

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4933013号  
(P4933013)

(45) 発行日 平成24年5月16日 (2012.5.16)

(24) 登録日 平成24年2月24日 (2012.2.24)

(51) Int. Cl.		F I	
A 2 3 K 1/165 (2006.01)		A 2 3 K 1/165	Z N A C
A 2 3 K 1/175 (2006.01)		A 2 3 K 1/175	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)		C 1 2 P 21/00	A
C 1 2 N 9/56 (2006.01)		C 1 2 N 9/56	

請求項の数 12 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2001-557399 (P2001-557399)	(73) 特許権者	503220392
(86) (22) 出願日	平成13年2月5日 (2001.2.5)		ディーエスエム アイピー アセツ ビー. ブイ.
(65) 公表番号	特表2003-521907 (P2003-521907A)		オランダ国, 6 4 1 1 ティーイー ヘーレン, ヘット オーバールーン 1
(43) 公表日	平成15年7月22日 (2003.7.22)	(74) 代理人	100099759
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/001152		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開番号	W02001/058275	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成13年8月16日 (2001.8.16)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成20年1月30日 (2008.1.30)	(74) 代理人	100087413
(31) 優先権主張番号	PA 2000 00200		弁理士 古賀 哲次
(32) 優先日	平成12年2月8日 (2000.2.8)	(74) 代理人	100117019
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動物飼料における酸安定性ズブチリシンプロテアーゼの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物飼料を製造する方法であって、当該方法が少なくとも1つの酸安定性プロテアーゼを動物試料に加える段階を含んで成り、当該プロテアーゼが

- (i) ズブチリシンファミリーに由来し、そして/あるいは
- (ii) S S I で阻害された場合に10%未満の残留活性を有し、そして、
- (iii) 37 及びpH 3.5での2時間のインキュベーション後の、当該プロテアーゼの残留活性が、5 及びpH 9.0での2時間のインキュベーション後の残留活性の少なくとも40%であり、ここで、当該プロテアーゼが純粋型で、 $A_{280}=1.0$ の濃度でインキュベートされたものであり、そして当該残留活性がpH 9.0及び25 でSuc-AAPF-p

10

【請求項 2】

動物飼料で使用するための組成物を製造する方法であって、当該方法が少なくとも1つの酸安定性プロテアーゼを組成物に加える段階を含んで成り、当該プロテアーゼが

- (i) ズブチリシンファミリーに由来し、そして/あるいは
- (ii) S S I で阻害された場合に10%未満の残留活性を有し、そしてこの中で、
- (iii) 37 及びpH 3.5での2時間のインキュベーション後の、当該プロテアーゼの残留活性が、5 及びpH 9.0での2時間のインキュベーション後の残留活性の少なくとも40%であり、ここで、当該プロテアーゼが純粋型で、 $A_{280}=1.0$ の濃度でインキュベートされたものであり、そして当該残留活性がpH 9.0及び25 でSuc-AAPF-p

20

NAに対して測定されたものである、方法。

【請求項3】

プロテアーゼの量が飼料1kg当たり0.01~200mgのプロテアーゼ酵素タンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

プロテアーゼの意図される量が飼料1kg当たり0.01~200mgのプロテアーゼ酵素タンパク質である、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

動物飼料の栄養価を向上させるための方法であって、当該方法が少なくとも1つの酸安定性プロテアーゼを動物飼料に加える段階を含んで成り、当該プロテアーゼが

(i)ズブチリシンファミリーに由来し、そして/あるいは  
 (ii)SSIで阻害された場合に10%未満の残留活性を有し、そしてこの中で、  
 (iii)37及びpH3.5での2時間のインキュベーション後の、当該プロテアーゼの残留活性が、5及びpH9.0での2時間のインキュベーション後の残留活性の少なくとも40%であり、ここで、当該プロテアーゼが純粋型で、 $A_{280}=1.0$ の濃度でインキュベートされたものであり、そして当該残留活性がpH9.0及び25でSuc-AAPF-pNAに対して測定されたものである、方法。

10

【請求項6】

(a)少なくとも1つの酸安定性プロテアーゼ；及び  
 (b)少なくとも1つの脂溶性ビタミン、及び/又は  
 (c)少なくとも1つの水溶性ビタミン、及び/又は  
 (d)少なくとも1つの微量元素、及び/又は  
 (e)少なくとも1つの多量元素；

