

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98807104.5

[51] Int. Cl.

A23K 1/00 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/98 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1315397C

[22] 申请日 1998.6.4 [21] 申请号 98807104.5

[30] 优先权

[32] 1997. 6. 4 [33] US [31] 60/048,611

[32] 1997. 6. 4 [33] EP [31] 97201641.4

[86] 国际申请 PCT/EP1998/003328 1998.6.4

[87] 国际公布 WO1998/055599 英 1998.12.10

[85] 进入国家阶段日期 2000.1.11

[73] 专利权人 巴斯福股份公司

地址 德国路德维希港

[72] 发明人 R·C·M·巴兰德斯

G·M·H·密斯特司

C·S·M·安戴拉

[56] 参考文献

EP0420358A 1991.5.1

EP0758018A 1997.2.12

EP0304332AA 1989.2.22

EP0257996A 1988.3.2

审查员 刘克宽

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 郭建新

权利要求书 2 页 说明书 18 页

[54] 发明名称

高活性植酸酶粒化物

[57] 摘要

公开了一种制备含植酸酶的水成液的方法，该方法包括：在含可同化碳源和氮源（例如葡萄糖和铵离子）的培养基中培养曲霉属或木霉菌属微生物，过滤所述培养基，再将形成的滤液进行超滤处理而给出具有至少 14,000FTU/g 的含水组合物。该水成液可被用来制备可掺入动物饲料的粒化物。

1. 一种制备含植酸酶的水成液的方法，该方法包括：

(a) 在允许重组表达植酸酶的条件下在含水培养基中培养具有异源植酸酶基因的曲霉属或木霉菌属微生物，所述异源植酸酶基因处于葡糖淀粉酶（对于曲霉属）启动子或纤维二糖水解酶（对于木霉菌属）启动子控制之下，所述培养基包括作为所述微生物的食物的可同化碳源和可同化氮源；

(b) 过滤所述含水培养基以除去微生物而得含水滤液；以及

(c) 将得自(b)的滤液进行超滤处理而得植酸酶浓度至少为14,000FTU/g的水成液。

2. 权利要求1的方法，其中所述微生物是黑曲霉、米曲霉或 *Trichoderma reesei*。

3. 权利要求1或2的方法，其中所述微生物不具有或者不表达葡糖淀粉酶（AG）基因。

4. 前述权利要求任一项的方法，其中所述微生物具有多个拷贝的植酸酶基因。

5. 前述权利要求任一项的方法，其中所述水成液基本上不含高淀粉酶。

6. 前述权利要求任一项的方法，其中所述培养基中的几乎全部碳源和氮源在(b)的过滤前已被微生物消耗。

7. 前述权利要求任一项的方法，其中所述水成液不含碳源和/或氮源。

8. 前述权利要求任一项的方法，其中的植酸酶是在具有葡糖淀粉酶信号序列的微生物中表达的。

9. 前述权利要求任一项的方法，其中所述含水滤液或水成液都未经经历结晶和/或脱色步骤。

10. 前述权利要求任一项的方法，其中形成的水成液植酸酶活性是18,000FTU/g或更高。

11. 一种可通过前述权利要求任一项的方法制备的水成液，它包括

浓度至少为 14,000FTU/g 的植酸酶。

12. 权利要求 11 的水成液，它得自一种植酸酶在其中被表达了培养基。

13. 一种制备适用于动物饲料的含植酸酶粒化物的方法，该方法包括加工一种固体载体和一种权利要求 11 或 12 的水成液从而获得含植酸酶的粒子，该固体载体包括至少 15%(w/w)的一种食用碳水化合物聚合物。

14. 权利要求 13 的方法，将所述水成液与载体混合，再捏和形成的混合物。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述粒子接着被干燥。

16. 权利要求 13 或 14 的方法，其中该方法包括：

- a) 将含有植酸酶的水成液与固体载体混合；
- b) 机械加工 a) 中得到的混合物而得含酶粒子；以及
- c) 干燥 b) 中获得的含酶粒子。

17. 权利要求 15 的方法，其中所述加工包括挤出、压丸、高剪切粒化、膨胀、流化床团聚或其组合。

18. 可通过权利要求 13~17 任一项的方法制备的含植酸酶的粒化物。

高活性植酸酶粒化物

本发明涉及植酸酶的制备和制品以及它们在制备用于动物饲料中饲料酶的粒化物方面的应用。

各种酶（例如植酸酶）在动物（例如牲畜）饲料中的应用正日益更常见。包括这些酶以便改善动物从饲料对营养物和矿物质的摄取，而且还可能帮助提高消化率。它们通常是通过在由工业酶生产者操作的大规模发酵罐内培养微生物而生产的。在发酵结束时，生成的“发酵液”通常经历一系列过滤步骤从而分离生物物质（微生物）与所需的酶（在溶液中）。然后该酶溶液或者以液体形式（常常在添加了各种稳定剂之后）出售或者被加工成干制品。

酶液体和干制品在商业规模上被用于动物饲料工业。液体制剂可在饲料压丸后被添加到饲料中以便避免压丸过程中会发生的酶的热灭活。

干制品通常涉及蒸汽压丸，其中饲料在压丸前经受蒸汽喷射。在后续的压丸步骤中，饲料受压通过模型或模子，形成的条形物被切割成各种长度的合适的丸粒。在该操作中，温度会升高到 60 ~ 95℃。

