



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109982576 B

(45) 授权公告日 2024.03.22

(21) 申请号 201780072180.6

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

(22) 申请日 2017.09.15

专利代理人 陈迎春 黄革生

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109982576 A

(51) Int.CI.

A23K 20/189 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.07.05

A23K 10/14 (2006.01)

(30) 优先权数据

A23K 50/10 (2006.01)

62/398,741 2016.09.23 US

(56) 对比文件

WO 2015128366 A2, 2015.09.03

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

US 2007015266 A1, 2007.01.18

2019.05.22

WO 2005123911 A2, 2005.12.29

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2013110766 A1, 2013.08.01

PCT/US2017/051758 2017.09.15

US 2017006896 A1, 2017.01.12

(87) PCT国际申请的公布数据

杜明等. “葡萄糖淀粉酶”. 《极端环境中酶科学与技术》. 哈尔滨工业大学出版社, 2014, 第128页.

W02018/057420 EN 2018.03.29

焦云鹏. “淀粉酶”. 《酶制剂生产与应用》. 中国轻工业出版社, 2015, 第180-181页.

(73) 专利权人 杜邦营养生物科学有限公司

审查员 梁永焯

地址 丹麦哥本哈根

权利要求书1页 说明书52页 附图6页

(72) 发明人 S·于 K·M·克拉格 W·李

(54) 发明名称

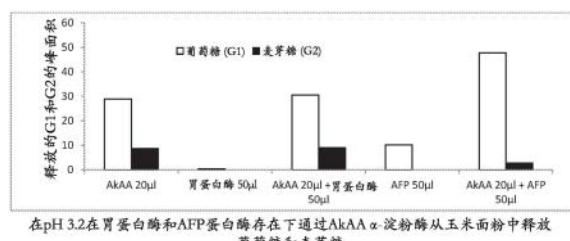
低PH活性 α -1,4/1,6-糖苷水解酶作为反刍动物的饲料添加剂用于增强淀粉消化的用途

(57) 摘要

公开了使用至少一种 α -1,4/1,6-糖苷水解酶(GLCH)作为反刍动物的饲料添加剂,其中所述水解酶: (a) 与在胃蛋白酶存在下在pH 6的水解酶活性相比,在胃蛋白酶存在下在pH小于或等于3具有至少20%活性, (b) 所述水解酶在反刍动物的包含瘤胃、皱胃和小肠的三个消化室的至少两个中具有活性,并且 (c) 所述水解酶与胰淀粉酶一起作用以增加葡萄糖产率。

B

CN 109982576 B



1. 衍生自里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的葡糖淀粉酶EC 3.2.1.3增加反刍动物中淀粉消化率和葡萄糖产率的用途,其中所述葡糖淀粉酶具有: (a) 与在胃蛋白酶存在下在pH 6的葡糖淀粉酶活性相比,在胃蛋白酶存在下在pH小于或等于3具有至少20%活性, (b) 所述葡糖淀粉酶在反刍动物的包含瘤胃、皱胃和小肠的三个消化室的至少两个中具有活性, (c) 所述葡糖淀粉酶与存在于所述反刍动物消化室中的消化酶一起作用以增加淀粉消化率和葡萄糖产率,并且 (d) 对麦芽糖具有至少20%的催化活性。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述葡糖淀粉酶能够在与瘤胃或皱胃中发现的条件相当的条件下水解生淀粉。

3. 如权利要求1或2所述的用途,其中所述葡糖淀粉酶与至少一种 α -淀粉酶一起作用以增加葡萄糖产率。

4. 如权利要求3所述的用途,其中所述 α -淀粉酶是GH 13家族的成员或是 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)。

5. 如权利要求4所述的用途,其中所述至少一种 α -淀粉酶是白曲霉(*Aspergillus kawachii*)的 α -淀粉酶或其变体或片段,棒曲霉(*Aspergillus clavatus*)的 α -淀粉酶或其变体或片段,土曲霉(*Aspergillus terreus*)的 α -淀粉酶或其变体或片段,或里氏木霉的 α -淀粉酶或其变体或片段。

6. 权利要求1或2所述的用途,其中所述葡糖淀粉酶与胰淀粉酶以及至少一种蛋白酶一起作用以增加葡萄糖产率。

7. 如权利要求6所述的用途,其中所述蛋白酶选自由以下组成的组:酸性蛋白酶或中性金属蛋白酶。

8. 如权利要求7所述的用途,其中所述蛋白酶是真菌天冬氨酸蛋白酶或细菌中性金属蛋白酶。

低PH活性 α -1,4/1,6-糖苷水解酶作为反刍动物的饲料添加剂 用于增强淀粉消化的用途

技术领域

[0001] 本领域涉及动物营养,并且具体涉及低pH活性 α -1,4/1,6糖苷水解酶(GLCH) (如 α -淀粉酶、葡糖淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶) 作为反刍动物的饲料添加剂用于增强淀粉消化的用途。

背景技术

[0002] 反刍动物具有通过其微生物/酶消化系统将粗饲料转化为蛋白质和能量的独特能力。因此,反刍动物在地球生态和食物链中起着重要作用。

[0003] 反刍动物和非反刍动物之间的主要区别在于反刍动物的胃有四个隔室:瘤胃、网胃、瓣胃和皱胃。在前两个室(瘤胃和网胃)中,食物与唾液混合并分离成固体物质层和液体物质层。固体堆积在一起形成反刍食物或食团。

[0004] 然后将反刍食物反刍并咀嚼以使其与唾液完全混合并分解粒度。纤维(尤其是纤维素和半纤维素)主要是通过微生物(大部分是细菌,以及一些原生动物、真菌和酵母)在这些室中分解成三种主要的挥发性脂肪酸(VFA):乙酸、丙酸和丁酸。蛋白质和非结构碳水化合物(果胶、糖和淀粉)也被发酵。

[0005] 虽然瘤胃和网胃具有不同的名称,但它们代表相同的功能空间,因为消化物可以在它们之间来回移动。这些室一起被称为瘤网胃。然后这些降解的消化物(现在位于瘤网胃中较低的液体部分)进入下一个室(瓣胃),在这里水和许多无机矿质元素被吸收进入血流中。

[0006] 在此之后,消化物移动到真胃(皱胃)中。皱胃是直接等效的单胃,并且消化物在皱胃中以大致相同的方式被消化。消化物最终移入小肠,在小肠中进行消化和营养素吸收。瘤网胃中产生的微生物也在小肠中被消化。在大肠中,发酵以与在瘤网胃中相同的方式继续进行。

[0007] 用作反刍动物饲料添加剂的酶主要是纤维蛋白酶,如纤维素酶、 β -葡聚糖酶和半纤维素酶(Beauchemin等人,2004,A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants.[反刍动物饲料酶产品开发的基本原理]Can.J.Anim.Sci.[加拿大动物科学杂志]84:23-36中的表1)。关于用于反刍动物用途的淀粉水解酶的报道是有限的。淀粉水解酶分为内切淀粉酶和外切淀粉酶。

[0008] 内切淀粉酶,也称为 α -淀粉酶(E.C.3.2.1.1),是淀粉降解酶,其催化多糖中内部 α -1,4-O-糖苷键的水解,同时在产物中保留 α -异头构型。大多数 α -淀粉酶需要钙离子(Ca^{2+})才能发挥其活性、结构完整性和稳定性。

[0009] α -淀粉酶家族,即糖苷水解酶的族GH-H,是包含近30种不同酶特异性的糖苷水解酶、转移酶和异构酶的最大家族。多种酶能够作用于淀粉。这些酶可分为四组:内切淀粉酶、外切淀粉酶、脱支酶和转移酶。

[0010] 内切淀粉酶切割内部 α -1,4键,产生 α -异头产物。

[0011] 外切淀粉酶切割外部葡萄糖残基的 α -1,4或 α -1,6键,产生 α -或 β -异头产物。

- [0012] 脱支酶仅水解 α -1,6键,留下长线性多糖。
- [0013] 转移酶切割供体分子的 α -1,4糖苷键并将部分供体转移至糖苷受体形成新的糖苷键。
- [0014] 糖苷水解酶基于其反应模式被分成多个类别,并且基于其明确定义的氨基酸序列相似性被分成多个家族。大多数淀粉转化酶属于GH-13家族。GH-13家族可以基于称为族的较大单元进一步分类,所述单元是催化模块的三维结构。在针对糖苷酶和转糖苷酶定义的十四个族(A-N)中, α -淀粉酶家族(GH-13)属于第八个族GH-H。
- [0015] 动物合成并分泌消化性胰腺 α -淀粉酶用于淀粉水解。所述 α -淀粉酶在pH 6-7附近具有最佳pH,并且在小肠中具有活性。
- [0016] 向饲料中添加微生物淀粉酶可以进一步增加动物的淀粉消化,这可能是由于分泌的胰淀粉酶不充足和/或在小肠消化道中饲料通过的非常快,使得胰淀粉酶没有足够的时间彻底消化淀粉,尤其是在家禽的情况下。(Isaksen, M.F. Cowieson, A.J. Kragh, K.M. (2010). Starch-and protein-degrading enzymes: biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. [淀粉降解酶和蛋白降解酶:生物化学、酶学和与动物饲料用途相关的特征]在:Enzymes in farm animal nutrition[农场动物营养中的酶]中/由M.R.Bedford和G.G.Partridge编辑,第85-95页)。
- [0017] 因此,内切淀粉酶已成为饲料工业中广泛使用的饲料酶之一。最常用的饲料淀粉酶衍生自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)。
- [0018] 这些饲料淀粉酶在pH 4至pH 8的pH范围内具有最佳活性。它们中的大多数对胃蛋白酶具有相当大的耐受性。然而,这些饲料酶似乎不具有生淀粉结合结构域(SBD),并且可能具有有限的水解非糊化生淀粉的能力。
- [0019] Planchot等人(Extensive degradation of native starch granules by alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*[来自烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)的 α -淀粉酶对天然淀粉颗粒的广泛降解],Journal of Cereal Science[谷物科学杂志],第21卷,第2期,1995,第163-171页)报道了与胰淀粉酶相比,来自芽孢杆菌属物种(*Bacillus* sp.)的 α -淀粉酶在降解颗粒淀粉方面的效率低。EFSA(Scientific Opinion on the safety and efficacy of Ronozyme RumiStar(alpha-amylase) as a feed additive for dairy cows[关于Ronozyme RumiStar(α -淀粉酶)作为奶牛饲料添加剂的安全性和有效性的科学意见].Additives and Products or Substances used in Animal Feed(FEEDAP)[动物饲料中使用的添加剂和产品或物质(FEEDAP)].EFSA Journal[EFSA杂志]2012;10(7):2777)报道了来自地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶用于奶牛的用途。效果有时是显而易见的,而有时效果并不显著。Dettori-Campus等人(Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26.[来自嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)NCA 26的淀粉酶对淀粉颗粒的水解]Process Biochemistry[加工生物化学]第27卷,第1期,1992年1月,第17-21页)研究了来自大约16种芽孢杆菌菌株的淀粉酶,并表明它们偏好可溶性淀粉而不是生淀粉,其中对于溶淀粉芽孢杆菌(*B. amylolyticus*)菌株,生淀粉活性与可溶性淀粉的最高比率为0.25。
- [0020] Tricarico等人(Dietary supplementation of ruminant diets with an

Aspergillus oryzae alpha-amylase. [用米曲霉 α -淀粉酶对反刍动物饮食进行膳食补充] Animal Feed Science and Technology. [动物饲料科学与技术] 第145卷, 第1-4期, 2008年8月14日, 第136-150页) 综述了来自米曲霉的 α -淀粉酶在反刍动物饮食的膳食补充中的用途并表明这种淀粉酶补充可以通过改变瘤胃的淀粉消化而不必增加瘤胃中的淀粉消化来改善动物生产力。这种效果很可能来自酶杂质, 因为根据定义, 预期添加淀粉酶会增加淀粉消化 (Beauchemin, Holtshausen, (2010) . Developments in enzyme usage in ruminants. [反刍动物中酶用量的发展] 在: Developments in enzyme usage in ruminants. [反刍动物中酶用量的发展] 中, 在: Enzymes in farm animal nutrition [农场动物营养中的酶] 中/由M.R.Bedford和G.G.Partridge编辑, 第206-230页)。

[0021] Monteiro de Souza等人 (Application of microbial alpha-amylase in industry-a review. [微生物 α -淀粉酶在工业中的应用-综述] Brazilian Journal of Microbiology [巴西微生物学杂志] (2010) 41:850-861) 综述了具有工业重要性的 α -淀粉酶, 以及几乎所有这些都具有高于pH 5的pH最佳值, 除了一种来自白曲霉 (Aspergillus kawachii) 的 α -淀粉酶, 所述酶在3.0处具有最佳pH和稳定性。由于具有降解生淀粉或颗粒淀粉的能力, 淀粉酶白曲霉与葡糖淀粉酶一起用于玉米淀粉的同时液化和发酵成生物乙醇 (Dunn-Coleman等人, 2008, US 7354752B2)。

[0022] 淀粉在饲料中的消化率高度可变, 并且取决于许多因素, 包括淀粉和饲料基质两者的物理结构。

[0023] 2005年2月17日公开的美国专利申请公开2005/0037053公开了具有淀粉酶活性并且能够降解单胃动物(如家禽和猪)的包含淀粉的饲料中抗性淀粉的酶的用途。

[0024] 2008年1月17日公开的WO 2008/06881公开了细菌淀粉酶用于牛科亚家族反刍动物的饲料中以改善产奶量、饲喂饮食的表观消化率、喂养料干物质消失、体重增加和/或饲料转换率的用途。

[0025] 2015年9月3日公开的WO 2015/128366公开了将细菌淀粉酶与一种或多种蛋白酶组合用于牛科亚家族反刍动物的饲料中以改善玉蜀黍和/或玉蜀黍青贮的消化率(具体地, 以改善产奶量、体重增加和/或饲料转化率)的用途。

[0026] 因此, 对增加反刍动物的淀粉消化率、增加葡萄糖产率、增加干物质消化和/或气体产生仍存在需求。

发明内容

[0027] 在一个实施例中, 公开了一种用于增加反刍动物中淀粉消化率和葡萄糖产率的方法, 所述方法包括添加至少一种 α -1,4/1,6-糖苷水解酶(GLCH)作为饲料添加剂以饲喂反刍动物, 其中所述水解酶: (a) 与在胃蛋白酶存在下在pH 6的水解酶活性相比, 在胃蛋白酶存在下在pH小于或等于3具有至少20%活性, (b) 所述水解酶在反刍动物的包含瘤胃、皱胃和小肠的三个消化室的至少两个中具有活性, 并且 (c) 所述水解酶与存在于所述反刍动物消化室中的消化酶一起作用以增加淀粉消化率和葡萄糖产率。

[0028] 在第二实施例中, 所述至少一种GLCH酶能够在与瘤胃或皱胃中发现的条件相当的条件下水解生淀粉。

[0029] 在第三实施例中, 所述水解酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶、葡糖淀粉酶和 α -葡

糖苷酶。优选地,所述组由以下组成:

[0030] α -淀粉酶和葡糖淀粉酶。

[0031] 在第四实施例中,所述 α -淀粉酶是GH 13家族的成员或选自由以下组成的组: α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1) ;支链淀粉酶 (EC 3.2.1.41) ;环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶 (EC 2.4.1.19) ;环麦芽糖糊精酶 (EC 3.2.1.54) ;海藻糖-6-磷酸水解酶 (EC 3.2.1.93) ;寡- α -葡糖苷酶 (EC 3.2.1.10) ;生麦芽糖淀粉酶 (EC 3.2.1.133) ;新支链淀粉酶 (EC 3.2.1.135) ; α -葡糖苷酶 (EC 3.2.1.20) ;形成麦芽四糖的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.60) ;异淀粉酶 (EC 3.2.1.68) ;葡糖葡聚糖酶 (EC 3.2.1.70) ;形成麦芽六糖的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.98) ;形成麦芽三糖的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.116) ;分支酶 (EC 2.4.1.18) ;海藻糖合酶 (EC 5.4.99.16) ;4- α -葡聚糖转移酶 (EC 2.4.1.25) ;形成麦芽五糖的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.-) ;淀粉蔗糖酶 (EC 2.4.1.4) ;蔗糖磷酸化酶 (EC 2.4.1.7) ;麦芽寡糖基海藻糖海藻糖水解酶 (EC 3.2.1.141) ;异麦芽酮糖合酶 (EC 5.4.99.11) ;麦芽寡糖基海藻糖合酶 (EC 5.4.99.15) ;淀粉- α -1,6-葡糖苷酶 (EC 3.2.1.33) ;和 α -1,4-葡聚糖:磷酸 α -麦芽糖基转移酶 (EC 2.4.99.16)。

[0032] 在第五实施例中,所述葡糖苷酶是GH 13或GH31家族的成员或选自由以下组成的组: α -葡糖苷酶 (EC 3.2.1.20) ; α -半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.22) ; α -甘露糖苷酶 (EC 3.2.1.24) ; α -1,3-葡糖苷酶 (EC 3.2.1.84) ;蔗糖酶-异麦芽糖酶 (EC 3.2.1.48) (EC 3.2.1.10) ; α -木糖苷酶 (EC 3.2.1.177) ; α -葡聚糖裂解酶 (EC 4.2.2.13) ;异麦芽糖基转移酶 (EC 2.4.1.-) ;寡糖 α -1,4-葡糖基转移酶 (EC 2.4.1.161) ;磺基喹诺酮酶 (sulfoquinovosidase) (EC 3.2.1.-)。

[0033] 在第六实施例中,所述葡糖淀粉酶是GH15家族的成员或选自由以下组成的组:葡糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3) ;葡糖葡聚糖酶 (EC 3.2.1.70) ; α -海藻糖酶 (EC 3.2.1.28) ;和右旋糖酐糊精酶 (EC 2.4.1.2)。

[0034] 在第七实施例中,公开了一种用于在反刍动物中在发酵期间增加淀粉消化率、增加葡萄糖产率、增加干物质消化和增加气体产生的方法,所述方法包括向饲料中添加一种酶组合物,所述酶组合物包含 (i) 至少一种GLCH酶作为反刍动物的饲料添加剂,其中所述酶: (a) 与在胃蛋白酶存在下在pH 6的酶活性相比,在胃蛋白酶存在下在pH小于或等于3具有至少20%活性, (b) 所述酶在反刍动物的包含瘤胃、皱胃和小肠的三个消化室的至少两个中具有活性,并且 (c) 所述酶与胰淀粉酶一起作用以增加葡萄糖产率;以及 (ii) 至少一种蛋白酶。

[0035] 在第九实施例中,所述至少一种GLCH酶能够水解生淀粉。

[0036] 在第十实施例中,所述GLCH酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶、葡糖淀粉酶和 α -葡糖苷酶。优选地,所述酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶和葡糖淀粉酶。

[0037] 在第十一实施例中,所述至少一种GLCH酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1) ;支链淀粉酶 (EC 3.2.1.41) ;环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶 (EC 2.4.1.19) ;环麦芽糖糊精酶 (EC 3.2.1.54) ;海藻糖-6-磷酸水解酶 (EC 3.2.1.93) ;寡- α -葡糖苷酶 (EC 3.2.1.10) ;生麦芽糖淀粉酶 (EC 3.2.1.133) ;新支链淀粉酶 (EC 3.2.1.135) ; α -葡糖苷酶 (EC 3.2.1.20) ;形成麦芽四糖的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.60) ;异淀粉酶 (EC 3.2.1.68) ;葡糖葡聚糖酶 (EC 3.2.1.70) ;形成麦芽六糖的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.98) ;形成麦芽三糖的 α -淀粉

酶(EC 3.2.1.116)；分支酶(EC 2.4.1.18)；海藻糖合酶(EC 5.4.99.16)；4- α -葡聚糖转移酶(EC 2.4.1.25)；形成麦芽五糖的 α -淀粉酶(EC 3.2.1.-)；淀粉蔗糖酶(EC 2.4.1.4)；蔗糖磷酸化酶(EC 2.4.1.7)；麦芽寡糖基海藻糖海藻糖水解酶(EC 3.2.1.141)；异麦芽酮糖合酶(EC 5.4.99.11)；麦芽寡糖基海藻糖合酶(EC 5.4.99.15)；淀粉- α -1,6-葡糖苷酶(EC 3.2.1.33)；和 α -1,4-葡聚糖：磷酸 α -麦芽糖基转移酶(EC 2.4.99.16)。

[0038] 在第十二实施例中，所述葡糖苷酶选自由以下组成的组： α -葡糖苷酶(EC 3.2.1.20)； α -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22)； α -甘露糖苷酶(EC 3.2.1.24)； α -1,3-葡糖苷酶(EC 3.2.1.84)；蔗糖酶-异麦芽糖酶(EC 3.2.1.48) (EC 3.2.1.10)； α -木糖苷酶(EC 3.2.1.177)； α -葡聚糖裂解酶(EC 4.2.2.13)；异麦芽糖基转移酶(EC 2.4.1.-)；寡糖 α -1,4-葡糖基转移酶(EC 2.4.1.161)；碘基喹诺酮酶(EC 3.2.1.-)。

[0039] 在第十三实施例中，所述葡糖淀粉酶选自GH15糖基水解酶家族。

[0040] 在第十四实施例中，所述蛋白酶选自由以下组成的组：酸性蛋白酶或中性金属蛋白酶，并且优选地，所述蛋白酶是真菌天冬氨酸蛋白酶或细菌中性金属蛋白酶。

附图说明

[0041] 图1描绘了在胃蛋白酶和AFP蛋白酶存在下通过AkAA α -淀粉酶从玉米面粉中释放葡萄糖和麦芽糖(实例2)。

[0042] 图2描绘了通过AkAA α -淀粉酶和胰酶从玉米面粉中释放葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖以及AkAA与胰酶在增加葡萄糖释放和减少麦芽三糖释放中的协同作用(实例4)。

[0043] 图3显示了在pH 2.5在胃蛋白酶的存在下和在pH 6.7在胰酶的存在下玉米面粉中AtAA α -淀粉酶的活性以及当AtAA和胰酶一起给予时麦芽三糖的完全转化(实例5)。

[0044] 图4显示了当与瘤胃液一起孵育时 α -淀粉酶AkAA和AcAA及其与葡糖淀粉酶TrGA和CS4以及天冬氨酸蛋白酶的混合物的稳定性(实例6)。

[0045] 图5显示了在pH 3.2-6.0测试的在胃蛋白酶存在下AkAA和AcAA α -淀粉酶的活性(实例7)。

[0046] 图6显示了在胰酶存在下含有 α -淀粉酶AkAA、AcAA和葡糖淀粉酶TrGA、CS4以及天冬氨酸蛋白酶AFP的酶混合物的活性(实例8)。

[0047] 图7显示了葡糖淀粉酶与胰酶在玉米淀粉颗粒水解增加中的相互作用(实例10)。

[0048] 图8显示了葡糖淀粉酶与胰酶在玉米面粉水解增加中的相互作用(实例10)。

[0049] 图9显示了在固定量的胰酶存在下，通过酵母麦芽糖酶(α -葡糖苷酶)从玉米淀粉颗粒中释放葡萄糖(实例13)。

[0050] 图10显示了五种 α -葡糖苷酶在瘤胃液中的稳定性以及与胰酶在葡萄糖释放中的相互作用(实例15)。

[0051] 图11显示了在pH 6.0在葡萄糖释放中五种 α -葡糖苷酶与胰酶的相互作用(实例16)。

具体实施方式

[0052] 引用的所有专利、专利申请和出版物均通过引用以其全文并入本文中。

[0053] 在本公开中，使用了许多术语和缩写。除非另有特别说明，以下定义适用。

[0054] 在元素或组分前的冠词“一个/种(a/an)”和“所述(the)”在关于所述元素或组分的实例(即,出现)的数目旨在是非限制性的。因此,“一个/种(a/an)”和“所述(the)”应理解为包括一个/种或至少一个/种,并且元素或组分的单数词语形式还包括复数,除非所述数字明显意指单数。

[0055] 术语“包含”意指如权利要求书中所提及的说明的特征、整数、步骤或组分的存在,而并未排除一个或多个其他特征、整数、步骤、组分或其组的存在或添加。术语“包含”旨在包括术语“基本上由……组成”和“由……组成”所涵盖的实施例。类似地,术语“基本上由……组成”旨在包括由术语“由……组成”涵盖的实施例。

[0056] 在存在的情况下,所有范围是包含端值的和可组合的。例如,当列举“1至5”的范围时,所列举的范围应解释为包括“1至4”、“1至3”、“1至2”、“1至2和4至5”、“1至3和5”等范围。

[0057] 如本文与数值结合所使用的,术语“约”是指数值的+/-0.5的范围,除非所述术语在上下文中另有具体定义。例如,短语“约6的pH值”是指pH值为从5.5至6.5,除非所述pH值另有具体定义。

[0058] 在本说明书全文中给出的每一最大数值限度旨在包括每一较低数值限度,如同此类较低数值限度在本文中明确写出一样。在本说明书全文中给出的每一最小数值限度将包括每一较高数值限度,如同此类较高数值限度在本文中明确写出一样。在本说明书全文中给出的每一数值范围将包括落入此类较宽数值范围内的每一较窄数值范围,如同此类较窄数值范围在本文中全部明确写出一样。

[0059] 术语 α -1,4/1,6-糖苷水解酶或 α -1,4;1,6-糖苷水解酶在本文中可互换使用(“GLCH”)。它们是指能够水解寡聚物或聚合物分子中 α -1,4键和/或 α -1,6键的酶,其中这些糖苷水解酶(a)与在胃蛋白酶存在下在pH 6的酶活性相比,在胃蛋白酶存在下在pH小于或等于3具有至少20%活性,(b)此类酶在反刍动物的包含瘤胃、皱胃和小肠的三个消化室的至少两个中具有活性,并且(c)所述酶与胰淀粉酶一起作用以增加葡萄糖产率。优选地,这些酶具有一个或两个碳水化合物结合模块并且能够水解生淀粉。优选地,这些糖苷水解酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶、葡糖淀粉酶和/或 α -葡糖苷酶。

[0060] 术语“糖苷水解酶”可与“糖苷酶”和“糖基水解酶”互换使用。糖苷水解酶有助于复合糖(多糖)中糖苷键的水解。与糖基转移酶一起,糖苷酶形成用于糖苷键合成和破坏的主要催化机制。糖苷水解酶被分类为EC 3.2.1,作为催化O-或S-糖苷水解的酶。糖苷水解酶也可根据水解反应的立体化学结果进行分类。因此它们可被分类为构型保持酶(retaining enzyme)或构型翻转酶(inverting enzyme)。糖苷水解酶也可分为外切或内切作用,取决于它们分别作用于(通常非还原)寡糖/多糖链的末端还是中间。糖苷水解酶也可以通过基于序列或结构的方法进行分类。它们通常以它们所作用的底物命名。

[0061] 术语“糖基转移酶”是指催化单糖之间糖苷键形成的酶。

[0062] 术语“聚糖”和“多糖”在本文中可互换使用。聚糖是指多糖或寡糖,或糖缀合物的碳水化合物部分,如糖蛋白、糖脂或蛋白多糖,即使所述碳水化合物仅为寡糖。聚糖可以是单糖残基的同聚物或杂聚物。它们可能是线性或支链分子。可以发现,如在糖蛋白和蛋白多糖中一样,聚糖附接到蛋白质。通常,它们可以在细胞的外表面找到。O-和N-连接的聚糖在真核生物中非常常见,但是也可以在原核生物中发现,尽管不太常见。

[0063] 术语“ α -淀粉酶”与 α -1,4-D-葡聚糖葡聚糖水解酶和糖原酶互换使用。 α -淀粉酶

(E.C.3.2.1.1) 通常(但不总是)需要钙才能起作用。这些酶催化寡糖和多糖中 α -1,4-糖苷键的内切水解。 α -淀粉酶以随机方式作用于淀粉、糖原和相关多糖和寡糖,从而释放 α -构型中的还原基团。

[0064] 术语“低pH活性 α -淀粉酶(“LpHAA”)是指与其在pH 6.0的活性相比,在pH小于或等于3.0具有至少20%活性的 α -淀粉酶。术语“葡糖淀粉酶”(EC 3.2.1.3)可与葡聚糖1,4- α -葡糖苷酶、淀粉葡糖苷酶、 γ -淀粉酶、溶酶体 α -葡糖苷酶、酸性麦芽糖酶、外切-1,4- α -葡糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、 γ -1,4-葡聚糖葡糖水解酶、酸性麦芽糖酶、以及1,4- α -D-葡聚糖水解酶互换使用。这种酶切割直链淀粉和支链淀粉非还原末端的最后的 α -1,4-糖苷键以产生葡萄糖。它还切割 α -1,6-糖苷键。