20

を含んで成る動物飼料添加物であって、

当該プロテアーゼが

(i)ズブチリシンファミリーに由来し、そして/あるいは  
 (ii)SSIで阻害された場合に10%未満の残留活性を有し、そしてこの中で、  
 (iii)37及びpH3.5での2時間のインキュベーション後の、当該プロテアーゼの残留活性が、5及びpH9.0での2時間のインキュベーション後の残留活性の少なくとも40%であり、ここで、当該プロテアーゼが純粋型で、 $A_{280}=1.0$ の濃度でインキュベートされたものであり、そして当該残留活性がpH9.0及び25でSuc-AAPF-pNAに対して測定されたものである、添加物。

30

【請求項7】

プロテアーゼの量が飼料1kg当たり0.01~200mgのプロテアーゼタンパク質の意図される添加に相当する、請求項6に記載の動物飼料添加物。

【請求項8】

フィターゼ、キシラナーゼ、ガラクタナーゼ、及び/又はベータ-グルカナーゼを更を含んで成る、請求項6又は7に記載の動物飼料添加物。

【請求項9】

50~800g/kgの粗製タンパク質含量を有し、そして少なくとも1つの酸安定性プロテアーゼを含んで成る動物飼料組成物であって、当該プロテアーゼが

40

(i)ズブチリシンファミリーに由来し、そして/あるいは  
 (ii)SSIで阻害された場合に10%未満の残留活性を有し、そしてこの中で、  
 (iii)37及びpH3.5での2時間のインキュベーション後の、当該プロテアーゼの残留活性が、5及びpH9.0での2時間のインキュベーション後の残留活性の少なくとも40%であり、ここで、当該プロテアーゼが純粋型、 $A_{280}=1.0$ の濃度でインキュベートされたものであり、そして当該残留活性がpH9.0及び25でSuc-AAPF-pNAに対して測定されたものである、組成物。

【請求項10】

プロテアーゼの量が飼料1kg当たり0.01~200mgのプロテアーゼタンパク質

50

である、請求項 9 に記載の動物飼料組成物。

【請求項 1 1】

少なくとも 1 つの植物タンパク質又はタンパク質源に少なくとも 1 つの酸安定性プロテアーゼを加える段階を含んで成る、植物タンパク質の処理方法であって、当該プロテアーゼが

(i) ズブチリシンファミリーに由来し、そして / あるいは

(ii) S S I で阻害された場合に 1 0 % 未満の残留活性を有し、そしてこの中で、

(iii) 3 7 及び p H 3 . 5 での 2 時間のインキュベーション後の、当該プロテアーゼの残留活性が、5 及び p H 9 . 0 での 2 時間のインキュベーション後の残留活性の少なくとも 4 0 % であり、ここで、当該プロテアーゼが純粋型、 $A_{280}=1.0$  の濃度でインキュベートされたものであり、そして当該残留活性が p H 9 . 0 及び 2 5 で Suc-AAPF-pNA に対して測定されたものである、方法。

10

【請求項 1 2】

少なくとも 1 つの植物タンパク質源の中にダイズが含まれる、請求項 1 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

技術分野

本発明は、動物飼料におけるズブチリシンファミリーの酸安定性セリンプロテアーゼの使用 (in vivo)、及び植物タンパク質を処理するための当該プロテアーゼの使用 (in vitro) に関する。

20

【0 0 0 2】

タンパク質は動物及びヒトにとって必須の栄養因子である。多くの家畜及び多くの人間は、植物タンパク質源から必須タンパク質を摂取する。重要な植物タンパク質源は、例えば脂肪種子植物、マメ科植物及び穀物である。

【0 0 0 3】

例えば、ダイズ粉が単胃動物、例えばブタ及び家禽の飼料中に含まれる場合、かなりの比率の当該ダイズ粉の固体が消化されない。例えば、子ブタ及び成長期のブタにおける、見かけ上の回腸におけるタンパク質の消化率は、約 8 0 % に過ぎない。

【0 0 0 4】

単胃動物及び多くの魚の胃は、強酸性の p H を示す。しかしながら、多くのタンパク質消化が小腸で起こる。従って、胃の通過で生存し得る酸安定性プロテアーゼについての必要性が存在している。

