使得对于同样数目的相同氨基酸,具有尽可能少空位的序列比对 (反映两条比较序列之间相关性较高) 将获得比具有许多空位的序列比对更高的分数。通常使用“仿射空位成本 (Affine gap costs)”,其对空位的存在征收相对较高的成本,对空位中每一个后续的残基征收较少的罚分。这是最通常使用的空位打分系统。高的空位罚分将当然会产生具有较少空位的最佳比对。大多数比对程序允许修改空位罚分。然而,当用这种软件进行序列比较时优选使用默认值。

[0115] 最大同源性百分数的计算因而首先需要在考虑空位罚分的情况下产生最佳比对。适用于执行这种比对的计算机程序是 Vector NTI Advance™11 (英杰公司 (Invitrogen Corp.))。其他可进行序列比较的软件的例子包括 (但不限于) :BLAST 软件包 (参

见 Ausubel 等人, 1999 年,《精编分子生物学方案》(Short Protocols in Molecular Biology), 第 4 版, 第 18 章) 和 FASTA(Altschul 等人, 1990 年,《分子生物学杂志》(J. Mol. Biol.), 第 403–410 页)。BLAST 和 FASTA 均可供进行离线和在线搜索 (参见 Ausubel 等人, 1999, 第 7–58 至 7–60 页)。然而, 对于一些应用, 优选使用 Vector NTI AdvanceTM11 程序。称为 BLAST 2Sequences 的新型工具也可用于比较蛋白质和核苷酸序列 (参见《欧洲微生物学会联合会微生物学快报》(FEMS Microbiol Lett), 1999 年, 第 174 卷第 2 期, 第 247–50 页) 和《欧洲微生物学会联合会微生物学快报》(FEMS Microbiol Lett), 1999 年, 第 177 卷第 1 期, 第 187–8 页)。

[0116] 尽管最终的同源性百分数也可按同一性来度量, 但比对过程本身通常不是基于要么全有要么全无 (all-or-nothing) 的成对比较。相反, 通常使用标度化相似性打分矩阵, 该矩阵基于化学相似性或进化距离给每一成对比较赋给分值。常用的这种矩阵的一个例子是 BLOSUM62 矩阵 –BLAST 程序包的默认矩阵。Vector NTI 程序通常使用公用默认值或定制的符号比较表 (如果提供的话) (更多细节请参见用户手册)。对于某些应用, 优选使用 Vector NTI AdvanceTM11 程序包的默认值。

[0117] 作为另外一种选择, 同源性百分数可用 Vector NTI AdvanceTM11 (英杰公司 (Invitrogen Corp.)) 中的多比对特征来计算, 该特征基于类似于 CLUSTAL(Higgins DG 和 Sharp PM, 1988 年,《基因》(Gene), 第 73 卷第 1 期, 第 237–244 页) 的算法。一旦该软件产生了最佳比对, 则有可能计算同源性百分数, 优选序列同一性百分数。该软件通常进行这种计算作为序列比较的一部分, 并产生数值结果。

[0118] 如果在确定序列同一性时要使用空位罚分, 则优选使用程序的默认参数来进行成对比对。例如, 以下参数是 BLAST 2 成对比对的当前默认参数:

[0119]

对于 BLAST2	DNA	蛋白质
期望阈值	10	10
字长	11	3
打分参数		
配对/错配打分	2, -3	不适用

	矩阵	不适用	BLOSUM62
[0120]	空位罚分(Gap Cost)	存在： 5 延伸： 2	存在： 11 延伸： 1

[0121] 在一个实施方案中，优选地，核苷酸序列和 / 或氨基酸序列的序列同一性可以采用 BLAST2 (blastn) 用如上定义的打分参数设置来确定。

[0122] 出于本发明的目的，同一性的程度是基于相同的序列元件的数目。本发明的氨基酸序列同一性程度可合适地通过本领域已知的计算机程序例如 Vector NTI Advance™ 11 (英杰公司 (Invitrogen Corp.)) 来确定。对于成对比对，所使用的打分参数优选地为 BLOSUM62，其中空位存在罚分为 11，空位延伸罚分为 1。

[0123] 合适地，核苷酸序列的同一性程度是在至少 20 个连续核苷酸上，优选在至少 30 个连续核苷酸上，优选在至少 40 个连续核苷酸上，优选在 50 个连续核苷酸上，优选在至少 60 个连续核苷酸上，优选在至少 100 个连续核苷酸测定。合适地，核苷酸序列的同一性程度可在整个序列上测定。

[0124] 氨基酸突变

[0125] 序列还可具有氨基酸残基的缺失、插入或置换，所述缺失、插入或置换产生沉默改变和导致功能上等价的物质。可基于残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和 / 或两亲性质的相似性作出有意的氨基酸置换，只要该物质的二级结合活性得以保留。例如，带负电的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸；带正电的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸；具有类似亲水性值的包含不带电极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯基丙氨酸和酪氨酸。

[0126] 可例如根据下表进行保守置换。第二列同一区组中的氨基酸，优选第三列同一行中的氨基酸可彼此置换：

[0127]

脂族	非极性	G A P
		I L V
	极性-不带电荷	C S T M
		N Q
	极性-带电荷	D E
		K R
芳族		H F W Y

[0128] 本发明还涵盖可能出现的同源置换（在本文中，置换和取代都用来指将现有的氨基酸残基用另选的残基进行交换），即对等置换，如碱性对碱性，酸性对酸性，极性对极性等。非同源置换也可能出现，即从一类残基置换成另一类残基，或者涉及到加入非自然氨基酸，如鸟氨酸（下文称为 Z）、二氨基丁酸鸟氨酸（下文称为 B）、正亮氨酸鸟氨酸（下文称为 O）、吡啶基丙氨酸、噻吩基丙氨酸、萘基丙氨酸和苯基甘氨酸。取代还可通过非天然氨基酸进行。

[0129] 变体氨基酸序列可包括可在序列的任何两个氨基酸残基之间插入的合适的间隔基团，这些间隔基团除了氨基酸间隔物如甘氨酸或 β -丙氨酸残基外，还包括烷基基团如甲基、乙基或丙基基团。变异的另一种形式（涉及存在一个或多个类肽（peptoid）形式的氨基酸残基）将是本领域技术人员十分了解的。为避免疑义，“类肽形式”用于指其中 α 碳取代基处于残基的氮原子而不是 α 碳上的变体氨基酸残基。用于制备类肽形式的肽的方法是本领域已知的，例如 Simon RJ 等人，《美国国家科学院院刊》(PNAS)，1992 年，第 89 卷第 20 期，第 9367-9371 页和 Horwell DC，《生物技术趋势》(Trends Biotechnol.)，1995 年，第 13 卷第 4 期，第 132-134 页）。

[0130] 核苷酸序列

[0131] 供在本发明中使用的核苷酸序列或者编码具有本文所定义的特定性质的多肽的核苷酸序列，可在其中包含合成的或修饰的核苷酸。对寡核苷酸作出的多种不同类型的修饰是本领域已知的。这包括膦酸甲酯和硫代磷酸酯主链和 / 或在分子的 3' 和 / 或 5' 端添加吖啶或多聚赖氨酸链。出于本发明的目的，应当理解本文所描述的核苷酸序列可通过本领域可用的任何方法修饰。可进行此类修饰以提高核苷酸序列的体内活性或寿命。

[0132] 本发明还涵盖使用与本文所讨论的序列互补的核苷酸序列或其任何衍生物、片段或衍生物。如果序列与其片段互补，则该序列可用作探针来鉴别其他生物体中的相似编码

序列等等。

[0133] 不与本发明的序列 100% 同源但处于本发明的范围之内的多核苷酸可以多种方式获得。本文描述的序列的其他变体可例如通过用探针探测 (probing) 从一系列个体 (例如来自不同种群的个体) 制备的 DNA 文库来获得。此外, 可获得存在于植物细胞的其他病毒同源物 / 细菌同源物或细胞同源物, 特别是细胞同源物, 此类同源物及其片段通常将能够选择性地与本文序列表中所示的序列杂交。此类序列可通过如下方法获得: 探测从其他植物物种制备的 cDNA 文库或基因组 DNA 文库, 并且在中等至高严格性条件下用包含随附序列表中的序列中任一条的全部或部分的探针探测此类文库。类似的考虑可应用于获得本发明的多肽或核苷酸序列的种同源物和等位基因变体。

[0134] 变体和株系 / 物种同源物还可用简并 PCR 获得, 简并 PCR 将使用被设计来靶向变体和同源物内这样的序列的引物, 所述序列编码本发明序列内的保守氨基酸序列。保守序列可例如通过将来自数种变体 / 同源物的氨基酸序列进行比对来预测。序列比对可用本领域已知的计算机软件来进行。例如, 广泛使用 GCG Wisconsin PileUp 程序。

[0135] 简并 PCR 中使用的引物将含有一个或多个简并位置, 并将在比用于以单序列引物从已知序列克隆序列的那些严格性条件低的严格性条件下使用。

[0136] 作为另外一种选择, 这种多核苷酸可通过对已表征的序列进行定点诱变来获得。在例如需要沉默密码子序列改变来优化多核苷酸序列在其中表达的特定宿主细胞的密码子偏好的情形中, 这可能是有用的。为了引入限制多肽识别位点, 或者为了改变多核苷酸所编码的多肽的性质或功能, 可能需要其他的序列改变。

[0137] 本发明的多核苷酸 (核苷酸序列) 可用于产生引物 (例如 PCR 引物)、备选的扩增反应的引物、探针 (例如用放射性或非放射性标记通过常规手段标记上显示标记 (revealing label) 的探针), 或者可将多核苷酸克隆进载体中。这种引物、探针和其他片段的长度将为至少 15 个, 优选至少 20 个, 例如至少 25、30 或 40 个核苷酸, 并且也为本文所用的术语本发明多核苷酸所涵盖。

[0138] 根据本发明的多核苷酸如 DNA 多核苷酸和探针可重组产生、合成产生或通过本领域技术人员可用的任何手段产生。它们还可以通过标准技术克隆。

[0139] 通常, 引物将通过合成手段产生, 涉及所需的核酸序列的逐步制备, 一次一个核苷酸。利用自动化技术完成该过程的技术是本领域容易获得的。

[0140] 较长的多核苷酸将通常用重组手段产生, 例如用 PCR (聚合酶链反应) 克隆技术。这将涉及到制备与焦脱镁叶绿素酶序列的需要进行克隆的区域侧接的一对引物 (例如约 15 至 30 个核苷酸的引物), 使引物与从植物细胞获得的 mRNA 或 cDNA 接触, 在能引起所需要的区域的扩增的条件下进行聚合酶链反应, 分离扩增的片段 (例如通过在琼脂糖凝胶上纯化反应混合物来分离) 和回收扩增的 DNA。引物可被设计为含有合适的限制性酶识别位点, 使得可将扩增的 DNA 克隆进合适的克隆载体中。

[0141] 种子的制备

[0142] 在一些实施方案中, 酶可以直接接触未处理过的含油种子。作为另外一种选择, 种子可以首先经历各种处理如清洁、调理和 / 或压片, 例如由 Fereidoon Shahidi 编辑、约翰威立父子出版公司 (John Wiley&Sons) 于 2005 年出版的《贝雷工业油脂产品》(Bailey's Industrial Oil and Fat Products), 第 6 版, 第 2 章中所描述。在一个实施方案中, 种子经