植酸酶是这样的酶：（至少部分地）水解肌醇六磷酸盐成为肌醇和无机磷酸盐。这些酶见于麦麸、植物籽、动物肠内，而且可通过微生物生产。植酸酶被掺入动物饲料，是由于它们能降解植酸酶，植酸酶能增大动物对磷和其它营养成分的利用率。植酸酶还可增大对钙的消化率。

磷是有机体生长的必需元素。就牲畜来说，饲料常常增补了无机磷以便使单胃动物良好生长。但是反刍动物的饲料中常常不需这样，因为反刍动物的瘤胃中存在的微生物产生能催化植酸酶向肌醇和无机磷酸盐转化的酶。肌醇六磷酸盐的降解经常是需要的，因为植酸会是不利于营养的，由于它螯合有用的矿物质（例如钙、锌、镁和铁），并且还能不利地与蛋白质反应，于是降低动物对它们的生物利用率。植酸酶的添加还可减少需要添加的无机饲料的量，从而减少粪肥中排泄的磷，这更有益

于环境。

各种植酸酶的基因已被克隆和表达了。EP - A - 0, 4 20, 358 (Gist-Brocades) 描述了微生物植酸酶的表达。

在近期的申请 EP - A - 0, 684, 313 (Hoffmann-La Roche) 中, 描述了编码具有植酸酶活性的各种多核苷酸的 DNA 序列。

EP - A - 0, 758, 018 (Gist-Brocades) 涉及改善酶 (尤其用作动物饲料的酶) 稳定性的方法, 并且涉及植酸酶。

WO - A - 94/03612 (Alko) 描述了用木霉菌属 (Trichoderma) 生产植酸酶降解酶, WO - A - 97/16076 (Novo Nordisk) 则描述了用于制备动物饲料的含酶制剂, 该饲料包括各种疏水性物质。

动物饲料体现了饲养牲畜和其它动物的最大费用之一。此外, 例如酶 (诸如植酸酶) 的添加剂可大为增加动物饲料的成本。本发明的一个目的是能提供生产成本更低的植酸酶组合物。这可通过能生产高活性的或高度浓缩的植酸酶组合物来实现。有数个因素使得本申请人能制备这些高活性组合物, 下文将讨论这些因素。

本申请人已注意到的能制备高活性植酸酶组合物的另一个优点在于, 这些组合物能表现出稳定性的显著增大 (尤其是在制备动物饲料(丸粒)的压丸过程中), 所以更可能比现有技术的组合物保持更高的随时间的植酸酶活性。

本发明的第一个方面提供了一种制备包括植酸酶的水成液的方法, 该方法包括:

(a) 在允许重组表达植酸酶的条件下在含水培养基中培养具有异源植酸酶基因的曲霉属或木霉菌属微生物, 所述异源植酸酶基因处于葡糖淀粉酶 (对于曲霉属(*Aspergillus*)) 启动子或纤维二糖水解酶 (对于木霉菌属) 启动子控制之下, 所述培养基包括作为所述微生物的食物的可同化碳源和可同化氮源;

(b) 过滤所述含水培养基以除去微生物而得含水滤液; 以及

(c) 将得自 (b) 的滤液进行超滤处理而得植酸酶浓度至少为 14,000FTU/g 的水成液。

已发现该方法在生成的含水组合物中提供特别高浓度的植酸酶。这

已能制备也是高活性水平的其它植酸酶组合物。它表明，不但该方法成本更低（每单位酶活性），而且发现了更浓的含植酸酶组合物比它们的浓度更小的对应物稳定得多。

所述微生物优选是这些菌种，即黑曲霉（*Aspergillus niger*）、米曲霉（*Aspergillus oryzae*）或 *Trichoderma reesei*。就曲霉属生物体来说，植酸酶基因合适地处于葡糖淀粉酶（或淀粉葡糖苷酶，AG）启动子的控制之下。就木霉菌属生物体来说，优选应用纤维二糖水解酶启动子。

可同化的碳源可以包括葡萄糖和/或麦芽糖糊精，和/或可同化的氮源可以包括铵离子。葡萄糖和铵离子可以是所述含水培养基中仅有的可同化的碳源或氮源。也就是说，预期未应用复合的碳源或氮源。铵离子可以以氨或铵盐形式提供。优选的铵盐包括硝酸铵、硫酸铵和磷酸铵。

优选地，所述碳源和/或氮源是在发酵过程中被供给培养基的。任一种营养源的供料速度可以与微生物消化它的速度大致相同。所以碳源和/或氮源可以按持续或连续方式提供。碳源和氮源可以独立地提供，或者从同一来源提供。

形成的水成液可能具有至少 16,000FTU/g 的植酸酶浓度，也可能甚至有 18,000FTU/g 或更高。

通过这些条件下应用这些特定的生物体，所述滤液将会是较浓的。这就使它能经历超滤作用。在一些现有技术方法中，形成的滤液含太多的残渣和其它物质而使它不能经历超滤作用（滤器阻塞）。然而，在本发明的方法中，滤液较为“清亮”，它使滤液能经历超滤作用而不需任何进一步的处理，并且通过超滤作用，可因此得到特别高浓度的含水组合物。

现有技术方法讨论了所述滤液或含水组合物经历结晶步骤和/或脱色步骤（例如活性炭过滤）的可能性。但是，这些另外的步骤（它们会增大生产植酸酶的费用）都可在本发明中省去。