30

【0 0 0 5】

背景技術

動物飼料における、そして植物タンパク質の処理のためのプロテアーゼの使用は以下の文書によって知られている。

【0 0 0 6】

WO95/28850 は、フィターゼ及びタンパク質分解酵素を含んで成る動物飼料添加物を開示している。様々なタンパク質分解酵素が p . 7 に詳述されている。

40

【0 0 0 7】

WO96/05739 は、キシラナーゼ及びプロテアーゼを含んで成る動物飼料添加物を開示している。適当なプロテアーゼが p . 2 5 に列挙されている。

【0 0 0 8】

WO95/02044 はアスペルギルス・アクレアツス (Aspergillus aculeatus) 由来のプロテアーゼ及び動物飼料におけるその使用を開示している。

【0 0 0 9】

US3966971 は酸性フィターゼ及び、任意にタンパク質分解酵素を用いる処理によって、植物タンパク質源からタンパク質を得る方法を開示する。適当なプロテアーゼは 2 段目に記載されている。

50

## 【 0 0 1 0 】

US4073884, US5047240, US3868448, US3823072, 及びUS3683069 は、ストレプトミセスの様々な菌株に由来するプロテアーゼ調製物及び動物飼料におけるそれらの使用を記載している。

## 【 0 0 1 1 】

しかしながら、これらのプロテアーゼは酸安定性ではなく、そして/あるいはズブチリシンファミリーのプロテアーゼではない。

## 【 0 0 1 2 】

本発明の簡単な説明

非常に酸安定性であり、そして動物飼料において向上した性能が期待される複数のプロテアーゼが今回同定された。これらのプロテアーゼはズブチリシンとして知られているプロテアーゼ群に属する。

10

## 【 0 0 1 3 】

本発明の詳細な説明

用語プロテアーゼは、本明細書で使用する場合、ペプチド結合を加水分解する酵素である（プロテアーゼ活性を有する）。プロテアーゼはまた、例えばペプチダーゼ、プロテイナーゼ、ペプチド加水分解酵素、又はタンパク質分解酵素と称される。

## 【 0 0 1 4 】

本発明に従う使用にとって好ましいプロテアーゼは、ポリペプチド鎖の内部に作用するエンド型のものである（エンドペプチダーゼ）。エンドペプチダーゼは問題のプロテアーゼの特異性に関連する、N末端及びC末端でブロックされているペプチドの基質に対する活性を示す。

20

## 【 0 0 1 5 】

上文のプロテアーゼの定義に含まれるものに、定期的に補充され、そして更新されるECリスト（Enzyme Nomenclature 1992 from NC-IUBMB, 1992）のEC3.4酵素群（それらの13個のサブクラスのいずれかを含む）に属する任意な酵素である。例えば、<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html> のワールドワイドウェブ(www)を参照のこと。

## 【 0 0 1 6 】

プロテアーゼは、それらの触媒機構に基づいて以下の群：セリンプロテアーゼ（S）、システインプロテアーゼ（C）、アスパラギン酸プロテアーゼ（A）、メタロプロテアーゼ（M）、及び未知のもの、又は現時点で分類されていないもの（U）、に分類される。Handbook of Proteolytic Enzymes, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner (eds), Academic Press (1998)の、特にgeneral introductionの項を参照のこと。

30

## 【 0 0 1 7 】

用語セリンプロテアーゼは、上記Handbookで定義されているセリンペプチダーゼ及びそれらの一群を言及する。

## 【 0 0 1 8 】

特定の態様において、セリンプロテアーゼは、触媒機構がペプチド結合を攻撃する求核試薬として働くセリン残基のヒドロキシル基に依存しているペプチダーゼである。

## 【 0 0 1 9 】

用語ズブチリシン又はズブチリシンファミリーは、本明細書で使用する場合、全てのS B族セリンプロテアーゼ、特にそのS 8ファミリーを含むことが意図される（S B族は上記Handbookの第9章で扱われている）。ズブチリシンにおいて、触媒の3配列の並びはAsp-His-Serである。三次構造はアルファヘリックス及びベータシートを共に含む。S B族はエンドペプチダーゼ及びエキソペプチダーゼを共に含む。これらのペプチダーゼは細菌、古細菌及び真核生物を含み；そこにはDNAウイルス由来の単一の代表者が存在する。

40

## 【 0 0 2 0 】

所定のプロテアーゼがズブチリシンであるか否かを決定するために、上記Handbook及びその中に示されている原則を参照すること。その様な決定は全ての型のプロテアーゼ、例えば天然又は野生型プロテアーゼ；あるいは遺伝子操作したプロテアーゼ又は合成プロテア