历机械和 / 或化学处理步骤,该步骤增加种子的表面积和 / 或有利于酶渗透到种子中,以提高叶绿素和叶绿素代谢物的水解速率。例如,在一些实施方案中,种子可以经过破碎、磨碎、去皮或压片后再与酶接触。以此方式制备种子的合适方法是本领域熟知的。

[0143] 在一个实施方案中,酶接触种子薄片。种子可以例如在一个或多个阶段使用平滑表面轧制机压片。薄片厚度可为约 0.1 至 1mm,优选地 0.1 至 0.5mm,更优选地 0.2 至 0.4mm(例如约 0.3mm)。在单一阶段压片方法的实施方案中,例如具有约 0.3mm 厚度的油菜籽薄片可以在单个步骤中制备。在适用于例如油菜籽的两阶段方法的一个实施方案中,约 0.4–0.7mm 的薄片厚度通过第一组轧辊制备,然后 0.2–0.3mm 厚度的薄片在第二阶段中制备。压片破裂了细胞壁,这不仅会从种子中释放一些油,而且会增加酶的渗透,从而有利于叶绿素及其代谢物的水解。

[0144] 使酶接触种子

[0145] 酶可以任何合适的方式施用到种子,例如完整种子、压片种子、去皮种子、磨碎种子或破碎种子。通常,酶以水溶液的形式施用到种子。在一个实施方案中,可以通过用包含酶的水溶液喷洒种子来施用酶。适用于喷洒液体的装置是本领域熟知的。示例性设备包括手动和电动泵驱动喷雾器。

[0146] 在一个实施方案中,酶的水溶液可以从产酶微生物的培养上清液回收。合适的纯化酶溶液可以使用已知的纯化技术如过滤和色谱法获得。例如,一种纯化方法可涉及从培养液分离生物质,并通过超滤和消毒过滤将所获得的溶液浓缩。

[0147] 用于本发明方法的酶可以进行配制或改性,例如化学改性,以提高油溶解度、稳定性、活性或用于固定化。例如,用于本发明方法的酶可以配制为两亲的或更亲脂的。例如,酶可以使用表面活性剂配制,以增加酶的活性。可以使用表面活性剂例如脱水山梨糖醇酯、柠檬酸酯、甘油或聚甘油酯或聚氧乙烯酯。在其他实施方案中,用于本发明方法的酶可以包埋在例如脂质体或凝胶,如藻酸盐水凝胶或藻酸盐微珠或等同物中。用于本发明方法的酶可以在胶束体系,例如三元胶束 (TMS) 或反胶束体系 (RMS) 介质中配制。用于本发明方法的酶可以如 Yi, 2002 年,《分子催化杂志, B 辑 : 酶催化》(J. Molecular Catalysis B : Enzymatic), 第 19 卷, 第 319–325 页) 中所述配制。

[0148] 酶可以任何合适的量施用到种子。例如,溶液可包含按溶液的总重量计浓度为约 0.001 至 10U/g,优选地 0.01 至 1U/g,如 0.01 至 0.1U/g 的酶。一单位定义为例如在《生物化学杂志》(J. Biol. Chem.), 1961 年,第 236 卷,第 2544–2547 页) 中所述的检测条件下,在 40°C 下每分钟水解 1 μ mol 底物(例如叶绿素、脱镁叶绿素和 / 或焦脱镁叶绿素) 的酶量。

[0149] 其他酶活性

[0150] 在一些实施方案中,除水解叶绿素或其衍生物的酶之外,还将一种或多种其他的酶施用到种子。可使用多种酶来消化植物种子材料并提高种子的出油率(参见例如 WO1991/013956、EP0113165、WO2008/088489 和 CA2673926)。此类其他酶处理可用于弱化和部分分解细胞壁(原生细胞壁和次生细胞壁)以及破坏包有油的被膜。这有利于油从种子释放及其后续的回收。

[0151] 例如,水溶液还可包含一种或多种纤维素降解酶、半纤维素降解酶、脂肪分解酶、果胶分解酶和 / 或蛋白水解酶,如 CA2673926 中所描述。在一个实施方案中,溶液还包含一种或多种纤维素酶、内切葡萄糖酶、纤维二糖水解酶、半纤维素酶、果胶酶、磷脂酶、蛋白酶

和 / 或植酸酶。此类酶可从天然或重组来源获得。这些酶可以单独或组合使用,这取决于种子的组成,如对于富含蛋白质的种子例如大豆,优选使用蛋白酶。此类其他酶活性可以不同的量存在于市售的产品中,例如得自德国达姆施塔特的 AB 酶制剂公司 (AB Enzymes, Darmstadt, Germany) 的具有纤维素酶、 β -葡聚糖酶和木聚糖酶活性的混合物Rohalase® OS。

[0152] 半纤维素降解酶和果胶分解酶优选地用于细胞壁中高含这些储存物质的种子,通常在这种情况下单独使用纤维素酶不足以引起细胞壁松弛或穿孔。果胶酶尤其可用于降解胞间层的原果胶,这导致改善的浆体形成以便压榨,并且有利于油的释放。半乳甘露聚糖酶优先用于(例如)大豆。此类酶的热稳定形式可用于一些实施方案。

[0153] 在一些实施方案中,其他酶可包括磷脂酶或蛋白酶。此类酶用于使油 / 水乳状液不稳定,所述乳状液可通过水性溶剂从含油种子萃取脂质来获得,如 WO2008/088489 中所描述。包含一种或多种这些活性的酶组合或混合物也是合适的。可以使用来自包括动物、植物或微生物在内的任何来源的此类酶活性。在一个实施方案中,酶活性包括来自哺乳动物(如猪)胰腺、紫红链霉菌 (*Streptomyces violaceoruber*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 或黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的磷脂酶活性。磷脂酶的使用可减少从种子获得的油的磷脂含量,这可减少油加工方法的后期对脱胶工序的需要。然而,当磷脂酶用于本发明时,优先的是种子在接触磷脂酶之前或同时(即不是之后)接触叶绿素酶或相关酶。

[0154] 可使用的磷脂酶包括(但不限于):磷脂酶 A(包括 A1 和 A2)、B(有时也称为溶血磷脂酶)、C 和 D。磷脂酶是水解磷脂如磷脂酰胆碱或磷脂酰乙醇胺的一类酶。磷脂酶类别的酶中有五种主要亚类:A1、A2、B、C 和 D 磷脂酶。A1 磷脂酶 (E. C. 3. 1. 1. 32) 优先水解磷脂如磷脂酰胆碱或磷脂酰乙醇胺的 sn1 酯键,产生 1-溶血磷脂和羧酸。通常,A1 磷脂酶需要钙作为辅因子。A1 磷脂酶通常表现出比 A2 磷脂酶更广泛的特异性。

[0155] A2 磷脂酶 (E. C. 3. 1. 1. 4) 优先水解磷脂如磷脂酰胆碱或磷脂酰乙醇胺的 sn2 酯键,产生 2-溶血磷脂和羧酸。除水解磷脂 (phospholipid) 之外,A2 磷脂酶对于水解胆碱衍生物和磷脂 (phosphatide) 也表现出一定的特异性。通常,A2 磷脂酶需要钙作为辅因子。

[0156] B 磷脂酶 (E. C. 3. 1. 1. 5) 也称为溶血磷脂酶。它们优先水解 2-溶血磷脂的 sn1 酯键,产生甘油磷脂和羧酸。B 磷脂酶也会水解 1-溶血磷脂的 sn2 酯键。

[0157] C 磷脂酶 (E. C. 3. 1. 4. 3) 优先水解磷脂如磷脂酰胆碱或磷脂酰乙醇胺的磷酸键,产生对应的二酰基甘油和磷酸胆碱。除水解磷脂之外,C 磷脂酶还会作用于溶血磷脂。可用于脱胶步骤的具有磷脂酶 C 活性的多肽在例如 WO2008143679、W02007092314、W02007055735、W02006009676 和 W003089620 中公开。

[0158] D 磷脂酶 (E. C. 3. 1. 4. 4) 优先水解磷脂如磷脂酰胆碱或磷脂酰乙醇胺的磷酸键,产生对应的磷脂酸和胆碱。除水解磷脂之外,D 磷脂酶还会作用于溶血磷脂。磷脂酶可单独使用,或以一种或多种具有相同或不同的 E. C. 分类和来自相同或不同的来源的活性的组合或混合物使用。包含一种或多种磷脂酶活性的粗制或部分纯化的酶制剂适用于本发明的一些实施方案。磷脂酶的商业来源也适用于本发明。例如,纽约州罗切斯特市的杰能科公司 (Genencor (Rochester, NY)) 提供了分别来自细菌和真菌来源的LysoMax® 和 G-ZYME® G999 磷脂酶。磷脂酶 C 可商购获得,例如得自密苏里州圣路易斯的西格玛公司 (Sigma(St. Louis, MO))。

[0159] 在采用磷脂酶的本发明优选实施方案中，优选地磷脂酶不产生溶血磷脂。在叶绿素酶与磷脂酶同时接触种子的情况下，尤其优选的是磷脂酶不产生溶血磷脂。优选地，磷脂酶是磷脂酶 C，例如得自马萨诸塞州剑桥的维莱尼姆公司 (Verenium Corporation, Cambridge, MA) 的 Purifine[®]。

[0160] 在另一个实施方案中，其他酶包括如 WO 2006/008508、WO2004/064537、WO 2004/064987 或 WO 2009/024736 中所描述的脂质酰基转移酶。可以使用任何具有酰基转移酶活性的酶（通常分类为 E. C. 2. 3. 1），尤其是包含氨基酸序列基序 GDSX 的酶，其中 X 为以下氨基酸残基中的一个或多个：L、A、V、I、F、Y、H、Q、T、N、M 或 S。在一个实施方案中，酰基转移酶是具有 Asn80Asp 突变的突变型杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 成熟脂质酰基转移酶 (GCAT)，例如包含发生翻译后修饰之后的 SEQ ID NO :23 氨基酸序列的酰基转移酶（参见图 22），或与其具有至少 80% 序列同一性的酶。优选地，脂质酰基转移酶为得自丹麦丹尼斯克公司 (Danisco A/S, Denmark) 的 Lysomax Oil[®]。

[0161] 合适的蛋白酶可得自（例如）微生物来源，包括解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquifaciens*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. lichenformis*)、黑曲霉 (*A. niger*) 或米曲霉 (*A. oryzae*)。在一个实施方案中，蛋白酶活性包括内肽酶。也可使用金属蛋白酶，无论是外切蛋白酶还是内切蛋白酶均可。多种蛋白酶可商购获得，例如得自纽约州罗切斯特市的杰能科公司 (Genencor (Rochester, NY)) 的真菌蛋白酶 500,000、Protex6L 蛋白酶和真菌蛋白酶浓缩物。