优选地，所述微生物不具有或者至少不表达葡糖淀粉酶基因。这就表明，所述微生物能为植酸酶的生产贡献更多的能量。

所述微生物可能具有多拷贝的植酸酶基因。已发现这可增大植酸酶的产量，因为有更多的植酸酶基因被表达。

该含水组合物可能基本上不含高淀粉酶。

在本发明的方法中，优选的是（基本上）全部碳源和/或氮源在进行（b）中的过滤之前已被微生物消耗了。这可通过在最后一次供应碳源和/或氮源后继续发酵一段时间来实现。也可在添加了全部碳源和/或氮源后继续发酵。我们会明白，这样做的好处在于，该含水组合物就可能（基本上）不含碳源和/或氮源（例如葡萄糖和/或铵离子）。又一次地，这样可以促成更清亮的水成液，它可能含更少的副产物。通过减少副产物的量，我们就可以将能应用该水成液或者能获得所需的高植酸酶活性所要求的加工步骤数减至最少。

最优选的生物体是黑曲霉。还优选的是，所述植酸酶是在具有葡糖淀粉酶信号序列的微生物中被表达的。

于是，形成的含植酸酶的水成液就可被用于各种用途，不过它在动物饲料中的应用在这里是特别期望的。本发明的第二个方面涉及该水成液（例如可通过第一个方面的方法制备），它包括浓度至少是 14,000FTU/g 的植酸酶。

在本说明书中，“植酸酶”不仅指天然植酸酶，还指具有植酸酶活性[例如能催化涉及从肌醇磷酸盐脱除或释放无机亚磷（磷酸盐）的反应]的任意酶。优选地，该植酸酶应属于 EC3.1.3.8 类。该植酸酶本身优选是真菌植酸酶，例如得自曲霉属或木霉菌属菌种的植酸酶。

本发明还能提供制备呈粒化物形式的植酸酶制剂（它应用食用碳水化合物聚合物作载体）的方法。所述载体可以呈粒化物或粉末形式。所述含植酸酶的水成液（例如溶液或浆状物）能与固体载体混合并能被吸附在载体上。在混合过程中或混合后，所述含植酸酶的液体和载体被加工成粒化物，该粒化物接着就可被干燥。碳水化合物载体的应用使得能吸附大量的组合物（因而吸附大量的植酸酶）。所述混合物可被用于形成能被容易地加工成粒子（例如它可被挤压）的弹性膏或非弹性糊状体。合适的载体是非纤维物质，它使得更容易造粒：纤维物质能阻止通过挤出造粒。

一些现有技术文献涉及含各种酶的丸粒，但这些丸粒通常在洗涤组合物中被用作洗涤剂。反之，本申请是用于动物饲料，为此，本发明的

粒化物是（动物）可食用的并且优选还是可消化的。因此，毫不意外，本发明的粒化物、粒子和组合物不含皂、去污剂和漂白剂或漂白化合物、沸石、粘结剂、填料（ TiO_2 、高岭土、硅酸盐、滑石粉等），仅举几种为例。

应选择食用碳水化合物聚合物，这样它可被动物食用（就它来说，饲料是所期望的）并且优选还是可消化的。该聚合物优选包括葡萄糖（例如含葡萄糖的聚合物），或 $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ 单元。优选地，所述碳水化合物聚合物包括 α -D-吡喃葡萄糖单元、直链淀粉（线型（1→4） α -D-葡聚糖聚合物）和/或支链淀粉（具有 α -D-（1→4）键和 α -D-（→6）键的支化 D-葡聚糖）。淀粉是优选的碳水化合物聚合物。可用来代替淀粉或者除淀粉之外的其它合适的含葡萄糖聚合物包括： α -葡聚糖、 β -葡聚糖、果胶（例如原果胶）和糖原。这些碳水化合物聚合物的衍生物（例如它们的醚和/或酯）也是预期的，不过糊化淀粉常避免应用。合适的碳水化合物聚合物是水不溶性的。

在本文描述的实施例中，应用了玉米淀粉、马铃薯淀粉和大米淀粉。不过，同样可应用得自其它（例如植物，诸如蔬菜或作物）来源的淀粉，其它来源例如木薯、小麦、玉米、西米、黑麦、燕麦、大麦、甘薯、高粱或竹芋。类似地，在本发明中可应用天然淀粉或改性淀粉（例如糊精）。优选地，所述碳水化合物（例如淀粉）含少量或者不含蛋白质，例如少于 5%（w/w），诸如少于 2%（w/w），优选少于 1%（w/w）。

所述固体载体的至少 15%（w/w）可能包括碳水化合物聚合物（例如淀粉）。不过，优选地，所述固体载体的至少 30%（w/w）包括碳水化合物，最宜至少 40%（w/w）。有利的是，所述固体载体的主要组分是碳水化合物（例如淀粉），例如多于 50%（w/w），优选至少 60%（w/w），合适地至少 70%（w/w），并且最宜至少 80%（w/w）。这些重量百分数都基于最终的干粒化物中非酶组分的总重量。

可被吸附在载体上的含植酸酶液体的量通常受可被吸附的水量限制。就天然粒状淀粉来说，该量可在 25~30%（w/w）之间变动，未应用高温（否则会引起淀粉溶胀）。在实施时，添加到碳水化合物中的酶液体百分数通常比该范围大得多，因为含酶液体通常含有较大量的固体。