[0065] 术语“ α -葡糖苷酶”(E.C.3.2.1.20)可与麦芽糖酶、葡萄糖转化酶、葡萄糖蔗糖酶、麦芽糖酶-葡糖淀粉酶、 α -葡萄糖吡喃糖苷酶、葡糖苷酶转化酶、 α -D-葡糖苷酶、 α -葡糖苷水解酶、 α -1,4-葡糖苷酶、以及 α -D-葡糖苷葡萄糖水解酶互换使用。这种酶水解末端非还原(1-4)连接的 α -葡萄糖残基以释放单个 α -葡萄糖分子。 α -葡糖苷酶是释放 α -葡萄糖而不是 β -葡萄糖的碳水化合物-水解酶。

[0066] 关于在饲养家畜时饲喂动物的产品,使用术语“饲料”。术语“饲料”和“动物饲料”可以互换使用。在优选的实施例中,所述食物或饲料供非反刍动物和反刍动物食用。

[0067] 如本文所使用的,术语“直接饲喂的微生物”(“DFM”)是活的(有活力的)天然发生的微生物的来源。DFM的类别包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳酸菌和酵母菌。芽孢杆菌属是独特的、形成孢子的革兰氏阳性杆菌。这些孢子非常稳定,并且可以承受环境条件,如热、湿气和一定范围的pH。这些孢子当被动物摄入后会萌发成有活性的营养细胞,并可用于粗粉和压成丸粒的饮食中。乳酸菌是革兰氏阳性球菌,可产生对病原体有拮抗作用的乳酸。由于乳酸菌似乎有点对热敏感,所以它们不能用于压成丸粒的饮食中。乳酸菌的种类包括双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)和链球菌(*Streptococcus*)。酵母不是细菌。这些微生物属于植物组真菌。

[0068] 如本文所使用的,术语“蛋白酶”是指能够切割肽键的酶。术语“蛋白酶(protease)”、“肽酶”和“蛋白酶(proteinase)”可以互换使用。蛋白酶可以在动物、植物、细菌、古细菌和病毒中找到。蛋白质水解可通过目前被分为以下六大组的酶实现:天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。

[0069] 具体地,术语“蛋白酶”意指源自微生物(例如真菌、细菌)或衍生自植物或动物的蛋白质或多肽结构域,且其具有催化肽键在蛋白质主链的一个或多个不同位置的切割的能力(例如E.C.3.4)。

[0070] 术语“酸性蛋白酶”意指在酸性条件下能够水解蛋白质的蛋白酶。它可以涵盖任何数量的蛋白质水解剂,如内肽酶或外肽酶。

[0071] 术语“天冬氨酸蛋白酶(aspartic protease)”和“天冬氨酸蛋白酶(aspartic acid protease)”在本文中可互换使用,是一种酸性蛋白酶。天冬氨酸蛋白酶(EC 3.4.23),也称为天冬氨酰蛋白酶,是一个活化的水分子与一个或多个催化天冬氨酸残基结合,以水解多肽底物中的肽键。通常,它们在活性位点上有两个高度保守的天冬氨酸,并且在酸性pH下最具活性。

[0072] 缩写“AFP”是指一种天冬氨酸真菌蛋白酶,是一种来自真菌微生物来源的天冬氨

酸蛋白酶。

[0073] 术语“金属蛋白酶”是其催化机制涉及金属的任何蛋白酶。大多数金属蛋白酶需要锌,但有些使用钴。金属离子通过三个配体与蛋白质配位。配位金属离子的配体可随组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸和精氨酸而变化。第四个配位位置被不稳定的水分子吸收。

[0074] 存在两个亚组的金属蛋白酶,所述金属蛋白酶包括(a)外肽酶、金属外肽酶(EC编号:3.4.17),和(b)金属内肽酶(3.4.24)。

[0075] 熟知的金属内肽酶包括ADAM蛋白和基质金属蛋白酶。

[0076] 如本文所使用的,术语“胃蛋白酶”是指在从2.0至3.5的低pH处将蛋白质分解成较小肽的酶,即它是属于天冬氨酸肽酶家族A1的蛋白酶。胃蛋白酶产生并被分泌到胃中,并且是人类和动物消化系统(胃蛋白酶在消化系统中帮助消化食物或饲料中的蛋白质)中的主要消化酶之一。

[0077] 如本文所使用的,术语“反刍动物”是指能够通过在消化之前在专门的胃中发酵(主要通过微生物作用)从基于植物的食物中获取营养素的哺乳动物。所述过程通常需要将发酵的摄取物(称为反刍食物)再次反刍和咀嚼。再次咀嚼反刍食物以进一步分解植物物质和刺激消化的过程叫做反刍。大约150种反刍动物物种包括家养物种和野生物种两者。反刍动物包括但不限于牛、奶牛、山羊、绵羊、长颈鹿、牦牛、鹿、麋鹿、羚羊、水牛等。

[0078] 如本文所使用的,术语“反刍动物的消化室”是指瘤胃、网胃、瓣胃、皱胃和小肠(McDonald等人,2011,Animal Nutrition[动物营养](第7版)第156-191页)。皱胃是直接等效的单胃。

[0079] 如本文所使用的,术语“秣料”是指一种动物饲料类型,是专门用于饲养驯养的家畜(如牛、山羊、绵羊、马、鸡和猪)的任何农业食料。“秣料”具体是指给予动物的食物(包括切割并喂给它们的植物),而不是它们自己觅食的食物(称为饲草)。术语秣料也被称为干饲料,并且包括干草、秸秆、青贮饲料、压缩的和压成丸粒的饲料、油和混合给养,以及发芽谷物和豆类(如豆芽、新鲜麦芽或麦芽废渣)。大多数动物饲料来自植物,但一些制造商将成分添加到动物来源的加工饲料中。

[0080] 关于在饲养家畜时饲喂动物的产品,使用术语“饲料”。术语“饲料”和“动物饲料”可以互换使用。

[0081] 术语“淀粉(starch)”和“淀粉(amyIum)”可互换使用。淀粉是由通过糖苷键连接的大量葡萄糖单元组成的聚合碳水化合物,并且是植物中最常见的储存碳水化合物。因此,“淀粉”可以指由植物的复合多糖碳水化合物组成任何材料,所述复合多糖碳水化合物由具有化学式 $(C_6H_{10}O_5)_x$ (其中X可以是任何数目)的直链淀粉和支链淀粉组成。具体地,所述术语是指任何基于植物的材料,包括但不限于谷物、草、块茎、和根,并且更具体地是小麦、大麦、玉米、黑麦、水稻、高粱、麸、木薯、粟、马铃薯、甘薯、和树薯。

[0082] 术语“淀粉结合结构域(SBD)或碳水化合物结合模块(CBM)”在本文中可互换使用。SBD可分为九个CBM家族。作为能量来源,淀粉被大量各种淀粉分解酶降解。然而,这些淀粉分解酶中仅约10%能够结合并降解淀粉。这些酶通常具有称为淀粉结合结构域的独特序列结构模块,所述淀粉结合结构域介导与淀粉颗粒的附接。SBD是指优先结合淀粉(多糖)底物或麦芽糖、 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精等的氨基酸序列。它们通常是在约10%的微生物淀粉分解酶中发现的大约100个氨基酸残基的基序。

[0083] 术语“催化结构域”是指多肽的结构区域,所述区域不同于CBM并且含有底物水解的活性位点。

[0084] 术语“颗粒淀粉”是指生的(即未烹调的)淀粉,例如,未经历糊化的颗粒淀粉。

[0085] 术语“颗粒淀粉水解(GSH)酶”和“颗粒淀粉水解(GSH)活性”在本文中可互换使用并且是指能够在与动物(具体是反刍动物)消化道中发现的条件相当的消化道相关条件下以颗粒形式水解淀粉的酶。

[0086] 术语“糊化”是指在水和热的存在下分解淀粉分子的分子间键,从而允许氢键结合位点与更多的水接合。这不可逆地将淀粉颗粒溶解于水中以形成黏性悬浮液。

[0087] 术语“聚合度(DP)”是指大分子或聚合物或寡聚物分子中单体单元的数目。例如,它可以指给定的糖类中单体单元的数目(n)。DP1的实例是单糖,如葡萄糖和果糖。DP2的实例是二糖,如麦芽糖和蔗糖。DP>3表示聚合度大于3的聚合物。

[0088] 术语“分离的”意指处于在自然界中不存在的形式或环境中的物质。分离物质的非限制性实例包括(1)任何非天然发生的物质,(2)任何物质,包括但不限于,任何宿主细胞、酶、变体、核酸、蛋白质、肽或辅因子,其至少部分地从与其天然相关的天然发生的成分中的一种或多种或全部中去除;(3)任何经人手修饰的物质(相对于自然界中发现的物质);或(4)相对于与其天然相关联的其他成分,通过增加物质的量进行修饰的任何物质。术语“分离的核酸分子”、“分离的多核苷酸”、和“分离的核酸片段”将可互换使用并是指单链或双链的RNA或DNA的聚合物,任选地含有合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。呈DNA聚合物形式的分离的核酸分子可由cDNA、基因组DNA或合成的DNA的一个或多个区段构成。

[0089] 术语“经纯化的”如应用于核酸或多肽时通常表示基本上不含其他组分的核酸或多肽,如通过本领域熟知的分析技术确定的(例如,纯化的多肽或多核苷酸在电泳凝胶、色谱洗脱液和/或经历密度梯度离心的介质中形成离散的带)。例如,在电泳凝胶中产生基本上一条带的核酸或多肽是“经纯化的”。经纯化的核酸或多肽是至少约50%纯的,通常是至少约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%、约99.8%或更加纯的(例如,在摩尔基础上按重量计的百分比)。在相关意义上,当在应用纯化或富集技术之后存在分子的浓度的大幅度增加时,对于所述分子而言组合物被富集了。术语“富集”是指化合物、多肽、细胞、核酸、氨基酸或其他特定材料或组分以高于起始组合物的相对或绝对浓度存在于组合物中。

[0090] 术语“肽”、“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用,并且是指通过肽键连接在一起的氨基酸的聚合物。“蛋白质”或“多肽”包含氨基酸残基的聚合序列。贯穿本公开使用了遵照IUPAC-IUB生物化学术语联合委员会(Joint Commission on Biochemical Nomenclature, JCBN)定义的氨基酸的单字母和3字母代码。单字母X是指二十个氨基酸中的任一个。还应当理解,由于遗传密码的简并性,多肽可以由多于一种核苷酸序列编码。突变可以由亲本氨基酸的单个字母代码命名,随后是位置编号,然后是变体氨基酸的单个字母代码。例如,将在位置87处的甘氨酸(G)突变为丝氨酸(S)表示为“G087S”或“G87S”。当描述修饰时,位置后面在括号中列出的氨基酸指示由任何列出的氨基酸在所述位置处的取代清单。例如,6(L,I)意指位置6可以被亮氨酸或异亮氨酸取代。有时,在序列中,将斜线(/)用于定义取代,例如,F/V指示特定位置,在所述位置处可以具有苯丙氨酸或缬氨酸。

[0091] 突变可以由亲本氨基酸的单个字母代码命名,随后是位置编号,然后是变体氨基酸的单个字母代码。例如,将在位置87处的甘氨酸(G)突变为丝氨酸(S)表示为“G087S”或“G87S”。

[0092] 术语“成熟”形式的蛋白质、多肽或肽是指没有信号肽序列和前肽序列的蛋白质、多肽或酶的功能形式。

[0093] 术语“前体”形式的蛋白质或肽是指具有有效地连接到所述蛋白质的氨基或羧基末端的前导序列的成熟形式的蛋白质。前体还可以具有有效地连接到前导序列的氨基末端的“信号”序列。前体还可以具有涉及翻译后活性的另外的多肽(例如,从其切割以留下成熟形式的蛋白质或肽的多肽)。

[0094] “前导序列”或“前肽序列”是指在信号肽序列与成熟酶序列(例如,如本文所述的糖苷水解酶)之间的、酶的正确折叠和分泌所必需的氨基酸序列;它们有时被称为分子内伴侣。前导序列或前肽序列的切割产生成熟的活性酶,其通常表达为前酶。

[0095] 术语“信号序列”和“信号肽”是指可以参与蛋白质的成熟或前体形式的分泌或定向转运的氨基酸残基序列。通常,信号序列位于前体或成熟蛋白序列的N-末端。信号序列可以是内源的或外源的。成熟蛋白中一般不存在信号序列。通常,在蛋白质转运后,信号序列通过信号肽酶从蛋白质切割。目的基因可以在有或没有信号序列的情况下表达。

[0096] 关于氨基酸序列或核酸序列,术语“野生型”指示氨基酸序列或核酸序列是天然的或天然存在的序列。如本文所使用的,术语“天然存在的”是指在自然界中发现的任何物质(例如蛋白质、氨基酸或核酸序列)。相反,术语“非天然存在”是指在自然界中没有发现的任何物质(例如,在实验室中生产的重组核酸和蛋白质序列、或野生型序列的修饰)。

[0097] 如本文所使用的,关于氨基酸残基位置,“对应于”(corresponding to或corresponds to)或“对应”是指在蛋白质或肽中所列举位置处的氨基酸残基,或类似于、同源于或等同于蛋白质或肽中所列举残基的氨基酸残基。如本文所使用的,“对应区域”通常是指相关蛋白质或参比蛋白质中的类似位置。

[0098] 术语“衍生自”和“获自”不仅是指由所讨论的生物体的菌株生产或可以由其生产的蛋白质,而且是指由从此类菌株分离的DNA序列编码并且在含有此类DNA序列的宿主生物体中生产的蛋白质。另外,所述术语是指由合成的和/或cDNA来源的DNA序列编码并且具有所讨论的蛋白质的鉴定特征的蛋白质。

[0099] 术语“氨基酸”是指蛋白质或多肽的基本化学结构单元。因此,氨基酸丙氨酸(疏水性氨基酸)的密码子可以被编码另一个疏水性较弱的残基(如甘氨酸)或疏水性较强的残基(如缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸)的密码子取代。类似地,导致一个带负电荷的残基取代另一个带负电荷的残基(如,天冬氨酸取代谷氨酸)或者一个带正电荷的残基取代另一个带正电荷的残基(如,赖氨酸取代精氨酸)的改变也可以预期产生功能上等效的产物。在许多情况下,导致蛋白分子的N-末端和C-末端部分改变的核苷酸变化也将预计不会改变所述蛋白的活性。所提出的修饰中的每一种均完全在本领域常规技术内,如确定所编码的产物的生物活性的保留情况。

[0100] 术语“密码子优化的”,如它是指用于转化各种宿主的核酸分子的基因或编码区域,是指核酸分子的基因或编码区域中密码子的改变,以反映宿主生物体的典型密码子使用,而不改变DNA编码的多肽。

[0101] 术语“基因”是指表达特定蛋白质的核酸分子,包括所述编码序列之前(5' 非编码序列)和之后(3' 非编码序列)的调控序列。“天然基因”是指自然界中发现的具有其自身调控序列的基因。“嵌合基因”是指不是天然基因的任何基因,其包含不是在自然界中一起被发现的调节和编码序列。因此,嵌合基因可以包含衍生自不同来源的调控序列和编码序列,或者包含衍生自同一来源但以不同于天然发生的方式排列的调控序列和编码序列。“内源基因”是指位于生物体基因组的天然位置中的天然基因。“外来”基因是指通常不在宿主生物体中被发现,但通过基因转移引入宿主生物体中的基因。外来基因可以包含插入非天然生物体中的天然基因或嵌合基因。“转基因”是通过转化程序引入基因组中的一种基因。

[0102] 术语“编码序列”是指编码特异性氨基酸序列的核苷酸序列。“合适的调控序列”是指位于编码序列的上游(5' 非编码序列)、内部或下游(3' 非编码序列),并且影响相关编码序列的转录、RNA加工或稳定性、或者翻译的核苷酸序列。调控序列可以包括启动子、翻译前导序列、RNA加工位点、效应子结合位点和茎环结构。

[0103] 术语“有效地连接”是指核酸序列在单个核酸分子上的缩合,使得一个核酸片段的功能受到另一个的影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达(即,所述编码序列在启动子的转录控制下)时,启动子与所述编码序列有效地连接。编码序列可以在正义或反义方向上有效地连接到调控序列上。

[0104] 术语“调控序列”或“控制序列”在本文中可互换使用,并且是指能够增加或减少生物体内特定基因表达的核苷酸序列区段。调控序列的实例包括但不限于启动子、信号序列、操纵子等。如上所述,调控序列可以以正义或反义方向有效地连接至目的编码序列/基因。

[0105] “启动子”或“启动子序列”是指定义在何处RNA聚合酶开始基因转录的DNA序列。启动子序列通常直接位于转录起始位点的上游或5' 末端。启动子可以全部衍生自天然或天然发生的序列,或者由衍生自在自然界发现的不同启动子的不同元件构成,或者甚至包含合成的DNA区段。本领域技术人员应当理解,不同的启动子可能引导基因在不同组织或细胞类型中、或在不同发育阶段、或者响应于不同环境或生理条件的表达(“诱导型启动子”)。

[0106] 所述“3' 非编码序列”是指位于编码序列下游的DNA序列,并包括编码能够影响mRNA加工或基因表达(如转录终止)的调控信号的序列。

[0107] 如本文所使用的,术语“转化”是指将核酸分子转移或引入到宿主生物体中。所述核酸分子可以作为线性或环状形式的DNA引入。所述核酸分子可以是自主复制的质粒,或者它可以整合进生产宿主的基因组中。含有转化的核酸的生产宿主被称为“转化的”或“重组的”或“转基因的”生物体或“转化体”。

[0108] 如本文所使用的,术语“重组”是指例如通过化学合成或者通过经基因工程技术操纵分离的核酸区段来将两个原本分离的核酸序列区段进行人工组合。例如,其中一个或多个区段或基因已经被插入的DNA,其自然地或通过实验室操作,从不同的分子、同一分子的另一部分或人工序列插入,导致在基因中引入新的序列并随后在生物体中引入。术语“重组”、“转基因”、“转化”、“工程化”或“外源基因表达修饰”在本文中可互换使用。

[0109] 术语“重组构建体”、“表达构建体”、“重组表达构建体”和“表达盒”在本文中可互换使用。重组构建体包含核酸片段,例如在自然界中未全部一起发现的调控序列和编码序列的人工组合。例如,构建体可以包含衍生自不同来源的调控序列和编码序列,或者包含衍生自相同来源但以不同于天然发生的方式排列的调控序列和编码序列。这样一个构建体可

以单独使用或可以与载体结合使用。如果使用载体,则载体的选择取决于如本领域技术人员熟知的将用于转化宿主细胞的方法。例如,可以使用质粒载体。技术人员充分了解必须存在于载体上以便成功转化,选择和繁殖宿主细胞的遗传元件。技术人员还将认识到,不同的独立转化事件可以导致不同水平和模式的表达(Jones等人,(1985)EMBO J[欧洲分子生物学学会杂志]4:2411-2418;De Almeida等人,(1989)Mol Gen Genetics[分子和普通遗传学]218:78-86),并且因此通常筛选多个事件,从而获得显示所需表达水平和模式的品系。此类筛选可以是完成的标准分子生物学测定、生物化学测定以及其他测定,这些测定包括DNA的印迹分析、mRNA表达的Northern分析、PCR、实时定量PCR(qPCR)、逆转录PCR(RT-PCR)、蛋白表达的免疫印迹分析、酶测定或活性测定、和/或表型分析。

[0110] 术语“生产宿主”、“宿主”和“宿主细胞”在本文中可互换使用,并且指任何生物体或其细胞,无论是人类还是非人类,其中重组构建体可以稳定或瞬时引入以表达基因。所述术语涵盖了亲本细胞的任何后代,由于在繁殖期间发生的突变,其与亲本细胞不同。

[0111] 术语“百分比同一性”是如通过比较这些序列所确定的两个或更多个多肽序列或者两个或更多个多核苷酸序列之间的关系。在本领域中,“同一性”也意指多肽或多核苷酸序列之间的序列相关性程度,视情况而定,如通过此类序列的串之间的匹配核苷酸或氨基酸的数目所确定的。可通过已知方法容易地计算“同一性”和“相似性”,所述方法包括但不限于以下文献中所述的那些:Computational Molecular Biology[计算分子生物学](Lesk, A.M.编辑),Oxford University Press[牛津大学出版社],纽约州(1988);Biocomputing: Informatics and Genome Projects[生物计算:信息学和基因组工程](Smith, D.W.编辑),Academic Press[学术出版社],纽约州(1993);Computer Analysis of Sequence Data, Part I[序列数据的计算机分析,第一部分](Griffin, A.M.和Griffin, H.G.编辑),Humana Press[胡玛纳出版社],新泽西州(1994);Sequence Analysis in Molecular Biology[分子生物学中的序列分析](von Heijne, G.编辑),Academic Press[学术出版社](1987);和Sequence Analysis Primer[引物序列分析](Gribskov, M.和Devereux, J.编辑),Stockton Press[斯托克顿出版社],纽约州(1991)。确定同一性和相似性的方法被编入公开可用的计算机程序中。

[0112] 如本文所使用的,“%同一性”或“百分比同一性”或“PID”是指蛋白质序列同一性。百分比同一性可以使用本领域已知的标准技术来确定。有用的算法包括BLAST算法(参见Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,1990;以及Karlin和Altschul,Proc Natl Acad Sci USA[美国科学院院报],90:5873-5787,1993)。BLAST程序使用若干个搜索参数,其中大部分设置为默认值。NCBI BLAST算法按照生物相似性找到最相关的序列,但是不推荐用于少于20个残基的查询序列(Altschul等人,Nucleic Acids Res[核酸研究],25:3389-3402,1997和Schaffer等人,Nucleic Acids Res[核酸研究],29:2994-3005,2001)。核酸序列搜索的示例性默认BLAST参数包括:相邻字长阈值=11;E值截止值=10;评分矩阵(Scoring Matrix)=NUC.3.1(匹配=1,错配=-3);空位开放=5;以及空位延伸=2。氨基酸序列搜索的示例性默认BLAST参数包括:字长大小=3;E值截止值=10;评分矩阵=BLOSUM62;空位开放=11;以及空位延伸=1。百分比(%)氨基酸序列同一性值由匹配相同残基的数值除以“参比”序列的残基总数(包括由程序为最佳/最大比对创建的任何空位)来确定。BLAST算法将“参比”序列称为“查询”序列。

[0113] 如本文所使用的,“同源蛋白质”或“同源酶”是指在一级、二级和/或三级结构中具有不同相似性的蛋白质。当比对蛋白质时,蛋白质同源性可以是指线性氨基酸序列的相似性。蛋白质序列的同源搜索可以使用来自NCBI BLAST的BLASTP和PSI-BLAST使用阈值(E值截止值)0.001进行。(Altschul SF, Madde TL, Shaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs [空位BLAST和PSI BLAST:新一代蛋白质数据库搜索程序], Nucleic Acids Res [核酸研究] 1997年第1组;25(17):3389-402)。使用该信息,可以将蛋白质序列分组。可以使用氨基酸序列构建系统发育树。

[0114] 可以使用LASERGENE生物信息计算包的Megalign程序(DNASTAR公司,麦迪逊,威斯康星州)、Vector NTI v.7.0的AlignX程序(Informax公司,贝塞斯达,马里兰州)或EMBOSS开放软件包(EMBL-EBI; Rice等人, Trends in Genetics [遗传学趋势] 16, (6):276-277 (2000))进行序列比对和百分比同一性计算。可以使用具有默认参数的CLUSTAL比对方法(例如CLUSTALW; 例如版本1.83) (Higgins和Sharp, CABIOS, 5:151-153 (1989); Higgins等人, Nucleic Acids Res. [核酸研究] 22:4673-4680 (1994); 和Chenna等人, Nucleic Acids Res [核酸研究] 31 (13):3497-500 (2003)) (其可通过欧洲生物信息学研究所从欧洲分子生物学实验室获得)来执行序列的多重比对。用于CLUSTALW蛋白比对的合适参数包括GAP存在罚分=15、GAP延伸=0.2、矩阵=Gonnet (例如, Gonnet250)、蛋白ENDGAP=-1、蛋白GAPDIST=4和KTUPLE=1。在一个实施例中,在慢比对情况下,使用快或慢比对以及默认设置。可替代地,可以修饰使用CLUSTALW方法(例如版本1.83)的参数以同样使用KTUPLE=1、空位罚分=10、GAP延伸=1、矩阵=BLOSUM (例如BLOSUM64)、窗口(WINDOW)=5和顶部存储的对角线(TOP DIAGONALS SAVED)=5。

[0115] 作为某些方面的特征,本文公开了各种多肽氨基酸序列和多核苷酸序列。在某些实施例中可以使用与本文公开的序列具有至少约70%-85%、85%-90%、或90%-95%同一性的这些序列的变体。可替代地,在某些实施例中,变体多肽序列或多核苷酸序列可以与本文公开的序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。所述变体氨基酸序列或多核苷酸序列具有与所公开的序列相同的功能,或具有所公开的序列的功能的至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%。

[0116] 关于多肽,术语“变体”是指与指定的野生型、亲本或参比多肽不同的多肽,因为它包括一种或多种天然发生的或人造的氨基酸取代、插入或缺失。类似地,关于多核苷酸,术语“变体”是指在核苷酸序列中与指定的野生型、亲本或参比多核苷酸不同的多核苷酸。野生型、亲本或参比多肽或多核苷酸的身份将从上下文中显而易见。

[0117] 术语“质粒”、“载体”和“盒”意指染色体外元件,其通常携带非细胞中心代谢的一部分的基因,并且通常呈双链DNA的形式。这样的元件可以是衍生自任何来源的、单链或双链DNA或RNA的、处于直链或环状形式的自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体、或核苷酸序列,其中许多核苷酸序列已经被连接或重组成能够将目的多核苷酸引入细胞中的独特构造。“转化盒”是指包含基因并具有促进特定宿主细胞转化的基因之外的元件的特定载体。

术语“表达盒”和“表达载体”在本文中可互换使用，并且是指含有基因并具有允许在宿主中表达所述基因的基因之外的元件的特定载体。

[0118] 如本文所使用的，术语“表达”是指处于前体抑或成熟形式的功能性终产物（例如，mRNA或蛋白质）的生产。表达也可指将mRNA翻译成多肽。

[0119] 基因的表达涉及所述基因的转录并将mRNA翻译成前体或成熟蛋白。“反义抑制”是指能够抑制靶蛋白表达的反义RNA转录物的生产。“共抑制”是指能够抑制相同的或基本上相似的外源或内源基因的表达的正义RNA转录物的生产（美国专利号5,231,020）。“成熟”蛋白指经翻译后加工的多肽；即已经去除了存在于初级翻译产物中的任何前肽或原肽的多肽。“前体”蛋白质指mRNA的翻译初级产物；即具有仍然存在的前肽和原肽。前肽或原肽可以是但不限于细胞内定位信号。“稳定转化”是指将核酸片段转移至宿主生物体的基因组中，包括细胞核的和细胞器的基因组，导致遗传稳定的遗传。相比之下，“瞬时转化”是指将核酸片段转移至宿主生物体的细胞核中或含有DNA的细胞器中，导致基因表达而无整合或稳定的遗传。含有经转化的核酸片段的宿主生物体被称为“转基因的”生物体。

[0120] 所述表达载体可以是用于转化本领域已知的合适的生产宿主的任何数量的载体或盒中的一种。通常，所述载体或盒将包括引导相关基因的转录和翻译的序列、可选择标记、和允许自主复制或染色体整合的序列。合适的载体通常包括含有转录起始对照的基因的5'区域和控制转录终止的DNA片段的3'区域。两个对照区域都可以衍生自与转化的生产宿主细胞的基因同源的基因和/或对所述生产宿主来说是天然的基因，尽管这样的控制区域不需要如此衍生。

[0121] 如本文所使用的，“同源蛋白质”或“同源酶”是指在一级、二级和/或三级结构中具有不同相似性的蛋白质。当比对蛋白质时，蛋白质同源性可以是指线性氨基酸序列的相似性。蛋白质序列的同源搜索可以使用来自NCBI BLAST的BLASTP和PSI-BLAST使用阈值（E值截止值）0.001进行。（Altschul SF, Madde TL, Shaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs [空位BLAST和PSI BLAST:新一代蛋白质数据库搜索程序] , Nucleic Acids Res [核酸研究] 1997年第1组; 25 (17) :3389-402）。使用该信息，可以将蛋白质序列分组。可以使用氨基酸序列构建系统发育树。可以在如Vector NTI Advance套件等程序中输入氨基酸序列，并且可以使用邻接（Neighbor Joining (NJ)）法创建引导树（Saitou和Nei, Mol Biol Evol [分子生物学与进化] , 4: 406-425, 1987）。可以使用针对序列距离的Kimura校正并且忽略具有空位的位置来计算树结构。程序如AlignX可以在系统发生树上显示的分子名称之后的括号内显示计算的距离值。