[0162] 反应条件

[0163] 在包含酶（以及任选地其他酶）的水溶液喷洒到种子上之后，种子的水含量将增加。在加入酶后，水含量可以从例如 1 重量% 变化至 40 重量%。然而，优选的是添加相对较低的水含量，例如通过喷洒来添加。通过将酶溶液喷洒到种子上来施加水，通常按种子的质量计仅会使种子的天然水含量（如 4–8% 重量 / 重量）增加约 0.1 至 2%（重量 / 重量），如 CA2673926 中所描述。在与酶温育后，制备的种子就可直接压榨并且回收油。在喷洒酶溶液后相对较低的水含量通常可使压榨工序得到改善。

[0164] 脱镁叶绿素在高温下分解为焦脱镁叶绿素，这通常是不太优选的，因为一些叶绿素酶对焦脱镁叶绿素的活性比对脱镁叶绿素的活性低。此外，焦脱镁叶绿素的叶绿素酶降解产物焦脱镁叶绿酸的水溶性比脱镁叶绿酸低，因此之后更难于从油去除。酶促反应速率在高温下增加，但将脱镁叶绿素向焦脱镁叶绿素的转化减至最低是有利的。

[0165] 根据以上描述，在尤其优选的实施方案中，种子与酶在低于约 80°C，优选地低于约 70°C，优选地约 68°C 或更低，优选地约 65°C 或更低的温度下温育，以减少向焦脱镁叶绿素转化的量。然而，为了保持良好的反应速率，优选的是在与酶温育期间保持尽可能高的种子温度。还优选的是在高得足以使内源性脂肪酶失活的温度下温育种子。因此，优选地，种子与酶在约 5°C 至约 80°C 之间，更优选地在 10°C 至约 80°C 之间，更优选地在约 15°C 至约 75°C 之间，更优选地在约 20°C 至约 70°C 之间，更优选地在约 30°C 至约 60°C 之间，更优选地在约 40°C 至约 50°C 之间温育。

[0166] 优选地，当酶与种子混合时，种子的温度处于所需的反应温度。在酶加入之前和 / 或期间，种子可以加热和 / 或冷却至所需温度。

[0167] 合适地，反应时间（即酶与种子温育的时间段，优选伴以搅拌）为足以让叶绿素和

叶绿素衍生物水解以例如形成叶绿醇和脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和 / 或焦脱镁叶绿酸的一段时间。例如，反应时间可以为至少约 1 分钟，更优选地至少约 5 分钟，更优选地至少约 10 分钟。在一些实施方案中，反应时间可以在约 15 分钟至约 48 小时之间，优选地约 1 小时至 24 小时，优选地约 12 至 24 小时。在一些实施方案中，种子可与酶在真空下温育，以增加酶向种子的扩散，从而增加反应速率。

[0168] 优选地，在约 pH 4.0 至约 pH 10.0 之间，更优选地在约 pH 5.0 至约 pH 10.0 之间，更优选地在约 pH 6.0 至约 pH 10.0 之间，更优选地在约 pH 5.0 至约 pH 7.0 之间，更优选地在约 pH 6.5 至约 pH 7.5 之间，例如在约 pH 7.0 (即中性 pH) 下实施该方法。

[0169] 压榨

[0170] 在一些实施方案中，处理的种子（如种子薄片）在与酶温育后进行压榨。所谓“压榨”旨在指任何机械力的施加，该施加通常导致从含油种子排出大部分的油。这个步骤可以使用本领域已知的任何合适设备，如连续螺杆压榨机、螺旋式压榨器、单螺杆或双螺杆挤出机进行。压榨可以（例如）使用一阶段或多阶段方法进行。

[0171] 螺旋式压榨器压榨通常使种子的油含量减少例如（就油菜籽而言）约 40% 至约 20%。如本领域所熟知，然后可使用溶剂萃取方法（如果需要）以从压榨饼回收剩余的油。在一些实施方案中，得自压榨和 / 或溶剂萃取的油还可使用叶绿素酶或相关酶进一步处理，如 WO2006/009676 中所描述。然而，本发明方法的优点是，由于叶绿素在从种子回收油的初始阶段被除去，因而可不需要另外的叶绿素去除步骤。

[0172] 如 EP10156412.8 中所公开，已经发现的是叶绿素酶和相关酶的活性取决于磷脂和 / 或其他表面活性剂的存在。此外，溶血磷脂水平的升高与叶绿素酶活性的降低相关。通过溶剂萃取从种子获得的油可具有相对高浓度的磷脂，而螺旋式压榨器压榨种子获得的油可具有低得多的磷脂含量。因此，本发明方法的优点是，在磷脂仍然存在的阶段叶绿素酶是有活性的。如果叶绿素酶在压榨后接触油，则由于不存在或存在非常低水平的磷脂，叶绿素酶活性可能会降低。出于类似原因以及如上所讨论，当磷脂酶用于本发明方法时，优选的是叶绿素酶在磷脂酶之前或与磷脂酶同时接触种子，并且磷脂酶不产生溶血磷脂。

[0173] 油的分离

[0174] 在使用根据本发明的酶处理种子，并且任选地如上所述压榨和 / 或溶剂萃取步骤之后，处理的液体（例如油）可使用适当的方法例如离心分离器分离。萃取的油可任选地用水或有机酸或无机酸例如乙酸、柠檬酸、磷酸、琥珀酸、苹果酸等等，或用盐溶液洗涤。

[0175] 叶绿素和 / 或叶绿素衍生物去除

[0176] 本发明的方法涉及用叶绿素酶或相关酶处理种子，与从未经酶处理的种子获得的油相比，该方法通常降低从种子萃取的油中叶绿素和 / 或叶绿素衍生物的水平。例如，与从未处理的种子获得的油中存在的叶绿素、脱镁叶绿素和 / 或焦脱镁叶绿素的浓度（按重量计）相比，该方法可以使叶绿素、脱镁叶绿素和 / 或焦脱镁叶绿素的浓度减少至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、或至少 99%。因此在特定实施方案中，按油的总重量计，处理后的萃取油中叶绿素和 / 或叶绿素衍生物的浓度可以小于 100、小于 50、小于 30、小于 10、小于 5、小于 1、小于 0.5、小于 0.1mg/kg、或小于 0.02mg/kg。

[0177] 进一步加工步骤

[0178] 在典型的植物油加工方法中, 使用压榨和 / 或己烷萃取获得粗制油, 使粗制植物油脱胶, 任选地经碱中和, 漂白 (使用例如粘土吸附, 随后弃去粘土), 并且脱臭从而产生精制、漂白和脱臭的油或 RBD 油 (参见图 21)。是否脱胶步骤取决于磷含量和其他因素。本发明的方法可与基于己烷萃取和 / 或酶辅助油萃取的方法结合使用 (参见《美国油脂化学家协会杂志》(Journal of Americal Oil Chemists' Society), 2006 年, 第 83 卷第 11 期, 第 973–979 页)。通常, 本发明的方法可以使用由 Fereidoon Shahidi 编辑、约翰威立父子出版公司于 2005 年出版的《贝雷工业油脂产品》(Bailey's Industrial Oil and Fat Products), 第 6 版中所描述的油加工步骤进行, 如图 21 中所示出。在一些实施方案中, 该方法可包括在该方法后期阶段 (即在处理种子后) 进行另外的叶绿素酶处理, 如 EP10156412.8 或 WO2006/009676 中所描述。

[0179] 在用酶处理后, 进一步加工步骤可帮助去除叶绿素和 / 或叶绿素衍生物的酶促水解产物。例如, 进一步加工步骤可去除脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸、焦脱镁叶绿酸和 / 或叶绿醇。

[0180] 脱胶

[0181] 油精制中的脱胶步骤的作用是通过加入水来分离磷脂。将通过脱胶沉淀的材料分离, 并且进一步加工为卵磷脂的混合物。商业化卵磷脂, 例如大豆卵磷脂和向日葵卵磷脂是半固态的或很粘的材料。它们由极性脂质 (主要是磷脂例如磷脂酰胆碱) 与三甘油酯微量组分的混合物组成。如本文所用, 术语“脱胶”意指通过从油中去除磷脂来精制油。在一些实施方案中, 脱胶可以包括将磷脂 (例如卵磷脂和磷脂) 转化为可水合的磷脂的步骤。

[0182] 本发明的方法可与任何脱胶工序一起使用, 包括水法脱胶、ALCON 油脱胶 (例如用于大豆)、Safinco 脱胶、“超级脱胶”、UF 脱胶、TOP 脱胶、联合脱胶、干法脱胶和 ENZYMAX™ 脱胶。参见例如美国专利 No. 6, 355, 693、6, 162, 623、6, 103, 505、6, 001, 640、5, 558, 781、5, 264, 367、5, 558, 781、5, 288, 619、5, 264, 367、6, 001, 640、6, 376, 689、WO 0229022、WO 98118912 等等。本发明方法包括的各种脱胶工序在 Bockisch, M., 1998 年, 《油脂手册, 植物油的提取》(Fats and Oils Handbook, The Extraction of Vegetable Oils), 第 5 章, 第 345–445 页, AOCS 出版社, 伊利诺伊州香槟的 (AOCS Press, Champaign, Illinois)) 中有描述。

[0183] 水法脱胶通常是指其中油与水 (例如 1 至 5 重量%) 温育以去除磷脂的步骤。通常, 水法脱胶可以在高温, 如 50 至 90°C 下进行。油 / 水混合物可搅拌例如 5 至 60 分钟, 以让磷脂分离进入水相, 然后将所述水相从油中除去。

[0184] 也可以进行酸法脱胶。例如, 可以在 60 至 70°C 下使油与酸 (例如 0.1 至 0.5% 的 50% 柠檬酸或苹果酸溶液) 接触, 混合, 与 1 至 5% 的水接触, 并且冷却至 25 至 45°C。

[0185] 用于本发明方法的其他合适脱胶工序在 WO 2006/008508 中有描述。适用于该方法的脱胶步骤的酰基转移酶在 WO 2004/064537、WO 2004/064987 和 WO 2009/024736 中也有描述。可以使用任何具有酰基转移酶活性的酶 (通常分类为 E. C. 2. 3. 1), 尤其是包含氨基酸序列基序 GDSX 的酶, 其中 X 为以下氨基酸残基中的一个或多个 :L、A、V、I、F、Y、H、Q、T、N、M 或 S。在一个实施方案中, 酰基转移酶是具有 Asn80Asp 突变的突变型杀鲑气单胞菌成熟脂质酰基转移酶 (GCAT), 例如包含发生翻译后修饰之后的 SEQ ID NO:23 氨基酸序列的酰基转移酶 (参见图 22), 或与其具有至少 80% 序列同一性的酶。在一个实施方案中, 脂质

酰基转移酶为得自丹麦丹尼斯克公司 (Danisco A/S, Denmark) 的 Lysomax Oil[®]。

[0186] 在另一个实施方案中,该方法包括脱胶步骤,其中油接触磷脂酶。可用于油脱胶步骤的磷脂酶通常与如上文针对可用于种子处理步骤的磷脂酶所述。可以使用任何具有例如磷脂酶 A1 (E. C. 3. 1. 1. 32) 或磷脂酶 A2 (E. C. 3. 1. 1. 4) 活性的酶,例如 Lecitase Ultra[®] 或胰磷脂酶 A2 (丹麦诺维信 (Novozymes, Denmark))。在一个实施方案中,该方法包括使用磷脂酶进行酶促脱胶步骤,例如使用 US 5, 264, 367、EP 0622446、W000/32758 或 Clausen, 2001 年,“通过新型微生物磷脂酶进行油的酶法脱胶”(“Enzymatic oil degumming by a novel microbial phospholipase”),《欧洲脂质科学和技术杂志》(Eur. J. Lipid Sci. Technol.) ,第 103 卷,第 333–340 页) 中所描述的脱胶步骤。