植酸酶溶液可能含有约 25% (w/w) 的固体, 正因为如此, 碳水化合物 (例如淀粉) 和植酸酶溶液可以在碳水化合物: 植酸酶溶液 = 0.5:1 ~ 2:1 (例如 1.2:1~1.6:1) 的比率下混合, 例如分别以约 60% (w/w): 40% (w/w) 的比率。优选地, 添加到固体载体中的液体量应使所述 (含水) 液体中的 (基本上) 全部水被固体载体中存在的碳水化合物吸附。

在高温下, 淀粉和其它碳水化合物聚合物在溶胀时能吸附大得多的量的水。为此, 希望碳水化合物聚合物能吸附水 (或含酶的水成液)。例如, 玉米淀粉在 60℃ 下能吸附其重量的三倍的水, 在 70℃ 下达十倍。所以, 本发明期望应用更高的温度以便吸附更大量的含酶液体, 尤其当涉及热稳定的植酸酶时确实是优选的。因此对这些酶来说, 固体载体和液体的混合可在高温 (例如高于室温) 下进行, 例如高于 30℃, 优选地高于 40℃, 最宜高于 50℃。备选地, 或者另外, 所述液体可在该温度下提供。

但是, 一般说来, 优选在更低温度 (例如室温) 下的非溶胀条件, 从而将由于在更高温度下 (热敏感性的) 植酸酶的不稳定性所引起的活性损失减至最小。在所述酶与所述液体的混合过程中合适的温度是 20 ~ 25℃。

用于本发明中将含植酸酶的液体和固体载体的混合物制成粒子 (换句话说是造粒) 的机械加工可采用食品、饲料和酶制剂加工中常用的已知技术。这可包括膨胀、挤出、球化处理、压丸、高剪切粒化、转鼓粒化、流化床团聚或其组合。这些方法通常的特征在于机械能的输入, 例如螺杆的驱动, 混合机构的转动, 压丸装置滚动机构的压力, 通过流化床团聚机的转动底板使粒子的运动或者通过气流使粒子的运动, 或者其组合。这些方法能使固体载体 (例如呈粉末形式) 与含植酸酶的液体 (水溶液或浆状物) 混合, 随后就被粒化。

然而在本发明的又一个实施方案中, 粒化物 (例如团聚物) 是通过将含植酸酶的液体喷到或涂到载体上 (例如在流化床团聚机中) 而形成的。这里, 形成的粒子可能包括团聚物 (例如可在流化床团聚机中生产)。

优选地, 含植酸酶液体和固体载体的混合另外还包括混合物的捏和。这可改善混合物的塑性从而便于粒化 (例如挤出)。

如果粒化物是通过挤出形成的，则挤出优选在低压下进行。这样做的优点在于，被挤出时混合物的温度将不会升高或者只是稍微升高。低压挤出包括例如在 Fuji Paudal 篮式挤出机或拱顶形挤出机中的挤出。优选地，挤出不导致被挤出物料的温度升高到高于 40℃。挤出可以自然地产生粒子（该粒子可能在通过模子后脱落）或者可采用切割机。

合适地，粒子将具有 30~40%（例如 33~37%）的水含量。酶含量适当地是 3~10%，例如 5~9%。

得到的粒子可经历修整（例如球化处理），例如在球化机（如 MARUMERISEN™ 机）中和/或压实。粒子可在干燥前被球化处理，因为这样可减少最终粒化物中粉尘的形成和/或可以便于粒化物的任何涂敷。

然后就可以干燥（例如在流化床干燥机中）该粒子，或者在流化床团聚的情况下，可被直接干燥（在团聚机中）而获得（干固体）粒化物。技术人员可应用食品、饲料或酶工业中干燥粒子的其它已知方法。合适地，该粒化物是可流动的。

干燥优选在 25~60℃（例如 30~50℃）的温度下进行。这里的干燥可能持续 10 分钟至数小时（例如 15~30 分钟）。所需时间的长度当然将取决于待干燥的粒子量，但总体原则是每 kg 粒子 1~2 秒。

当粒子干燥后，形成粒化物优选具有 3~10%（例如 5~9%）的水含量。

可以给该粒化物涂上一层涂层而给出另外的（例如有利的）特性或性能，例如低粉尘含量、颜色、保护酶以防受周围环境的影响、一种粒化物中不同的酶活性或其组合。该粒子可被涂上脂肪、蜡、聚合物、盐、软膏和/或油膏或者含（第二种）酶的涂层（例如液体）或其组合。应明白，如果需要的话，可以涂布数层（不同的）涂层。要在粒化物涂上涂层，可利用一些已知的方法，包括流化床、高剪切制粒机、混合制粒机或诺塔混合器的应用。

在其它实施方案中，可将另外的组分掺入该粒化物（例如作为加工助剂），为的是进一步改善粒化物的压丸稳定性和/或贮存稳定性。下面讨论一些这类优选的添加剂。

盐可被包括于该粒化物中, (例如含于所述固体载体或液体中)。优选地可添加无机盐(如 EP-A-0,758,018 中建议的那样), 无机盐可以改善干植酸酶制剂的加工性和贮存稳定性。优选的无机盐包括二价阳离子, 例如锌、镁和钙。硫酸根是最优选的阴离子。