50

ーゼについて実施されることがある。

【0021】

あるいは、阻害研究は S S I (ストレプトミセス (Streptomyces) ズブチリシン阻害剤) で実施されることもあり、そしてズブチリシンは一定のモル過剰の S S I で阻害した場合に、最大 10% の残留活性を有するプロテアーゼとして定義される。この試験は例 8 に記載の様に実施され得る。この定義の特定の態様において、ズブチリシンは最大 8%、最大 6%、又は最大 5% の残留活性を有する。「最大」の表現は「以下」の表現と同一であるとみなされる。

【0022】

プロテアーゼ活性は、問題のプロテアーゼの特異性に関与するペプチド結合を含む基質が利用される、任意なアッセイを用いて測定され得る。アッセイ pH 及びアッセイ温度も同様に問題のプロテアーゼに適合される。アッセイ pH 値の例は、pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 又は 11 である。アッセイ温度の例は 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 又は 70 である。

10

【0023】

プロテアーゼ基質の例はカゼイン、及び p N A 基質、例えば Suc-AAPF-pNA (例えば Sigma S-7388 から入手可能) である。この p N A 基質の大文字は、1 文字アミノ酸コードを表している。別の例はプロタザイム A K (Megazyme T-PRAK によって錠剤として調製されたアズリン色素架橋型カゼイン) である。pH - 活性及び pH - 安定性の研究にとって p N A 基質が好ましく、一方、温度 - 活性研究の場合、プロタザイム A K 基質が好ましい。

20

【0024】

プロテアーゼアッセイの例は、実験の項目に記載されている。

【0025】

本発明に従う使用にとって、プロテアーゼの起源に対する限定は存在しない。従って、用語プロテアーゼは、天然又は野生型プロテアーゼだけでなく、プロテアーゼ活性を示すその任意な突然変異体、変異体、フラグメント等、並びに合成プロテアーゼ、例えば混合プロテアーゼ、及び共通プロテアーゼを含む。そのような遺伝子操作したプロテアーゼは、当業界で知られている様に、例えば部位指定突然変異導入、P C R (P C R 反応におけるプライマーの 1 つとして、所望の突然変異を含む P C R フラグメントを用いる)、又はランダム突然変異法によって調製され得る。共通タンパク質の調製は、例えば EP897985 に記載されている。

30

【0026】

本発明に従う使用のための、ズブチリシンファミリーの酸安定性プロテアーゼの例は、(i) バチルス (Bacillus) sp. NCIMB40484、バチルス・アルカロフィラス (Bacillus alcalophilus) NCIMB10438; フサリウム・オキシスポラム (Fusarium oxysporum) IFO 4471; パエシロマイセス・リラシナス (Paecilomyces liliiacinus) CBS 102449、アスペルギルス (Aspergillus) sp. CBS 102448、アクレモニウム・クリソゲナム (Acremonium chryso genum) ATCC 48272、及びアクレモニウム・キリエンス (Acremonium kiliense) ATCC 20338 由来のプロテアーゼ;

(ii) (i) のプロテアーゼの任意なものと少なくとも 70, 75, 80, 85, 90, 又は少なくとも 95% 同一のプロテアーゼ;

40

(iii) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、又は配列番号 4 のいずれかと少なくとも 70, 75, 80, 85, 90, 又は少なくとも 95% 同一のプロテアーゼ、

(iv) 配列番号 5 (全配列 1 ~ 397、又はそのフラグメント 28 ~ 397 若しくは 118 ~ 397)、配列番号 6 (全配列 1 ~ 367、又はそのフラグメント 70 ~ 367 若しくは 84 ~ 367)、又は配列番号 7 のいずれかと少なくとも 70, 75, 80, 85, 90, 又は少なくとも 95% 同一のプロテアーゼ、である。

【0027】

同一性のパーセンテージを計算するために当業界で知られている任意なコンピュータプログラムが使用されることがあり、例えば G C G バージョン 8 のプログラムパッケージに

50

において提供されるGAPプログラム(Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453)である。GAPを用いる場合、次の設定値がポリペプチド配列の比較に使用される: 5.0のGAPクリエーションペナルティ及び0.3のGAPエクステンションペナルティ。

【0028】

特定の態様において、本発明に従う使用のためのプロテアーゼは微生物のプロテアーゼであり、ここで、用語「微生物の(microbial)」は当該プロテアーゼが微生物(microorganism)に由来し、又はそれから派生すること、あるいは微生物に由来する類似体、フラグメント、変異体、突然変異体、又は合成プロテアーゼであることを示す。それは、本来の野生型微生物菌株、別の微生物菌株、又は植物において産生し又は発現することがあり、すなわち当該用語は野生型の、天然プロテアーゼの発現、並びに任意な宿主における組換え体の、遺伝子操作型又は合成のプロテアーゼの発現を網羅する。