[0187] 酸处理 / 碱中和

[0188] 在一些实施方案中,在水脱胶后可以进行酸处理 / 碱中和步骤以进一步降低油中的磷脂含量。在另一个实施方案中,可以进行包含酸处理 / 碱中和的单一脱胶步骤。此类方法通常称为全脱胶或碱精制。

[0189] 已经发现,酸处理 / 碱中和步骤对于去除叶绿素的酶促水解产物例如脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和焦脱镁叶绿酸是特别有效的。因此,这个步骤可在该方法中酶处理步骤后的任何阶段进行。例如,这个步骤可包括加入酸例如磷酸,然后用碱例如氢氧化钠中和。在酸 / 碱中和处理后,将化合物如脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和焦脱镁叶绿酸从油中萃取到水相中。

[0190] 在此类方法中,通常首先将油与 0.05 至 0.5 重量% 的浓磷酸例如在 50 至 90°C 的温度下接触,并且混合以帮助沉淀磷脂。接触时间可以是例如 10 秒至 30 分钟。随后,例如在 50 至 90°C 的温度下加入碱的水溶液 (例如 1 至 20% 的氢氧化钠水溶液),然后温育并且混合 10 秒至 30 分钟。然后可将油加热至约 90°C,并通过离心使含水皂相与油分离。

[0191] 任选地,也可以用例如氢氧化钠或水进行进一步洗涤步骤。

[0192] 脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和焦脱镁叶绿酸去除

[0193] 本发明的方法可以任选地涉及去除不含叶绿醇的叶绿素衍生物,例如脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和焦脱镁叶绿酸的步骤。此类产物可以由于本发明的酶对叶绿素或叶绿素衍生物的水解而存在于组合物中,或者可以作为污染物或作为加工产物中的不需要组分天然存在。由于脱镁叶绿酸的分解,焦脱镁叶绿酸也可能存在于组合物中,脱镁叶绿酸本身可以由具有脱镁叶绿素酶活性的酶对脱镁叶绿素的活性而产生,或者脱镁叶绿酸可以在叶绿素酶对叶绿素作用后由脱植基叶绿素形成 (参见图 1)。用于油精制的加工条件,尤其是加热,可以例如通过促进脱镁叶绿素转化为焦脱镁叶绿素,后者随后水解为焦脱镁叶绿酸,而促进焦脱镁叶绿酸作为主要组分形成。

[0194] 在一个实施方案中,与酶处理之前和之后的含量任一者或两者相比,本发明的方法可减少油中脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和 / 或焦脱镁叶绿酸的含量。因此,在一些实施方案中,在酶处理后脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和 / 或焦脱镁叶绿酸的浓度可增加。通常,该方法涉及去除脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和 / 或焦脱镁叶绿酸的步骤,使得此类产物的浓度低于酶处理后的浓度。优选地,将通过这个酶促步骤产生的脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和 / 或焦脱镁叶绿酸从油中去除,使得这些产物在油中的最终含量低于酶处理前的含量。

[0195] 本发明方法的优点是,反应产物例如脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和 / 或焦脱镁叶

绿酸可以通过例如酸处理 / 碱中和的步骤简单、轻易地从油中去除。因此，在优选的实施方案中，叶绿素和叶绿素衍生物可以基本上从油中去除，而无需进一步加工步骤，例如粘土和 / 或二氧化硅处理和脱臭。

[0196] 粘土处理

[0197] 优选的是该方法不包括粘土处理步骤。避免使用粘土是有利的，因为这可减少成本，减少由于粘附于粘土而导致的油损失，并且提高有用的化合物例如类胡萝卜素和生育酚的保留。

[0198] 在一些实施方案中，该方法可以在无粘土处理步骤和无脱臭步骤下进行，这与涉及粘土处理的方法相比可使此类有用的化合物在精制油中的浓度增加。

[0199] 二氧化硅处理

[0200] 在一些实施方案中，该方法可以包括二氧化硅处理步骤，尽管并不总是必要的。例如，该方法可以包括使用本领域已知的无吸附剂或含少量吸附剂的二氧化硅精制装置和方法，例如使用 TriSyl 二氧化硅精制方法（马里兰州哥伦比亚的格雷斯戴维森公司 (Grace Davison, Columbia, MD)）或 SORBSIL RTM 二氧化硅（伊利诺伊州乔利埃特的英力士二氧化硅公司 (INEOS Silicas, Joliet, IL)）。

[0201] 二氧化硅处理步骤可用于去除油中的任何残余脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸和 / 或焦脱镁叶绿酸或其他极性组分。例如，在一些实施方案中，二氧化硅处理步骤可以用作酸处理 / 碱中和（全脱胶或碱精制）步骤的替代步骤。

[0202] 在一个实施方案中，该方法包括两阶段二氧化硅处理，例如包括被用于去除二氧化硅的分离步骤（例如过滤步骤）分开的两个二氧化硅处理步骤。二氧化硅处理可以在高温下，例如在高于约 30°C，更优选地约 50 至 150°C，约 70 至 110°C，约 80 至 100°C 或约 85 至 95°C，最优选地约 90°C 下进行。

[0203] 脱臭

[0204] 在一些实施方案中，该方法可以包括脱臭步骤，通常作为该方法中的最终精制步骤。在一个实施方案中，脱臭是指油的蒸汽蒸馏，其通常去除挥发性气味和风味化合物、生育酚、甾醇、甾烷醇、类胡萝卜素以及其他营养物质。通常，将油在低压（例如 0.1 至 1kPa）下加热至 220 至 260°C 以排除空气。将蒸汽（例如 1-3 重量%）吹入油中例如 15 至 120 分钟以去除挥发性化合物。可以收集含水馏出液。

[0205] 在另一个实施方案中，脱臭可以使用惰性气体（例如氮气）代替蒸汽进行。因此，脱臭步骤可包括用惰性气体（例如氮气）进行气泡精炼或鼓泡，例如 A. V. Tsiadi 等人，“在浅池中用氮气气泡精炼向日葵油”（“Nitrogen bubble refining of sunflower oil in shallow pools”），《美国油脂化学家协会杂志》(Journal of the American Oil Chemists' Society)，2001 年，第 78 卷，第 4 期，第 381-385 页）中所描述。可以收集通过油的气相并且任选地使其冷凝，和 / 或可将其中的挥发性化合物萃取到水相中。

[0206] 在一些实施方案中，本发明方法在没有粘土处理的情况下进行，但包括脱臭步骤。有用的化合物（例如类胡萝卜素、甾醇、甾烷醇和生育酚）可以至少部分地从油萃取到得自脱臭步骤的馏出液（例如含水或含氮馏出液）中。这个馏出液提供诸如类胡萝卜素和生育酚的化合物的有价值的来源，而所述化合物在包括粘土处理的方法中可因夹带而至少部分地损失。

[0207] 生育酚在漂白期间的损失取决于漂白条件和所施用的粘土的类型,但已有报道在漂白步骤中生育酚去除达 20–40% (K. Boki、M. Kubo、T. Wada 和 T. Tamura, 出处同上, 第 69 卷, 第 323 页, 1992 年)。已有报道在大豆油加工期间, 漂白步骤中生育酚的损失达 13% (S. Ramamurthi、A. R. McCurdy 和 R. T. Tyler, S. S. Koseoglu、K. C. Rhee 和 R. F. Wilson 编辑,《世界含油种子与食用油加工会议论文集》(Proc. World Conf. Oilseed Edible Oils Process), 第 1 卷, AOCS 出版社, 伊利诺伊州香槟 (AOCS Press, Champaign, Illinois), 1998 年, 第 130–134 页)。

[0208] 类胡萝卜素可在粘土处理的和非粘土处理的油的脱臭步骤中从油中去除。通常, 对有颜色的类胡萝卜素的去除加以控制, 以产生具有在指定数值范围内的预定颜色的油。可以通过更改脱臭步骤来改变精制油中类胡萝卜素和其他挥发性化合物的含量。例如, 在希望在油中保持较高浓度的类胡萝卜素的实施方案中, 脱臭步骤可以在较低温度 (例如使用 200°C 或更低温度的蒸汽) 下进行。在此类实施方案中, 特别优选避免粘土处理步骤, 因为这将使得精制油中类胡萝卜素浓度较高。

[0209] 现在将结合以下非限制性实施例进一步说明本发明。

[0210] 实施例 1

[0211] 来自小麦 (*Triticum aestivum*) 的叶绿素酶在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中的克隆和表达

[0212] 将编码小麦叶绿素酶 (Chlorophyllase) (SEQ. ID No. 2, 下文称为小麦叶绿素酶 (chlase)) 的核苷酸序列 (SEQ ID No. 3) 在枯草芽孢杆菌中表达, 其带有枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶的信号肽 (aprE) (参见图 17)。为了在芽孢杆菌中的最佳表达, 从金斯瑞公司 (美国新泽西州皮斯卡塔韦的金斯瑞公司, 08854 (GenScript Corporation, Piscataway, NJ 08854, USA)) 订购了密码子优化的基因构建体 (TRI_CHL)。

[0213] 构建体 TRI_CHL 包含 20 个核苷酸, 在小麦叶绿素酶编码区上游具有 BssHII 限制性位点以供融合到 aprE 信号序列, 该编码区下游具有 PacI 限制性位点用于克隆至芽孢杆菌表达载体 pBNppt 中。

[0214] 将构建体 TRI_CHL 用 BssHII 和 PacI 消化, 并用 T4DNA 连接酶连接到经 BssHII 和 PacI 消化的 pBNppt 中。

[0215] 将连接混合物转化进大肠杆菌 (*E. coli*) TOP10 细胞中。通过 DNA 测序 (丹麦里斯考的 DNA 技术公司 (DNA Technology A/S, Risskov, Denmark)) 确认包含 TRI_CHL 基因的 BssHII 和 Pac 插入片段的序列, 把正确质粒克隆之一命名为 pBN-TRI_CHL (图 18)。将 pBN-TRI_CHL 转化进枯草芽孢杆菌菌株 BG 6002 中, 该菌株为 AK 2200 的衍生菌株, 如 WO 2003/099843 中所述。

[0216] 选择一个新霉素抗性 (neoR) 转化子, 用于表达小麦叶绿素酶。

[0217] 实施例 2

[0218] 来自莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, 为绿藻) 的叶绿素酶在枯草芽孢杆菌中的克隆和表达

[0219] 将编码衣藻叶绿素酶 (chloryphyllase) (SEQ. ID No. 4, 下文称为衣藻叶绿素酶 (chlamy chlase)) 的核苷酸序列 (SEQ ID No. 5) 在枯草芽孢杆菌中表达, 其带有枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶的信号肽 (aprE) (参见图 19 和 20)。为了在芽孢杆菌中的最佳表达,