优选地可添加无机盐(如 EP-A-0,758,018 中建议的那样), 无机盐可以改善干酶制剂的加工性和贮存稳定性。优选的无机盐是水溶性的。它们可以包括二价阳离子, 例如锌(尤其优选)、镁和钙。硫酸根是最优选的阴离子, 不过导致水溶性的其它阴离子也可应用。该盐可以呈固体形式添加(例如添加到混合物中)。不过, 该盐可以在与固体载体混合之前被溶于水或含酶的液体中。合适地, 该盐被提供的量至少是 15% (w/w, 基于酶), 例如至少是 30%。但是, 它可能高达至少 60% 或者甚至 70% (也是 w/w, 基于酶)。这些量可应用于所述粒子或粒化物。因而, 所述粒化物可能包括少于 12% (w/w) 的盐, 例如 2.5~7.5%, 诸如 4~6%。

如果该盐在水中提供, 那么它的量可能是 5~30% (w/w), 例如, 15~25%。

压丸稳定性的进一步改善可通过掺入疏水性的胶凝化合物或缓慢溶解(例如在水中)化合物而达到。这些化合物可被提供的量为 1~10wt%, 例如 2~8wt%, 优选是 4~6wt% (基于水和固体载体组分的重量)。合适的物质包括衍生化纤维素, 例如 HPMC (羟丙基甲基纤维素)、CMC (羧甲基纤维素)、HEC (羟乙基纤维素); 聚乙烯醇(PVA); 和/或食用油。食用油(例如豆油或低芥酸菜子油)可作为加工助剂被添加(例如添加到待粒化的混合物中), 不过, 一般说来, 疏水性物质(例如棕榈油)优选不存在。

优选地, 该粒子具有较窄的尺寸分布(例如它们是单分散性的)。这可促进植酸酶在粒子中和/或酶粒化物在动物饲料中的均匀分布。本发明的方法倾向于生产窄尺寸分布的粒化物。但是, 如果必要的话, 在该方法中可包括一个另外的步骤而进一步使所述粒子的尺寸分布变窄, 例如筛分。所述粒化物的尺寸分布合适地在 100 μ m~2000 μ m 之间, 优选在 200 μ m~1800 μ m 之间, 最宜在 300 μ m~1600 μ m 之间。所述粒子可以具有不规则的(但优选是规则的)形状, 例如接近球形。

在动物饲料（它包括宠物食物）中可以包括其它合适的酶。这些酶的功能通常是改善饲料转化率，例如通过减小某些饲料化合物的粘度或者通过减小其抗营养效果。还可以将饲料酶例如用于减少粪肥中有害于环境的化合物的量。为了这些目的优选的酶是：糖酶，例如淀粉分解酶和植物细胞壁降解酶，它们包括纤维素酶，例如 β -葡聚糖酶，半纤维素，例如木聚糖酶，或半乳聚糖酶；肽酶，半乳糖苷酶，果胶酶，酯酶；蛋白酶，优选具有中性和/或酸性最适 pH；以及脂肪酶，优选是磷脂酶，例如哺乳动物胰磷脂酶 A2。优选地，该酶不包括淀粉降解酶（例如淀粉酶）。在一些实施方案中可能排除蛋白酶，因为如果消化的话这些酶可能引起不良影响。如果该酶是植物细胞壁降解酶，（例如纤维素酶），并且尤其是半纤维素（例如木聚糖酶），那么最终的粒化物可能具有的酶活性范围是 3,000 ~ 10,000EXU/g，优选是 5,000~80,000EXU/g，最宜是 8,000~70,000EXU/g。如果该酶是纤维素酶，例如 β -葡聚糖酶，那么最终的粒化物可能具有的酶活性是 500 ~ 15,000BGU/g，优选是 1,000~10,000BGU/g，最宜是 1,500~7,000BGU/g。

所述粒子可能包括 5~20%（例如 7~15%）的酶。该酶可以是天然酶或重组体。

因此，本发明优选的方法包括：

- a. 将含植酸酶的水成液和包括至少 15%（w/w）食用碳水化合物聚合物的固体载体混合，例如将该固体载体与含酶的水成液混合；
- b. 任选捏和形成的混合物；
- c. 粒化（例如通过机械加工）该混合物以便获得含酶粒子，例如通过应用制粒机或者通过挤出；
- d. 任选将该粒子团成球状；
- e. 干燥形成的粒子而得含酶粒化物。

在全过程中，应注意将酶接触的最高温度保持在 80℃ 以下。

本发明的粒化物适用于制备动物饲料。在其最宽范围，本发明的该方面覆盖的粒化物包括植酸酶和食用碳水化合物聚合物，该粒化物的活性至少是 6,000FTU/g。在这些方法中，将粒化物与饲料物质混合，或者就这样混合，或者作为预混合物的部分。本发明粒化物的特征使它们被

用作混合物的组分，该混合物很适合作为动物饲料，尤其是如果该混合物被蒸汽处理后接着被压丸。在这样的丸粒中可见到或者可辨认出所述干粒子。

于是，本发明的第三个方面涉及制备动物饲料、或者动物饲料的预混合物或前体的方法，该方法包括将第二个方面的组合物与一种或多种动物饲料物质（例如颗粒）或组分混合。然后就可以对该混合物灭菌（例如进行热处理）。再将形成的组合物适当地加工成丸粒。

本发明的第四个方面涉及包括第二个方面的粒化物的组合物，它优选是食用饲料组合物（例如动物饲料）。该组合物优选呈丸粒的形式（可以是每颗丸有1~5颗（例如2~4颗）干粒子）。