[0122] 了解分子之间的同源性可以揭示分子的进化历史以及它们的功能信息；如果新测序的蛋白质与已经表征的蛋白质同源，则存在新蛋白质的生物化学功能的强烈指示。两个实体之间最基本的关系是同源性；如果两个分子衍生自共同的祖先，则它们被称为是同源的。同源分子或同源物可以分为两类：旁系同源物和直系同源物。旁系同源物是存在于一个物种内的同源物。旁系同源物在它们的详细生物化学功能上往往不同。直系同源物是存在于不同物种内并且具有非常相似或完全相同功能的同源物。蛋白质超家族是可以推断出共同祖先的蛋白质的最大分组（进化枝）。通常这个共同祖先是基于序列比对和机械相似性。通常，超家族含有若干个在所述家族内显示序列相似性的蛋白质家族。基于MEROPS蛋白酶

分类系统,术语“蛋白质宗族”通常用于蛋白酶超家族。

[0123] CLUSTAL W算法是序列比对算法的另一个实例(参见Thompson等人,Nucleic Acids Res[核酸研究]22:4673-4680,1994)。CLUSTAL W算法的默认参数包括:空位开放罚分=10.0;空位延伸罚分=0.05;蛋白质权重矩阵=BLOSUM系列;DNA权重矩阵=IUB;延迟发散序列%=40;空位分隔距离=8;DNA转换权重=0.50;列表亲水残基=GPSNDQEKR;使用负性矩阵=关;切换特殊残基罚分=开;切换亲水罚分=开;以及切换结束空位分隔罚分=关。在CLUSTAL算法中,包括在任一末端发生的缺失。例如,在500个氨基酸的多肽的任一末端(或多肽内)具有五个氨基酸缺失的变体相对于“参比”多肽具有99% (495/500个同一的残基×100)的百分比序列同一性。这样的变体将被与所述多肽具有“至少99%的序列同一性”的变体所涵盖。

[0124] 如本文所使用的,术语“功能测定”是指提供酶活性指示的测定法。在一些实施例中,所述术语是指其中针对以其通常的能力发挥功能的能力来分析酶的测定系统。

[0125] 反刍动物具有通过其微生物/酶消化系统将粗饲料转化为蛋白质和能量的独特能力。因此,反刍动物在地球生态和食物链中起着重要作用。

[0126] 反刍动物与非反刍动物之间的主要区别在于反刍动物具有由瘤胃、网胃、瓣胃和皱胃组成的四隔室胃。皱胃是直接等效的单胃(McDonald等人,2011,Animal Nutrition[动物营养](第7版)第156-191页)。

[0127] 瘤胃是最大的隔室,体积为150-200升(40-50加仑)。

[0128] 在消化系统中存在数十亿的微生物。它们帮助奶牛消化和利用饲料中的营养素。为了实现有效的饲料利用和高产奶量,细菌必须具有最佳条件。消化饲料的正是细菌。事实上,饲喂奶牛涉及饲喂奶牛瘤胃中的微生物。

[0129] 发酵过程发生在瘤胃和网胃中。奶牛的瘤胃就像一个大发酵桶。超过200种不同的细菌和20种类型的原生动物帮助奶牛利用纤维喂养料和非蛋白质氮源。

[0130] 发酵是指微生物将碳水化合物转化为挥发性脂肪酸和气体。所述过程允许奶牛将纤维素纤维转化为能量。

[0131] 在发酵期间(每天500-1500升)(150-400加仑)在瘤胃内产生的气体中,20%-40%由甲烷和二氧化碳组成。发酵气体的生产代表相当大的能量损失。某些发酵调节剂(如离子载体)通过减少那些气体能量损失来改善反刍动物的能量效率。

[0132] 通过打嗝排出发酵气体。当不可能打嗝或打嗝无效时,奶牛会出现胃气胀。当饲料进入瘤胃时,它在瘤胃垫上分层,瘤胃垫浮在瘤胃内容物的顶部。通过瘤胃壁的节律性收缩,新鲜食用的材料积聚在垫的后部区域。瘤胃垫由未消化的材料组成,其中干物质含量为15%。细菌黏附在饲料上并逐渐消化可发酵材料。当奶牛反刍时,来自前层的反刍食物被喷出。口中唾液增加,并且通过牙齿的研磨作用,暴露于微生物的表面变得更大。

[0133] 随着细菌的作用和反刍过程的继续,饲料颗粒变得更小。它们逐渐吸收液体并沉入瘤胃底部。瘤网胃底部的瘤胃内容物的干物质含量为5%。

[0134] 瘤胃每分钟收缩一次。收缩允许液体和固体内容物在瘤胃中混合以刺激发酵并避免停滞。收缩还用于释放捕获在瘤胃内容物的垫或液体部分中的气体。然后通过打嗝释放发酵气体。中断此过程可能导致胃气胀。通过瘤胃收缩将恰当大小和密度的饲料颗粒分离进网胃中的液体。随后的收缩迫使这些颗粒和液体内容物中的一些从瘤网胃出来并进入瓣

胃。

[0135] 瘤胃和网胃基本上是一个隔室,但具有不同的功能。虽然大部分发酵作用发生在瘤胃中,但网胃用作进入瓣胃或反刍的暂存区域。

[0136] 理想的瘤胃pH值在6和7之间。在这个范围内的瘤胃微生物是最健康的。如果pH值变化太大,一些类型的微生物被消除,并且饲料的利用率降低。在pH值低于6.0下,消化纤维素(干草、青贮饲料等)的微生物不能生长或发酵纤维素。当瘤胃pH值降至6以下时,瘤胃被认为是酸中毒的。瘤胃酸中毒可能是急性的,伴随pH值迅速急剧下降。在高产畜群中更常见的是亚临床酸中毒,其特征在于慢性、间歇周期的低瘤胃pH。

[0137] 如上所述,淀粉在饲料中的消化率高度可变,并且取决于许多因素,包括淀粉和饲料基质的物理结构。

[0138] 已经发现,通过使用至少一种 α -1,4/1,6-糖苷水解酶(GLCH)作为反刍动物的饲料添加剂可以改善反刍动物饮食中的淀粉消化率,尤其是生淀粉的水解,其中所述水解酶:(a)与在胃蛋白酶存在下在pH 6的酶活性相比,在胃蛋白酶存在下在pH小于或等于3具有至少20%活性,(b)所述水解酶在反刍动物的包含瘤胃、网胃、瓣胃和皱胃的至少两个消化室中具有活性,并且(c)所述水解酶与存在于所述反刍动物消化室中的消化酶一起作用以增加葡萄糖产率和增加淀粉消化率。

[0139] 在又另一方面,描述了一种用于在反刍动物中在发酵期间增加淀粉消化率、增加葡萄糖产率、增加干物质消化和增加气体产生的方法,所述方法包括向饲料中添加酶组合物,所述酶组合物包含(i)至少一种GLCH酶作为反刍动物的饲料添加剂,其中所述酶:(a)与在胃蛋白酶存在下在pH6的酶活性相比,在胃蛋白酶存在下在pH小于或等于3具有至少20%活性,(b)所述酶在反刍动物的包含瘤胃、皱胃和小肠的三个消化室的至少两个中具有活性,并且(c)所述酶与胰淀粉酶一起作用以增加葡萄糖产率;以及(ii)至少一种蛋白酶。

[0140] 与水解酶一起作用以增加葡萄糖产率的存在于反刍动物消化室中的一些消化酶,包括但不限于瘤胃微生物淀粉分解酶、胃蛋白酶或胰酶。

[0141] 优选地,所述水解酶能够在与瘤胃或皱胃中发现的条件相当的条件下水解生淀粉。

[0142] 所述水解酶可以选自由以下组成的组: α -淀粉酶、葡糖淀粉酶和 α -葡糖苷酶或者所述水解酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶和葡糖淀粉酶。

[0143] 无论是否可商购,任何合适的 α -淀粉酶(E.C.3.2.1.1)均可用于本文所述的方法中。

[0144] 示例性 α -淀粉酶包括但不限于野生型 α -淀粉酶、其变体或片段或基因工程化的杂合 α -淀粉酶,所述杂合 α -淀粉酶衍生自例如来自一种微生物来源的催化结构域和另一种微生物来源的淀粉结合结构域。可用于制备此类杂合酶的其他 α -淀粉酶的非限制性实例可衍生自芽孢杆菌(*Bacillus*)、曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)、根霉属(*Rhizopus*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、青霉属(*Penicillium*)、脉孢菌属(*Neurospora*)和腐质霉属(*Humicola*)。

[0145] 还可以提及那些具有颗粒淀粉水解活性(GSH)的 α -淀粉酶或已经被重组工程化以具有GSH活性的 α -淀粉酶。这种GSH活性是有利的,因为这些酶分解更多的淀粉,具体是任何颗粒(生)淀粉,其可存在于任何含有糖蜜等的饲料中。具有GSH活性的 α -淀粉酶包括但不限

于从白曲霉(例如, AkAA)、黑曲霉(*Aspergillus niger*) (例如, AnAA), 棒曲霉(*A. clavatus*) (Acaa)、土曲霉(*A. terreus*) (AtAA) 和里氏木霉(*Trichoderma reesei*) (例如, TrAA) 获得的 α -淀粉酶。

[0146] α -淀粉酶、AkAA、Acaa 和 AtAA 具有两个碳水化合物结合结构域, 其中一个属于碳水化合物结合模块/结构域家族20 (CBM20或CD20), 而另一个有时称为二级结合位点 (SBS)。SBS和CBM似乎通过以下起作用:1) 将酶靶向其底物, 2) 引导底物进入活性位点沟 (active site groove), 3) 底物破坏, 4) 增强持续性, 5) 变构调节, 6) 传递反应产物, 和/或7) 锚定到亲本微生物的细胞壁上。

[0147] 许多这些推定的功能与CBM中属于非催化结合的功能一致。与CBM相反, SBS相对于催化位点具有固定位置, 使得它们或多或少地适合承担特定的功能 (Cuyvers S., Dornez E., Delcour J.A., Courtin C.M. (2012), Occurrence and functional significance of secondary carbohydrate binding sites in glycoside hydrolases [糖苷水解酶中二级碳水化合物结合位点的发生和功能意义]. Crit. Rev. Biotechnol. [生物技术评论] 32, 93-107)。

[0148] 一些可商购的具有GSH活性的 α -淀粉酶或用于碳水化合物水解过程的酶是可商购的, 参见, 例如, 可从诺和诺德公司 (Novo Nordisk A/S) 获得的 **TERMAMYL® 120-L**、**LC** 和 **SC SAN SUPER®**、**SUPRA®** 和 **LIQUEZYME® SC**, 可从Verenium公司获得的 **FUELZYME® LF**, 以及可从美国丹尼斯科公司 (Danisco, US, Inc.) 的杰能科部门 (Genencor Division) 获得的 **CLARASE® L**、**SPEZYME® FRED**、**SPEZYME® XTRA**、**GC626** 和 **GZYME® G997**。

[0149] 在其他实施例中, 希望 α -淀粉酶是酸稳定的 α -淀粉酶, 并且与其在pH 6.0的活性相比, 所述淀粉酶在pH小于或等于3.0具有20%的活性。

[0150] 所述 α -淀粉酶可以选自由以下组成的组: α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1); 支链淀粉酶 (EC 3.2.1.41); 环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶 (EC 2.4.1.19); 环麦芽糖糊精酶 (EC 3.2.1.54); 海藻糖-6-磷酸水解酶 (EC 3.2.1.93); 寡- α -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.10); 生麦芽糖淀粉酶 (EC 3.2.1.133); 新支链淀粉酶 (EC 3.2.1.135); α -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.20); 形成麦芽四糖的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.60); 异淀粉酶 (EC 3.2.1.68); 葡糖葡聚糖酶 (EC 3.2.1.70); 形成麦芽六糖的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.98); 形成麦芽三糖的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.116); 分支酶 (EC 2.4.1.18); 海藻糖合酶 (EC 5.4.99.16); 4- α -葡聚糖转移酶 (EC 2.4.1.25); 形成麦芽五糖的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1); 淀粉蔗糖酶 (EC 2.4.1.4); 蔗糖磷酸化酶 (EC 2.4.1.7); 麦芽寡糖基海藻糖海藻糖水解酶 (EC 3.2.1.141); 异麦芽酮糖合酶 (EC 5.4.99.11); 麦芽寡糖基海藻糖合酶 (EC 5.4.99.15); 淀粉- α -1,6-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.33); 和 α -1,4-葡聚糖:磷酸 α -麦芽糖基转移酶 (EC 2.4.99.16)。

[0151] 无论是否可商购, 任何合适的葡萄糖淀粉酶 (GA) (E.C.3.2.1.3.) 均可用于本文所述的方法中。

[0152] 葡萄糖淀粉酶 (同义词: 淀粉葡萄糖苷酶 (GA) (E.C.3.2.1.3)) 的合适性取决于其对麦芽糖的活性。因此, 当在2% (w/v) 麦芽糖、pH 6.0和40°C下测定时, 与从里氏木霉 (TrGA) 获得的葡萄糖淀粉酶的活性相比, 合适的葡萄糖淀粉酶应对在蛋白质基础上的麦芽糖具有至少

20%的活性。TrGA因其从淀粉产生葡萄糖的能力而广泛用于第一代生物乙醇加工中(美国专利,2008,US 7413879B2,里氏木霉葡萄糖淀粉酶及其同源物)。STARGENTM002是由杜邦公司(DuPont)销售的用于乙醇生产的颗粒淀粉水解酶产品。

[0153] 对于动物营养而言,麦芽糖到葡萄糖的高水解速率是重要的,因为消化道中的血流吸收的是葡萄糖,而不是其对应的二聚体麦芽糖。

[0154] 因此,黑曲霉葡萄糖淀粉酶(AnGA)对麦芽糖的低活性使其成为不适于在本文所述方法中使用的葡萄糖淀粉酶。已知葡萄糖淀粉酶在活性位点附近具有许多用于结合的亚位点。开发了用于分析葡萄糖淀粉酶的底物亲和力的亚位点理论。所述理论的假设之一是底物可以以生产或非生产模式与酶结合。据信,黑曲霉葡萄糖淀粉酶(AnGA)的低活性可能是由于麦芽糖以非生产模式与AnGA结合的可能性。(Swanson等人,1977, Biotechnol. Bioeng. [生物技术和生物工程]19:1715-1718)。

[0155] 示例性葡萄糖淀粉酶包括但不限于野生型葡萄糖淀粉酶、其变体或片段或基因工程化的杂合葡萄糖淀粉酶,所述杂合葡萄糖淀粉酶衍生自例如来自一种微生物来源的催化结构域和来自另一种微生物来源的淀粉结合结构域。杂合葡萄糖淀粉酶包括例如具有来自一种生物体的GA(例如篮状菌属(Talaromyces)GA)的催化结构域的葡萄糖淀粉酶和来自不同生物体的GA(例如,木霉属GA)的淀粉结合结构域(SBD)的葡萄糖淀粉酶。

[0156] 此类杂合葡萄糖淀粉酶还可以使用肽对来自一种生物体的GA(例如篮状菌属GA)的催化结构域和来自不同生物体的GA(例如,木霉属GA)的淀粉结合结构域(SBD)进行排列来制备。

[0157] 此类杂合葡萄糖淀粉酶的实例包括但不限于黑曲霉G1和G2葡萄糖淀粉酶(参见例如,Boe1等人,(1984)EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]3:1097-1102;WO 92/00381、WO 00/04136和美国专利号6,352,851);泡盛曲霉(Aspergillus awamori)葡萄糖淀粉酶(参见例如,WO 84/02921);米曲霉葡萄糖淀粉酶(参见例如,Hata等人,(1991)Agric. Biol. Chem. [农业与生物化学]55:941-949)和曲霉菌(Aspergillus shirousami)(参见例如,Chen等人,(1996)Prot. Eng. [蛋白质工程]9:499-505;Chen等人,(1995)Prot. Eng. [蛋白质工程]8:575-582;和Chen等人,(1994)Biochem J.[生物化学杂志]302:275-281)。

[0158] 一些葡萄糖淀粉酶由细菌、植物和/或真菌内源性表达。例如,一些葡萄糖淀粉酶由若干种丝状真菌菌株产生。

[0159] 优选地,所述葡萄糖淀粉酶将具有颗粒淀粉水解活性(GSH)或者所述葡萄糖淀粉酶已经被重组工程化以具有GSH活性。这种GSH活性是有利的,因为这些酶分解更多的淀粉,特别是任何颗粒(生)淀粉,其可存在于任何含有糖蜜等的饲料中。

[0160] 可用于本文公开的方法中的葡萄糖淀粉酶包括从以下获得的那些:篮状菌属菌株(例如,埃默森篮状菌(T.emersonii)、雷塞特纳斯篮状菌(T.leycettanus)、杜邦提篮状菌(T.Duponti))和嗜热篮状菌(T.thermophilus)葡萄糖淀粉酶(参见例如,WO 99/28488;美国专利号RE:32,153;美国专利号4,587,215);木霉属菌株(例如,里氏木霉)和与美国专利公开号2006-0094080公开的SEQ ID NO:4具有至少约80%、约85%、约90%以及约95%序列同一性的葡萄糖淀粉酶;根霉属菌株(例如,雪白根霉(R.Niveus)和米根霉(R.Oryzae);毛霉菌属(Mucor)菌株和腐质霉属菌株(例如,灰腐质霉(H.grisea))(参见例如,Boe1等人,(1984)EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]3:1097-1102;WO 92/00381;WO 00/04136;Chen等人,

(1996) *Prot. Eng.* [蛋白质工程] 9: 499-505; Taylor 等人, (1978) *Carbohydrate Res.* [碳水化合物研究] 61: 301-308; 美国专利号 4,514,496; 美国专利号 4,092,434; 美国专利号 4,618,579; Jensen 等人, (1988) *Can. J. Microbiol.* [加拿大微生物学杂志] 34: 218-223 以及 WO 2005/052148 的 SEQ ID NO:3)。在一些实施例中, 葡糖淀粉酶与 WO 05/052148 的 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 90%、约 92%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 和约 99% 的序列同一性。可用于本发明的其他葡糖淀粉酶包括从罗耳阿太菌 (*Athelia rolfsii*) 及其变体 (参见例如, WO 04/111218) 和青霉属物种 (例如, 产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)) 中获得的那些。

[0161] 可商购的葡糖淀粉酶包括但不限于 Spirizyme Ultra、**Spirizyme® Achieve**、**Spirizyme® Fuel**、**SPIRIZYME® EXCEL**、**DISTILLASE®**、**OPTIDEX® L-400** 和 **G ZYME® G990 4X**、**GC480**、**G-ZYME® 480**、**FERMGEN® 1-400** (美国丹尼斯科公司的杰能科部门), **CU. CONC®** (新日本化工公司 (Shin Nihon Chemicals), 日本), **GLUCZYME®** (日本天野药业公司 (Amano Pharmaceuticals, Japan)) (参见例如, Takahashi 等人, (1985) *J. Biochem.* [生物化学杂志] 98: 663-671)。可用于本发明的二级酶包括由根霉属物种 (即“Gluc1” (MW 74,000)、“Gluc2” (MW 58,600) 和“Gluc3” (MW 61,400)) 产生的三种形式的葡糖淀粉酶 (例如, E.C.3.2.1.3)。

[0162] 可以如本文所述使用任何合适的 α -葡糖苷酶 (E.C.3.2.1.20)。

[0163] 如上所述, α -葡糖苷酶以其水解模式从麦芽糖、异麦芽糖和麦芽糖类中释放葡萄糖。它还可以以其合成模式将葡萄糖单元转移至包括葡萄糖、麦芽糖、异麦芽糖和麦芽糖类或任何其他合适分子的受体分子, 尤其是在较高底物浓度和高产物浓度下。在消化道中, 所述合成模式或转移反应是最小的, 因为产生的产物葡萄糖将因吸收而被去除。

[0164] 蛋白酶 (protease) (也称为肽酶或胰酶 (proteinase)) 是一种能够切割肽键的酶。蛋白酶经过多次进化, 且不同种类的蛋白酶可以通过完全不同的催化机制进行相同的反应。蛋白酶可以在动物、植物、细菌、古细菌和病毒中找到。

[0165] 蛋白质水解可通过目前被分为以下六大组的酶实现: 天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。

[0166] 优选地, 所述蛋白酶是酸性蛋白酶, 并且更优选是酸性真菌蛋白酶。

[0167] 任何酸性或中性蛋白酶均可用于本公开中。例如, 酸性真菌蛋白酶包括从以下获得的那些: 曲霉属、木霉属、毛霉菌属和根霉属, 如黑曲霉、泡盛曲霉、米曲霉、里氏木霉和米黑毛霉 (*M. miehei*)。AFP 可以衍生自细菌、植物和真菌来源的异源或内源蛋白质表达。优选地, AFP 是由木霉属菌株分泌的。

[0168] 示例性酸性蛋白酶包括但不限于野生型酸性蛋白酶、其变体或片段或基因工程化的杂合酸性蛋白酶, 所述杂合酸性蛋白酶衍生自例如来自一种微生物来源的催化结构域和来自另一种微生物来源的淀粉结合结构域。

[0169] 在另一方面, 所述蛋白酶可以是中性蛋白酶, 如金属蛋白酶 (同义词: 金属肽酶), 并且更优选是细菌金属蛋白酶。

[0170] 在另一方面, 任何分离的、重组的、基本上纯的、合成衍生的或非天然存在的核酸

(包含编码具有本文所述的任何糖苷水解酶活性的任何多肽(包括任何融合蛋白等)的核苷酸序列)已在上文中讨论过。还感兴趣的是包含编码本文所述的任何糖苷水解酶的多核苷酸的载体。对技术人员将显而易见的是,所述载体可以是任何合适的表达载体并且对载体的选择可因载体待插入其中的细胞的类型而异。合适的载体包括pGAPT-PG、pRAX1、pGAMD、pGPT-pyrG1、pC194、pJH101、pE194和pHP13(参见Harwood和Cutting[编辑],第3章, Molecular Biological Methods for *Bacillus*[针对芽孢杆菌的分子生物学方法],John Wiley&Sons[约翰威利父子公司][1990])。还参见,Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*[在枯草芽孢杆菌中用于遗传操作的整合载体],在:Sonenshein等人[编辑],*Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*[枯草芽孢杆菌和其他革兰氏阳性细菌:生物化学、生理学和分子遗传学],American Society for Microbiology[美国微生物学会],华盛顿特区[1993],第615-624页;和p2JM103BBI。

[0171] 所述表达载体可以是用于转化本领域已知的合适的生产宿主的任何数量的载体或盒中的一种。通常,所述载体或盒将包括引导相关基因的转录和翻译的序列、可选择标记、和允许自主复制或染色体整合的序列。合适的载体通常包括含有转录起始对照的基因的5'区域和控制转录终止的DNA片段的3'区域。两个对照区域都可以衍生自与转化的生产宿主细胞的基因同源的基因和/或对所述生产宿主来说是天然的基因,尽管这样的控制区域不需要如此衍生。

[0172] 控制转录终止的DNA片段也可以衍生自对优选的生产宿主细胞来说是天然的各种基因。在某些实施例中,包括终止控制区域是任选的。在某些实施例中,所述表达载体包括衍生自优选的宿主细胞的终止控制区域。

[0173] 所述表达载体可以包括在所述生产宿主中,具体是在微生物生产宿主的细胞中。所述生产宿主细胞可以是在真菌或细菌家族中发现的微生物宿主,并且其在大范围的温度、pH值和溶剂耐受性下生长。例如,预期细菌、藻类和真菌(如丝状真菌和酵母)中的任何一种可以合适地容纳所述表达载体。

[0174] 在所述生产宿主细胞中包括所述表达载体可以用于表达目的蛋白质,使得其可以存在于细胞内、细胞外或细胞内和细胞外的组合中。与用于回收细胞内表达所产生的蛋白质的方法相比,细胞外表达使从发酵产物中回收所需蛋白质更容易。

[0175] 重组表达载体可以是任何载体,如质粒或病毒,其可以方便地进行重组DNA程序并导致核苷酸序列的表达。载体选择通常取决于载体与所述载体待引入的生产宿主的相容性。所述载体可以是线性或闭环质粒。所述载体可以是自主复制载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如质粒、染色体外元件、微染色体或人工染色体。所述载体可以含有用于确保自我复制的任何手段。可替代地,所述载体可以是当被引入生产宿主时整合到基因组中并与已整合到其中的染色体一起复制的载体。此类载体的一些非限制性实例提供于Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains[真菌遗传学库存中心菌株目录](FGSC, <www.fgsc.net>)中,合适的表达和/或整合载体的另外实例提供于Sambrook等人,(1989),同上,Ausubel(1987),同上,van den Hondel等人,(1991), Bennett和Lasure(编辑),MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI[真菌中更多的基因操作], Academic Press[学术出版社],396-428和美国专利号5,874,276中。特别有用的载体包括

pTREX、pFB6、pBR322、PUC18、pUC100和pENTR/D。用于细菌细胞的合适的质粒包括允许在大肠杆菌 (E. coli) 中复制的pBR322和pUC19, 以及例如允许在芽孢杆菌中复制的pE194。

[0176] 简言之, 关于在生产宿主细胞中的生产, 可以参考Sambrook等人, (1989), 同上, Ausubel (1987), 同上, van den Hondel等人, (1991), 在: Bennett和Lasure (编辑), MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI [真菌中更多的基因操作], Academic Press [学术出版社] (1991), 第70-76和396-428页; Nunberg等人, (1984), Mol. Cell Biol. [分子细胞生物学] 4: 2306-2315; Boel等人, (1984) 30EMBO J. [欧洲分子生物学学会杂志] 3: 1581-1585; Finkelstein, 在: BIOTECHNOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI [丝状真菌的生物技术], Finkelstein等人编辑, Butterworth-Heinemann [巴特沃斯海涅曼出版社], 波士顿, 马萨诸塞州 (1992), 第6章; Kinghorn等人, (1992) APPLIED MOLECULAR GENETICS OF FILAMENTOUS FUNGI [丝状真菌的应用分子遗传学], Blackie Academic and Professional [黑人的学术和专业], Chapman and Hall [C-H出版社], 伦敦; Kelley等人, (1985) EMBO J. [欧洲分子生物学学会杂志] 4: 475-479; Penttila等人, (1987) Gene [基因] 61: 155-164; 和美国专利号5, 874, 276。合适载体的列表可以在Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains [真菌遗传学库存中心菌株目录] (FGSC, www at fgsc.net) 中找到。合适的载体包括从例如英杰公司 (Invitrogen)、生命技术公司 (Life Technologies) 和普洛麦格公司 (Promega) 获得的那些载体。适合用于真菌宿主细胞的特定载体包括载体如pFB6、pBR322、pUC 18、pUC100、pDONTM201、pDONRTM221、pENTRTM、pGEM[®]3Z和pGEM[®]4Z。

[0177] 所述载体系统可以是单个载体或质粒, 或者两个或更多个载体或质粒, 它们一起含有待引入宿主细胞基因组的总DNA, 或转座子。

[0178] 所述载体还可以含有一个或多个可选择标记以允许容易选择转化的细胞。可选择标记是基因, 其产物提供杀生物剂或病毒抗性等。可选择标记的实例包括赋予抗微生物抗性的标记。营养标记也可用于本发明, 包括本领域作为amdS、argB和pyr4已知的那些标记。可用于转化木霉的标记是本领域已知的 (参见例如, Finkelstein, 第6章, 在Biotechnology of Filamentous Fungi [丝状真菌的生物技术], Finkelstein等人编辑, Butterworth-Heinemann [巴特沃斯海涅曼出版社], 波士顿, 马萨诸塞州 (1992) 和Kinghorn等人, (1992) Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi [丝状真菌的应用分子遗传学], Blackie Academic and Professional [布莱基学术与专业], Chapman and Hall [C-H出版社], 伦敦)。在一些实施例中, 所述表达载体也包括复制子、编码允许选择携带重组质粒的细菌的抗生素抗性的基因、和在质粒的非必需区域中的允许插入异源序列的独特限制性位点。所选择的特定抗生素抗性基因不是决定性的; 本领域已知的许多抗性基因中的任一种都是合适的。优选地选择原核序列, 使得它们不干扰DNA在里氏木霉中的复制或整合。