从金斯瑞公司（美国新泽西州皮斯卡塔韦的金斯瑞公司,08854(GenScript Corporation, Piscataway, NJ08854, USA)）订购了密码子优化的基因构建体 (CHL_CHL)。

[0220] 构建体 CHL_CHL 包含 20 个核苷酸,在衣藻叶绿素酶编码区上游具有 BssHII 限制性位点以供融合到 aprE 信号序列,该编码区下游具有 PacI 限制性位点用于克隆到芽孢杆菌表达载体 pBNppt 中。

[0221] 将构建体 CHL_CHL 用 BssHII 和 PacI 消化,并用 T4DNA 连接酶连接到经 BssHII 和 PacI 消化的 pBNppt 中。

[0222] 将连接混合物转化进大肠杆菌 (E. coli) TOP10 细胞中。通过 DNA 测序 (丹麦里斯考的 DNA 技术公司 (DNA Technology A/S, Risskov, Denmark)) 确认包含 CHL_CHL 基因的 BssHII 和 Pac 插入片段的序列,把正确质粒克隆之一命名为 pBN-CHL_CHL (图 20)。将 pBN-CHL_CHL 转化进枯草芽孢杆菌菌株 BG 6002 中,该菌株为 AK 2200 的衍生菌株,如 WO 2003/099843 中所述。

[0223] 选择一个新霉素抗性 (neoR) 转化子,用于表达衣藻叶绿素酶。

[0224] 实施例 3

[0225] 用来自小麦 (*Triticum aestivum*) 的叶绿素酶处理油菜籽

[0226] 来自小麦属的叶绿素酶 (参见实施例 1) 对通过溶剂萃取从种子分离的粗制油菜籽油和粗制大豆油中 d 叶绿素、脱镁叶绿素和焦脱镁叶绿素的活性非常大。溶剂萃取使粗制油中的磷脂含量相对较高 (1-2%)。已经证实,油中具有高水平的磷脂对于良好的叶绿素酶活性是必不可少的。

[0227] 然而,油 (如油菜籽油) 并非总是通过油的溶剂萃取来制备,而是大部分通过螺旋式压榨器压榨种子来制备 (参见由 Fereidoon Shahidi 编辑、约翰威立父子出版公司 (John Wiley&Sons) 于 2005 年出版的《贝雷工业油脂产品》(Bailey's Industrial Oil and Fat Products), 第 6 版, 第 2.2 章)。通过压榨油菜籽获得的油具有含量非常低的磷脂。在压榨的油菜籽油中,由于磷脂的含量较低,叶绿素酶活性将会较低。因此,在本实施例中,叶绿素酶在油压榨之前添加到种子。

[0228] 在本实施例中,经油菜籽 (得自丹麦的斯卡诺拉 (Scanola, Denmark)) 进行调理和压片。在进行的实验中,将酶添加到压片的种子,因为这使得酶更好地渗透到种子中。将油菜籽在轧制机上压片 (0.3mm)。

[0229] 将来自小麦属、在大肠杆菌中表达并纯化、以 CoRe-43 标记的叶绿素酶添加至含油种子中,添加量如下表 1 中所示。酶制剂 Rohalase OS® (得自德国的 AB 酶制剂公司 (AB Enzymes, Germany) 的具有纤维素酶、β - 葡聚糖酶和木聚糖酶活性的混合物) 和 Purifine® (得自美国维莱尼姆公司 (Verenium Corporation, US) 的磷脂酶 C) 也如表 1 中所示添加。

[0230] 表 1

[0231]

		1	2	3	4
压片的油菜籽	g	250	250	250	250
Rohalase OS 1 : 5 稀释	ml	1	1	1	

Purifine 1 : 5 稀释	ml			1	1
Chlorophyllase Core 43 1 : 3 稀释	ml		2.42	2.42	
水		4	1.58	0.58	4.00
Rohalase OS	ppm	800	800	800	
Purifine	ppm			800	800
Chlorophyllase Core 43	U/g		0.1	0.1	
水	%	2	2	2	2

[0232] 将酶和水喷洒到压片的种子上，并在 45°C 下温育 16 小时。然后将种子在得自瑞典 Skeppsta Maskin 公司 (Skeppsta Maskin AB, Sweden) 的油压榨 20 型螺旋式压榨器上进行压榨。实验 1、2、3 和 4 的油收率分别为 26%、26.6%、28% 和 27.6%。将压榨分离的油在 10000rcf 下离心 5 分钟，然后通过 HPLC/MS 分析（表 2）。

[0233] 表 2 压榨油菜籽油的 HPIC/MS 分析

[0234]

	1	2	3	4
	ppm	ppm	ppm	ppm
脱镁叶绿酸	0.22	0.30	0.26	0.19
焦脱镁叶绿酸	0.23	0.13	0.12	0.18
脱镁叶绿素 b	0.23	0.13	0.12	0.18
脱镁叶绿素 a	3.69	1.77	1.62	2.71
焦脱镁叶绿素	0.05	0.03	0.04	0.05
叶绿素 b	0.22	0.12	0.16	0.21
叶绿素 a	0.68	0.47	0.57	0.66

[0235] HPLC/MS 分析的结果（表 2）证实含油种子中的叶绿素酶具有活性。在叶绿素酶处理的样品中，大约 50% 的脱镁叶绿素被降解。大量的叶绿素和焦脱镁叶绿素也被降解。在叶绿素酶处理的样品中，脱镁叶绿酸的浓度增加，这与脱镁叶绿素的降解相一致，尽管似乎所形成的脱镁叶绿酸中有一些可被吸收于油菜籽饼粕中，而不出现在萃取的油中。

[0236] 上面说明书中提及的所有出版物以引用的方式并入本文。对本领域的技术人员将

显而易见的是，可在不背离本发明的范围和精神的条件下对所描述的本发明方法和系统作出多种修改和变型。尽管本发明已结合特定的优选实施方案进行了说明，但应该理解受权利要求书保护的本发明不应该不当地受限于这些特定的实施方案。实际上，生物化学和生物技术或相关领域的技术人员显而易见的对所描述的本发明实施方式的各种修改旨在落入如下权利要求书的范围内。

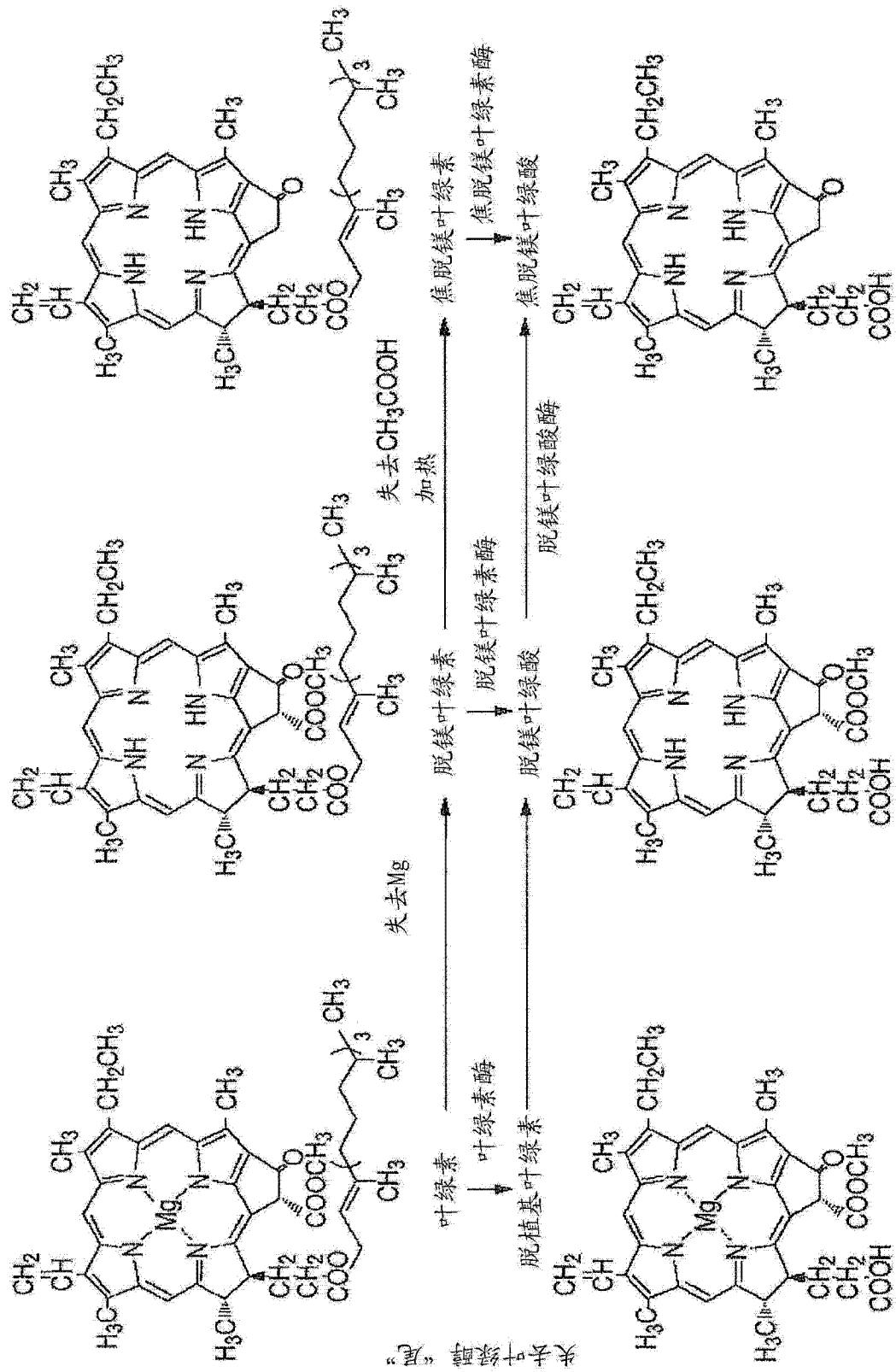


图 1

SEQ ID NO:1

1 MSSSSRNAF EDGKYKSNLL TLDSSSRCK ITPSSRASPS PPKQLLVATP VEEGDYPVVM
 61 LLHGYYLLYNS FYSQMLHVS SHGFILIAPO LYSIAGPDTM DEIKSTAEIM DWLSVGLNHF
 121 LPAQVTPNLS KFALSGHSRG GKTAFAVALK KFGYSSNLKI STLIGIDPVD GTGKGKQTTP
 181 PVLAYLPNSE DLDKTPILVI GSGLGETARN PLFPPCAPPG VNHRFFREC QGPWAHFVAK
 241 DYGHLDMLDD DTKGIRGKSS YCLCKNGEER RPMRRFVGGL VVSFLKAYLE GDDRELVKIK
 301 DGCHEDVPVE IQEFEVIM