适当地，该组合物包括0.05~2.0FTU/g，例如0.3~1.0FTU/g，最宜0.4~0.6FTU/g的植酸酶。可能存在0.5~50（例如1~40）EXU/g的木聚糖酶。备选地，或者另外还可能存在0.1~1.0（例如0.2~0.4）BGU/g的纤维素酶。

该组合物可能具有10~20%（例如12~15%）的水含量。酶的量合适地是0.0005~0.0012%，例如至少5ppm。

本发明的第五个方面涉及促进动物生长的方法，该方法包括：用包括第二个方面的组合物或第四个方面的组合物的食物喂养动物。这里，动物食物可能包括所述粒化物本身，或存在于饲料中的粒化物。

本发明的第六个方面涉及组合物在动物饲料中的应用或作为动物饲料的组分的应用，或者在动物食物中的应用。

本发明的第七个方面还涉及一种组合物的应用，该组合物包括至少15%（w/w）作为植酸酶的载体从而改善植酸酶的压丸稳定性的食用碳水化合物聚合物。

合适的动物包括农畜（猪、家禽、牲畜）、非反刍动物或单胃动物（猪、野禽、家禽、海洋动物（例如鱼）），反刍动物（牛或羊，例如奶牛、绵羊、山羊、鹿、牛犊、羔羊）。家禽包括雏鸡、母鸡和火鸡。

本发明一个方面的优选的特征和特性同样适合已作必要修正的另一方面。

给出如下实施例仅仅是为了阐述本发明，不打算作为或者不能被认

为是限制性的。

实施例

实施例 1

黑曲霉 CBS 513.88 的发酵

黑曲霉真菌孢子制剂是按标准方法制备的。

将孢子和随后的细胞通过一系列在锥形瓶中的分批发酵转到一个 10 升的发酵罐中。在分批培养中生长后，将该发酵罐中的内含物用作最终的 500 升分批发酵的接种物。

应用的培养基含有：91g/l 玉米淀粉 (BDH Chemicals)，铵 38g/l 一水合葡萄糖；0.6g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；0.6g/l KCl；0.2g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 12g/l KNO_3 。通过用 4N NaOH 或 4N H_2SO_4 自动滴定将 pH 保持在 4.6 ± 0.3 。

在 28℃ 下在自动控制的溶解氧浓度为 25% 的空气饱和下使细胞生长。发酵 10 天后，植酸酶产量达到 5~10U/ml 的最大值。

应用硫酸铵代替玉米淀粉（给出相当的可同化氮含量）重复发酵。

实施例 2

植酸酶的纯化和表征：植酸酶活性分析

将 100μl 发酵滤液（如果必要的话就稀释）或上清液或者 100μl 软化水（demiwater，作为参比）加到具有如下成分的培养混合物中：

- 0.25M 乙酸钠缓冲液 (pH 5.5)，或
- 甘氨酸 HCl 缓冲液，pH 2.5；
- 1mM 植酸，钠盐
- 软化水补加到 900μl

将形成的混合物在 37℃ 下培养 30 分钟。通过添加 1ml 10% TCA（三氯乙酸）停止反应。当反应终止后，添加 2ml 试剂 [3.66 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 于 50ml 钼酸铵溶液（2.5 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 8ml H_2SO_4 ，用软化水稀释到 250ml）中]。

用分光光度法在 750nm 处测定蓝色光强度。测量结果指示（相对于

0 ~ 1mMol/l 的范围内磷酸盐校正曲线) 释放的磷酸盐量。

实施例 3

A. 植酸酶在用表达载体 (含有被融合入黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶(AG)基因的启动子和/或信号序列的无花果曲霉(A. Ficum)植酸酶基因) 转化了的黑曲霉 CBS 513.88 中的表达

为了达到在黑曲霉中超量表达植酸酶, 衍生了一种表达盒, 其中无花果曲霉植酸酶基因处于黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶 (AG) 启动子与信号序列的联合控制之下。为了更长的前导序列, 将所述 AG 启动子序列融合入包括植酸酶前导序列 (该植酸酶前导序列被融合入编码成熟蛋白的植酸酶基因片段) 的植酸酶编码序列 (见 EP - A - 0, 420, 358 的参考实施例 10)。

B. 植酸酶基因在黑曲霉中在 AG 启动子控制下的表达

通过已知方法 (例如见 EP - A - 0, 420, 358 的实施例 9) 用 10 μ g DNA 片段转化黑曲霉菌株 CBS 513.88 (在 1988 年 10 月 10 日保藏的)。分离得自每个表达盒的单一黑曲霉转化体, 在选择性乙酰胺 - 琼脂板上划线培养孢子。从在 37 $^{\circ}$ C 下于 0.4% 马铃薯 - 葡萄糖 (Oxoid, England) 琼脂板上生长了 3 天的细胞收集每个转化体的孢子。于摇瓶内在下列条件下测定植酸酶产量:

将大约 1×10^8 个孢子接种入 100ml 含下列物质 (每升) 的预培养基: 1g KH_2PO_4 ; 30g 麦芽糖; 5g 酵母提取物; 10g 酪蛋白水解物; 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 3g Tween 80。将 pH 调节到 5.5。