[0179] 所述载体还可以含有允许所述载体稳定整合到产物宿主基因组中或者允许载体在独立于所述细胞基因组的生产宿主中的自主复制的一种或多种元件。为了整合到宿主细胞基因组中, 所述载体可以依赖于编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列或所述载体的任何其他元件, 用于通过同源或非同源重组将载体稳定整合到所述基因组中。

[0180] 对于自主复制, 所述载体可以进一步包含使所述载体能够在生产宿主中自主复制的复制起点。

[0181] 可将编码糖苷水解酶的核苷酸序列的多于一个拷贝插入生产宿主中以增加其产生。核苷酸序列拷贝数的增加可以通过将至少一个另外的序列拷贝整合到生产宿主的基因组中或通过包括可扩增的可选择标记基因来获得,并且因此可以通过在适当的选择剂存在下培养生产宿主细胞来选择核苷酸序列的另外拷贝。

[0182] 将包含编码任何糖苷水解酶的核苷酸序列的载体引入生产宿主中,使得所述载体维持为染色体整合体或维持为自我复制的染色体外载体。一般认为整合是一个优点,因为所述核苷酸序列更可能稳定地维持在生产宿主中。如上所讨论的,将载体整合到生产宿主染色体中可以通过同源或非同源重组发生。

[0183] 示例性载体包括但不限于pGXT(与公开的PCT申请WO 2015/017256中所述的pTTTpyr2载体相同)。还可以提及标准的细菌表达载体,包括噬菌体λ和M13,以及质粒如基于pBR322的质粒,pSKF,pET23D和融合表达系统如MBP、GST和LacZ。也可以将表位标签,例如c-myc,添加到重组蛋白中以提供便利的分离方法。

[0184] 合适的表达和/或整合载体的实例提供于Sambrook等人,(1989),同上,Bennett和Lasure(编辑)More Gene Manipulations in Fungi[真菌中更多的基因操作],(1991)Academic Press[学术出版社],第70-76页和第396-428页和其中引用的文章;USP 5,874,276和Fungal Genetic Stock Center Catalogue of Strains[真菌遗传学库存中心菌株目录](FGSC, www.fgsc.net.)中。有用的载体可以从普洛麦格公司和英杰公司获得。一些特定的有用载体包括pBR322,pUC18,pUC100,pDONTM201,pENTRTM、pGEN[®]3Z和pGEN[®]4Z。然而,也可以使用发挥等效功能并且在本领域中已知或变得已知的其他形式的表达载体。因此,可以在表达本文所公开的DNA序列中使用多种宿主/表达载体组合。例如,有用的表达载体可以由染色体、非染色体和合成的DNA序列的区段组成,如SV40的各种已知衍生物和已知的细菌质粒,例如来自大肠杆菌的质粒,这些质粒包括col E1、pCR1、pBR322、pMb9、pUC 19及其衍生物,更广泛的宿主范围质粒,例如RP4,噬菌体DNA,例如噬菌体λ的多种衍生物,例如NM989,和其他DNA噬菌体,例如M13和丝状单链DNA噬菌体,酵母质粒,如2.mu质粒或其衍生物。

[0185] 生产宿主的选择可以是任何合适的微生物,如细菌、真菌和藻类。通常,所述选择取决于编码目的糖苷水解酶的基因。

[0186] 合适的生产宿主的实例包括但不限于细菌、真菌、植物细胞等。优选地,所述生产宿主可以选自大肠杆菌,链霉菌属(Streptomyces),汉逊酵母属(Hansenula),木霉属(特别是里氏木霉),芽孢杆菌属,乳杆菌属(Lactobacillus),曲霉属(特别是黑曲霉),植物细胞和/或芽孢杆菌属、木霉属或曲霉属的孢子。

[0187] 在一些实施例中,重组糖苷水解酶可用于本文公开的方法和组合物中。在优选的方面,提供了包含本文所述的糖苷水解酶的食物或饲料添加剂。

[0188] 许多标准转染方法可以用于产生表达大量所需糖苷水解酶的细菌和丝状真菌(例如曲霉或木霉)细胞系。用于将DNA构建体引入产生纤维素酶的木霉菌株的一些公开方法包括:Lorito、Hayes、DiPietro和Harman,(1993)Curr.Genet.[现代遗传学]24:349-356;Goldman、VanMontagu和Herrera-Estreilla,(1990)Curr.Genet.[现代遗传学]17:169-174;和Penttila、Nevalainen、Ratto、Salminen和Knowles,(1987)Gene[基因]6:155-164,还参见USP 6,022,725;USP 6,268,328和Nevalainen等人,“The Molecular Biology of

Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes[木霉属的分子生物学及其在同源和异源基因表达中的应用]”,在:Molecular Industrial Mycology[分子工业真菌学],编辑,Leong和Berka,Marcel Dekker Inc.[马塞尔德克尔公司],纽约州(1992),第129-148页;针对曲霉属,包括Yelton、Hamer和Timberlake,(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国科学院院报]81:1470-1474,针对镰刀菌属,包括Bajar、Podila和Kolattukudy,(1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国科学院院报]88:8202-8212,针对链霉菌属,包括Hopwood等人,1985,Genetic Manipulation of Streptomyces:Laboratory Manual[链霉菌属的遗传操作:实验室手册],The John Innes Foundation[约翰英纳斯基金会],诺维奇,英国和Fernandez-Abalos等人, Microbiol[微生物学]149:1623-1632(2003),并且针对芽孢杆菌属,包括Brigidi、DeRossi、Bertarini、Riccardi和Matteuzzi,(1990) FEMS Microbiol.Lett.[FEMS微生物学快报]55:135-138。

[0189] 然而,可以使用用于将外源核苷酸序列引入宿主细胞的任何熟知的程序。这些包括使用磷酸钙转染、聚凝胺、原生质体融合、电穿孔、基因枪法、脂质体、显微注射、原生质载体、病毒载体,以及用于将克隆的基因组DNA、cDNA、合成DNA、或其他外源遗传材料引入宿主细胞的任何其他熟知方法(参见例如,Sambrook等人,同上)。还使用的是美国专利号6,255,115中描述的农杆菌介导的转染方法。只需要使用能够成功地将至少一个基因引入能够表达所述基因的宿主细胞中的具体遗传工程化程序。

[0190] 取决于所使用的宿主细胞,可以进行转录后和/或翻译后修饰。转录后和/或翻译后修饰的一个非限制性实例是多肽的“剪切”或“截短”。例如,这可以导致使糖苷水解酶从无活性或基本上无活性的状态变为活性状态,如前肽在进行进一步的翻译后加工后成为具有酶活性的成熟肽的情况一样。在另一情况下,所述剪切可导致获得如本文所述的成熟糖苷水解酶并且进一步去除N或C-末端氨基酸以产生保留酶活性的截短形式。

[0191] 转录后或翻译后修饰的其他实例包括但不限于肉豆蔻酰化、糖基化、截短、脂化和酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸磷酸化。本领域技术人员将认识到蛋白质可能经历的转录后或翻译后修饰的类型可取决于表达蛋白质的宿主生物体。

[0192] 用于曲霉属和木霉属的转化方法描述于例如Yelton等人,(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国科学院院报]81:1470-1474;Berka等人,(1991), Applications of Enzyme Biotechnology[酶生物技术的应用],编辑Kelly和Baldwin, Plenum Press[普莱纽姆出版社](纽约州);Cao等人,(2000) Sci.[科学]9:991-1001; Campbell等人,(1989) Curro Genet.[当代遗传学]16:53-56;Pentilla等人,(1987) Gene[基因]61:155-164;de Groot等人,(1998) Nat.Biotechnol.[自然生物技术]16:839-842; USP 6,022,725;USP 6,268,328和EP 238 023。以下文献中描述了异源蛋白质在木霉中的表达:USP6,022,725;USP 6,268,328;Harkki等人(1991),Enzyme Microb.Technol.[酶微生物技术]13:227-233;Harkki等人,(1989),Bio Technol.[生物技术]7:596-603;EP 244,234;EP 215,594;以及Nevalainen等人,“The Molecular Biology of Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes[木霉属的分子生物学及其在同源和异源基因表达中的应用]”,在:MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY[分子工业真菌学]中,编辑Leong和Berka,Marcel Dekker Inc.[马塞尔德克尔公司],纽约州(1992)第129-148页。关于镰刀菌菌株的转化还可以参考以下文献:W096100787

和Bajar等人, (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院报] 88: 8202-28212。

[0193] 将表达载体引入细胞后, 在有利于表达在启动子序列控制下的基因的条件下培养转染或转化的细胞。在一些情况下, 所述启动子序列是cbh1启动子。大批量的转化细胞可以如Ilmen等人, 1997中所述进行培养 (“Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. [丝状真菌里氏木霉中纤维素酶基因表达的调控]” Appl. Envir. Microbiol. [应用与环境微生物学] 63: 1298-1306)。

[0194] 取决于钙离子浓度, 将DNA摄取到宿主木霉属物种菌株中。通常, 在摄取溶液中使用约10mM-50mM的CaCl₂。另外的合适的化合物包括缓冲系统, 如TE缓冲液(10mM Tris, pH 7.4; 1mM EDTA)或10mM MOPS (pH 6.0)和聚乙二醇。据信聚乙二醇使细胞膜融合, 从而允许培养基的内容物被递送至木霉属物种菌株的细胞质中。此融合时常留下整合到宿主染色体中的多个拷贝的质粒DNA。

[0195] 通常, 使用已经进行了渗透性处理的原生质体或细胞转化木霉属物种, 通常以10⁵至10⁷/mL、特别是2x 10⁶/mL的密度进行。

[0196] 可以将100μL体积的在适当的溶液(例如, 1.2M山梨糖醇和50mM CaCl₂)中的这些原生质体或细胞与所需DNA混合。通常, 向摄取溶液中添加高浓度的PEG。可以将从0.1至1体积的25% PEG 4000添加到原生质体悬浮液中; 然而, 向原生质体悬浮液中添加约0.25体积是有用的。也可以将添加剂如二甲亚砜、肝素、亚精胺、氯化钾等添加到摄取溶液中以促进转化。类似的程序可用于其他真菌宿主细胞。参见, 例如美国专利号6,022,725。

[0197] 用于培养细胞的培养基可以是适合于使宿主细胞生长和获得本文所述的任何糖苷水解酶的表达的任何常规培养基。合适的培养基和培养基组分可从商业供应商获得或可以根据公开的配方(例如, 如在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的目录中所述)来制备。

[0198] 在一些实施例中, 可以使用本领域已知的任何培养方法来实现重组微生物的所消耗的全发酵液的制备, 从而导致目的酶的表达。因此, 发酵可以理解为包括在实验室或工业发酵罐中在合适的培养基和酶能够被表达或分离的条件下进行的摇瓶培养、小规模或大规模发酵(包括连续发酵、分批发酵、补料分批发酵或固态发酵)。术语“所消耗的全发酵液”在本文中定义为包括培养基、胞外蛋白质(例如, 酶)和细胞生物质的发酵材料的未分级内容物。应当理解, 术语“所消耗的全发酵液”还涵盖已经使用本领域熟知的方法裂解或透化的细胞生物质。

[0199] 宿主细胞可以在允许表达本文所述的任何糖苷水解酶的合适条件下培养。这些酶的表达可以是组成型的, 使得它们能被连续产生, 或诱导型的, 需要刺激来启动表达。在诱导型表达的情况下, 当需要时可通过例如向培养基中添加诱导物质, 例如地塞米松或IPTG或槐糖来启动蛋白质生产。

[0200] 多肽也可以在体外无细胞系统(如TNTTM(普洛麦格公司)兔网织红细胞系统)中重组生产。表达宿主也可以在有氧条件下在对于宿主来说适当的培养基中培养。可以提供摇动或搅动和通气的组合, 其中生产在对所述宿主来说适当的温度下(例如从约25°C至约75°C(例如30°C至45°C), 这取决于宿主的需要和所需α-葡萄糖苷酶的生产)发生。培养可以发生从约12至约100小时或更长时间(以及其间的任何小时值, 例如从24至72小时)。通常, 培养肉汤的pH为约4.0至约8.0, 同样取决于宿主相对于目的酶(如本文所述的糖苷水解酶)的生

产所需的培养条件。因为可以在常规营养培养基中培养生产宿主和转化细胞。用于转化的宿主细胞的培养基可以适当地修饰以激活启动子并选择转化的细胞。特定培养条件(如温度、pH等)可以是用于所选择的宿主细胞的表达的那些条件,并且对于本领域技术人员将是显而易见的。此外,优选的培养条件可以在科学文献中找到,如Sambrook,(1982)同上;Kieser,T,MJ.Bibb,MJ.Buttner,KF Chater和D.A.Hopwood(2000),Practical Streptomyces Genetics[实用链霉菌属遗传学],John Innes Foundation[约翰·内斯基金会],诺维奇,英国;Harwood等人,(1990),Molecular Biological Methods for Bacillus[芽孢杆菌的分子生物学方法],John Wiley[约翰威利公司]和/或来自美国典型培养物保藏中心(ATCC;www.atcc.org)。

[0201] 本领域熟知的任何发酵方法都可以合适用来使如上所述的转化的或衍生的真菌菌株发酵。

[0202] 经典的分批发酵是封闭的系统,其中在发酵开始时设定培养基的组成,并且所述组成在发酵期间不改变。在发酵开始时,用一种或多种所需生物体接种培养基。换言之,整个发酵过程发生而自始至终没有向发酵系统添加任何组分。

[0203] 可替代地,分批发酵符合关于添加碳源的“分批”的资格。此外,通常在整个发酵过程中进行尝试来控制因素如pH和氧气浓度。通常,分批系统的代谢物和生物质组成不断变化直到发酵停止的时间。在分批培养中,细胞通过静态停滞期进展到高生长对数期,最后进入生长速率减少或停止的稳定期。不经处理,稳定期中的细胞将最终死亡。通常,在对数期的细胞负责产物的大量生产。标准分批系统的合适的变体是“补料分批发酵”系统。在典型的分批系统的这种变化中,随着发酵的进展,将底物以增量添加。当已知分解代谢物抑制将抑制细胞的代谢时和/或在发酵培养基中希望具有有限量的底物的情况下,补料分批系统是有用的。在补料分批系统中测量实际的底物浓度是困难的并且因此其是基于可测量因子的变化而估测的,所述因子为如pH、溶解氧、和废气(如CO₂)的分压。分批和补料分批发酵是本领域熟知的。

[0204] 连续发酵是另一种已知的发酵方法。它是开放的系统,在所述系统中,将定义的发酵培养基连续添加到生物反应器中,同时去除等量的条件培养基以用于处理。连续发酵通常将培养物保持在恒定的密度,其中将细胞主要维持在对数期生长。连续发酵允许对一种或多种影响细胞生长和/或产物浓度的因素进行调节。例如,限制营养素(如碳源或氮源)可以维持在固定的速度,并允许调节所有其他参数。在其他系统中,影响生长的许多因素可以不断改变,而通过培养基浓度测量的细胞浓度保持不变。连续系统努力保持稳定态的生长条件。因此,由于转移培养基而引起的细胞损失应当与发酵中的细胞生长速率相平衡。调节用于连续发酵过程的营养素和生长因子的方法以及最大化产物形成速率的技术在工业微生物学领域中是熟知的。

[0205] 分离和浓缩技术是本领域已知的,并且常规方法可用于制备包含本发明的 α -葡萄糖苷酶多肽的浓缩溶液或肉汤。

[0206] 发酵后,获得发酵液,通过常规分离技术去除微生物细胞和各种悬浮固体(包括剩余的粗发酵材料),以便获得含酶溶液。通常使用过滤、离心、微滤、旋转真空鼓式过滤、超滤、离心然后超滤、提取或色谱法等。

[0207] 有时可能需要浓缩包含目的多肽的溶液或肉汤以优化回收。使用未浓缩的溶液或

肉汤通常会增加孵育时间,以便收集富集或纯化的酶沉淀。

[0208] 可以使用常规浓缩技术浓缩含酶溶液直至获得所需酶水平。含酶溶液的浓缩可以通过在本文中所讨论的技术中的任一种来实现。富集和纯化方法的实例包括但不限于旋转真空过滤和/或超滤。

[0209] 可以使用本领域已知的各种测试来测试如本文所述的糖苷水解酶的活性。例如,可以根据需要通过将所述酶与糖蛋白或寡糖和水组合来测试活性。活性可以通过分析反应产物来测量,所述反应产物可以通过例如薄层色谱法或HPLC(使用针对单糖和寡糖分析的柱)、偶联酶测定(使用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶进行葡萄糖定量)、以及针对一般还原糖测定的3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂(参见以下实例)来分离和可视化。

[0210] 此外,无论是否包入胶囊内,如本文所述的糖苷水解酶可以是颗粒形式。

[0211] 据信,如本文所述的糖苷水解酶可以与一种或多种另外的酶组合使用。在一些实施例中,一种或多种另外的酶,酯酶,甲酰胺酶,半乳糖苷酶(例如 α 或 β -半乳糖苷酶),外切葡聚糖酶,葡聚糖裂解酶,内切葡聚糖酶,葡糖淀粉酶,葡萄糖氧化酶,葡糖苷酶(例如 α 或 β -葡糖苷酶),葡糖醛酸酶,半纤维素酶,水解酶,转化酶,异构酶,漆酶,酚氧化酶,脂肪酶,裂解酶,甘露糖苷酶,氧化酶,氧化还原酶,果胶酶,果胶酸裂解酶,果胶乙酰酯酶,果胶解聚酶,肽酶,果胶甲基酯酶,果胶分解酶,过氧化物酶,酚氧化酶,植酸酶,聚半乳糖醛酸酶,鼠李糖半乳糖醛酸酶,核糖核酸酶,素马甜,转移酶,转运蛋白,转谷氨酰胺酶,木聚糖酶,己糖氧化酶(D-己糖:(3/4-氧化还原酶,EC 1.1.3.5),酸性磷酸酶和/或其他,或其组合。这些包括例如调节组合物或饲料的黏度的酶。

[0212] 本文讨论的任何GLCH酶,优选地, α -淀粉酶、葡糖淀粉酶和 α -葡糖苷酶可以与直接饲喂的微生物组合使用。DFM的类别包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳酸菌和酵母菌。芽孢杆菌属(*Bacilli*)是独特的、形成孢子的革兰氏阳性杆菌。这些孢子非常稳定,并且可以承受环境条件,如热、湿气和一定范围的pH。这些孢子当被动物摄入后会萌发成有活性的营养细胞,并可用于粗粉和压成丸粒的饮食中。乳酸菌是革兰氏阳性球菌,可产生对病原体有拮抗作用的乳酸。由于乳酸菌似乎有点对热敏感,所以它们不能用于压成丸粒的饮食中。乳酸菌的种类包括双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)和链球菌(*Streptococcus*)。酵母不是细菌。这些微生物属于植物组真菌。

[0213] 本文讨论的任何GLCH酶,优选地, α -淀粉酶、葡糖淀粉酶和 α -葡糖苷酶可以与合适的兽用药物组合使用以减少酸中毒或减少瘤胃原生动物生物体。

[0214] 此类兽用药物可包括离子载体,如莫能菌素及其衍生物。

[0215] 毒素结合剂被设计为结合饲料中的毒素,并保护动物免受其不良影响。因此,本文讨论的任何GLCH酶也可以与毒素结合剂或毒素吸附剂组合使用。毒素结合剂的一个实例是霉菌毒素结合剂,包括但不限于不同的水合铝硅酸钙钠(HSCAS)、膨润土、沸石、黏土、酵母细胞壁和毒素降解酶。

[0216] 在另一方面,本文讨论的任何GLCH酶也可以与草药、精油和抗结块剂组合使用。

[0217] 精油是含有来自植物的挥发性芳香化合物的浓缩的疏水液体。精油也被称为挥发油(volatile oil)、香精油、挥发油(aetherolea),或简单地被称为从中提取它们的植物的油,如丁香油。在油含有植物香料(衍生自植物的特征香料)的“精华”的意义上,所述油是“必需的”。这里使用的术语“必需的”并不意指不可缺少的,如术语“必需氨基酸”或“必需脂

肪酸”，因为它们是给定活生物体的营养需要而被这么称呼。精油通常通过蒸馏(往往通过使用蒸汽)来提取。其他方法包括表达、溶剂提取、净油提取、树脂采收(resin tapping)和冷压。它们用于香水、化妆品、肥皂和其他产品中，用于调味食物和饮料，以及用于为香料和家用清洁产品添加香味。

[0218] 动物饲料可以包括植物材料，如玉米，小麦，高粱，大豆，低芥酸菜籽，向日葵，或针对反刍动物的这些植物材料或植物蛋白源中的任何的混合物。预期动物性能参数，如生长、采食量和饲料效率，但同时改善的均匀性、降低的动物房内的氨浓度以及因此改善的动物的福利和健康状况，都将得到改善。更具体地，如本文所使用的“动物性能”可以通过动物的饲料效率和/或增重和/或通过饲料转化率和/或通过饲料中的营养素的消化率(例如氨基酸消化率)和/或饲料中的可消化能或代谢能和/或通过氮保留量和/或通过动物避免坏死性肠炎的负面影响的能力和/或通过受试者的免疫应答来确定。

[0219] 术语“动物饲料”、“饲料”、“喂养料”和“秣料”可互换使用，并且包含选自下组的一种或多种饲料原料，所述组包含：a) 谷类，如小粒谷物(例如小麦、大麦、黑麦、燕麦及其组合)和/或大粒谷物，如玉蜀黍或高粱；b) 来自谷类的副产物，如玉米蛋白粉、具有可溶物的干酒糟(Distillers Dried Grains with Solubles) (DDGS) (具体是基于玉米的具有可溶物的干酒糟(cDDGS))、麦麸、小麦粗粉、小麦次粉、米糠、稻壳、燕麦壳、棕榈仁和柑橘渣；c) 获自以下来源的蛋白质：如大豆、向日葵、花生、羽扇豆、豌豆、蚕豆、棉花、低芥酸菜籽、鱼粉、干血浆蛋白质、肉和骨粉、马铃薯蛋白、乳清、干椰肉、芝麻；d) 获自植物和动物来源的油和脂肪；和/或e) 矿物质和维生素。

[0220] 当用作或用于制备饲料(如功能性饲料)时，本发明的酶或饲料添加剂组合物可以与以下中的一种或多种结合使用：营养上可接受的载体、营养上可接受的稀释剂、营养上可接受的赋形剂、营养上可接受的辅剂、营养活性成分。例如，可以提及选自由以下组成的组的至少一种组分：蛋白质、肽、蔗糖、乳糖、山梨糖醇、甘油、丙二醇、氯化钠、硫酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、甲酸钠、山梨酸钠、氯化钾、硫酸钾、乙酸钾、柠檬酸钾、甲酸钾、乙酸钾、山梨酸钾、氯化镁、硫酸镁、乙酸镁、柠檬酸镁、甲酸镁、山梨酸镁、偏亚硫酸氢钠、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯。

[0221] 在一个优选的实施例中，将本发明的酶或饲料添加剂组合物与饲料组分混合以形成喂养料。如本文所使用的，“饲料组分”意指喂养料的全部或部分。喂养料的部分可意指喂养料的一种成分或喂养料的一种以上(例如2种或3种或4种或更多种)成分。在一个实施例中，术语“饲料组分”涵盖预混物或预混物成分。优选地，饲料可以是秣料或其预混物、复合饲料或其预混物。

[0222] 可将根据本发明的饲料添加剂组合物与复合饲料、复合饲料组分混合或将其混合至复合饲料的预混物或混合至秣料、秣料组分或秣料的预混物中。

[0223] 本文所述的任何喂养料可包含一种或多种选自包含以下的组的饲料材料：a) 谷类，例如小粒谷物(例如小麦、大麦、黑麦、燕麦、黑小麦以及它们的组合)和/或大粒谷物例如玉蜀黍或高粱；b) 来自谷类的副产物，例如玉米蛋白粉、湿饼(特别是基于玉米的湿饼)、干酒糟(DDG) (特别是基于玉米的干酒糟(cDDG))、具有可溶物的干酒糟(DDGS) (特别是基于玉米的具有可溶物的干酒糟(cDDGS))、麦麸、小麦粗粉、小麦次粉、米糠、稻壳、燕麦壳、棕榈仁和柑橘渣；c) 获自以下来源的蛋白质：如大豆、向日葵、花生、羽扇豆、豌豆、蚕豆、棉花、低芥酸菜籽，

芥酸菜籽、鱼粉、干血浆蛋白质、肉和骨粉、马铃薯蛋白、乳清、干椰肉、芝麻; d) 获自植物和动物来源的油和脂肪; e) 矿物质和维生素。

[0224] 如本文所使用的,术语“秣料”意指提供给动物的任何食物(而不是动物必须自己觅食)。秣料涵盖已经切下的植物。此外,秣料包括青贮饲料、压缩的和压成丸粒的饲料、油和混合给养,也包括发芽谷物和豆类。

[0225] 秣料可以获得自选自以下的植物中的一种或多种:玉米(玉蜀黍)、苜蓿(紫苜蓿)、大麦、百脉根、芸苔属、Chaumoellier、羽衣甘蓝、油菜籽(低芥酸菜籽)、芜菁甘蓝(瑞典甘蓝)、萝卜、三叶草、杂种三叶草、红三叶草、地下三叶草、白三叶草、羊茅草、雀麦草、粟、燕麦、高粱、大豆、树(用作树干草的修剪下的树嫩枝)、小麦、和豆科植物。

[0226] 术语“复合饲料”意指呈粗粉、丸粒、球丸(nut)、饼或碎屑形式的商业饲料。复合饲料可由多种原料和添加剂共混而来。根据目标动物的特定需求配制这些共混物。

[0227] 复合饲料可以是提供所有每日所需营养素的完全饲料、提供口粮(蛋白质、能量)的一部分的浓缩物或仅提供另外的微量营养素(如矿物质和维生素)的补充剂。

[0228] 用于复合饲料中的主要成分是饲料谷物,其包括玉米、小麦、低芥酸菜籽粉、油菜籽粉、羽扇豆、大豆、高粱、燕麦和大麦。

[0229] 合适地,本文所提及的预混物可以是由微量成分构成的组合物,所述微量成分为如维生素、矿物质、化学防腐剂、抗生素、发酵产物和其他必需成分。预混物通常是适合于共混进商业口粮内的组合物。

[0230] 在一个实施例中,喂养料包含以下或由以下组成:玉米、DDGS(如, cDDGS)、小麦、麦麸、或其任何组合。

[0231] 在一个实施例中,饲料组分可为玉米、DDGS(例如, cDDGS)、小麦、麦麸、或其组合。在一个实施例中,喂养料包含以下或由以下组成:玉米、DDGS(如, cDDGS)或其组合。

[0232] 本文所述的喂养料可含有按重量计至少30%、至少40%、至少50%或至少60%的玉米和大豆粉或玉米及全脂大豆、或者小麦粉或向日葵粉。

[0233] 例如,喂养料可以含有约5%至约40%的玉米DDGS。对于家禽,所述喂养料平均可含有约7%至15%的玉米DDGS。对于猪(swine或pig),所述喂养料可含有平均5%至40%的玉米DDGS。它也可以含有玉米作为单一谷物,在这种情况下,所述喂养料可以包含约35%至约80%的玉米。

[0234] 在包含混合谷物(例如包含如玉米和小麦)的喂养料中,所述喂养料可包含至少10%的玉米。

[0235] 另外或可替代地,喂养料也可包含至少一种高纤维饲料材料和/或至少一种高纤维饲料材料的至少一种副产物以提供高纤维喂养料。高纤维饲料材料的实例包括:小麦、大麦、黑麦、燕麦,来自谷类的副产物,例如玉米蛋白粉、玉米蛋白饲料、湿饼、干酒糟(DDG)、具有可溶物的干酒糟(DDGS)、麦麸、小麦粗粉、小麦次粉、米糠、稻壳、燕麦壳、棕榈仁和柑橘渣。一些蛋白质源也可视为高纤维:获自如以下来源的蛋白质:向日葵、羽扇豆、蚕豆和棉花。在一个方面,如本文所述的喂养料包含选自由以下组成的组的至少一种高纤维材料和/或所述至少一种高纤维饲料材料的至少一种副产物,例如:具有可溶物的干酒糟(DDGS)(具体是cDDGS)、湿饼、干酒糟(DDG)(具体是cDDG)、麦麸和小麦。在一个实施例中,本发明的喂养料包含选自由以下组成的组的至少一种高纤维材料和/或所述至少一种高纤维饲料材料