图 2

SEQ ID NO. 2

1 MAAAAPATEM NKSAAAGAEVP EAFTSVFQPG KLAVEAIQVD ENAAPTPPIP VLIVAPKDAG
 61 TYPVAMILLHG FFILHNHFYEH LLRHVASHGF IIVAPQFSIS IIIPSGDAEDI AAAAKVADWL
 121 PDGLPSPVILPK GVEPELSKLA LAGHSRGGHT APSIALGHAK TQLTFSALIG LDVAGTGKS
 181 SOLOPKILTY EPSSFGMAMP VLVIGTGLGE EKKNIFFPPC APKDVNHAEF YRECKPPCY
 241 FVTKDYGHLD MLDDDAPIKFI TCVCKDGNGC KGKMRRCVAG IMVAFLNAL GEKDADLEAI
 301 LRDPAAVAPTT LDVVEHRVA

图 3

SEQ ID No. 3

1 GCGCGCAGGC TGCTGGAAAA ATGGCAGCGG CTGCCCGGG CGAAACAATG AATAAAAGCG
 61 CAGCGGGTGC CGAAGTTCCCT GAAGCATTTA CGTCTGTGTT TCAACCGGGC AAATTGGCTG
 121 TCGAACGCAT TCAGGTAGAC GAAAACGCTG CCCCTACACC GCCTATTCCG GTCTTGATCG
 181 TAGCACCTAA AGATGGGGA ACGTATCCGG TCGCGATGCT GCTTCATGGC TTTTCCCTGC
 241 ATAACCATTT TTACGAACAT TTGTTGGCTC ATGTCGCGTC CCATGGATT ATTACATCGTAG
 301 CTCCCTCAATT TTCAAATTAGC ATTATCCCGT CAGGCACGC GGAAGATATC GCAGCGGCTG
 361 CCAAAAGITGC TGACTGGCTG CCGGATGGCC TTCCTAGCGT TTTACCGAAA GGCCTTGAAAC
 421 CTGAACCTTC TAAACTGGCT CTTGCCGGAC ATTCCCGCGG CGGACATACA GCTTTTCAT
 481 TAGCCTGGGG CCATGCAAAA ACACAGTAA CGTTTCTGC CCTGATTGGA CTTGATCCGG
 541 TTGCAGGTAC AGGCAAATCA AGCCAATG AGCCTAAAAT CCTGACGTAT GAACCGTCTT
 601 CCTTTCGGCAT GGCTATGCCT GTTCTTGTA TTGGAACAGG TTTGGCGAA GAAAAGAAAA
 661 ATATTTCTT TCCGCGGTGC GCCCCGAAAG ATGTTAACCA TGCAGAATT TATCGTGAAT
 721 GCCGGCGGCC TTGTTATTAC TTGTGACAA AAGACTACGG ACATTTAGAT ATGTTGGATG
 781 ACGATGUACU GAAATTATTAC ACGTGCGCTC GTAAGATGG AAATGGTTGC AAAGGTAAAA
 841 TGAGACGCTG TGTGCGGGGC ATTATGGTAG CATTCTGAA CGCAGCGCTG GGCAGAAAAAG
 901 ACGCGGATCT TGAAGCTATC TTAAGAGACC CGGCAGTTGC GCGGACAACG CTTGATCCGG
 961 TTGAACATCG CGTGGCTTAA TTAA

图 4

SEQ ID No. 4

1 MPSTQFLGAS TLLLFGLRAV MSSDDYIKRG DLPTSKWSGR VTLRVDSAMA VPLDVVITYP
 61 SSGAAAYPVL VMYNGFQAKA PWYRGIVDHV SSWGYIVVQY TNGGLFPIVV DRVELTYLEP
 121 LLTWLETQSA DAKSPLYGRA DVSRILGTMGH SRGGKLAALQ FAGRTDVSGC VLFDPVDGSP
 181 MTPESADYPS ATKALAAAGR SAGLVGAAT GSCNPVGQNY PKFWGALAPG SWQMVLSQLQAG
 241 HMQFARTGNP FLWSDLRLC GRGTMMSSDV ITYSAAFVVA WFEGIFRPAQ SQMGISNFKT
 301 WANTQVAARS ITFDIKPMQS PQ

图 5

SEQ ID No. 5

1 GCGCGCAGGC TGCTGGAAAA ATGCCCTCTA CACAATTCT TGGAGCATCC ACGCTGCTTT
 61 TATTTGGTTT ACGTGCAGTC ATGTCAAGCG ATGACTATAT TAAACGGGGT GATTTGCCGA
 121 CATCAAATG GAGCGGAAGA GTCACGTGTC GCGTAGATTG AGCTATGGCC GTTCCGGCTGG
 181 ACGTTGTGAT CACATATCCT TCTTCCGGCG CAGCGGCTTA TCCGGTCCTG GTAATGTACA
 241 ATGGATTTCAG GCGAAAAGCG CCGTGGTACA GAGGCATTGT TGATCATGTG TCAAGCTGGG
 301 GATATACAGT CGTACAATAC ACGAACGGCG GACTTTTCC TATCGTTGTG GACCGCGTCG
 361 AACTTACATA TTAGAACCG TTGCTGACAT GGTTAGAAAC GCAGTCTGCT GATGCCAAT
 421 CCCCGTGTGA CGGCAGAGCT GACGTATCAC GCCTGGGCAC AATGGGACAT AGCAGAGGTG
 481 GCAAATTGGC CGCACTGCAA TTTGCGGGCC GCACGGATGT TTCAGGGATGC GTGCTTTTG
 541 ATCCTGTGGA CGGCAGCCCG ATGACACCTG AATCACCTGA CTATCCGAGC GCTACGAAAG
 601 CACTTGGGGC TGCCGGACGT TCTGCCGGTT TAGTGGCGC AGCGATTACA GGTTCATGTA
 661 ATCCGGTGGG CCAGAACTAC CCTAAATTT GGGGACCATT GGCGCCTGGT TCATGGCAAA
 721 TGGTCTGAG CCAGGCAGGC CATATGCAAT TTGCGAGAAC AGGAAATCCG TTTTAGATT
 781 GGAGCCTTGA CGGTTTATGC GGACGGGGTA CGATGATGTC TICCGATGTC ATCACATATT
 841 CTGCTGCCCT TACGGTAGCT TGGTTTGAAG GCATTTTCG TCCGGCCCCAA TCTCAGATGG
 901 GAATCTCCAA TTTTAAACCA TGGGCAAACAA CGCAAGTTGC AGCGCGGTCT ATTACATTG
 961 ATATCAAACC GATGCAATCC CCTCAGTAAT TAATTA

图 6

SEQ ID NO:6

1 MEIISLNVVP QCSVVTWSSK LATKRLVPNR SSLLFSGVKK SRLVIRSGNS DGYVVGENDD
 61 LGRIARRGES TSKVLIPGLP DESNGEIAAR ISHSHCEWK P KLRVHYEKAG CDNLDAPOVL
 121 FLPFGFVGGSF HYEKQLTDLG RDYRVWAIDF LGQQLSLPTE DPPTMTEETS SSEDKEPFWG
 181 FGDKTEPWAD QLVFSLDLWR DQVQYFVEEV IGEPVYIAGN SLGGYVALYF AATHPHLVKG
 241 VTLLNATPFW GFFPNPVRSP KLARLFPWPW AFPLPERVKK ITELVWQKIS DPESIAEILK
 301 QVYTDHSINV DKVFSRIVEV TQHPAAAASF ASIMLAPGGE LSFSEALSRC KENNQICLM
 361 YGREDPWVRP LWGKKIKKEI PNAPYYEISP AGHCPHDEVP EVVNYLMRGW IKHLESGGFE
 421 ALPLLEDTEE DWEESRIGRE IEFPRDGWKK AVNLWLYGSN YTYWRGVRES FRSSFIRVFG
 481 GKSA

图 7

SEQ ID NO:7

1 aacccaaatc ttcttatttc tcttcacctt tagatttttc ctcgcttaat ttctcaataa
 61 cgctctcaga gagaccattt gatgaagcgtt ctcgcttctg gaatttgaaa aggatttgat
 121 aagacgaggat catagaagat taccgcaagt tcataactt ttgaacttg ttatggagat
 181 aatctcaactg aacgttgtgc cccagtgtc tgggttact tggagtagta aatttagcaac
 241 gaaaagattt gtcccaaattt ggtcaagttt gttattctca ggggtcaaaa aatccagact
 301 tgtgattcga agtggaaattt ccgtggta tgggttgg gagaatgatg acttgggtcg
 361 tatagccaga agaggagaat caacgtcaaa ggttttattt cctggttgc ctgatgaatc
 421 aaatggtggaa attgtgtcga gaatcgtca ttctcaactgc gagggtggc ccaagcttag
 481 agtacattat gagaagccg gttgtgacaa ttctcgatgt cctgcgtgt tgggttctcc
 541 tggctttggc gttgttcat ttcaactatga gaagcagttt accgatttgg gaagggattt
 601 tcgagttatgg gttattgtt ttcttggaca gggtttatctt ctccctactg aagatcttac
 661 taccatgact gaagaaacca gttcctogga agataaggaa ccattttggg gatttgggtga
 721 caaaaactgaa ccgtgggctg atcaacttgtt attctctctg gatctcttgg gggatcaagt
 781 tcagtatgtt gttagaagagg ttatcggtga gcctgtgtac attgcaggaa actcaacttgg
 841 agggatgtt gctctctact ttgcagcaac ccatacttac ctgggttacgg gtgttacctt
 901 gcttaatgca acaccattt ggggttctt ccctaatttcca gtaagatccc caaagcttagc
 961 acgtctctt ccattggcccg gaggatttcc tctgccccaa agagtggaaa aaatcacaga
 1021 attgggttgg caaaaagataa gtgtatcgtt aagcatagttt gagataactt aacaggctta
 1081 cacagaccat ttatcataatg tggataaaatg attctcacgtt attgtggagg tcacacagca
 1141 tccggctgtt gcagcatcgtt ttgttcaat catgttctgtt cctgggtggag agctatctt
 1201 ctccgaagct ttatcttaggtt gtaaggaaaa caatgtttagt atatgttctca tttatggaaag
 1261 agaagatcca tgggtgagac cgttatgggg aaagaagata aagaagaaaa tcccaacgc
 1321 tccataactac gagatcagcc cagcgggtca ctggccacac gatgaagtcc ctgagggtgg
 1381 gaactatctg atgcgcgggtt ggtcaagca cctggagtctt ggtggttttt aagcgctccc
 1441 gcttttggag gacactgaag aagattggaa ggagtccagg attgttagag aaattttagtt
 1501 cccgagagat gttggaaaaa aagcagtgttca ttgttggta tatgggtcaa actatacgtt
 1561 ctggagagga gtttagagaat tttagatc cagttttata aggggtttt gagggaagtc
 1621 tgcataagaag aagcatggaa cagttgttca gtgtaaattt attgtatctt atgttgcatt
 1681 cgatgttagt tataatgtt ttttttttcaatgttcaaaatgttcaaaaaggaaaa
 1741 gtttagaaaaaa tatctacttg atagtttagtcc acctaaatcg aaggaacttcc ttcttgcatt
 1801 ttttttttcaatgttcaaaatgttcaaaaaggaaaa