在 34 $^{\circ}$ C 的旋转式摇床中生长一夜后, 将 1ml 生长培养物接种入 100ml 含下列物质 (每升) 的主培养基: 2g KH_2PO_4 ; 70g 麦芽糊精 (maldex MDO₃ Amylum); 12.5 酵母提取物; 25g 酪蛋白水解物; 2g K_2SO_4 ; 5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.03g ZnCl_2 ; 0.02g CaCl_2 ; 0.05 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 FeSO_4 。将 pH 调节到 5.6。

菌丝体生长至少 140 小时。植酸酶产量是按实施例 2 中描述的方法测定的。应用等量的葡萄糖和硫酸铵作为碳源和氮源重复发酵。将发酵液过滤而给出滤液, 将它与生物质分离。应用表达盒 PFYT3 (AG - 启

动子/植酸酶前导序列) 得 280U/ml 的最大植酸酶活性。

实施例 4

从滤液纯化植酸酶

按下列方法纯化而获得高度纯化的植酸酶:

1. 在 pH 4.9 时阳离子交换层析
2. 在 pH 3.8 时阳离子交换层析
3. 在 pH 6.3 时阴离子交换层析
4. 超滤

1. 用水将所述植酸酶滤液稀释 20 倍并将 pH 调节到 4.9。让该物料通过用 20mM 柠檬酸/NaOH(pH4.9)缓冲液平衡的 S Sepharose 快速流动柱。收集含植酸酶的未结合的物料并用于下一步。

2. 将 pH 4.9 的物料调节到 pH 3.8, 植酸酶被结合在用 2mM 柠檬酸/NaOH(pH3.8)缓冲液平衡的 S Sepharose 快速流动柱上。用 20mM NaPO₄、50mM NaCl(pH7.6)缓冲液从柱上洗脱植酸酶。

3. 将从第二个阳离子交换步骤汇集的植酸酶级分 pH 调节到 6.3, 使植酸酶结合在用 10mM KPO₄(pH 6.3)缓冲液平衡的 Q Sepharose 快速流动柱上。应用在相同的缓冲液中至 1M NaCl 的梯度洗脱植酸酶。

纯化结果总结	
样品	纯化因子
起始滤液	1
在 pH 4.9 的阳离子交换后	1.07
在 pH 3.8 的阳离子交换后	1.2
阴离子交换后	1.46

应用具有 Kalle E35 膜的 Amicon Stirred Cell (2L 组件)通过 3 巴下超滤将最后 (阴离子交换的) 含 10mg 蛋白质/ml 的产物浓缩十倍。

纯化后的植酸酶的最终浓度达 280~300g/l (28~30%)。比活性为 100FTU/mg 蛋白质, 这导致植酸酶活性为 28,000~30,000FTU/g。

实施例 5

高活性植酸酶稳定性试验

为了阐明更高的酶浓度（在应用高活性植酸酶液体制备的粒子中）给出更高的压丸稳定性，制备了具有高酶浓度的粒化物并测试了这些样品的压丸稳定性。

对比样品 A：通过混合、捏和、挤出、球化处理和干燥制备基于玉米淀粉的低活性酶粒化物。

通过将 73%（w/w）玉米淀粉和低浓度 4%（w/w）植酸酶超滤液和 23%（w/w）水混合和捏和制备了一种混合物。应用 Nica E-220 篮式挤出机挤出该混合物而得湿挤出物，将它在 Fuji Paudal Marumerise™ 中球化处理 2 分钟得到平均直径为 600 μ m 的圆粒子。随后将这些粒子在 Glatt GPCG 1.1 流化床干燥机中干燥。该粒化物的最终活性是 610FTU/g。

对比样品 B：通过混合、捏和、挤出、球化处理和干燥制备基于玉米淀粉的中等活性酶粒化物。

通过将 70%（w/w）玉米淀粉和 17%（w/w）植酸酶超滤液和 13%（w/w）水混合和捏和制备了一种混合物。应用 Nica E-220 篮式挤出机挤出该混合物而得湿挤出物，将它在 Fuji Paudal Marumeriser 中球化处理 2 分钟得到平均直径为 600 μ m 的圆粒子。随后将这些粒子在 Glatt GPCG 1.1 流化床干燥机中干燥。该粒化物的最终活性是 4170FTU/g。

样品 C

通过混合、捏和、挤出、球化处理和干燥制备基于玉米淀粉的高活性酶粒化物。

通过将 67%（w/w）玉米淀粉和 30%（w/w）实施例 4 中制备的植酸酶超滤液（但被稀释到 18,400FTU/g）和 3%（w/w）水混合和捏和制备了一种混合物。应用 Nica E-220 篮式挤出机挤出该混合物而得湿挤出物，将它在 Fuji Paudal Marumeriser 中球化处理 2 分钟得平均直径为 600 μ m 的圆粒子。随后将这些粒子在 Glatt GPCG 1.1 流化床干燥机中干燥。该粒化物的最终活性是 6830FTU/g。

压丸稳定性的比较

然后将所述不同的酶粒化物置于压丸试验中比较它们的压丸稳定性。压丸试验包括将所述酶粒化物与饲料预混合物分别在 1500、320 和 200ppm 下混合。通过蒸汽喷射预处理这些混合物使温度升到 75℃，接着在压丸机中将这此混合物压丸得到温度为 82℃的饲料丸粒，随后将它们干燥。这种方法是饲料工业获得饲料丸粒的常用方法。