的至少一种副产物,例如:含可溶物干酒糟(DDGS)(具体是cDDGS)、麦麸和小麦。

[0236] 所述饲料可为以下中的一种或多种:复合饲料和预混物,包括丸粒、坚果或(牲畜)饼状物;作物或作物残余物:玉米、大豆、高粱、燕麦、大麦、椰子核、稻草、谷壳、甜菜残渣;鱼粉;肉粉和骨粉;糖蜜;油饼和滤饼;低聚糖;糖渍饲用植物:青贮饲料;海草;种子和谷物,完整的或通过压碎、碾磨等制备;发芽谷物及豆类;酵母提取物。

[0237] 如本文所使用的,术语“饲料”在一些实施例中涵盖宠物食物。宠物食物是旨在由宠物消费的植物或动物材料,如狗食或猫食。宠物食物(如狗食和猫食)可以干燥形式(如用于狗的磨碎食物)或湿罐装形式。猫食可含有氨基酸牛磺酸。

[0238] 动物饲料还可以包括鱼食。鱼食通常含有使养殖鱼保持良好健康所需的大量营养素、痕量元素和维生素。鱼食可以呈小片、丸粒或片的形式。压成丸粒的形式(其中的一些快速沉降)经常用于较大鱼或底饲物种。一些鱼食还含有添加剂(如 β 胡萝卜素或性激素)以人工增强观赏性鱼的颜色。

[0239] 在仍另一方面,动物饲料涵盖鸟食。鸟食包括用于喂鸟器中以及用于饲喂宠物鸟的食物。通常,鸟食由多种种子组成,但也可涵盖板油(牛肉或羊肉脂肪)。

[0240] 如本文所使用的,术语“接触”是指间接或直接将如本文所述的糖苷水解酶(或包含糖苷水解酶的组合物)应用到产品(例如饲料)中。可以使用的应用方法的实例包括但不限于:在包含饲料添加剂组合物的材料中处理产品、通过将饲料添加剂组合物与产品混合而直接应用、将饲料添加剂组合物喷涂至产品表面上或将产品浸入饲料添加剂组合物的配制品中。在一个实施例中,优选将本发明的饲料添加剂组合物与产品(例如喂养料)混合。可替代地,喂养料的乳液或原始成分中可包括饲料添加剂组合物。这允许所述组合物赋予性能益处。

[0241] 术语“热稳定”意指加热至指定温度之前添加剂中存在/有活性的酶的至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或98%在冷却至室温之后仍存在/有活性。优选地,加热至指定温度之前添加剂中存在且有活性的酶的至少约80%在冷却至室温之后仍存在且有活性。

[0242] 也可能的是,本文所述的糖苷水解酶(或包含如本文所述的此类糖苷水解酶的酶组合物)可以均化以产生粉末。

[0243] 在替代性优选实施例中,将如本文所述的糖苷水解酶(或包含如本文所述的糖苷水解酶的酶组合物)配制成如WO 2007/044968(称作TPT颗粒)或W01997/016076或W01992/012645中所述的颗粒,将这些文献通过引用并入本文中。“TPT”意指热保护技术。

[0244] 在另一方面,当将饲料添加剂组合物配制为颗粒时,这些颗粒包含包覆在蛋白质核心上的水合屏障盐。这样的盐包衣的优点在于使耐热性改善、使保藏稳定性改善和保护免受其他原本会不利影响所述酶的饲料添加剂的影响。优选地,用于盐包衣的盐在20°C下具有大于0.25的水活度或大于60%的恒定湿度。在一些实施例中,盐包衣包含 Na_2SO_4 。

[0245] 制备如本文所述的糖苷水解酶(或包含如本文所述的糖苷水解酶的酶组合物)的方法还可以包含将粉末制粒的进一步步骤。粉末可以与本领域已知的其他组分进行混合。可强加力使粉末、或包含粉末的混合物通过模具,并将所得线料切成适宜的不同长度的丸料。

[0246] 任选地,制粒步骤可包括在丸粒形成之前进行的蒸汽处理或调理阶段。可将包含

粉末的混合物置于调节器中,例如带有蒸汽注射的搅拌器。将混合物在达到指定温度的调节器中加热,如从60°C-100°C,典型的温度将是70°C、80°C、85°C、90°C、或95°C。停留时间可以是从几秒钟到几分钟并且甚至几小时不等。如5秒钟、10秒钟、15秒钟、30秒钟、1分钟、2分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟和1小时。应当理解,如本文所述的糖苷水解酶(或包含如本文所述的糖苷水解酶的酶组合物)适合于添加到任何适当的饲料材料中。

[0247] 技术人员应当理解,不同的动物要求不同的喂养料,甚至同一种动物也可能要求不同的喂养料,这取决于饲养所述动物的目的。

[0248] 任选地,喂养料还可含有另外的矿物质(如,例如钙)和/或另外的维生素。在一些实施例中,喂养料为玉米大豆粉混合物。

[0249] 喂养料通常在饲料磨机中生产,在磨机中首先将原料研磨成合适的粒度,然后与适当的添加剂混合。然后,可以将喂养料生产成糊状或丸粒;后者通常涉及这样的方法,通过所述方法将温度升高至目标水平,然后使饲料通过模具从而生产出特定大小的丸粒。让丸粒冷却。随后,可添加液体添加剂例如脂肪和酶。制备喂养料也可涉及另外的步骤,所述步骤包括制粒之前的挤出或膨化,具体是通过至少可包括使用蒸汽的适宜技术进行的挤出或膨化。

[0250] 所述喂养料可为用于以下的喂养料:单胃动物,如家禽(例如肉鸡、下蛋鸡、肉用种鸡、产仔鸡、火鸡、鸭、鹅、水禽)和猪类(所有年龄类别);反刍动物,如牛(例如奶牛或公牛(包括牛犊))、马、绵羊、宠物(例如狗、猫)或鱼(例如无胃鱼,有胃鱼,淡水鱼,如鲑鱼、鳕鱼、鳟鱼和鲤鱼(例如锦鲤鱼),海鱼(如黑鲈);和甲壳类动物,如虾、贻贝和扇贝)。优选地,所述喂养料用于猪。

[0251] 所述饲料添加剂组合物和/或包含其的喂养料可以任何合适的形式使用。所述饲料添加剂组合物能以固体或液体配制品或其替代物形式使用。固体配制品的实例包括粉剂、糊剂、大丸粒、胶囊剂、丸粒、片剂、尘剂和颗粒,其可以是可润湿的、喷雾干燥的或冷冻干燥的。液体配制品的实例包括但不限于水性、有机或水性-有机溶液、悬浮液和乳剂。

[0252] 在一些应用中,可将所述饲料添加剂组合物与饲料混合或在饮用水中施用。

[0253] 饲料添加剂组合物,包含将如本文所教导的糖苷水解酶与饲料可接受载体、稀释剂或赋形剂混合,并且(任选地)进行包装。

[0254] 可使喂养料和/或饲料添加剂组合物与至少一种矿物质和/或至少一种维生素混合。由此衍生的组合物可在本文中称为预混物。所述喂养料可包含按重量计至少0.0001%的饲料添加剂。合适地,喂养料可以包含按重量计至少0.0005%、至少0.0010%、至少0.0020%、至少0.0025%、至少0.0050%、至少0.0100%、至少0.020%、至少0.100%、至少0.200%、至少0.250%、至少0.500%的饲料添加剂。

[0255] 优选地,食物或饲料添加剂组合物可以进一步包含至少一种生理学上可接受的载体。所述生理学上可接受的载体优选地选自以下中的至少一者:麦芽糖糊精、石灰岩(碳酸钙)、环糊精、小麦或小麦组分、蔗糖、淀粉、 Na_2SO_4 、滑石、PVA、及其混合物。在一个另外的实施例中,所述食物或饲料添加可还包含金属离子螯合剂。金属离子螯合剂可选自EDTA或柠檬酸。

[0256] 在一些实施例中,所述食物或饲料添加剂组合物包含水平为至少0.0001g/kg、0.001g/kg、至少0.01g/kg、至少0.1g/kg、至少1g/kg、至少5g/kg、至少7.5g/kg、至少10.0g/

kg、至少15.0g/kg、至少20.0g/kg、至少25.0g/kg的如本文所述的糖苷水解酶。在一些实施例中,所述食物或饲料添加剂包含一定水平使得当添加至食物或饲料材料时,所述饲料材料包含在1-500mg/kg、1-100mg/kg、2-50mg/kg或2-10mg/kg范围的如本文所述的糖苷水解酶。在本发明的一些实施例中,所述食物或饲料材料包含至少100、1000、2000、3000、4000、5000、10000、20000、30000、50000、100000、500000、1000000或2000000单位的糖苷水解酶/千克饲料或食物材料。

[0257] 范围可以包括但不限于上面讨论的较低和较高范围的任何组合。

[0258] 包含本文所述的任何糖苷水解酶和本文所述的组合物的制剂可以以任何合适的方式制备以确保所述制剂包含活性酶。此类制剂可以是液体、干粉或颗粒。优选地,所述饲料添加剂组合物呈固体形式,适合于添加在饲料丸粒上或添加至饲料丸粒。

[0259] 干粉或颗粒可以通过本领域技术人员已知的手段制备,如高剪切制粒、鼓式制粒、挤出、滚圆、流化床附聚、流化床喷雾干燥。

[0260] 本文所述的糖苷水解酶和组合物可以被包衣,例如包入胶囊内。在一个实施例中,包衣保护酶免受热影响并且可视为防热剂。在一个实施例中,包衣保护酶避免低pH。**Eudragit®**是可以使用的包衣材料的一个实例。

[0261] 将本文所述的饲料添加剂组合物配制成干粉或颗粒,如W02007/044968(称为TPT颗粒)或WO 1997/016076或WO 1992/012645中所述(所述文献各自通过引用全部并入本文中)。

[0262] 在一个实施例中,可将动物饲料配制成包含以下的饲料组合物的颗粒:芯;活性剂;和至少一个包衣,在选自以下中的一种或多种的条件后,颗粒的活性剂保持至少50%活性、至少60%活性、至少70%活性、至少80%活性:a) 饲料制粒工艺,b) 蒸汽加热的饲料预处理工艺,c) 储存,d) 作为未经制粒混合物中的成分储存,和e) 作为包含选自以下的至少一种化合物的饲料基础混合物或饲料预混物中的成分储存:微量矿物质、有机酸、还原糖、维生素、氯化胆碱以及产生酸性或碱性饲料基础混合物或饲料预混物的化合物。

[0263] 关于颗粒,至少一个包衣可包含构成所述颗粒的至少55%w/w的水分水合材料;和/或至少一个包衣可包含两层包衣。所述两层包衣可为水分水合包衣和防潮层包衣。在一些实施例中,所述水分水合包衣可为所述颗粒的25%w/w至60%w/w并且所述防潮层包衣可为所述颗粒的2%w/w至15%w/w。所述水分水合包衣可选自无机盐、蔗糖、淀粉和麦芽糖糊精,并且所述防潮层包衣可选自聚合物、树胶、乳清和淀粉。

[0264] 所述颗粒可使用饲料制粒工艺制备并且所述饲料预处理工艺可在70°C至95°C(如在85°C至95°C)进行长达若干分钟。

[0265] 可将饲料添加剂组合物配制成用于动物饲料的颗粒,其包含:芯;活性剂,在储存之后以及在颗粒作为一种成分的蒸汽加热制粒工艺之后,所述颗粒的活性剂保持至少80%活性;防潮层包衣;和水分水合包衣,其至少为所述颗粒的25%w/w,所述颗粒在蒸汽加热制粒工艺之前具有小于0.5的水活性。

[0266] 所述颗粒可具有选自聚合物和树胶的防潮层包衣并且所述水分水合材料可为无机盐。所述水分水合包衣可为所述颗粒的25%w/w至45%w/w并且所述防潮层包衣可为所述颗粒的2%w/w至10%w/w。

[0267] 颗粒可使用蒸汽加热制粒工艺制备,所述工艺可在85°C至95°C进行多达若干分

钟。

[0268] 可替代地,所述组合物处于适合于消耗的液体制剂中,优选地,这种液体消费品含有以下中的一种或多种:缓冲剂、盐、山梨糖醇和/或甘油。

[0269] 此外,可通过将一种或多种酶施用(例如喷涂)于载体底物(如碾碎的小麦)上来配制饲料添加剂组合物。

[0270] 在一个实施例中,饲料添加剂组合物可以被配制成预混物。仅举个实例,所述预混物可包含一种或多种饲料组分,如一种或多种矿物质和/或一种或多种维生素。

[0271] 在一些实施例中,糖苷水解酶将处于生理学上可接受的载体中。合适的载体可以是大的、缓慢代谢的大分子,如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和失活病毒颗粒。可以使用药学上可接受的盐,例如无机酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐,或有机酸盐,如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐。治疗组合物中的药学上可接受的载体可另外含有液体,如水、盐水、甘油和乙醇。另外,辅助物质,如润湿剂或乳化剂或pH缓冲物质,可能存在于此类组合物中。此类载体使得药物组合物能够配制成为用于被患者摄取的片剂、丸剂、糖衣糖、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、浆剂和混悬剂。一旦配制,可以直接向反刍动物施用本发明的组合物。

[0272] 本文公开的组合物和方法的非限制性实例包括:

[0273] 1. 一种用于增加反刍动物中淀粉消化率和葡萄糖产率的方法,所述方法包括添加至少一种 α -1,4/1,6-糖苷水解酶(GLCH)作为饲料添加剂以饲喂反刍动物,其中所述水解酶:(a)与在胃蛋白酶存在下在pH 6的水解酶活性相比,在胃蛋白酶存在下在pH小于或等于3具有至少20%活性,(b)所述水解酶在反刍动物的包含瘤胃、皱胃和小肠的三个消化室的至少两个中具有活性,并且(c)所述水解酶与存在于所述反刍动物消化室中的消化酶一起作用以增加淀粉消化率和葡萄糖产率。

[0274] 2. 如实施例1所述的水解酶,其中所述至少一种GLCH酶能够在与瘤胃或皱胃中发现的条件相当的条件下水解生淀粉。

[0275] 3. 如实施例1所述的水解酶,其中所述水解酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶、葡糖淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶。

[0276] 4. 如实施例2所述的水解酶,其中所述水解酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶和葡糖淀粉酶。

[0277] 5. 如实施例3或4所述的水解酶,其中所述 α -淀粉酶是GH 13家族的成员或选自由以下组成的组: α -淀粉酶(EC 3.2.1.1);支链淀粉酶(EC 3.2.1.41);环麦芽糖糊精葡萄糖转移酶(EC 2.4.1.19);环麦芽糖糊精酶(EC 3.2.1.54);海藻糖-6-磷酸水解酶(EC 3.2.1.93);寡 α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.10);生麦芽糖淀粉酶(EC 3.2.1.133);新支链淀粉酶(EC 3.2.1.135); α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20);形成麦芽四糖的 α -淀粉酶(EC 3.2.1.60);异淀粉酶(EC 3.2.1.68);葡萄糖糊精酶(EC 3.2.1.70);形成麦芽六糖的 α -淀粉酶(EC 3.2.1.98);形成麦芽三糖的 α -淀粉酶(EC 3.2.1.116);分支酶(EC 2.4.1.18);海藻糖合酶(EC 5.4.99.16);4- α -葡萄糖转移酶(EC 2.4.1.25);形成麦芽五糖的 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1);淀粉蔗糖酶(EC 2.4.1.4);蔗糖磷酸化酶(EC 2.4.1.7);麦芽寡糖基海藻糖海藻糖水解酶(EC 3.2.1.141);异麦芽酮糖合酶(EC 5.4.99.11);麦芽寡糖基海藻糖合酶(EC 5.4.99.15);淀粉- α -1,6-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.33);和 α -1,4-葡萄糖:磷酸 α -麦芽糖基

转移酶(EC 2.4.99.16)。

[0278] 6. 如实施例3或4所述的水解酶,其中所述葡萄糖苷酶是GH 13或GH31家族的成员或选自由以下组成的组: α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20); α -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22); α -甘露糖苷酶(EC 3.2.1.24); α -1,3-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.84);蔗糖酶-异麦芽糖酶(EC 3.2.1.48)(EC 3.2.1.10); α -木糖苷酶(EC 3.2.1.177); α -葡萄糖聚糖裂解酶(EC 4.2.2.13);异麦芽糖基转移酶(EC 2.4.1.-);寡糖 α -1,4-葡萄糖基转移酶(EC 2.4.1.161);碘基喹诺酮酶(EC 3.2.1.-)。

[0279] 7. 如实施例3或4所述的水解酶,其中所述葡萄糖淀粉酶是GH15家族的成员或选自由以下组成的组:葡萄糖淀粉酶(EC 3.2.1.3);葡萄糖聚糖酶(EC 3.2.1.70); α -海藻糖酶(EC 3.2.1.28);和右旋糖酐糊精酶(EC 2.4.1.2)。

[0280] 8. 一种用于在反刍动物中在发酵期间增加淀粉消化率、增加葡萄糖产率、增加干物质消化和增加气体产生的方法,所述方法包括向饲料中添加酶组合物,所述酶组合物包含(i)至少一种GLCH酶作为反刍动物的饲料添加剂,其中所述酶:(a)与在胃蛋白酶存在下在pH 6的酶活性相比,在胃蛋白酶存在下在pH小于或等于3具有至少20%活性,(b)所述酶在反刍动物的包含瘤胃、皱胃和小肠的三个消化室的至少两个中具有活性,并且(c)所述酶与胰淀粉酶一起作用以增加葡萄糖产率;以及(ii)至少一种蛋白酶。

[0281] 9. 如实施例8所述的酶组合物,其中所述至少一种GLCH酶能够水解生淀粉。

[0282] 10. 如实施例8所述的酶组合物,其中所述GLCH酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶。

[0283] 11. 如实施例9所述的酶组合物,其中所述酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶。

[0284] 12. 如实施例10和11所述的酶组合物,其中所述至少一种GLCH酶选自由以下组成的组: α -淀粉酶(EC 3.2.1.1);支链淀粉酶(EC 3.2.1.41);环麦芽糖糊精聚糖转移酶(EC 2.4.1.19);环麦芽糖糊精酶(EC 3.2.1.54);海藻糖-6-磷酸水解酶(EC 3.2.1.93);寡 α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.10);生麦芽糖淀粉酶(EC 3.2.1.133);新支链淀粉酶(EC 3.2.1.135); α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20);形成麦芽四糖的 α -淀粉酶(EC 3.2.1.60);异淀粉酶(EC 3.2.1.68);葡萄糖聚糖酶(EC 3.2.1.70);形成麦芽六糖的 α -淀粉酶(EC 3.2.1.98);形成麦芽三糖的 α -淀粉酶(EC 3.2.1.116);分支酶(EC 2.4.1.18);海藻糖合酶(EC 5.4.99.16);4- α -葡萄糖聚糖转移酶(EC 2.4.1.25);形成麦芽五糖的 α -淀粉酶(EC 3.2.1.-);淀粉蔗糖酶(EC 2.4.1.4);蔗糖磷酸化酶(EC 2.4.1.7);麦芽寡糖基海藻糖海藻糖水解酶(EC 3.2.1.141);异麦芽酮糖合酶(EC 5.4.99.11);麦芽寡糖基海藻糖合酶(EC 5.4.99.15);淀粉 α -1,6-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.33);和 α -1,4-葡萄糖聚糖:磷酸 α -麦芽糖基转移酶(EC 2.4.99.16)。

[0285] 13. 如权利要求10或11所述的酶组合物,其中所述葡萄糖苷酶选自由以下组成的组: α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20); α -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22); α -甘露糖苷酶(EC 3.2.1.24); α -1,3-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.84);蔗糖酶-异麦芽糖酶(EC 3.2.1.48)(EC 3.2.1.10); α -木糖苷酶(EC 3.2.1.177); α -葡萄糖聚糖裂解酶(EC 4.2.2.13);异麦芽糖基转移酶(EC 2.4.1.-);寡糖 α -1,4-葡萄糖基转移酶(EC 2.4.1.161);碘基喹诺酮酶(EC 3.2.1.-)。

[0286] 14. 如实施例10或11所述的酶组合物,其中所述葡萄糖淀粉酶选自GH15糖基水解酶

家族。

[0287] 15. 如实施例8所述的酶组合物,其中所述蛋白酶选自由以下组成的组:酸性蛋白酶或中性金属蛋白酶。

[0288] 16. 如实施例15所述的酶组合物,其中所述蛋白酶是真菌天冬氨酸蛋白酶或细菌中性金属蛋白酶。

[0289] 实例

[0290] 除非在本文中另有定义,本文所用的全部技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同意义。Singleton等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY[微生物学和分子生物学词典],第2版,John Wiley and Sons[约翰威利父子公司],纽约(1994),以及Hale和Marham,THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY[哈珀柯林斯生物学词典],Harper Perennial[哈珀永久出版社],纽约州(1991)为技术人员提供了本公开中所使用的许多术语的通用词典。

[0291] 本公开在下面的实例中进一步定义。应当理解,这些实例尽管说明了某些实施例,但仅以示例的方式给出。从以上的讨论和所述实例中,本领域的技术人员能够确定本公开的本质特性,并且在不脱离本公开的实质和范围的情况下,可进行各种变化和修改以使其适应各种用途和条件。

[0292] 实例1

[0293] 随后实例中使用的材料

[0294] 表1中列出了蛋白质样品,用于随后实例中。表1显示了酶类型、样品的来源生物体(当已知时)和内部或商业来源,以及序列的专利参考。

[0295] 表1. 评估的酶组分列表。

蛋白质名称	酶类型	生物体来源	参考
AkAA	α -淀粉酶	重组的, 白曲霉来源	专利 US 7354752
AcAA	α -淀粉酶	重组的, 棒曲霉来源	专利 US 8945889
AtAA	α -淀粉酶	重组的, 土曲霉来源	专利 US 20150376668
TrGA	葡糖淀粉酶	重组的, 里氏木霉来源	专利 US 7413879
CS4	葡糖淀粉酶	重组的, 变体	专利 US 8058033
Brew1	葡糖淀粉酶	重组的, 变体	专利 US 8809023
FvGA	葡糖淀粉酶	重组的, 轮枝镰刀菌 (<i>Fusarium verticillioides</i>) 来源	专利 WO 2016100871
AfuGA	葡糖淀粉酶	重组的, 烟曲霉来源	专利 US 20160115509
AFP	蛋白酶	重组的, 里氏木霉来源	专利 US 8288517
酵母麦芽糖酶	α -葡糖苷酶	麦格酶公司 (Megazyme)	目录号 E-MALTS
TG L-2000	α -葡糖苷酶	重组的, 黑曲霉来源	US 2015/0240279
Aclglu1	α -葡糖苷酶	重组的, 棒曲霉来源	US 20150240279
Nfiglu1	α -葡糖苷酶	重组的, 费希新萨托菌 (<i>Neosartorya fischeri</i>) 来源	US 20150240279
TauSec098	α -葡糖苷酶	堆肥篮状菌 (<i>Rasamsonia composticola</i>)	US 20150240279
TauSec099	α -葡糖苷酶	堆肥篮状菌 (<i>Rasamsonia composticola</i>)	US 20150240279
猪胃蛋白酶	蛋白酶	西格玛公司 (Sigma)	目录号 P7000
猪胰酶	多种酶	西格玛公司 (Sigma)	目录号 P7545
P14L	中性金属内肽酶 (嗜热菌蛋白酶 (Thermolysin))	硝卤解蛋白土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus caldoproteolyticus</i>)	专利 US 8114656
P7L	中性金属内肽酶 (芽孢杆菌溶素)	解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	专利 US 8574884
AnGA	葡糖淀粉酶	黑曲霉, 麦格酶公司	目录号 E-AMGDF

[0296] [0297] 实例2

[0298] 在酸性天冬氨酸蛋白酶猪胃蛋白酶和里氏木霉AFP存在下, AkAA淀粉酶对玉米面粉的水解

[0299] 反应混合物含有1mL玉米面粉浆料 (20%, w/w, pH 3.2)、AkAA (209mg/mL) 20 μ L、猪胃蛋白酶(西格玛公司, P7000, 10000U/mL于水中) 50 μ L、来自里氏木霉 (5mg/mL) 的5 μ L和50 μ L的AFP以及至最终体积为1.07mL的水。将反应在40°C下进行5h, 伴随以200rpm的振荡。在反应结束时, 将30 μ L反应上清液与0.23mL水混合, 并通过0.22 μ m膜滤器过滤。使用水作为洗脱液经15min, 在78°C下, 将滤液 (40 μ L) 在Aminex HPX-87N HPLC柱(伯乐公司(Bio-Rad))上以0.6mL/min的流速经受HPLC分析。根据制造商的说明书, 使用线内RI (折射率指数) 检测器检

测葡萄糖和麦芽糖峰，并使用Chromelone软件(戴安公司(Dionex))整合峰面积。

[0300] 如果胃蛋白酶本应在皱胃和小肠中起作用，则饲料酶对反刍动物的活性不应受所述胃蛋白酶影响。

[0301] 图1显示胃蛋白酶和AFP均不会对在pH 3.2从玉米面粉中释放葡萄糖(G1)和麦芽糖(G2)产生负面影响。pH 3.2是皱胃中可能出现的pH值之一，尤其是在摄取饲料后(Constable等人, 2005. Effect of suckling cow's milk or milk replacer on abomasal luminal pH in dairy calves [哺乳牛乳或代乳品对奶犊牛皱胃腔内pH的影响], J.Vet.Intern.Med.[兽医内科学杂志]19:97-102)。事实上，向含有AkAA的反应混合物中添加胃蛋白酶和AFP分别使G1的释放增加4%和22%。胃蛋白酶本身很少会或不会从玉米面粉中释放G1和G2，而AFP本身会引起一些G1的释放，但不会释放G2。添加到含有AkAA的反应混合物中的AFP不仅增加了G1的释放，而且还增加了G1相对于G2的量，这指示AFP更有利于释放葡萄糖，即单体(G1)。G1可以被动物直接吸收到血流中。

[0302] 在与瘤胃和皱胃中发现的条件相当的条件下，据信两种天冬氨酸蛋白酶可通过水解颗粒周围的蛋白质和颗粒内部发现的蛋白质使得玉米淀粉颗粒更容易接近AkAA (Mu-Forster等人, 1996. Physical association of starch biosynthetic enzymes with starch granules of maize endosperm granule-associated forms of starch synthase I and starch branching enzyme II [淀粉生物合成酶与玉蜀黍胚乳颗粒相关形式的淀粉合酶I和淀粉分支酶II的淀粉颗粒的物理结合], Plant Physiol.[植物生理学] 111:821-829; Mu-Forster等人, 1998. Surface localization of zein storage proteins in starch granules from maize endosperm, proteolytic removal by thermolysin and in vitro cross-linking of granule-associated polypeptides. [来自玉蜀黍胚乳的淀粉颗粒中玉米醇溶蛋白贮藏蛋白的表面定位、嗜热菌蛋白酶的蛋白水解去除和颗粒相关多肽的体外交联] Plant Physiol.[植物生理学] 116:1563-1571)。胃蛋白酶是胃和皱胃中产生的主要蛋白水解酶。它通过内部肽键的裂解消化蛋白质，其中最佳pH为2-4。AFP是来自里氏木霉的细胞外内肽酶，其中最佳pH范围为3-4.5(表1)。

[0303] 除非另有说明，实例2和其他实例中使用的玉米由88.2%干物质(DM)、9.3%粗蛋白(CP)、2.0%酸性洗涤剂纤维(ADF)、用淀粉酶处理的6.6%中性洗涤剂纤维(aNDF)、78.5%非纤维碳水化合物(NFC)、89.0%总可消化营养素(TDN)组成。

[0304] 实例3

[0305] 在瘤胃液存在下，AkAA淀粉酶的稳定性

[0306] 对于在反刍动物中有效的动物饲料酶添加剂，重要的是酶在瘤胃液和瘤胃条件下具有相当大的稳定性。表2中的数据显示AkAA在不含细胞的瘤胃液的存在下在40°C下孵育4.5h是稳定的，因为葡萄糖和麦芽糖的释放不会受到瘤胃液量增加的显著影响。

[0307] 使用的AkAA具有209mg/mL的总蛋白质浓度，稻淀粉颗粒(西格玛公司S7260)在水中以8% (w/w) 浆料制备，其中将pH调节至3.2。与预孵育混合物混合后，pH变为pH 5.3。从奶牛中收集的不含细胞的瘤胃液的pH为6.1，所述奶牛被饲喂草(41.66%)、全大麦(14.79%)、玉蜀黍(16.78%)、干甜菜渣和甜菜残渣饼(3.02%)、碾碎的大麦(6.66%)、油菜籽粉(4.88%)、大豆粉(4.46%)、Komix(维生素和矿物质混合液, 0.2%)、Roed Suplex Caps(维生素混合液0.05%)、Suplex E-5000(维生素E和硒, 0.03%)、白垩(0.07%)、盐