10

【0029】

用語「微生物」は、本明細書で使用する場合、古細菌、細菌、真菌、ウイルス(vira)等を含む。

【0030】

微生物の例は、細菌、例えばバチルス属の細菌、例えばバチルスsp. NCIMB40484、バチルス・アルカロフィラス(Bacillus alcalophilus) NCIMB10438;あるいはプロテアーゼ活性を示す突然変異体又は変異株である。

20

【0031】

微生物の更なる例は、真菌、例えば酵母又は糸状菌類、例えばパエシロマイセス属から選択されるもの、例えばパエシロマイセス・リラシナスCBS 102449、アスペルギルス、例えばアスペルギルスsp. CBS 102448、アクレモニウム、例えばアクレモニウム・クリソゲナムATCC 48272、アクレモニウム・キリエンスATCC 20338、又はフサリウム、例えばフサリウム・オキシスポラムIFO 4471;あるいはプロテアーゼ活性を示す突然変異体又は変異株である。

【0032】

別の態様において、当該プロテアーゼは植物プロテアーゼである。植物起源のプロテアーゼの例は、メロン果肉由来のプロテアーゼである(Kaneda et al., J. Biochem. 78, 1287-1296(1975))。

30

【0033】

用語「動物」は、全ての動物、例えば人間を含む。動物の例は非反芻動物、及び反芻動物、例えばウシ、ヒツジ及びウマである。特定の態様において、動物は非反芻動物である。非反芻動物は、単胃動物、例えばブタ又はイノシシ(swine)(限定しないが、子ブタ、成長期のブタ、及び雌ブタを含む);家禽類、例えばシチメンチョウ及びニワトリ(限定しないが、ブロイラーのニワトリ、産卵ニワトリを含む);若いウシ;及び魚類(限定しないが、サケを含む)を含む。

【0034】

用語「飼料」又は「飼料組成物」は、動物による摂取に適した、又はそれが意図される、任意の化合物、調製物、混合物、又は組成物を意味する。

40

【0035】

本発明に従う使用において、前記プロテアーゼは、食餌の前、後、又はそれと同時に、動物に給餌されることがある。後者のものが好ましい。

【0036】

本文において、用語「酸安定性」は、 $A_{280}=1.0$ に相当する希釈液中での、そして次の緩衝液:

100 mM コハク酸、100 mM HEPES、100 mM CHES、100 mM CABS、1 mM  $CaCl_2$ 、150 mM KCl、0.01% Triton(商標)X-100、pH 3.5、において37で2時間インキュベーションした後の、純粋なプロテアーゼ酵素のプロテアーゼ活性が、

50

本明細書の例 2 C に記載のアッセイ ( 基質 : Suc-AAPF-pNA、pH 9.0、25 ) を用いて測定した場合、参照活性の少なくとも 40 % であることを意味する。

【 0037 】

上記の酸安定性の定義の特定の態様において、プロテアーゼ活性は参照活性の少なくとも 45、50、55、60、65、70、75、80、85、又は少なくとも 90 % である。

【 0038 】

用語「参照活性」は、次の緩衝液 :

100 mM コハク酸、100 mM HEPES、100 mM CHES、100 mM CABS、1 mM CaCl<sub>2</sub>、150 mM KCl、0.01 % Triton ( 商標 ) X-100、pH 9.0、において 5 で 2 時間インキュベーションした後の、A<sup>280</sup>=1.0 に相当する希釈中での、純粋な型の、同一プロテアーゼのプロテアーゼ活性であって、上述の様に決定される活性を言及する。

10

【 0039 】

換言すると、酸安定性を決定する方法は、次の段階 :

a) 試験すべきプロテアーゼ試料 ( 純粋型、A<sub>280</sub>=1.0 ) を 2 つのアリコート ( I 及び II ) に分け ;

b) アリコート I を 37 °C 及び pH 3.5 で 2 時間インキュベーションし ;

c) アリコート I の残留活性を測定し ( pH 9.0 及び 25 °C ) ;

d) アリコート II を 5 °C 及び pH 9.0 で 2 時間インキュベーションし ;

e) アリコート II の残留活性を測定し ( pH 9.0 及び 25 °C ) ;