表 1 归纳了压丸试验的结果。显然，具有最高酶浓度的两种粒子具有高得多的压丸稳定性。

表 1
压丸试验的结果

样品号	粒化物活性(以 FTU/g 为单位)	饲料粉的温度(℃)	丸粒的温度(℃)	压丸后的酶收率(%)
对比(A)	610	75	82	<17
对比(B)	4,170	75	82	37
(C)	6,830	75	82	48

实施例 6

通常混合、捏和、压丸和干燥制备含豆油和 MgSO_4 添加剂的基于马铃薯淀粉的酶粒化物

在一个混合器/捏和机中添加 30kg 马铃薯淀粉并混入 2.5kg 豆油。接着添加含 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.5kg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 14kg 超滤液)的得自曲霉属的植酸酶超滤液 (16,840 FTU/g)。在捏和机中充分混合该产物，然后如实施例 1 中那样挤出并在流化床干燥机中干燥。这产生 5870FTU/g 的产物。

实施例 7

通过混合、捏和、挤出、球化处理和干燥制备基于大米淀粉的酶粒化物

通过将 62% (w/w) 大米淀粉和 38% (w/w) 实施例 6 中应用的相同植酸酶超滤液混合和捏和制备了一种混合物。应用 Fuji Paudal 篮式挤出机挤出该混合物而得湿挤出物，再将它在 MARUMERISER™ 中球化

处理一分钟得平均直径为 785 μ m 的圆粒子。随后如实施例 1 中那样在流化床干燥机中干燥这些粒子。该粒化物的最终活性是 7280FTU/g。

实施例 8

通过混合、捏合、挤出、球化处理和干燥制备基于玉米淀粉的含 HPMC 添加剂的酶粒化物

通过将 54% (w/w) 玉米淀粉、5% HPMC (羟丙基甲基纤维素) 和 41% (w/w) 实施例 6 中应用的植酸酶超滤液的混合物捏和获得了一种酶制品。应用 Fuji Paudal 篮式挤出机挤出该混合物而得湿挤出物, 将它在 MARUMERISER™ 中球化处理一分钟得平均直径为 780 μ m 的圆粒子。随后在流化床干燥机中于 40℃ 床温和 75℃ 入口温度下将这些粒子干燥 20 分钟。这样获得的干酶粒化物活性为 8470FTU/g。

实施例 9

通过混合、捏和、挤出、球化处理和干燥制备含 HEC 添加剂、基于玉米淀粉的酶粒化物

通过将 54% (w/w) 玉米淀粉、5% (w/w) HEC (羟乙基纤维素) 与 41% (w/w) 实施例 6 中应用的相同的植酸酶超滤液混合和捏和获得了一种酶制品。应用 Fuji Paudal 篮式挤出机挤出该混合物而得湿挤出物, 将它在 MARUMERISER™ 中球化处理一分钟得平均直径为 780 μ m 的圆粒子。随后在流化床干燥机中于 40℃ 床温和 75℃ 入口温度下将这些粒子干燥 20 分钟。这样获得的干酶粒化物活性为 8410FTU/g。

实施例 10

应用了得自实施例 4 的超滤液的 18,000FTU/g 的超滤液, 并稀释了。
样品

配制的三个样品的活性是 610FTU/g (A, 对比样); 4170FTU/g (B, 对比样) 和 6830 (C) FTU/g。这给出了活性分别为 1.153、1.685 和 1.745FTU/g 饲料的三种饲料。

将第一个样品 (150g) 与 20kg 饲料按下述那样混合。此后将该预

混合物与 80kg 饲料混合并分成两份，成为两个不同温度下两个试验的饲料。第二个样品是 153.6g 于 20kg 饲料中。将该 20,153.6 样品分成 10.076kg 的等量的两份。然后将每份与 230kg 饲料混合而得试验用的饲料粉。

至于第三个试验，将 96g 粒化物与 20kg 饲料混合再分成 10.048g 的两份。然后将每份与 230kg 饲料混合而得试验用的饲料粉。压丸速度是 600kg/h。

所述饲料混合物包括：

玉米	20.00%
小麦	30.00%
大豆（加热了）	10.00%
大豆（粗粉 46.7/3.7）	18.20%
木薯（65% 淀粉）	6.97%
骨粉饲料（56.5/10.9）	4.00%
鱼粉（70.6%re）	1.00%
羽毛粉，含水	1.00%
豆油/玉米油	1.30%
动物脂肪	4.00%
维生素/矿物质预混合物（玉米）	1.00%
碳酸钙	0.85%
磷酸一钙	1.05%
盐	0.26%
L- 赖氨酸 HCl	0.16%
DL- 蛋氨酸	0.21%

然后将这三种混合物压丸。将饲料进料入匀湿器，其中将蒸汽直接加到饲料粉上。温度升高到 75℃。随后从造粒机排出饲料粉，饲料粉在造粒机中被推动通过具有 5mm 孔、65mm 厚的模板。此时饲料的温度又升高 4℃ 达到 79℃。

这三种饲料的活性是 10.11(A)；10.04(B)和 9.81(C)。

该试验的残余活性结果是：63%（A）；66%（B）和 72%（C），分别相应于原来的 610FTU/g 样品；4170 FTU/g 样品和 6830 FTU/g 样品。

这表明，即使有相似活性（B 和 C），最高活性的配方（C；6830 FTU/g，本发明的配方）给出高得多的压丸稳定性。这比（对比的）样品 B 高 6%，该值相当显著，因为从活性增加很大（610 至 4170 FTU/g）的样品（从 A 到 B）只观测到 3% 的增大。