(0.06%)、以及水(7.33%)的混合给养。瘤胃液由奥胡斯大学(Aarhus University)动物科学系(Department of Animal Science)提供(Blichers Alle 20, DK-8830切勒(Tjele),丹麦)。如实例2所述的在HPLC(具有来自伯乐公司的Aminex HPX-87N HPLC柱)上分析从反应中释放的糖。

[0308] 表2.AkAA在瘤胃液中在40°C下持续4.5h的稳定性。

处理编号 (n = 3)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
瘤胃液, μL	0	0	90	90	140	140	190	190	240	240
AkAA, μL	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
热处理的瘤胃液, μL	240	240	150	150	100	100	50	50	0	0
在 40°C 下预孵育 4.5 h, 伴随以 200 rpm 的振荡, 然后添加另外的 AkAA 和底物稻淀粉以开始催化反应										
AkAA, μL	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
稻淀粉浆料, mL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
将酶反应在 40°C 下持续 3 h, 伴随以 200 rpm 的振荡										
将在反应结束时获得的上清液用水稀释 4 倍, 并注入 40 μL 用于释放的葡萄糖 (G1) 和麦芽糖 (G2) 的 HPLC 分析										
G1 峰面积	5.78	6.25	5.75	5.48	6.86	7.15	7.43	6.62	6.70	6.28
G2 峰面积	4.33	4.08	4.18	4.07	3.96	3.89	3.89	3.74	4.06	3.83
G1 + G2 峰面积	10.11	10.32	9.93	9.56	10.82	11.04	11.32	10.36	10.76	10.11
处理编号 1 的百分比	100	102	98	95	107	109	112	102	106	100

[0310] 实例4

[0311] AkAA对胰酶的稳定性以及AkAA与胰酶对增加葡萄糖产率和减少麦芽三糖产率的影响

[0312] 反应混合物含有处于0 μL 、5 μL 、10 μL 和20 μL 的猪胰酶(西格玛公司P7545, 25mg/mL, 在0.1%NaCl中制备), AkAA (209mg/mL) 20 μL , 具有5mM CaCl_2 、吐温80 (0.01% w/v) 的0.1M Mes (pH 6.7) 60 μL 。添加0.1%的NaCl溶液至最终反应体积为0.12mL。将反应混合物在40°C下孵育3h, 然后添加底物1.5mL玉米面粉浆料(10% w/w)并将其在40°C下进一步孵育13h。将获得的上清液稀释8.33倍, 并如实例2中所述使用RI检测器在HPLC上分析40 μL 葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖。

[0313] 图2显示AkAA在模拟瘤胃小肠条件的条件下具有活性。它显示了用3种剂量的猪胰酶(Pan)测试的另外和互补效应。AkAA中包含Pan增加了葡萄糖和麦芽糖产生, 并减少了麦芽三糖的形成/积聚, 这在营养上是有利的, 因为葡萄糖可以被直接吸收, 而麦芽糖可以被肠黏膜 α -葡糖苷酶(麦芽糖酶)水解(Nichols等人, 1998. Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning, homology to sucrase-isomaltase, [人小肠麦芽糖酶-葡糖淀粉酶cDNA克隆, 与蔗糖酶-异麦芽糖酶同源] J. Biol. Chem. [生物化学杂志] 273:3076-3081)。胰酶是动物(尤其是单胃动物和反刍动物)的主要消化酶混合物。它含有酶组分, 如由猪胰腺的外分泌细胞产生的胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶、核糖核酸酶以及蛋白酶。因此, 胰酶是允许其水解蛋白质、淀粉和脂肪的酶的组合。

[0314] 实例5

[0315] 在胃蛋白酶和胰酶存在下,AtAA淀粉酶对玉米面粉的活性

[0316] 对于胃蛋白酶反应,反应混合物具有在60mM甘氨酸-HCl (pH 2.5) 中制备的10% (w/w) (西格玛公司S4126) 的0.1mL玉米淀粉浆料、10 μ L胃蛋白酶(西格玛公司P7000, 10000U/mL于水中) 和0.6 μ L (16.76mg/mL) AtAA淀粉酶。将反应在40°C下进行3h。将样品离心。将上清液稀释、过滤并如实例2中所述的使用用于糖分析的RI检测器在HPLC上进行分析。除了在0.1M Mes (pH 6.7) 中制备玉米淀粉浆料并添加5 μ L的25mg/mL猪胰酶(Pan) (西格玛公司P7545, 溶解于0.1%NaCl中) 之外,胰酶反应与胃蛋白酶反应相同。

[0317] 图3显示当在pH 2.5在胃蛋白酶存在下或在pH 6.7在胰酶存在下进行测试时,土曲霉 α -淀粉酶AtAA(AtAmy1)具有活性。此外,AtAA和胰酶在将所有麦芽三糖基本上转化为可被动物直接吸收的葡萄糖方面显示出互补效应。

[0318] 实例6

[0319] 在瘤胃液存在下,AkAA和AcAA淀粉酶对玉米淀粉的水解

[0320] 将240 μ L不含细胞的瘤胃液与10 μ L酶样品 (AkAA (209mg/mL)、AcAA (172mg/mL)、AkAA与里氏木霉GA(TrGA) 和里氏木霉AFP (223mg/mL)、或AcAA与TrGA变体CS4和AFP (125mg/mL) (表1)) 混合,并在40°C下孵育4h,随后添加溶解于含有5mM CaCl₂ (pH4.5) 的0.1M乙酸盐中的250 μ L玉米淀粉(西格玛公司S4126)浆料,并进一步孵育30min。在反应结束时,过滤所述反应样品,并通过使用碱性3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂进行分析,用于上清液中总还原糖的检测(根据Yu等人(Yu等人, 1997. Methods for the assay of 1,5-anhydro-D-fructose and alpha-1,4-glucan lyase. [测定1,5-脱水-D-果糖和 α -1,4-葡聚糖裂解酶的方法]Carbohydr. Res. [碳水化合物研究]305:73-82) (具有小的修改))。即,将10 μ L稀释的反应样品转移至含有120 μ L的DNS试剂的96孔PCR板。将所述板在95°C孵育5min,随后冷却5min至20°C,然后将100 μ L这些混合物转移至新的96孔板中,将所述新的96孔板用于在分光光度计中测量550nm处的光密度。

[0321] 图4显示在瘤胃液中孵育后测试的所有4种酶样品的玉米水解活性的非常小的降低。里氏木霉GA及其变体(CS4)和里氏木霉AFP酶的存在对由AkAA和AcAA淀粉酶样品两者催化的底物的总水解具有有益影响。淀粉酶/葡糖淀粉酶/蛋白酶的两种酶混合物均以29:70:1的总蛋白比率制备。如图4所示,在40°C下的瘤胃液中预孵育4h,随后在40°C下在pH 4.5处与玉米淀粉孵育30min后(当与未处理的混合物比较时),淀粉酶AkAA、AcAA及其与葡糖淀粉酶TrGA和CS4以及天冬氨酸蛋白酶AFP的混合物失去它们总活性的小于13%。

[0322] 在模拟瘤胃条件下的这些结果指示,这两种淀粉酶及其与葡糖淀粉酶和天冬氨酸肽酶的混合物可以在反刍动物的消化道中存活。

[0323] 实例7

[0324] AkAA和AcAA淀粉酶在不同pH条件下在胃蛋白酶存在下的活性

[0325] 反应混合物含有在0.1M甘氨酸-HCl (pH 3.2)、0.1M乙酸盐 (pH 4.1、4.7) 或0.1M Mes (pH 6.0) (三者全部具有5mM CaCl₂) 中制备的1.0mL玉米面粉浆料 (20%w/w)、25 μ L的AkAA (209mg/mL) 或AcAA (172mg/mL)、25 μ L胃蛋白酶(西格玛公司P7000, 10000U/mL于水中)。将反应在40°C下进行2h。在反应结束时,将通过离心获得的上清液通过0.45 μ m过滤器过滤并稀释20倍。如实例6中详述,测定稀释的样品的总还原糖。

[0326] 图5显示在胃蛋白酶不存在或存在下,在pH 3.2、4.1、4.7和6.0孵育的AkAA和AcAA样品对玉米面粉的水解。与在胃蛋白酶不存在的情况相比,在胃蛋白酶存在下,如通过AkAA和AcAA释放总还原糖所测量的淀粉酶活性没有受到显著影响。它进一步指示,这两种具有70%同一性的淀粉酶在与反刍动物消化道中发现的条件相当的条件下具有活性:例如,皱胃酸度条件(pH 3.2)、小肠上段条件(pH 4.1-4.7)和与小肠和瘤胃中发现的条件(两者均在pH 6.0或pH 6.0附近)相当的条件之一。因此,AkAA和AcAA淀粉酶在瘤胃相关pH处似乎比目前用作单胃饲料添加剂的其他淀粉酶(如来自解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉和米曲霉的 α -淀粉酶)更具活性(Monteiro de Souza等人,Application of microbial α -amylase in industry-a review.[微生物 α -淀粉酶在工业中的应用-综述]Brazilian Journal of Microbiology[巴西微生物学杂志](2010)41:850-861)。

[0327] 实例8

[0328] 在胰酶存在下内切/外切葡聚糖水解酶和内切蛋白酶混合物的活性

[0329] 反应混合物含有1.0mL玉米面粉浆料(20% w/w,在0.1M Mes中,5mM CaCl₂pH 6.0)、25 μ L AkAA+TrGA+AFP(223mg/mL)或AcAA+CS4+AFP(125mg/mL)的酶混合物、25 μ L猪胰酶(西格玛公司P7545,25mg/mL,在0.1% NaCl中制备)。将反应在40°C下进行2h。在反应结束时,将通过离心获得的上清液通过0.45 μ m过滤器过滤并稀释20倍。如实例6中详述,测定稀释的样品的总还原糖。图6显示在胰酶存在下,在40°C下pH 6.0处与玉米面粉(20% w/w)孵育2h后,AkAA+TrGA+AFP的酶混合物和AcAA+CS4+AFP的酶混合物分别将还原糖产量提高了4.2倍和3.8倍。该研究显示,AkAA+TrGA+AFP和AcAA+CS4+AFP混合物在通过瘤胃时存活,并且皱胃可与胰酶协同作用以促进糖释放。

[0330] 与AkAA(实例4)一样,还发现AcAA与胰酶协同作用。表3显示,如果AcAA与胰酶一起给予,则还原能力(DNS值)的产生是两种酶在pH 6.0单独产生的还原能力之和的1.6倍,并且在pH 6.7对应的值是1.25倍。

[0331] 在40°C下持续2h,反应混合物含有在具有5mM CaCl₂的0.1M Mes(pH 6.0和6.7)中的1mL 20% w/v玉米淀粉浆料,含有与不含25 μ L的猪胰酶(2.5% w/v)和25 μ L的AcAA(17.2mg/mL)。如实例6测定产生的还原糖。

[0332] 表3.AcAA与胰酶在pH 6.0和6.7的协同效应

处理	pH 6.0	pH 6.7
对照(无淀粉酶或胰酶)	1.16	1.00
仅胰酶(减去对照)	1.96	1.80
仅AcAA(减去对照)	1.24	1.06
AcAA与胰酶一起给予(减去对照)	5.12	3.57

[0334] 实例9

[0335] 相对于在pH 6.0,在pH 2.5在胃蛋白酶存在下内切葡聚糖水解酶、外切葡聚糖水解酶和内切蛋白酶混合物AFP的还原糖释放活性

[0336] 表4显示相对于在pH 6.0,在pH 2.5在胃蛋白酶不存在和存在下,AkAA、AcAA、TrGA、CS4和AFP的混合物的活性。可以看出,在实验条件下,两种酶混合物在pH 2.5的活性相对于在pH 6.0的活性超过20%。在与反刍动物的胃或皱胃(其中普遍pH值较低)中发现的条件相当的条件下,酶混合物中的酶既稳定又具有活性将是有利的。

[0337] 反应混合物含有在具有5mM CaCl₂的0.1M甘氨酸-HCl (pH 2.5) 中或在具有5mM CaCl₂的0.1M Mes-NaOH (pH 6.0) 中的1.0mL玉米面粉浆料 (10%, w/w)、25μL AkAA+TrGA+AFP (223mg/mL) 或AcAA+CS4+AFP (125mg/mL) 的酶混合物、以及25μL胃蛋白酶 (10000U/mL)。将所述反应在40°C下进行2h, 伴随以300rpm的振荡。在反应结束时, 将底物通过在0.45μm过滤器96孔过滤板中以3500rpm离心5min与酶和产物分离。将滤液稀释2倍并如实例6中所述测定还原糖值。

[0338] 表4. 相对于在pH 6.0, 在pH 2.5在胃蛋白酶存在和不存在下, AkAA、AcAA、TrGA、CS4和AFP的内切葡聚糖水解酶、外切葡聚糖水解酶和内切蛋白酶混合物的还原糖释放活性。在pH 6.0的活性被认为是100%。

	反 应 pH	对 照	对 照 +胃蛋白酶	AkAA+TrGA +AFP	AkAA+TrGA +AFP+胃蛋白酶	AcAA+CS4 +AFP	AcAA+CS4 +AFP+胃蛋白酶
[0339]	pH 2.5	0.375	0.368	0.569	0.610	0.424	0.450
	pH 6.0	0.390	0.395	0.547	0.587	0.624	0.612
	pH 2.5 相 对 于 pH 6.0, %			123	126	21	38

[0340] 实例10

[0341] 在胰酶存在下, 在小肠消化条件下葡糖淀粉酶对玉米淀粉的水解

[0342] 反应混合物含有在0.1M Mes (pH 6.0) 中的0.5mL玉米淀粉浆料 (西格玛公司 S4126) 或玉米面粉浆料 (10% w/v)、50μL胰酶 (在所述反应混合物中的最终浓度为0.25%) 以及处于400ppm的葡糖淀粉酶, 最终体积为0.56mL。将所述反应在40°C下进行1h, 伴随以300rpm的振荡。在反应结束时, 使用台式离心机通过离心从淀粉颗粒分离获得上清液, 并通过实例6中所述的DNS试剂方法测定所述上清液的总还原糖, 即, 将10μL上清液或稀释的上清液与100μL DNS试剂在96孔PCR板中混合。然后将PCR板在95°C下孵育5min, 随后冷却5min至20°C。将90μL的反应混合物转移至96孔读板, 并测量550nm处的吸光度作为DNS值。

[0343] 图7 (以玉米淀粉为底物) 和图8 (以玉米面粉为底物) 显示所有五种葡糖淀粉酶 CS4、TrGA、Brew1、AfuGA和FvGA (详见表1) 与胰酶协同作用产生还原糖, 如DNS值所指示的。葡糖淀粉酶 (GA) (1,4- α -D-葡聚糖葡糖水解酶 (EC 3.2.1.3)) 催化 α -1,4和 α -1,6-糖苷键的水解以从淀粉和相关的多糖和寡糖的非还原末端中释放 β -D-葡萄糖 (Sauer等人, 2000. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering, [葡糖淀粉酶:结构/功能关系和蛋白质工程] Biochim. Biophys. Acta [生物化学与生物物理学报], 1543: 275-293)。因此, 与某些类型的 α -葡糖苷酶相反, GA还能够水解生淀粉以及在 α -葡聚糖及其寡聚物中发现的 α -1,4和 α -1,6-糖苷键。

[0344] 图7和8显示猪胰酶和所有五种GA具有某些水解玉米淀粉颗粒的能力, 其中在pH 6.0和40°C下观察到FvGA的最高活性。当反应混合物含有GA和猪胰酶两者时, 观察到显著的协同作用。据信, 这种协同作用可能不仅归因于购自西格玛公司的胰酶产品中存在的胰腺 α -淀粉酶, 而且可能归因于该胰酶产品中也存在的蛋白酶, 所述蛋白酶可与任何可能存在

于玉米淀粉颗粒表面以及颗粒内部的蛋白质相互作用。

[0345] 这个实例显示葡萄糖淀粉酶可以与胰腺消化酶协同作用以从玉米(其中含有化学成分)中产生葡萄糖(参见实例2)。本实验中使用的五种GA和上述实例2-9中使用的三种 α 淀粉酶AkAA、AcAA和AtAA都具有属于家族20的碳水化合物结合模块(CBM20) (Christiansen等人,2009. The carbohydrate-binding module family 20-diversity, structure, and function[碳水化合物结合模块家族20-多样性、结构和功能], FEBS Journal[欧洲生化学会联盟杂志], 276:5006-5029; Janecka等人,2011. Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals[存在于来自微生物、植物和动物的淀粉和糖原结合蛋白中的两个非催化结构域家族的结构和进化方面]. Enzyme and Microbial Technology[酶和微生物技术], 49:429-440)。这些酶可以在碳水化合物结合模块旁边具有另外的碳水化合物结合位点(Sorimachi等人,1997. Solution structure of the granular starch binding domain of Aspergillus niger glucoamylase bound to beta-cyclodextrin[与 β -环糊精结合的黑曲霉葡萄糖淀粉酶的颗粒淀粉结合结构域的溶液结构], Structure[结构], 5:647-661)。这些碳水化合物结合模块和碳水化合物结合位点对于淀粉颗粒和麦芽糖类的活性可能是必需的,并因此当与胰酶组合时有助于协同效应。

[0346] 实例11

[0347] 在瘤胃条件下葡萄糖淀粉酶对玉米淀粉的水解

[0348] 表5显示,在不存在淀粉底物的瘤胃液中孵育4h后,五种葡萄糖淀粉酶的剩余活性为至少80%,除了剩余65%活性的AfuGA。作为反刍动物的饲料酶,在40°C下在瘤胃液中必须具有相当大的持续4h的稳定性。

[0349] 因此,这些酶作为反刍动物的饲料酶显示出有用性,因为它们在40°C下在瘤胃液中稳定并保持4h活性。

[0350] 在400ppm下,所述预孵育混合物含有0.25mL不含细胞的瘤胃液、5种葡萄糖淀粉酶中每一种各5 μ L。将预孵育在48孔板中在40°C下持续4h,伴随以300rpm的振荡。为了对照,预孵育时间为零。预孵育后,添加在0.1M Mes (pH 6.0) 中的0.25mL玉米淀粉(西格玛公司S4126)浆料(10% w/v)并在40°C下伴随振荡来反应30min。使用台式离心机通过离心从淀粉颗粒分离获得上清液,并通过如实例10中所述的DNS方法测定所述上清液的总还原糖。

[0351] 表5.五种葡萄糖淀粉酶在瘤胃液存在下在40°C下持续4h的稳定性。

[0352]

葡萄糖淀粉酶	对玉米淀粉的剩余活性(%)
CS4	81
TrGA	98
Brew1	86
AfuGA	65
FvGA	80

[0353] 实例12

[0354] 在胃蛋白酶存在下,相对于在pH 6.0,在pH 2.5五种葡萄糖淀粉酶的活性

[0355] 在模拟瘤胃或瘤皱胃(其中普遍pH值较低)中发现的条件的条件下,酶既稳定又具

有活性将是有利的。相对于基于淀粉类饮食的pH约为6的瘤胃和小肠中的活性,在pH 2.5的活性应该相当高,足以在所述低pH消化室中具有显著的消化率。表6显示,与它们在pH 6.0的活性相比,所有五种葡萄糖淀粉酶在pH 2.5具有超过20%的活性。因此,瘤胃、皱胃和小肠的平衡活性将增加消化淀粉类营养素的机会。

[0356] 反应混合物(在48孔微孔板中)含有在甘氨酸-HCl(60mM pH 2.5)中或在Mes-NaOH(100mM, pH 6.0)中制备的0.5mL玉米面粉浆料(10% w/v)、50μL猪胃蛋白酶(最终浓度1000U/mL)、以及5μL葡萄糖淀粉酶(最终浓度,400ppm)。将所述反应在40°C下进行60min。如实例10中所述,通过DNS试剂分析释放的还原糖。将在pH 6.0的活性用作100%。

[0357] 表6.五种葡萄糖淀粉酶在pH 2.5和pH 6.0的活性比。将每种酶在pH 6.0的活性报告为100%。

葡萄糖淀粉酶	pH 2.5	pH 6.0	pH 2.5 相对于 pH 6.0, %
CS4	0.497	0.793	63
TrGA	0.498	0.778	64
Brew1	0.491	0.578	85
AfuGA	0.663	0.715	93
FvGA	0.220	0.692	32

[0359] 实例13

[0360] 在小肠模拟条件下,在胰酶存在下通过酵母 α -葡萄糖苷酶从玉米淀粉中的葡萄糖释放

[0361] 反应混合物含有:悬浮于含有5mM CaCl₂的0.1M Mes(pH 6.0)中的0.5mL玉米淀粉(西格玛公司S4126)浆料(10% w/v),0μL、10μL、20μL或35μL酵母 α -葡萄糖苷酶(也可称为麦芽糖酶,购自麦格酶公司,E-MALTS,1000U/mL),0μL至25μL猪胰酶(在1% NaCl中2.5% w/v,购自西格玛公司,目录号P7545),以及0μL至60μL水,总体积为0.56mL。将所述反应混合物在48孔板中在40°C下在振荡孵育器中孵育60min。使用台式离心机将板以3500rpm离心10min以分离未消化的淀粉颗粒。使用基于葡萄糖氧化酶/过氧化物酶(GOPOD)的葡萄糖测定试剂盒,将获得的上清液转移至96孔板用于葡萄糖测定。

[0362] 对于GOPOD葡萄糖测定,将8μL上清液转移至具有来自麦格酶公司(K-GLUC 09/14)的240μL GOPOD试剂的96孔读板。将板在50°C下孵育20min,并根据麦格酶公司的说明书读取在510nm处的吸光度。

[0363] 胰酶产品(西格玛公司P7545)含有胰腺 α -淀粉酶、脂肪酶、核糖核酸酶和若干种蛋白酶(包括胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶)是熟知的。猪和牛 α -淀粉酶的膳食淀粉水解产物主要是麦芽糖(Banks等人,1976. The action pattern of bovine pancreatic α -amylase.[牛胰腺 α -淀粉酶的作用模式] Int'l J. Biochem. [国际生物化学杂志], 7:107-110)。已知动物(包括单胃动物和反刍动物)使用小肠膜结合酶水解麦芽糖(Nichols等人,1998. Human Small Intestinal Maltase-glucoamylase cDNA Cloning, homology to sucrase-isomaltase[人小肠麦芽糖酶-葡萄糖淀粉酶cDNA克隆,与蔗糖酶-异麦芽糖酶同源] J. Biol. Chem. [生物化学杂志] 273:3076-3081)。自由移动的酶比膜结合的(固定的)酶具有更大的催化功效。

[0364] 图9显示,在没有胰酶的情况下,从0μL、10μL、20μL至35μL给予的酵母 α -葡萄糖苷酶

不能增加从玉米淀粉颗粒中的葡萄糖释放。

[0365] 然而,在2.5 μ L胰酶的存在下,葡萄糖被释放,并且添加10 μ L的 α -葡萄糖苷酶使释放的葡萄糖量增加一倍。随着给予 α -葡萄糖苷酶的增加,葡萄糖产率进一步增加。这指示酵母 α -葡萄糖苷酶与胰酶中存在的酶协同作用以从玉米淀粉中释放葡萄糖。据信,存在于胰酶中的蛋白酶可在一定程度上促进这种协同作用,因为蛋白酶可水解淀粉颗粒表面上存在的蛋白质以及存在于颗粒内的蛋白质。淀粉颗粒上和淀粉颗粒内的这些蛋白质可能会对淀粉消化产生负面影响(McAllister等人,1993. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms.[蛋白质基质对瘤胃微生物消化谷物的影响]J.Anim.Sci.[动物科学杂志]71:205-212)。

[0366] 实例13中使用的 α -葡萄糖苷酶是购自麦格酶国际爱尔兰股份有限公司(Megazyme International Ireland)的酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)的高度纯化形式(EC 3.2.1.20,CAZy家族:GH13,蛋白质数据库条目:P53341,P38158,CAS:9001-42-7)。这个实例显示游离微生物的 α -葡萄糖苷酶与胰腺消化酶具有良好的协同作用。然而,发现该酵母 α -葡萄糖苷酶在与瘤胃和瘤皱胃中发现的条件相当的条件下不稳定且无活性。据信,可能需要进一步的努力(如包衣该酵母 α -葡萄糖苷酶或进行蛋白质工程)以使其在胃蛋白酶存在下在如此低的pH下是稳定的,使得它能够在瘤胃小肠中起作用。

[0367] 实例14

[0368] 在模仿小肠的条件下,在胰酶存在下通过真菌 α -葡萄糖苷酶从玉米淀粉中的葡萄糖释放

[0369] 检测三种真菌 α -葡萄糖苷酶TG L-2000、Aclglu1和Nfiglu1(表1)在胃蛋白酶、胰酶和瘤胃液存在下的稳定性和活性(下表7.1、7.2和7.3)。表7.1-7.3显示,所有三种 α -葡萄糖苷酶与胰酶协同作用,以增加从玉米淀粉中的葡萄糖释放。

[0370] 与胰酶的协同作用研究如下进行:将具有5mM CaCl₂的0.1M Mes(pH 6.0)中的0.5mL玉米淀粉(西格玛公司S4126)浆料(10% w/v)与0或2.5 μ L α -葡萄糖苷酶TG L-2000(3.1mg/mL)以及0或2.5 μ L猪胰酶(西格玛公司P7545,在1% NaCl中的2.5% w/v)一起孵育。将所述反应在40°C下进行1h。然后将反应混合物通过0.22 μ m过滤器过滤。使用麦格酶公司的葡萄糖测定试剂盒(GOPOD)(K-GLUC 09/14)(如上文实例13中所述)测定滤液中释放的葡萄糖,并如下进行:将8 μ L滤液与0.24mL GOPOD试剂在96孔板中混合,并在50°C下孵育20min后在510nm处读数。将在510nm处测量的OD单位用作葡萄糖释放的量化。

[0371] 与胃蛋白酶和胰酶(Pan)的协同作用研究如下进行:预孵育混合物含有0.1mL甘氨酸-HCl(pH 3.0)、5mM CaCl₂、25 μ L猪胃蛋白酶(西格玛公司P7000,5000U/mL)和2.5 μ L的TG L-2000。将混合物在4°C下孵育2h。在孵育结束时,添加在0.1M Mes(pH 6.0)中的0.5mL玉米淀粉浆料(10%,w/v)和2.5 μ L胰酶(2.5%),并在40°C下进一步孵育1h。如以上关于胰酶研究所述的,使用麦格酶公司的葡萄糖测定试剂盒对释放的葡萄糖进行测定。

[0372] 稳定性和与瘤胃淀粉水解酶的相互作用的研究如下进行:将2.5 μ L α -葡萄糖苷酶TG L-2000与0.24mL不含细胞的瘤胃液在40°C下孵育4h。在孵育结束时,添加在0.1M乙酸盐(pH 4.5)中的0.25mL玉米淀粉(10% w/v)并在40°C下进一步孵育30min。使用如上所述的麦格酶公司的葡萄糖测定试剂盒对释放的葡萄糖进行测定,用于胰酶研究。

[0373] 单独使用 α -葡萄糖苷酶和猪胰酶产生有限的从玉米淀粉中的葡萄糖释放(表7.1)。

α -葡糖昔酶TG L-2000和胰酶组合释放的葡萄糖量比这两种酶制剂中每一种的单独葡萄糖释放总和高5.2倍(表7.1)。类似地,当Ac1glu1和Nfiglu1在相同条件下与胰酶组合时,与Ac1glu1和胰酶或Nfiglu1和胰酶的单独释放的总和相比,葡萄糖释放量分别增加8.3倍(表7.2)和7.8倍(表7.3)。

[0374] 在胃蛋白酶存在下,在pH 3.0测试三种 α -葡糖昔酶的胃蛋白酶稳定性(表7.1)。显然,即使在不存在底物,pH 3.0和40°C下与胃蛋白酶预孵育2h后,2.5 μ L α -葡糖昔酶TG L-2000和胰酶的组合使葡萄糖释放增加了7.3倍(表7.1)。对于在相同条件下测试的 α -葡糖昔酶(Ac1glu1和Nfiglu1),通过组合,葡萄糖释放增加4.1倍(表7.2)和6.9倍(表7.3)。所有三种 α -葡糖昔酶都显示胃蛋白酶稳定性,因为尽管与胃蛋白酶预孵育,但当它们与测定混合物中的胰酶组合时,它们仍显示出协同效应。