图 8

SEQ ID NO:8

1 MMILAFFLIF MEFYFQLRRR YASYLLINMI LLITADQFW GMEILTSSTA SCCLVVNLRW
 61 KLAENGNSSS QLKLPSTSRR KILFARTNQR NGSLRFSSVD KFLKKLNHGK GSRSLDSFGG
 121 LKNNGNSKVFS GNSSSYVVGG EDDVGSITEN GESPTKVLIP GLPDESNGEY SAPVSSCFWK
 181 WPKKLNVHYE KAGCENVNSP PVLFLPGFGV GSFHYEKQLK DLGRDYRVWA IDFLGQGMSL
 241 PVENPTLFSK DGAASEGKDS IWGFGDEIEP WANDLVFSMD LWQDQVHNFI EEVIGEPVYI
 301 VGNSLGGFVA LYFAARYPHL VKGVTLNNAT PFWGFLPNPI RSPRLARIFF WSGTFPLPAN
 361 VRKLIAFFWQ KISDPKSIAE ILKQVYTDHS TNIDKVFSRI LEJTOHPAAA ASFASIMFAP
 421 QQLSFRRTL ARCKMSDTPI CLVYKGEDPW VKPVWGLQVK QQVPEAPYYE ISPAGHCPHD
 481 EVPEAVNYLL RGWIKNLESH GSVALPLHED AEVVENSFAM DLEFVREGSR KSVIVRFFFGS
 541 RFSIWNNSFSS YIKSQFKETT SRILTP

图 9

SEQ ID NO:9

1 MEILSCHSAP CCKLVNLGGT SVHKSSGSSQ AKLPGRNNR ILCARIGSKL GSSGYSNLDD
 61 FCTKNFGRHE GSRSLTAFKG SANVNSKALS ESYNGYVIDG KEGVGDISER GDLITQILIP
 121 GLPDDSNDDS GAQISSCFWE WKPKLTVHYE KSGCENVNSP PVLFLPGFGV GSFHYEKQLK
 181 DLGRDFRVWA VDFLGQGMSL PFEDPAPQSK KELDSERNDF SWGFGDETEP WANELVYSID
 241 LWQDQVRYFI EQVIGEPVYI VGNSLGGFVA LYFAACNPQL VKGVTLNAT PFWGFLPNPS
 301 RSPSLARIFF WAGTFPLPAF VRKLTEFWQ KISDPRSIGE VLKQVYADHS TKVDKVFSRI
 361 LETTQHPAAA ASFASIMFAP QGQLSFSEAL SRCQMSNVPI CLMYGKEDPW VRPVWGLQVK
 421 RQLEAPYYE ISPAGHCPHD EVPEVVNYLL RGWIGNLESK GSVTPLLDD PENIQYGTTK
 481 DLEFVREGSK KSVRVHFYGS RFSLWNRIKS YVKSRFEALE INSR

图 10

SEQ ID NO:10

1 MFSPCPLISS GQTQWLDLGM DILTFNVTT S HRTAHFGSKL VDKTKYSCKS KVSTIIKPQV
 61 FCARIDQSCG LLRFSSSNKF LDYPKKIEVS KKHNALKGIK VVNSKVLSGN YNGYVIEADE
 121 DMESVSGSGE STPEILIPGL PNESSGECKA PINSCFWEWK PKLYVHYEKA GCENVKSPPV
 181 LFLPGFGVGS FHFENQLKDL GRDYRVWAID FLGQGMSLPV ENPTLQLREG DILEGKNSFW
 241 GFGDETEPWA NELVYSMDLW RDQVRYFIEE VIGEPVYVVG NSLGGFVAIY FAASNQPLVK
 301 GVTLLNATPF WGFLPNPIRS PRLARIIPWS GTFPLPASVR KLTEFFWQKI SDPKSIAQVL
 361 KQVYADHSTN VDQVFSRILK ITQHPAAAAS FASIMFAPQG QLSFRECLMR CKMNNLPICL
 421 LYGREDPWVK PIWGLQVKRQ VPEASYYEIS PAGHCPHDEV PEVCSSLFL VGIPLLFLVI
 481 L

图 11

SEQ ID NO:11

1 MEVVSSSHSC LAFNRTPSSA WRFPGNGLGP GHAKLTRPRS AILCVRSGTA SNPADSGKVN
 61 ASHGFYVSDV DAALQGIPKK VGEIEKMIIP SLPEGPESSL ISTGFWEWKP KLSVYYEKSG
 121 IDNSKAPSVL FLPFGFGVGT F HFEKQLKD LG RDYKVWTMDF LGQGMSLPCE DPAPKSTS
 181 LDEDTYWGFG QELQPWAEEL VYSIDLWRDQ VQHFIEEVIG EPVYIVGN SL GGFVSLYLA
 241 SCPHLVKGV LLNATPFWGF LPNPATS PRL SKIFPWAGTF PLPSFVRKLT ETVWQKISDP
 301 RSIQGILKQV YADHSTNVDM VFSRIIETTQ HPAAAASFAS IMCAPKGQIS FEEALSRCQR
 361 QGIPISLMYQ REDPWRPIW GIKVKQQVPE SPYYEISPAG HCPHDEVPEV INYLLRGWLK
 421 NVESEGSVAV PFLEEPSYAE NGVSRELEFV RGGSKKSVHV RLFGSKISLW SQLRSLLKSN
 481 TWVISR

图 12

SEQ ID NO:12

1 MEVVSCSHSC SALHQTPAST WRLRGSALGL GLGHARPSRT RRYTVACVGT TSGASNPCCS
 61 GKVHAAQGFH VSDVDAALQG IPSMKAGEAE RVMIQGLPEG PDSSPISTGF WEWKPKLTVH
 121 YERSGMKNSK APAVLFLPGF GVGTFFFEKQ LRDLGRDHVR WTMDFLGQGM SLPGEDPAPS
 181 SIASEDAFWG FGQDSQPWAE ELVYSVDLWQ NQVQHFIEEV IREPVYIVGN SLGGFVALYF
 241 AASSPHLVKG VTLLNATPFW GFFPNPATSP RLSKIFPWAG TFPLPSFVRK ITEAVWQKIS
 301 DPKSIQDILK QVYADHSTNV DVFSRIVEI TQHPAAAASF ASIMFAPRGQ ISFQEAIISRC
 361 QDQGIPISLM YGREDPWIRP IWGLKVKQQV PEAPYYEISP AGHCPhDEVP EVINYLLRGW
 421 LKNLESEGSV DLPLFLEERSY AERGVSRKSV SVRLYGTKIS LWSQLSSFLN
 481 TRVPKSKRIVL R

图 13

SEQ ID NO:13

1 MEVHSCYSTT YYCIVNVSKC LISNQAKFPI VKERRLYSGL DVYSIKKKRT QRLTITALKG
 61 FDSVDSSLSS ESYNSDIIDG KVGTQDVIGS AKSVPKVIVP SLPDETKADS VAVVDSCWE
 121 WKPKLKVKHYE KSGCQNVNSA PILFLPGFGV GSFHYEKQLK DLGCDHRIWA LDFLGQGKSL
 181 PCEDPTLQSK RLDESERDGN NAVWFGFDEA EPWAKELVYS VDLWRDQVRY FIEEVIKEPV
 241 YIVGNLSGGY VALYLAAYYP QLVKGVTLLN ATPFWGFLPN PVRSPRLSRL FPWAGTFPLP
 301 DTIRKLTELV WQKISAPESI AEVLKQVYAD HTTKVDKVFS SILEVTEHPA AAASLASILF
 361 APRGQLSFKE ALTGCRMNNV PVCLMYGKED PWVMPFWALQ VKRQLPEAPY YQISPAHGCP
 421 HDEVPEIVNF LLRGWIKNIE SHSSVALPLL DSPESEIYDI VRDLEFVRQG MKKSVRVQFY
 481 GSMTSQWEKL GMFLKSRFQY GVYSP

图 14

SEQ ID NO:14

1 MEVSSSHSC LAFN RTPSSA WRFPGNGLGP GHAKLTRPRS AILCVRSFTA SNPADSGKVN
 61 ASHGFYVSDV DAALQGIPKK VGEIEKMIIP SLPEGPESSL ISTGFWEWKP KLSVYYEKSG
 121 IDNSKAPSVL FLPGFGVGTF HFEKQLKD LGDVKWTMDF LGQGMSLPCE DPAPKSTSCE
 181 LDEDTYWGEQ QELQWAEEL VYSIDLWRDQ VQHFIEEVIG EPVYIVGNL GGFSVSLYLA
 241 SCPHLVKVGT LLNATPFWGF LPNPATSPRL SKIFPWAGTF PLPSFVRKLT ETWQKISDF
 301 RSIQGILKQV YADHSTNVDM VFSRIIETQ HPAAAASFAS IMCAPKGQIS FEEALSRCQR
 361 QGIPISLMYQ REDPWWRPIW GIKVKQQVPE SPYYEISPAG HCPhDEVPEV PGKSLAWWIT
 421 GRLQAS

图 15

SEQ ID NO:15

1 IASHIWEWRH RWNIHYECAG TSLNTNAPAM LLLPGFGVGS FHYHQQLRDL GQEYRVWAID
 61 FLGQGKSWPS HDPAPEEEAEE VVEEIRHWSL GKNPEPWAEG LVYSVDTWRD QVHAFIEKVI
 121 GGPVYIVGNS LGGYVGGSYFA ATNPVELVKV TLLNATPFWA FTPNSRRYPL LSKLTPWGGL
 181 LPVPIFAKAI IRFWWDLLRN PSTIRNMLGA VYANRSAINK KLITQIIETAT DHPAFAAFA
 241 SIVFAPRAHT DFGENLISLK ERRMPMCMY GKEDPWVVF WGQRAKQRNP DAIYYELSPA
 301 GHCPHHEAPE VLFPQAIVLL ACMVQNIIGK ARPLFKG