20

f) アリコート II に対して相対的なアリコート I の残留活性 ( % ) を計算すること、を含んで成る。

【 0040 】

あるいは、上文の酸安定性の定義において、段階 b) の緩衝液の pH の値は 2.0、2.5、3.0、3.1、3.2、3.3、又は 3.4 であってもよい。

【 0041 】

上文の択一的な段階 b) の緩衝液の pH 値に関連する上文の酸安定性の定義の、他の択一的な態様において、参照のものと比較した場合の残留プロテアーゼ活性は、少なくとも 5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は少なくとも 50 % である。

【 0042 】

別の態様において、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、又は 8.5 の pH 値は段階 d) の緩衝液に適用され得る。

30

【 0043 】

上文の酸安定性の定義において、用語「A<sub>280</sub>=1.0」は、緩衝液ブランクと比較して、1 cm の光路長のキュベットにおいて、280 nm で 1.0 の吸収を生じせしめる様な前記純粋プロテアーゼの濃度 ( 希釈 ) を意味する。

【 0044 】

そして、上文の酸安定性の定義において、用語「純粋プロテアーゼ」は、1.70 以上の A<sub>280</sub> / A<sub>260</sub> 比を有する試料であって ( 例 2 E を参照のこと )、クーマシー染色した SDS-PAGE ゲルのスキャンニングによって、前記プロテアーゼに相当するバンドのそのスキャンニング強度の少なくとも 95 % を有することが測定されるもの ( 例 2 A を参照のこと ) を言及する。あるいは、A<sub>280</sub> / A<sub>260</sub> 比は、1.50、1.60、1.65、1.70、1.75、1.80、1.85 以上であるか、あるいは 1.90 以上である。

40

【 0045 】

しかしながら、本発明に従う使用のために、プロテアーゼは純粋である必要はなく ; それは、例えば他の酵素、他のプロテアーゼでさえも含むことがあり、この場合、それはプロテアーゼ調製物と称されることがある。それでもなお、明確に定義されるプロテアーゼ調製物が有利である。例えば、本質的に他のプロテアーゼから妨害を受けない又はそれを混入していないプロテアーゼの用量 ( dose ) を飼料に正確に添加するほうがより対処しやすい。用語「用量」は、正確に言えば、特に一貫性のある、且つ一定の結果を得る目的、及

50

び所望の効果に基づいて添加量を最適化した容量を言及する。

【0046】

特定の態様において、飼料に加えられる型の、又は飼料添加物に含められる場合のプロテアーゼは、明確に定義される。明確に定義される、は、サイズ排除クロマトグラフィーによって決定した場合（例12を参照のこと）、プロテアーゼ調製物が少なくとも50%純粋であることを意味する。

【0047】

他の特定の態様において、プロテアーゼ調製物は、この方法によって決定した場合、少なくとも60、70、80、85、88、90、92、94、又は少なくとも95%純粋である。

【0048】

あるいは、用語「明確に定義される」は、適切なサイズ排除クロマトグラフィーによるプロテアーゼ調製物の画分が、1つの主要なプロテアーゼ成分のみを明らかにしていることを意味する。

【0049】

当業者は、どのように適切なサイズ排除クロマトグラフィーカラムを選択するかを知っている。当業者は、例えば、Amersham Pharmacia BiotechのHiLoad26/60 Superdex75pgカラム上で調製物を分画することによって開始することがある（例12を参照のこと）。ピークがはっきりと分かれられない場合、当業者は異なるカラム（例えば変更したカラムの粒子サイズ及び/又はカラムの長さを有するもの）を試すことがあり、そして/あるいは試料の体積を変更することがある。単純且つ一般的な試行錯誤の方法によって、当業者は、例12に記載される様に実施される純度の計算に基づいた、十分な分解能（ピークの明確な分離）を有するカラムに到達するであろう。

【0050】

当該プロテアーゼ調製物は、（a）飼料に直接加えられてもよく（又は植物タンパク質の処理工程で直接使用されてもよい）、あるいは（b）1又は複数の中間組成物、例えば後に飼料に加えられる飼料添加物又はプレミックスの製造において使用されてもよい（又は処理工程で使用されてもよい）。上述した純度の程度は、上文の（a）又は（b）のいずれかに従い使用される、本来のプロテアーゼ調製物の純度を言及する。