[0375] 类似地,评估了瘤胃液中三种 α -葡糖昔酶的协同作用和稳定性(表7.1-7.3)。表7.1显示,对于添加到瘤胃液中的 α -葡糖昔酶TG L-2000,与通过 α -葡糖昔酶TG L-2000和通过瘤胃液单独释放的葡萄糖总和相比,葡萄糖释放增加了2.0倍;并且与不存在 α -葡糖昔酶的释放相比,在瘤胃液中预孵育,在TG L-2000存在下,葡萄糖的释放也增加了2.0倍(表7.1),这意味着 α -葡糖昔酶TG L-2000在瘤胃液中是稳定的。对于 α -葡糖昔酶Ac1glu1和Nfiglu1,它们的存在分别导致用瘤胃液“无预孵育和预孵育处理”的葡萄糖释放增加2.0倍和2.8倍(表7.2-7.3)。

[0376] 表7.1.来自黑曲霉的 α -葡糖昔酶TG L-2000与胰酶(Pan)的协同效应、瘤胃液中的淀粉分解活性、以及胃蛋白酶存在下从玉米淀粉中释放葡萄糖(G1)的耐受性。重复次数(n)为2-4。

	无 Pan	有 Pan	有 Pan	胃蛋白 酶 + Pan 在 40°C 下孵育 2 h	胃蛋白 酶 + Pan 在 40°C 下孵育 2 h	没有与 瘤胃液 预孵育	没有与 瘤胃液 预孵育	与瘤胃 液在 40°C 下预孵 育 4 h	与瘤胃 液在 40°C 下预孵 育 4 h
TG L-2000	+	-	+	-	+	-	+	-	+
OD510 nm	0.16	0.086	1.29	1.175	8.544	0.494	0.885	0.982	1.822
标准差	0.00 5	0.001	0.014	0.145	0.276	0.199	0.05	0.117	0.11
由于添 加了 TG L-2000, G1 释放			5.2		7.3		2.0		2.0

成倍增 加									
n	2	4	2	4	2	4	2	4	2

[0379] 表7.2.来自棒曲霉(Ac1glu1)的 α -葡糖昔酶与胰酶(Pan)的协同效应、瘤胃液中的淀粉分解活性、以及胃蛋白酶存在下从玉米淀粉中释放葡萄糖(G1)的耐受性。

[0380] 除了使用来自棒曲霉的0 μ g或50 μ g α -葡糖昔酶Ac1glu1(表1)之外,反应和测定条件与表7.1相同。重复次数(n)为2-4。

	无 Pan	有 Pan	有 Pan	胃蛋白 酶 + Pan 在 40°C 下孵育 2 h	胃蛋白 酶 + Pan 在 40°C 下 孵育 2 h	没有与 瘤胃液 预孵育	没有与 瘤胃液 预孵育	与瘤胃 液在 40°C 下预孵 育 4 h	与瘤胃 液在 40°C 下预孵 育 4 h
Aclglu1	+	-	+	-	+	-	+	-	+
OD510 nm	0.06 6	0.08 1	1.22	1.175	4.845	0.494	0.75	0.982	2.05
标准差	0.00 3	0.00 1	0.01 3	0.145	0.52	0.199	0.03	0.117	0.08
由于添 加了 Aclglu1, G1 释放 成倍增 加			8.3		4.1		2.0		2.8
n	2	4	2	4	2	4	2	4	2

[0382] 表7.3. 来自费希新萨托菌(Nfiglu1)的 α -葡萄糖苷酶与胰酶(Pan)的协同效应、瘤胃液中的淀粉分解活性、以及胃蛋白酶存在下从玉米淀粉中释放葡萄糖(G1)的耐受性。

[0383] 除了使用来自费希新萨托菌的0 μ g或50 μ g α -葡萄糖苷酶Nfiglu1之外,反应和测定条件与以上关于表7.1所述的相同。重复次数(n)为2-4。

	无 Pan	有 Pan	有 Pan	胃蛋白 酶 + Pan 在 40°C 下孵育 2 h	胃蛋白 酶 + Pan 在 40°C 下 孵育 2 h	没有与 瘤胃液 预孵育	没有与 瘤胃液 预孵育	与瘤胃 液在 40°C 下预孵 育 4 h	与瘤胃 液在 40°C 下预孵 育 4 h
Nfiglu1	+	-	+	-	+	-	+	-	+
OD510 nm	0.08	0.086	1.29	1.175	8.12	0.494	0.73	0.982	2.06
标准差	0.002	0.001	0.077	0.145	0.13	0.199	0.01	0.117	0.00

由于添 加了 Nfiglu1, G1 释放 成倍增 加			7.8		6.9		2.0		2.8
n	2	4	2	4	2	4	2	4	2

[0386] 实例15

[0387] 真菌 α -葡萄糖苷酶在瘤胃液中的稳定性以及与胰酶在葡萄糖释放中的相互

[0388] 作用

[0389] 预孵育混合物含有真菌 α -葡萄糖苷酶中的每一种,每种50 μ g:将TG L-2000、Aclglu1、Nfiglu1、TauSec098和TauSec099(表1)溶解于在24孔板的孔中混合的2.5 μ L和240 μ L不含细胞的瘤胃液中。为了对照,不添加 α -葡萄糖苷酶。将混合物在40°C下孵育4h。在孵育结束时,将250 μ L玉米淀粉浆料(10% w/v,西格玛公司S4126)溶解于0.1M Mes, 5mM CaCl₂ (pH 6)中并添加2.5 μ L胰酶(西格玛公司P7545,在0.1% NaCl中,2.5%,w/v),并且在40°C下

进行反应30min(n=4)。将离心后获得的上清液稀释10倍,并使用来自麦格酶公司的葡萄糖测定试剂盒如实例13所述量化释放的葡萄糖。

[0390] 图10显示,与“无预孵育”处理相比,在40°C下在瘤胃液中将五种 α -葡糖苷酶预孵育4h没有导致活性丧失。似乎在预孵育的样品中释放的葡萄糖多于在未预孵育的样品中释放的葡萄糖(图10)。这可能指示这些 α -葡糖苷酶与存在于瘤胃液中的淀粉水解酶相互作用,所述瘤胃液具有残留水平的淀粉底物。

[0391] 实例16

[0392] 在pH 6.0,五种 α -葡糖苷酶与胰酶从玉米淀粉中释放葡萄糖的协同作用

[0393] 所述反应混合物含有在含有5mM CaCl₂的0.1M Mes (pH 6.0)中的0.5mL玉米淀粉(西格玛公司S4126)浆料(10% w/v)、在2.5 μ L和0或2.5 μ L胰酶溶液(西格玛公司P7545,在0.1%NaCl中2.5% w/v)中的50 μ g α -葡糖苷酶。为了对照,省略 α -葡糖苷酶。在40°C下进行反应60min(n=4),并使用实例13中所述的葡萄糖测定试剂盒量化释放的葡萄糖。

[0394] 图11显示,仅使用胰酶而不使用另外的酶,则用于对照的葡萄糖(0.67mg/mL反应混合物)的生产是有限的。当仅使用 α -葡糖苷酶时,除了显示葡萄糖释放的TG L-2000(0.80mg/mL反应混合物)之外,葡萄糖释放低。当 α -葡糖苷酶和胰酶两者一起使用时,取决于所用 α -葡糖苷酶的量,葡萄糖释放量在11-20倍的范围内增加。这说明了当使用五种 α -葡糖苷酶中的任一种和胰酶时,可以获得从玉米淀粉中释放葡萄糖的协同效应。

[0395] 实例17

[0396] 用胃蛋白酶处理的 α -葡糖苷酶在pH 2.5和pH 6.0的活性

[0397] 反应混合物含有在2.5 μ L、75 μ L胃蛋白酶(西格玛公司P7000,储备溶液5000U/mL)中的50 μ g的五种 α -葡糖苷酶TG L-2000、Ac1glu1、Nfiglu1、TauSec098和TauSec099(表1)和在具有5mM CaCl₂(pH 2.5)的0.1M甘氨酸-HCl或在具有5mM CaCl₂(pH 6.0)的0.1M Mes-NaOH中的1.5mL麦芽糖(21.5mg/mL)。将所述反应在40°C下进行30min。在反应结束时,然后将所述反应混合物稀释10倍并使用如上文实例13中所述来自麦格酶公司的葡萄糖测定试剂盒对葡萄糖释放进行测定。

[0398] 表8.五种 α -葡糖苷酶在pH 2.5至pH 6.0的活性比。活性在pH 6.0被认为是100%。

葡糖苷酶	相对于在 pH 6.0, 在 pH 2.5 的活性 (%)
TG L-2000	138
Ac1glu1	107
Nfiglu1	84
TauSec098	120
TauSec099	167

[0400] 表8显示,除了Nfiglu1(与在pH 6.0相比,在pH 2.5具有84%活性)之外,在胃蛋白酶存在下,所有四种葡糖苷酶在pH 2.5比在pH 6.0更具活性。因此,这些酶作为反刍动物的饲料酶显示出有用性,因为它们在40°C下在瘤胃液中稳定并保持活性4h。

[0401] 实例18

[0402] 葡糖淀粉酶与金属肽酶P14L和P7L的组合使用增加在玉米瘤胃发酵中的干物质消化和气体产生

[0403] 如下所述评估4种葡糖淀粉酶(CS4、TrGA、AfuGA、FvGA)和两种金属肽酶/蛋白酶(P14L、P7L)及其组合对在0h、3h、7h、9h、12h和24h孵育/发酵的干物质消化(DMD)和气体产生的影响。葡糖淀粉酶和蛋白酶均以0.25mg/g浓度应用。

[0404] 在瘤胃液的体外分批培养中使用马齿玉米作为底物,评估4种葡糖淀粉酶(CS4、TrGA、AfuGA、FvGA)和两种金属肽酶/蛋白酶(P14L、P7L)及其组合对瘤胃微生物发酵的影响。实验基于之前建立和公开的方案(Adesogan, A. T., Krueger, N. A. 和 Kim, S.C. 2005. Anim. Feed Sci. Technol. [动物饲料科学与技术]123:211-223)。在体外分批发酵系统中使用的马齿玉米具有88.8%干物质(DM)、9.3%粗蛋白(CP)、3.2%酸性洗涤剂纤维(ADF)、8.3%用淀粉酶(aNDF)处理的中性洗涤剂纤维、76.9%非纤维碳水化合物(NFC)、88.0%总可消化营养素(TDN)。将其研磨至4mm。所有酶以每克马齿玉米0.25mg酶蛋白在三次单独运行中应用,每次处理重复4次,并且所述发酵或孵育在39℃下持续0h、3h、7h、9h、12h和24h。将碾碎的马齿玉米称重(每次运行重复6次)至F57滤袋(安卡姆科技公司(ANKOM Technology),马斯顿(Macedon),纽约州)。在放入瓶中之前,将酶在0.1M柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中稀释,并添加至0.5g F57袋中的碾碎的马齿玉米中(Krueger, N.A. 和 A.T. Adesogan. 2008. Anim. Feed Sci. Tech. [动物饲料科学与技术]145:84-94; Goering, H.K. 和 P.J. Van Soest. 1970. 农业手册编号379, ARS USDA, 华盛顿特区, 第20页)。用Uline公司的桌面塑料袋封口机(Uline Tabletop Poly Bag Sealer)(Impulse® AIE-200类型)密封F57滤袋,然后立即放入发酵容器(160mL血清瓶)中。还包括仅由滤袋组成的空瓶,以及仅含有不含酶的碾碎的马齿玉米的对照。在消耗总混合给养(TMR)后,从三头泌乳的、瘤胃插管的荷斯坦奶牛中代表性地吸出瘤胃液2h至3h。基于干物质饲喂至瘘管奶牛的TMR成分组合物由以下组成:38.2%玉米青贮饲料、27.3%碾碎的去壳玉米、含有44%粗蛋白的14.5%大豆粉、9.1%柑橘渣、4.5%饲养场预混物、4.0%中期开花的苜蓿干草、1.8%能量增强剂(MS专业营养(MS Specialty Nutrition),敦提(Dundee)、伊利诺伊州)、0.5%Novasil(巴斯夫公司(BASF),德国),总计100%。

[0405] 将收集的瘤胃液通过四层粗棉布过滤,然后与预热的人工唾液(39℃)混合。人工唾液的组合物包括 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的微量矿物质溶液; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的常量矿物质溶液; $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$ 和 NaHCO_3 的缓冲溶液;胰蛋白酶蛋白胨溶液(胰蛋白胨,西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich),圣路易斯,密苏里州,美国);氧化还原指示剂刃天青和含有半胱氨酸HC1、1M NaOH、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 和蒸馏水的还原溶液。瘤胃液和人工唾液之间的体积比为1:2。将缓冲的瘤胃液(52mL)添加至含有滤袋的160mL血清瓶中,并且用橡胶塞封闭瓶并用铝密封圈进行密封。将瓶在39℃下在强制空气(forced-air)孵育器中孵育0h、3h、7h、9h、12h和24h。在孵育结束时,将含有残余物的滤袋在60℃下烘箱干燥48h并称重以量化DMD。用压力传感器测量瓶内的气体压力,并随后在0h、3h、7h、9h、12h和24h孵育下转换为气体体积。以下公式用于将气体压力转换为气体体积:

[0406] 气体体积(mL) = (气体压力(psi)*4.8843)+3.1296

[0407] 基于使用160mL血清瓶的实验条件确定所述等式,并用于表9.1-9.2的所有实验。

[0408] 统计分析:对于实例18中的所有实验,使用SAS的GLIMMIX程序(版本9.1;SAS研究所(SAS Institute),凯利(Cary),北卡罗来纳州)分析收集的数据。将实验被设计为完全随机区组设计,其中每次运行被认为是一个区组。当以不同剂量测试酶时,剂量用作模型中的

固定效应。响应变量包括体外DMD和气体产生。运行被认为是一个随机因素。模型的固定效应包括在孵育后不同小时测量的发酵参数的采样时间。在进行最终分析之前,使用SAS的UNIVARIATE程序测试异常值和正态性的残差。处理影响在P<0.05处被证明是显著的,而在0.05≤P≤0.10处定义了任何趋势。

[0409] 可以在表9.1.1至9.1.4中发现四种葡糖淀粉酶(CS4、TrGA、AfuGA、FvGA)和两种金属肽酶/蛋白酶(P14L、P7L)及其组合对在0h、3h、7h、9h、12h和24h孵育/发酵下的干物质消化(DMD)和气体产生评估的结果。葡糖淀粉酶和蛋白酶均以0.25mg/g浓度应用。

[0410] CS4+/-P14L处理:在0h、3h和7h孵育或发酵下,没有观察到DMD响应于CS4补充的明显的影响(表9.1.1)。然而,在9h、12h和24h孵育下,DMD分别提高了56%、36%和25% (P<0.05)。类似地,在9h、12h和24h孵育下,蛋白酶P14L分别使DMD提高了79%、59%和32% (P<0.05)。在9h、12h和24h孵育下,CS4和P14L的组合分别使DMD提高了109%、86%和45% (P<0.05)。

[0411] TrGA+/-P14L处理:在9h孵育下,使用TrGA和P14L使DMD分别增加了62%和79% (表9.1.2)。在9h孵育下,与对照相比,两种酶的组合使DMD增加至124% (P<0.01)。

[0412] AfuGA+/-P14L处理:表9.1.3给出了AfuGA和P14L的组合对瘤胃发酵参数的影响。在7h、9h、12h和24h孵育下,使用AfuGA、P14L及组合使DMD增加 (P<0.05)。在7h、9h、12h和24h孵育下,两种酶的组合影响明显,因为它使DMD分别增加了119%、146%、108%和60%,并且影响的量级大于单独提供的酶 (P<0.05)。

[0413] FvGA+/-P14L处理:表9.1.4给出了FvGA和P14L的组合对瘤胃发酵参数的影响。在0h、3h和7h孵育下,没有观察到DMD响应于FvGA补充的影响;然而,在9h孵育下,使用FvGA、P14L及其组合使DMD分别提高了42%、79%和93% (P<0.01)。

[0414] 至少在12h和24h孵育下,发现所有四种葡糖淀粉酶、金属肽酶P14L及其组合显著增加了发酵气体的产生 (P<0.05) (表9.1.1-9.1.4)。

[0415] CS4、TrGA、AfuGA、FvGA+/-P7L处理:表9.2.1-9.2.4给出了在0h、3h、7h、9h、12h和24h孵育/发酵下,4种葡糖淀粉酶(CS4、TrGA、AfuGA、FvGA)与金属肽酶/蛋白酶P7L组合对DMD的影响。正如表9.1.1-9.1.4,葡糖淀粉酶和蛋白酶均以0.25mg/g浓度应用。

[0416] 基于观察到的结果,观察到4种葡糖淀粉酶与P7L组合的协同效应或另外效应,这与孵育时间无关。在0h、3h、7h、9h、12h和24h孵育下,CS4和P7L组合的另外效应使DMD分别增加了49%、112%、72%、60%、55%和19% (表9.2.1;P<0.01)。在0h、3h、7h、9h、12h和24h,TrGA和P7L的组合也使DMD分别增加了41%、109%、73%、64%、60%和25% (表9.2.2;P<0.01)。

[0417] 在0h、3h、7h、9h、12h和24h,AfuGA(表9.2.3)和P7L的组合使DMD分别增加了23%、116%、85%、66%、58%和21% (P<0.01)。虽然FvGA与P7L组合的功效在3h、7h、9h和12h孵育下有效提高DMD,但与对照相比,在0h和24h没有观察到影响(表9.2.4)。在孵育的大部分时间点观察到所有4种葡糖淀粉酶、蛋白酶P7L及其组合的更大的累积气体体积,进一步支持了DMD提高 (P<0.05) (表9.2.1-9.2.4)。

[0418] 表9.1.1.CS4和蛋白酶(P14L)及其组合对体外干物质消化率和气体产生的影响。^{a-c}意指行内不同上标具有差异 (P<0.05)。

时间, h	对照	CS4	P14L	组合	SE	P 值
干物质消化率, %						
0	7.2	8.64	9.97	9.5	2.16	0.81
3	11.95	15.7	22.21	23.49	4.42	0.28
7	13.48	18.46	19.35	24.16	2.76	0.13
9	16.07 ^c	25.15 ^{ab}	28.81 ^{ab}	33.71 ^a	1.60	< 0.01
12	23.63 ^b	32.27 ^{ab}	37.47 ^{ab}	44.04 ^a	4.32	0.05
[0419] 24	42 ^b	52.59 ^{ab}	55.49 ^a	61.04 ^a	4.04	0.05
气体体积, mL						
0	2.79	3.0	2.84	2.95	0.59	0.99
3	9.72	9.92	10.81	10.69	0.63	0.55
7	19.5	19.69	21.82	22.85	1.67	0.45
9	30.75	33.69	32.04	38.93	2.42	0.16
12	47.87 ^b	53.87 ^{ab}	50.29 ^b	62.54 ^a	3.13	0.04
24	75.49 ^c	91.12 ^{ab}	79.4 ^{bc}	99.7 ^a	4.69	0.02

[0420] 表9.1.2.TrGA和蛋白酶(P14L)及其组合对体外干物质消化率和气体产生的影响。^{a-c}意指行内不同上标具有差异(P<0.05)。

时间, h	对照	TrGA	P14L	组合	SE	P 值
干物质消化率, %						
0	7.2	8.23	9.97	10.22	1.71	0.57
3	11.95	16.65	22.20	25.81	8.02	0.17
7	13.48	20.65	19.35	26.11	3.28	0.13
[0421] 9	16.07 ^c	26.11 ^b	28.81 ^b	36.01 ^a	1.54	< 0.01
12	23.62 ^b	34.11 ^{ab}	37.47 ^a	44.05 ^a	4.14	0.05
24	42 ^b	56.75 ^a	55.49 ^{ab}	63.63 ^a	4.17	0.04
气体体积, mL						
0	2.79	3.09	2.84	3.01	0.51	0.97
3	9.72	10.08	10.82	12.31	0.87	0.23
7	19.5	20.7	21.82	23.56	1.98	0.54
[0422] 9	30.75	35.57	32.05	41.69	2.70	0.08
12	47.87 ^b	56.28 ^{ab}	20.29 ^b	65.99 ^a	3.42	0.02
24	75.49 ^b	97.24 ^a	79.41 ^b	106.26 ^a	5.09	< 0.01

[0423] 表9.1.3.AfuGA和蛋白酶(P14L)及其组合对体外干物质消化率和气体产生的影响。^{a-c}意指行内不同上标具有差异(P<0.05)。

时间, h	对照	AfuGA	P14L	组合	SE	P 值
干物质消化率, %						
0	7.2	10.19	9.97	11.94	2.02	0.46
3	11.95	18.48	22.20	26.42	4.65	0.23
7	13.48 ^b	23.26 ^{ab}	19.35 ^{ab}	29.57 ^a	3.17	0.04
9	16.07 ^c	30.73 ^b	28.81 ^b	39.58 ^a	1.56	< 0.01
12	23.62 ^b	37.18 ^{ab}	37.47 ^{ab}	49.07 ^a	5.04	0.04
24	42 ^b	57.59 ^a	55.48 ^a	67.27 ^a	3.64	< 0.01
气体体积, mL						
0	2.78	2.83	2.84	2.96	0.50	0.99
3	9.72	10.47	10.83	13.19	0.80	0.07
7	19.5	21.12	21.83	28.76	1.52	0.01
9	30.74 ^b	37.62 ^b	32.06 ^b	48.37 ^a	2.40	< 0.01
12	47.87 ^c	59.98 ^b	50.30 ^c	75.11 ^a	2.60	< 0.01
24	75.49 ^c	102.68 ^b	79.45 ^c	121.87 ^a	3.37	< 0.01

[0424] 表9.1.4.FvGA和蛋白酶(P14L)及其组合对体外干物质消化率和气体产生的影响。^{a-c} 意指行内不同上标具有差异(P<0.05)。

时间, h	对照	FvGA	P14L	组合	SE	P 值
干物质消化率, %						
0	7.2	7.09	9.97	9.10	2.54	0.81
3	11.95	15.17	22.22	24.28	4.13	0.20
7	13.48	16.47	19.35	21.36	2.55	0.22
9	16.07 ^c	22.74 ^b	28.81 ^{ab}	31.01 ^a	1.99	< 0.01
12	23.63	29.42	37.47	37.42	5.0	0.17
24	42	44.89	55.49	56.47	3.74	0.06
气体体积, mL						
0	2.79	2.99	2.84	3.03	0.46	0.98
3	9.72	10.54	10.82	11.93	0.64	0.19
7	19.5 ^b	21.77 ^{ab}	21.82 ^{ab}	25.42 ^a	1.22	0.05
9	30.75 ^b	35.77 ^{ab}	32.05 ^b	41.47 ^a	2.09	0.03
12	47.87 ^b	54.39 ^b	50.30 ^b	62.26 ^a	2.21	< 0.01
24	75.49 ^b	85.68 ^b	79.45 ^b	96.57 ^a	3.19	< 0.01

[0425] 表9.2.1CS4和蛋白酶(P7L)及其组合对体外干物质消化率和气体产生的影响。^{a-c} 意指行内不同上标具有差异(P<0.05)。

时间, h	对照	CS4	P7L	组合	SE	P 值
干物质消化率, %						
[0428] 0	9.21 ^b	10.8 ^a	12.6 ^a	13.7 ^a	0.77	< 0.01
3	14.7 ^d	17.8 ^c	24.2 ^b	31.1 ^a	1.01	< 0.01
7	25.0 ^c	29.7 ^b	40.2 ^a	43.1 ^a	1.43	< 0.01
9	30.3 ^d	36.0 ^c	44.7 ^b	48.5 ^a	1.37	< 0.01

	12	31.9 ^c	40.2 ^b	43.8 ^b	49.5 ^a	1.86	< 0.01
	24	52.5 ^b	56.8 ^b	57.7 ^{ab}	62.4 ^a	1.83	< 0.01
气体体积, mL							
[0429]	0	2.98	3.64	3.24	3.39	0.23	0.23
	3	6.50 ^b	6.45 ^b	8.84 ^a	9.11 ^a	0.54	< 0.01
	7	11.27 ^d	13.31 ^c	14.50 ^b	17.19 ^a	0.34	< 0.01
	9	14.46 ^c	20.82 ^b	19.67 ^b	24.35 ^a	0.98	< 0.01
	12	13.59 ^c	20.12 ^b	21.02 ^b	24.35 ^a	0.52	< 0.01
	24	31.88 ^b	40.45 ^a	31.42 ^b	43.34 ^a	1.25	< 0.01

[0430] 表9.2.2.TrGA和蛋白酶(P7L)及其组合对体外干物质消化率和气体产生的影响。^{a-c}意指行内不同上标具有差异(P<0.05)。

	时间, h	对照	TrGA	P7L	组合	SE	P 值
			干物质消化率, %				
[0431]	0	9.21 ^c	10.8 ^b	11.1 ^b	13.0 ^a	0.45	< 0.01
	3	14.7 ^d	18.0 ^c	24.2 ^b	30.7 ^a	1.04	< 0.01
	7	25.0 ^c	28.9 ^b	40.2 ^a	43.3 ^a	1.33	< 0.01
	9	30.3 ^c	36.5 ^c	44.7 ^b	49.6 ^a	1.06	< 0.01
	12	31.9 ^c	41.0 ^b	43.8 ^b	51.1 ^a	1.66	< 0.01
	24	52.5 ^c	58.8 ^b	57.7 ^b	65.5 ^a	1.76	< 0.01
气体体积, mL							
	0	2.98	3.53	3.24	3.53	0.22	0.24
	3	6.50 ^b	6.82 ^b	8.83 ^a	10.15 ^a	0.47	< 0.01
	7	11.27 ^d	13.03 ^c	14.26 ^b	18.26 ^a	0.47	< 0.01
	9	14.46 ^c	22.03 ^{ab}	19.67 ^b	23.43 ^a	1.13	< 0.01
	12	13.59 ^c	20.33 ^b	21.02 ^b	26.34 ^a	0.60	< 0.01
	24	31.88 ^c	41.60 ^b	31.42 ^c	45.16 ^a	1.45	< 0.01

[0432] 表9.2.3.AfuGA和蛋白酶(P7L)及其组合对体外干物质消化率和气体产生的影响。^{a-c}意指行内不同上标具有差异(P<0.05)。

	时间, h	对照	AfuGA	P7L	组合	SE	P 值
			干物质消化率, %				
[0433]	0	9.21 ^b	12.1 ^a	11.1 ^a	11.3 ^a	0.55	< 0.01
	3	14.7 ^d	20.1 ^c	24.2 ^b	31.7 ^a	0.92	< 0.01
	7	25.0 ^d	33.5 ^c	40.2 ^b	46.2 ^a	1.45	< 0.01
	9	30.2 ^d	38.5 ^c	44.7 ^b	50.2 ^a	1.00	< 0.01
	12	31.9 ^c	42.0 ^b	43.8 ^b	50.3 ^a	1.81	< 0.01
	24	52.5 ^c	60.4 ^{ab}	57.7 ^{bc}	63.6 ^a	1.90	< 0.01
气体体积, mL							
	0	2.98	3.85	3.24	3.24	0.25	0.12
	3	6.50 ^c	8.35 ^b	8.84 ^b	10.88 ^a	0.53	< 0.01
	7	11.27 ^c	15.05 ^b	14.50 ^b	17.44 ^a	0.35	< 0.01
	9	14.46 ^b	21.94 ^a	19.67 ^a	21.86 ^a	1.18	0.02
	12	13.59 ^c	22.55 ^b	21.02 ^b	25.17 ^a	0.65	< 0.01
	24	31.88 ^b	44.24 ^a	31.42 ^b	43.19 ^a	1.29	< 0.01

[0434] 表9.2.4.FvGA和蛋白酶(P7L)及其组合对体外干物质消化率和气体产生的影响。^{a-c}意指行内不同上标具有差异(P<0.05)。

[0435]	时间, h	对照	FvGA	P7L	组合	SE	P 值
气体体积, mL							

[0436]	干物质消化率, %					
	0	9.20	9.85	11.1	10.7	0.51
	3	14.7 ^c	18.0 ^b	24.2 ^a	25.3 ^a	1.09
	7	25.1 ^b	28.6 ^b	40.2 ^a	40.2 ^a	1.48
	9	30.3 ^c	33.7 ^b	44.7 ^b	45.9 ^b	1.10
	12	31.9 ^b	34.9 ^b	43.8 ^a	46.9 ^a	1.99
	24	52.5 ^{ab}	50.2 ^b	57.7 ^a	56.8 ^a	1.93
气体体积, mL						
0	2.98	3.64	3.24	3.8	0.35	0.35
3	6.50 ^c	8.34 ^b	8.84 ^{ab}	10.08 ^a	0.49	< 0.01
7	11.27 ^c	13.46 ^b	14.50 ^b	15.91 ^a	0.39	< 0.01
9	14.46 ^b	18.06 ^a	19.67 ^a	19.73 ^a	0.94	0.16
12	13.59 ^c	19.23 ^b	21.02 ^a	22.45 ^a	0.60	< 0.01
24	31.88 ^b	33.94 ^{ab}	31.42 ^b	36.40 ^a	1.31	0.041