图 16

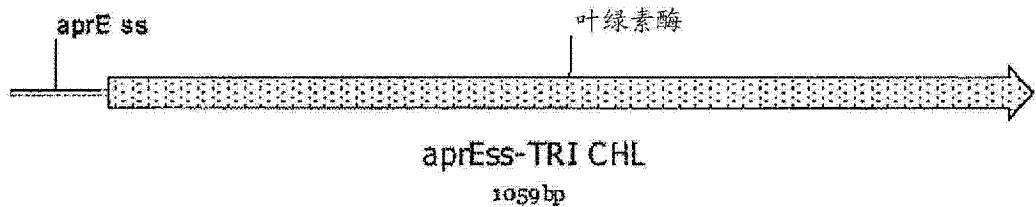


图 17

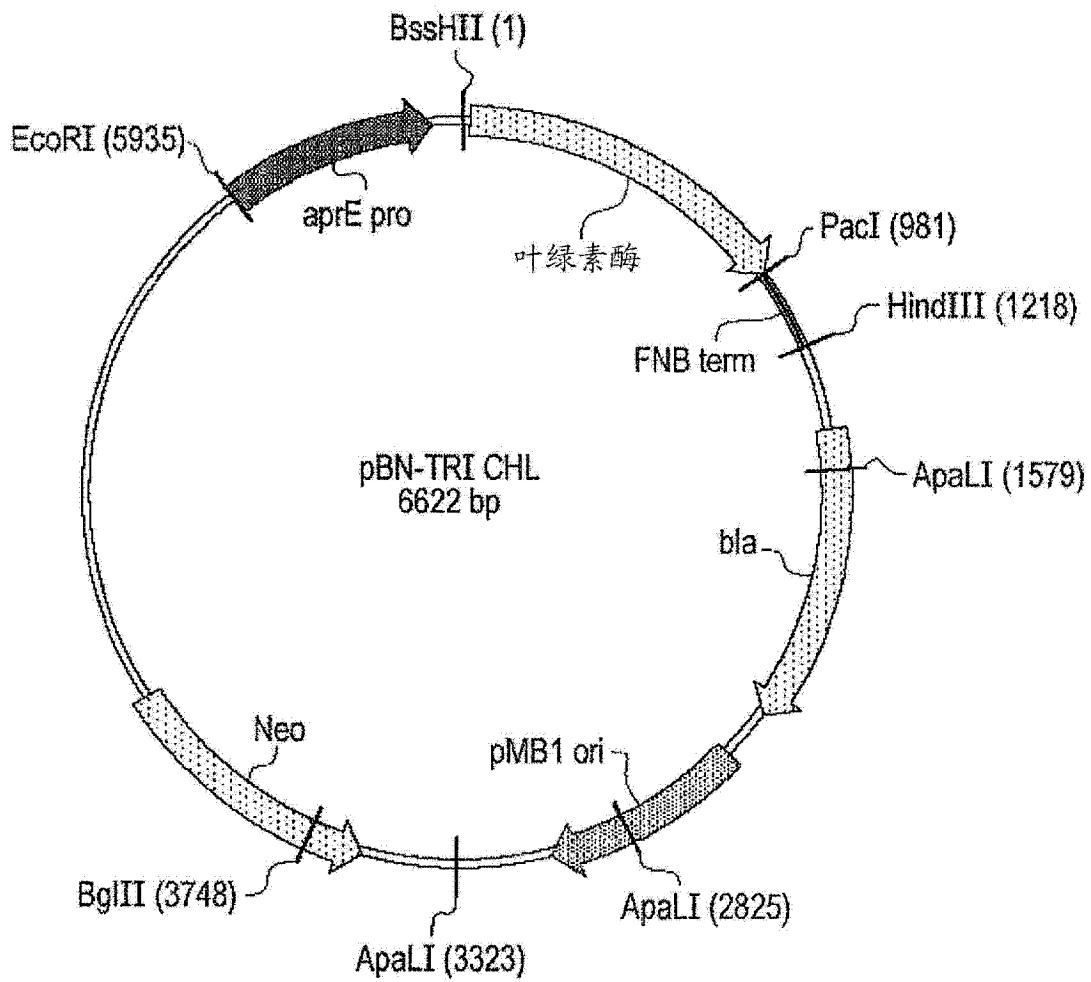


图 18

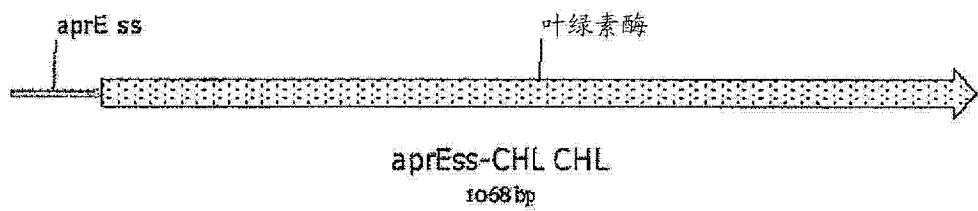


图 19

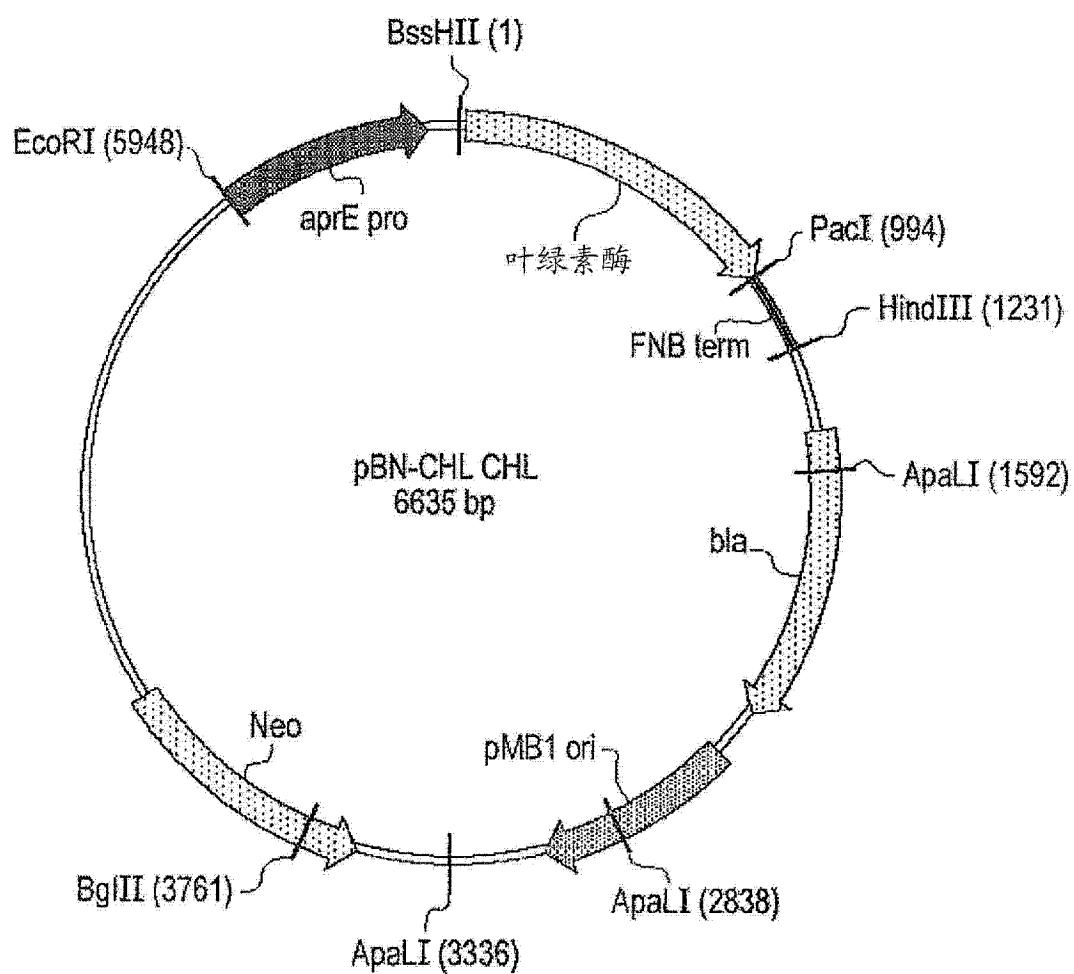


图 20

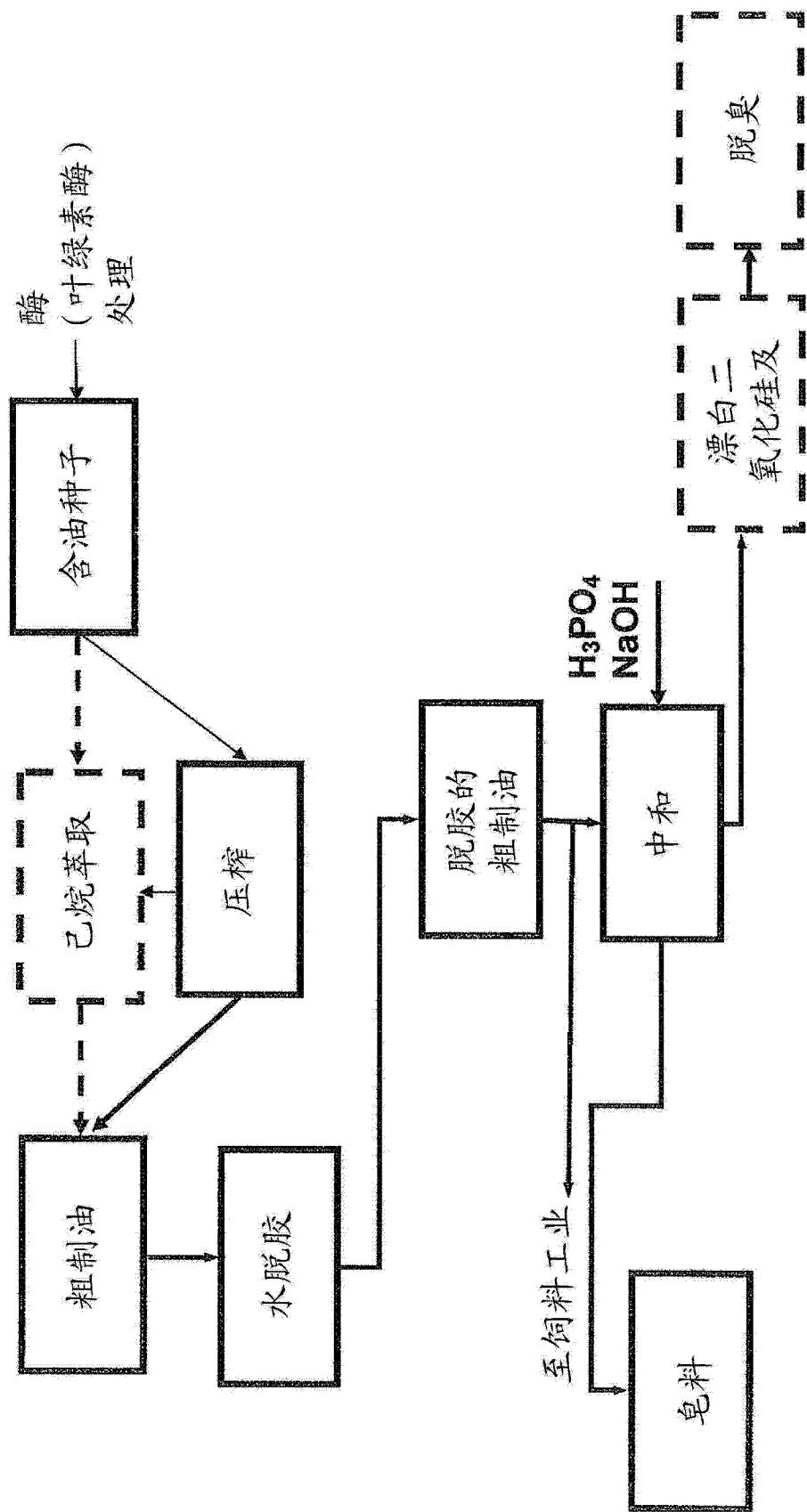


图 21

SEQ ID NO:23

```
1 ADTRPAFSRI VMFGDSDLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTKQFPGLT
61 IANEAEGGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTOFLQKD SFKPDDLVL WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLFNLPDLGQ NPSARSQKVV EAVSHVSAYH
181 NKLLLNLARQ LAPTMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGGLSD VENPCYDGYY VWKPFRSASP
241 RSASPLNCEG KMFWDQVHPT TVVHAALSER AATFIETQYE FLAHG
```

图 22