【0051】

この程度の純度を有するプロテアーゼ調製物は、特に組換え産生方法を用いて得ることができ、一方、それらは、当該プロテアーゼが伝統的な発酵法で産生される場合、そのように容易には得られず、そして更により大きなバッチ間の変動性にもさらされる。

【0052】

その様なプロテアーゼ調製物は、当然のことながら、他の酵素と混合され得る。

【0053】

1つの特定の態様において、本発明に従う使用のためのプロテアーゼは、酸安定性に加えて、中性に近い至適pH-活性も有する。

【0054】

用語「中性に近い至適pH-活性」は、1又は複数の以下のこと：至適pHがpH6.0~11.0、又はpH7.0~11.0、又はpH6.0~10.0、又はpH7.0~10.0、又はpH8.0~11.0、又はpH8.0~10.0の間にあることを意味する（本明細書の例2B及び7、並びに図2及び5を参照のこと）。

【0055】

別の特定の態様において、本発明に従う使用のためのプロテアーゼは、酸安定性に加えて、熱安定性でもある。

【0056】

用語「熱安定性」は、1又は複数の以下のこと：至適温度が少なくとも50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、又は少なくとも70であることを意味する（本明細書の例2D及び7並びに図3及び6を参照のこと）。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 7 】

更に特定の態様において、本発明に従う使用のためのプロテアーゼは本明細書の例 4 の *in vitro* モデルに従い、植物タンパク質を可溶化し得る。

## 【 0 0 5 8 】

用語「植物タンパク質」は、本明細書で使用する場合、植物由来又は起源の少なくとも 1 つのタンパク質、例えば修飾型タンパク質及びタンパク質誘導体を含む、任意の化合物、組成物、調製物又は混合物を言及する。特定の態様において、植物タンパク質のタンパク質含量は少なくとも 10、20、30、40、50、又は 60% (w/w) である。

## 【 0 0 5 9 】

植物タンパク質は、植物タンパク質源、例えばマメ科植物及び穀物類に由来してもよく、例えばマメ科 (Fabaceae) (マメ科 (Leguminosae))、アブラナ科、アカザ科、及びイネ科の植物由来の材料、例えばダイズ粉、ルピナス粉及びナタネ粉に由来してもよい。

10

## 【 0 0 6 0 】

特定の態様において、植物タンパク質源はマメ科の 1 又は複数の植物、例えばダイズ、ルピナス、エンドウマメ、又はマメ由来の材料である。

## 【 0 0 6 1 】

別の特定の態様において、植物タンパク質源は、アカザ科の 1 又は複数の植物、例えばビート、テンサイ、ハウレンソウ又はキノア由来の材料である。

## 【 0 0 6 2 】

植物タンパク質源の他の例は、ナタネ、及びキャベツである。

20

## 【 0 0 6 3 】

ダイズは好ましい植物タンパク質源である。

## 【 0 0 6 4 】

植物タンパク質源の他の例は、穀物類、例えばオオムギ、コムギ、ライムギ、カラスムギ、トウモロコシ (コーン)、コメ、及びモロコシである。

## 【 0 0 6 5 】

少なくとも 1 つの、ズブチリシンファミリーの酸安定性プロテアーゼを用いる植物タンパク質の本発明に従う処理は、植物タンパク質の可溶化の増大をもたらす。

## 【 0 0 6 6 】

以下のものは、本発明のプロテアーゼを用いて得られる可溶化タンパク質のパーセンテージの例である：少なくとも 76.8%、77.0%、77.2%、77.4%、77.6%、77.8%、78.0%、78.2%、78.4%、78.6%、又は少なくとも 78.8% (本明細書の例 4 の *in vitro* モデルを参照のこと)。

30

## 【 0 0 6 7 】

用語「タンパク質の可溶化」は、基本的にタンパク質を溶液にすることを意味する。そのような可溶化は、通常複合体の、天然の組成物、例えば飼料の、他の成分からのプロテアーゼを介するタンパク質の放出に起因することがある。可溶化はプロテアーゼ処理をしていない試料と比較した場合の、可溶性タンパク質の量の増大として測定され得る (本明細書の例 4 を参照のこと)。