[0437] 实例19

[0438] 葡糖淀粉酶对麦芽糖的水解

[0439] 通常,葡萄糖在动物中被吸收。麦芽糖是由两个单位葡萄糖形成的二糖。因此,麦芽糖需要水解成葡萄糖单体以便被吸收。除了用作饲料添加剂酶的其他优选特性之外,葡糖淀粉酶对底物麦芽糖具有高催化活性是有利的。优选地,当与本文所述的测试条件下TrGA的活性相比时,葡糖淀粉酶对底物麦芽糖应具有至少20%的活性。

[0440] 对麦芽糖的葡糖淀粉酶活性确定如下。在96孔微孔板中制备含有2% (w/v) 或8% (w/v) 麦芽糖 (M-5885, 西格玛公司) 和在含有5mM CaCl₂的50mM Mes-NaOH (pH 6.0) 中的10μg葡糖淀粉酶的反应混合物,最终体积为0.05mL。一式三份重复每个葡糖淀粉酶-麦芽糖反应。

[0441] 将所述反应在40°C下进行20min,其关于葡萄糖释放在线性范围内。将所述反应在PCR机器中在95°C下运行5min。冷却至室温(23°C)后,在微孔板中,将10μL稀释至0.5mg至0.9mg葡萄糖/mL浓度范围的反应混合物与0.24mL GOPOD试剂(来自麦格酶公司的D-葡萄糖测定试剂盒,GOPOD格式)混合。然后将混合物在50°C下孵育20min并读取在510nm处的吸光度。使用来自制造商的葡萄糖标准来创建用于校准的标准曲线。

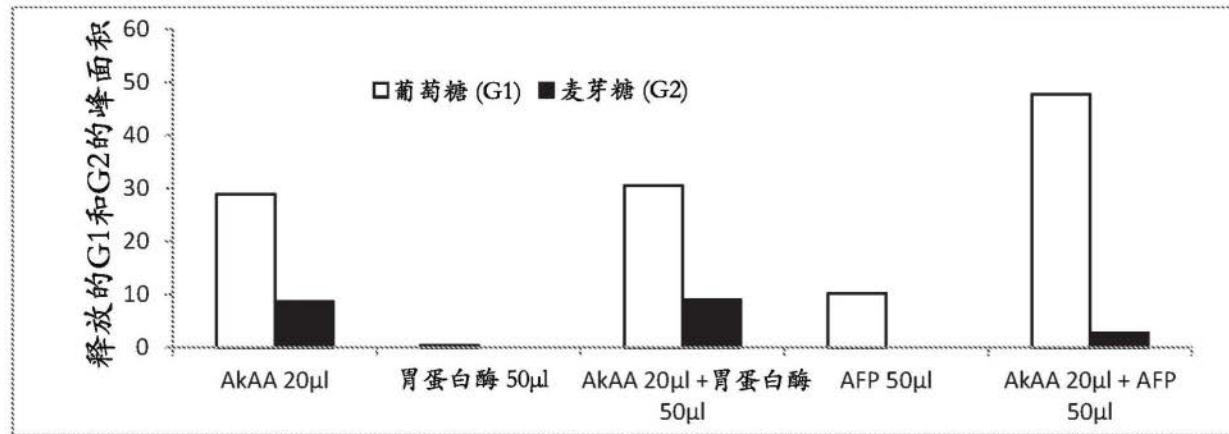
[0442] 表10中的数据显示,所测试的所有葡糖淀粉酶在与体内消化条件中发现的条件相似或接近的条件(如接近6.0的中性pH)下对麦芽糖具有活性。

[0443] 观察到AnGA是一个例外,因为在这些测试条件下,它存在于底物麦芽糖上。因此,AnGA不是如本文所述使用的合适的葡糖淀粉酶。

[0444] 表10. 在pH 6.0和在两种麦芽糖浓度下四种葡糖淀粉酶对麦芽糖的水解。

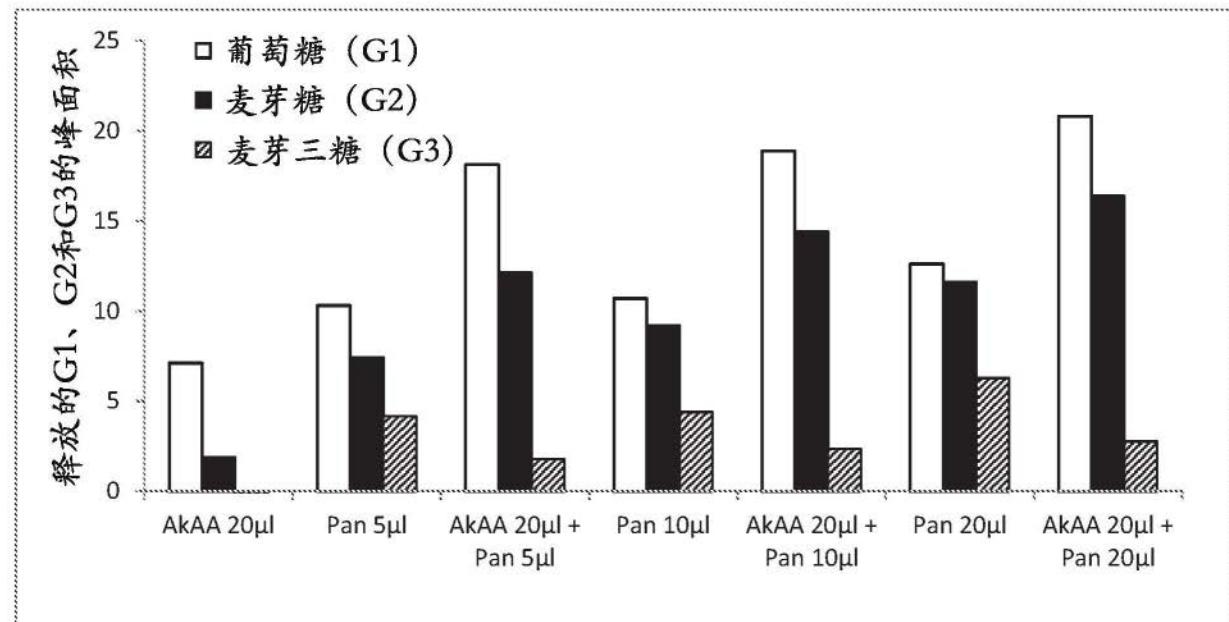
处理	麦芽糖2% (w/v)	麦芽糖8% (w/v)
TrGA*	100	100
CS4	44	44
AfuGA	41	33
AnGA	15	12
对照(减去酶)	0.2	2

[0446] *TrGA对麦芽糖的活性被视为100%。



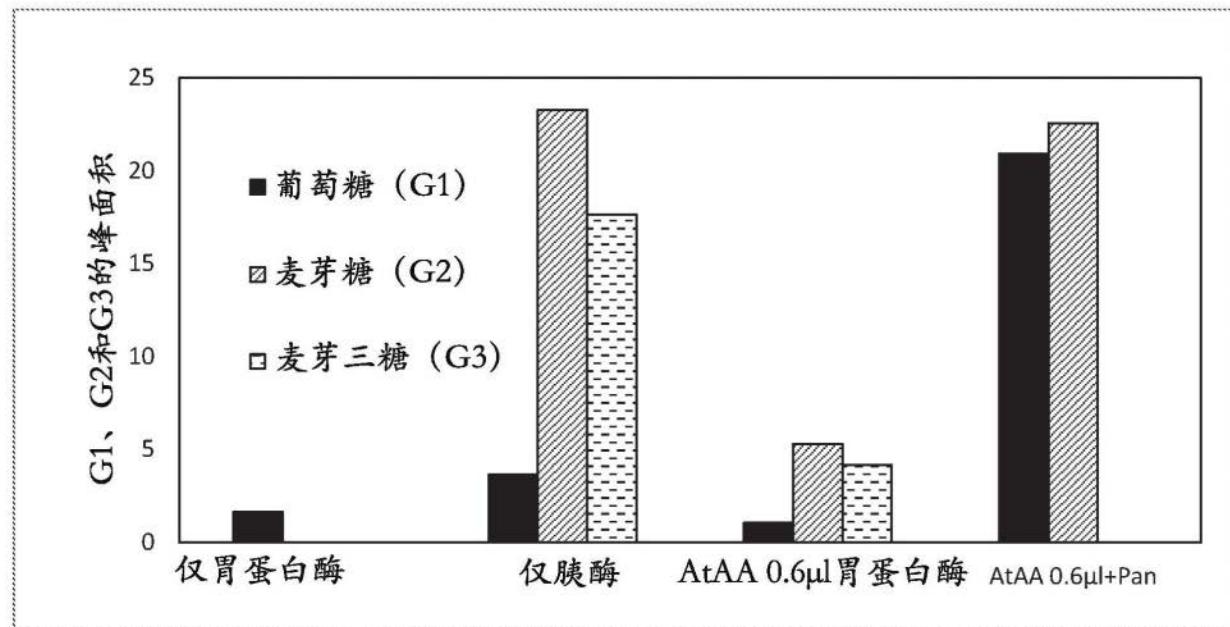
在pH 3.2在胃蛋白酶和AFP蛋白酶存在下通过AkAA α -淀粉酶从玉米面粉中释放葡萄糖和麦芽糖

图1



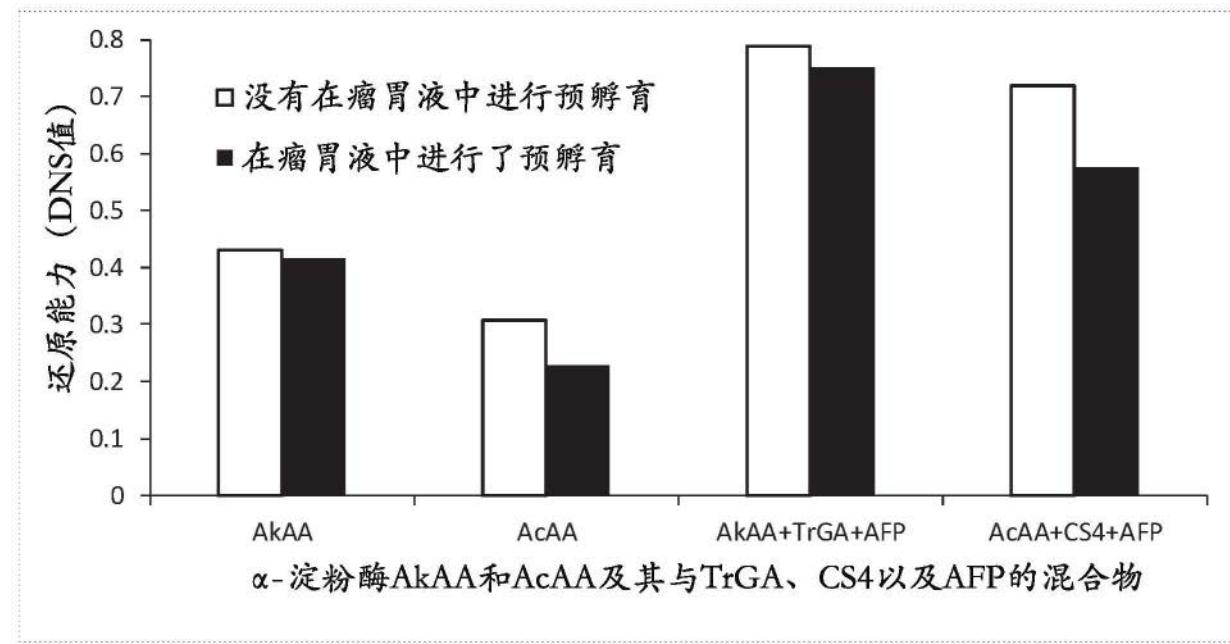
在pH 6.7通过AkAA α -淀粉酶和胰酶从玉米面粉中释放葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖以及AkAA与胰酶在增加葡萄糖释放和减少麦芽三糖释放中的协同作用

图2



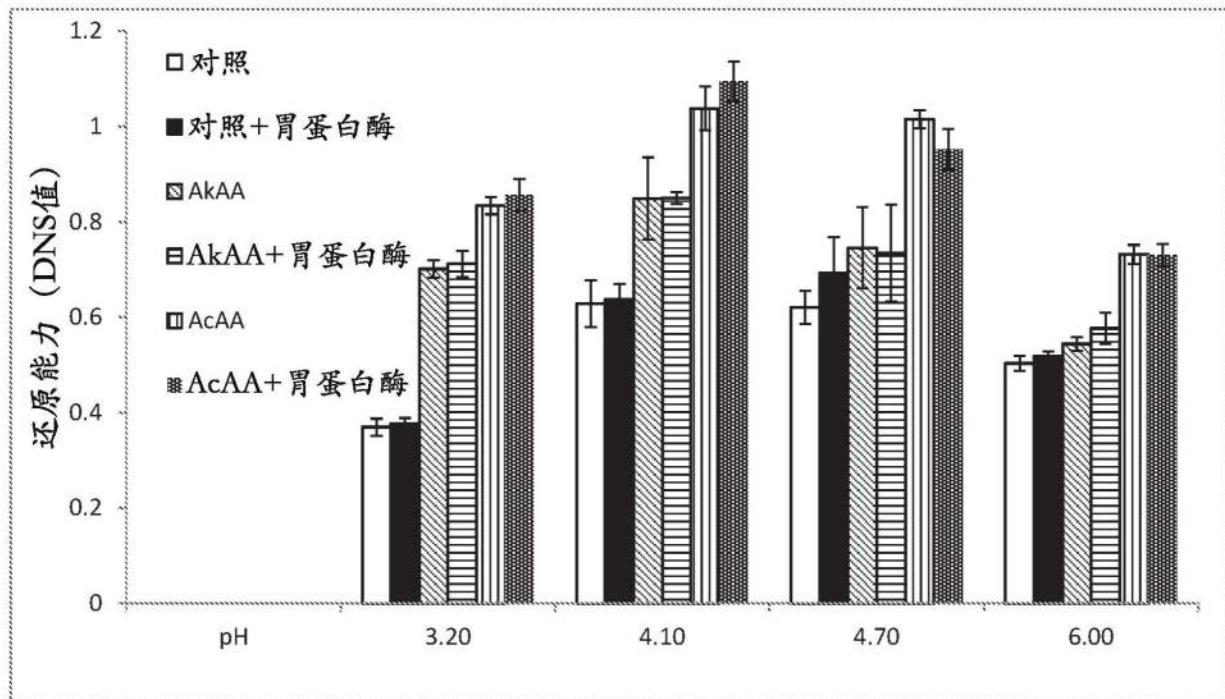
在pH 2.5在胃蛋白酶存在下和在pH 6.7在胰酶存在下玉米面粉中AtAA α -淀粉酶的活性以及当AtAA和胰酶一起给予时麦芽三糖的完全转化

图3



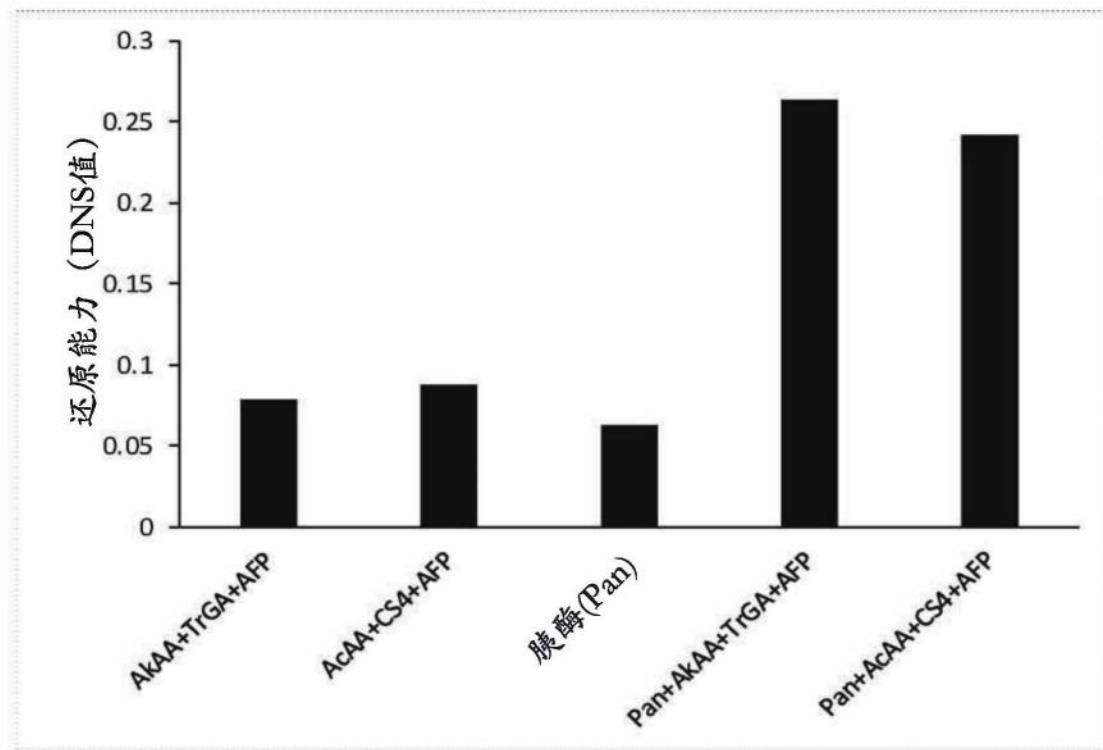
当与瘤胃液一起孵育时 α -淀粉酶AkAA和AcAA及其与葡萄糖淀粉酶(TrGA或CS4)以及天冬氨酰蛋白酶(AFP)的混合物的稳定性

图4



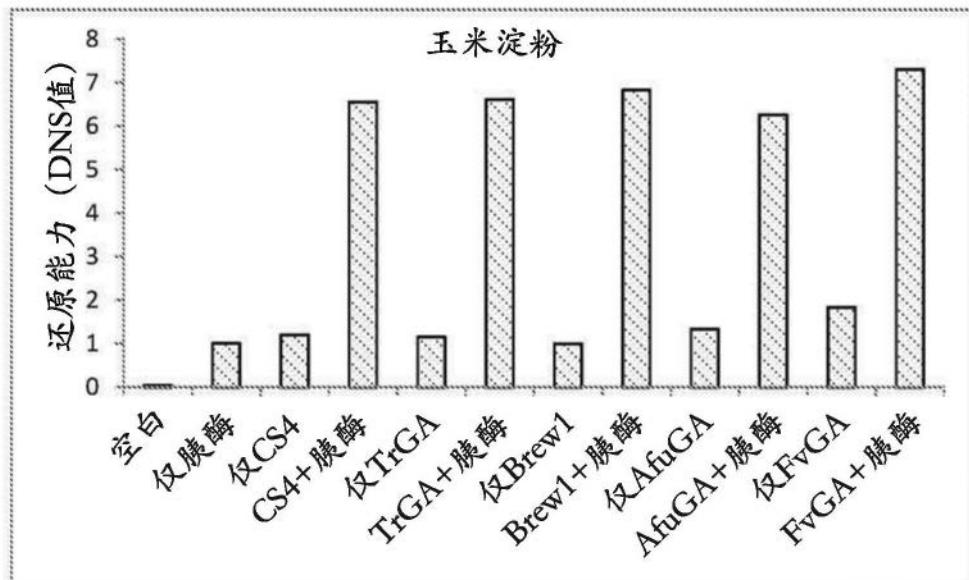
在pH 3.2-6.0测试的在胃蛋白酶存在下的AkAA和AcAA α -淀粉酶的活性

图5



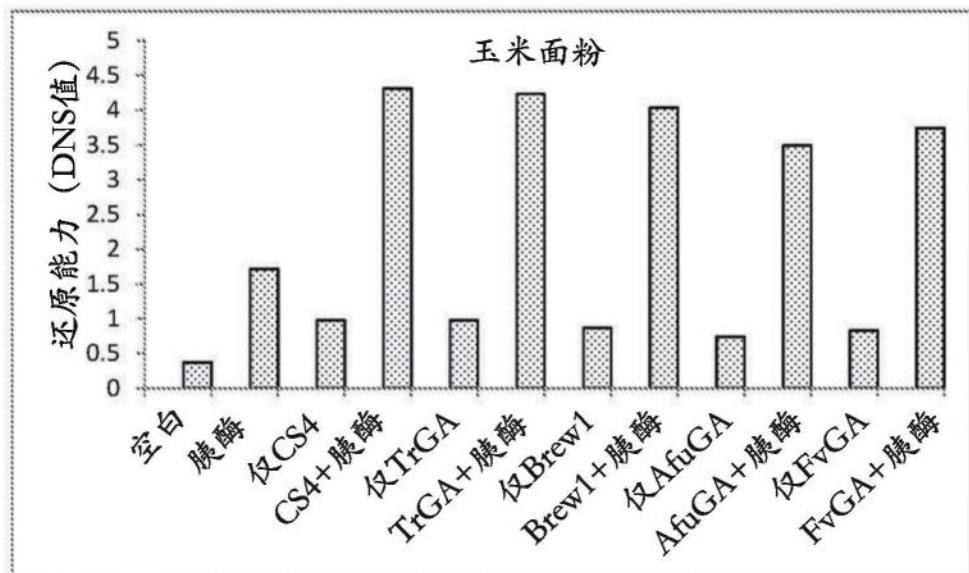
在pH 6.0在胰酶 (Pan) 存在下含有 α -淀粉酶 AkAA 或 AcAA 和葡萄糖淀粉酶 (TrGA 或 CS4) 以及天冬氨酸酰肽酶 (AFP) 的酶混合物的活性

图6



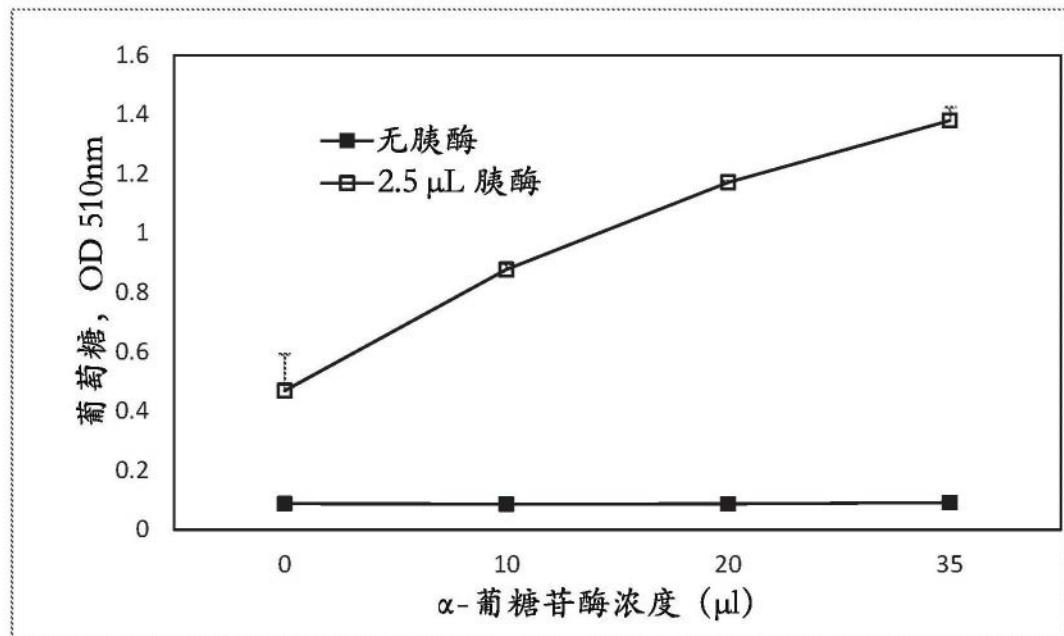
在pH 6.0葡萄糖淀粉酶CS4、TrGA、Brew1、AfuGA和FvGA与胰酶
在玉米淀粉颗粒水解增加中的相互作用

图7



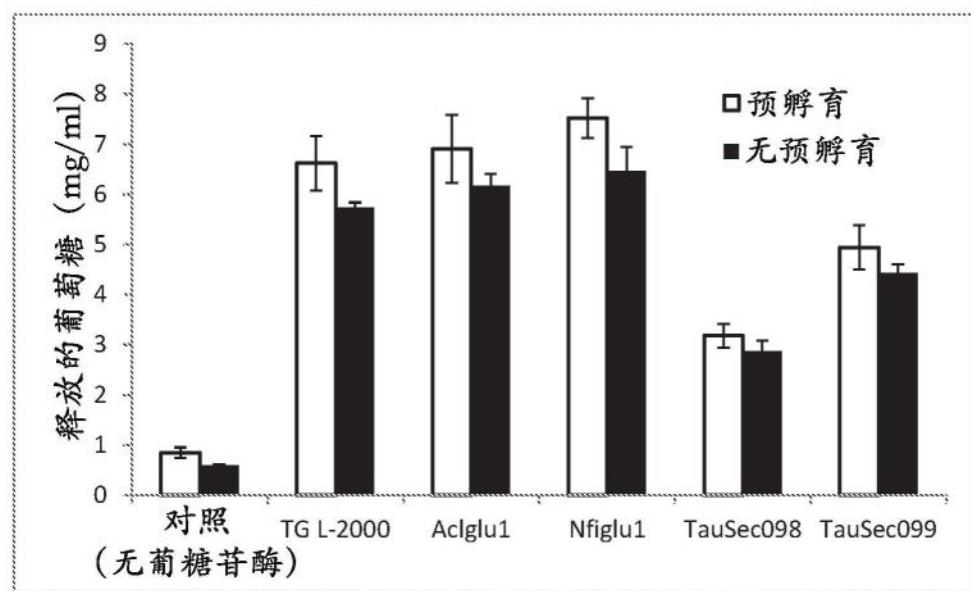
在pH 6.0葡萄糖淀粉酶CS4、TrGA、Brew1、AfuGA和FvGA与胰
酶在玉米面粉水解增加中的相互作用

图8



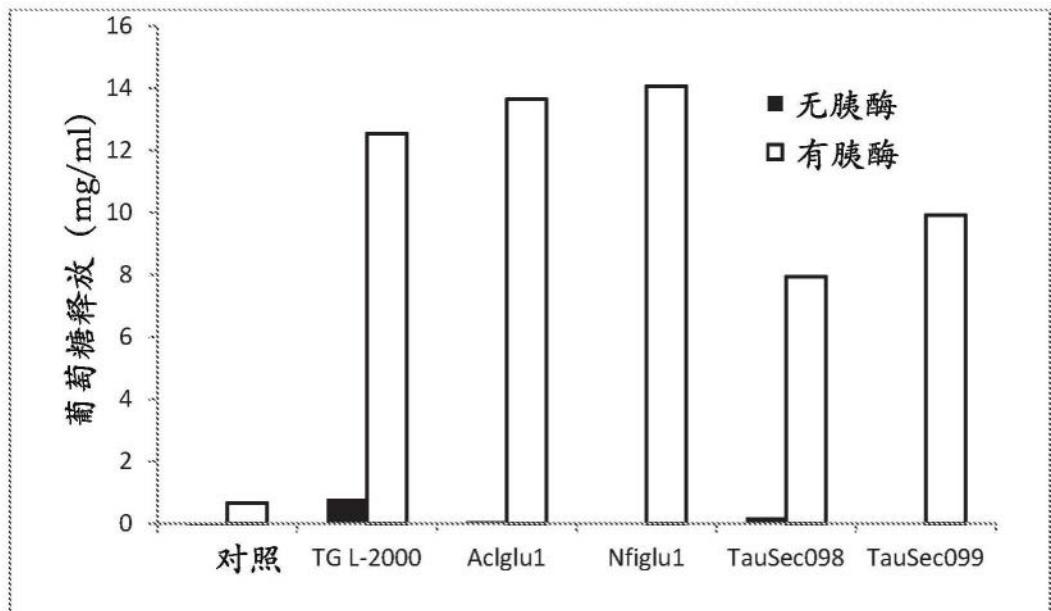
在pH 6.0在固定量的胰酶存在下，通过酵母麦芽糖酶(α -葡萄糖苷酶)从玉米淀粉颗粒中释放葡萄糖

图9



在pH 6.0五种 α -葡萄糖苷酶在瘤胃液中的稳定性以及与胰酶在葡萄糖释放中的相互作用

图10



在pH 6.0用胰酶预孵育条件下，五种 α -葡萄糖苷酶进行的葡萄糖释放

图11