## 【 0 0 6 8 】

処理工程の特定の態様において、問題のプロテアーゼは、その植物タンパク質又はタンパク質源に対するその可溶化作用に影響する (又は働きかけ、又は影響を及ぼす)。これを達成するために、植物タンパク質又はタンパク質源は典型的に溶媒、例えば水性溶媒、例えば水の中で懸濁され、そして pH 及び温度の値は、問題の酵素の特性に関して注意を払って調整される。例えば、当該処理は、実際のプロテアーゼの相対活性が少なくとも 50、又は 60、又は 70、又は 80、又は 90% である、pH 値で行ってもよい。同様に、例えば、当該処理は、実際のプロテアーゼの相対活性が少なくとも 50、又は 60、又は 70、又は 80、又は 90% である、温度で行ってもよい (これらの相対活性は本明細書の例 2 で定義される)。当該酵素反応は所望の結果が得られるまで続けられ、その後、それは酵素を不活性化することによって、例えば加熱処理段階によって停止しても、又はし

40

50

なくてもよい。

【0069】

本発明の処理工程の別の特定の態様において、プロテアーゼの働きは維持され、これは、例えば当該プロテアーゼが植物タンパク質又はタンパク質源に加えられるが、その可溶化作用は、いわば、一度適当な可溶化条件が確立されると、又は一度任意な酵素阻害剤が不活性化されると、又はどの様な他の手段が酵素の働きを延長するために適用されても、後に所望とされるまで変化しないことを意味する。

【0070】

1つの態様において、当該処理は、動物飼料又は動物飼料における使用のための植物タンパク質の前処理であり、すなわちタンパク質は摂取前に可溶化される。

10

【0071】

用語「動物飼料の栄養価の向上」は、タンパク質の利用性を向上させ、それによってタンパク質抽出の増大、より高いタンパク質の収率、及び/又はタンパク質の活用性の増大をもたらすことを意味する。その結果、当該飼料の栄養価が増大し、そして動物の成長速度及び/又は体重増加及び/又は飼料変換（すなわち体重増加と比較される摂取飼料の重量）が向上する。

【0072】

特定の態様において、体重増加はコントロールの少なくとも101%、102%、103%、104%、105%、106%、又は少なくとも106.6%である（本明細書の例10を参照のこと）。

20

【0073】

更に特定の態様において、飼料変換は多くとも（又は未満）99%、98%、97.5%、97%であり、又は多くとも96.6%である。これは最大99%、98%、97.5%、97%、又は最大96.6%の飼料変換に等しい。また、本明細書の例10を参照とし、コントロールと比較すること。

【0074】

当該プロテアーゼは、任意な型で、比較的純粋なプロテアーゼとして、又は動物飼料に加えることが意図される他の成分と一緒に、すなわち動物飼料添加物の型で、例えばいわゆる動物飼料のためのプレミックスとして、飼料に加えられ得る。

【0075】

#### 動物飼料添加物

ズブチリシンファミリーの酸安定性プロテアーゼの他に、本発明の動物飼料添加物は、少なくとも1つの脂溶性ビタミン、及び/又は少なくとも1つの水溶性ビタミン、及び/又は少なくとも1つの微量元素、及び/又は少なくとも1つの多量元素を含む。

30

【0076】

更に、任意の飼料添加物成分として、着色剤、芳香性化合物、安定剤、及び/又は、フィターゼ EC3.1.3.8又はEC3.1.3.26；キシラーゼ EC3.2.1.8；ガラクタナーゼ EC3.2.1.89；及び/又はベータグルカナーゼ EC3.2.1.4の中から選択される少なくとも1つの他の酵素がある（ECは、NC-IUBMB,1992に由来する、1992年の酵素命名法に従う酵素分類を意味する）（<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>のワールドワイドウェブ(www)も参照のこと）。

40

【0077】

特定の態様において、これらの他の酵素は明確に定義されている（プロテアーゼ調製物について上文で定義し、そして例示したもの。例12を参照のこと）。

【0078】

通常、脂溶性及び水溶性ビタミン、並びに微量元素は、飼料に加えることが意図される、いわゆるプレミックスの一部を形成し、一方、多量元素は通常飼料に対して別々に加えられ。これらの組成物の型のいずれも、本発明に従う酸安定性ズブチリシンで強化された場合、本発明の動物飼料添加物である。

【0079】

50

特定の態様において、本発明の動物飼料添加物は、動物の食餌又は飼料に、0.01～10.0%；更に詳細には0.05～5.0%；あるいは0.2～1.0%（100gの飼料当たりの1gの添加物を意味する%）のレベルで含めることが意図される（又は含めねばならないと規定される）。このことは、特にプレミックスについても同様である。

【0080】

従って、動物飼料添加物、例えばプレミックスの個々の成分の濃度は、同一成分の最終飼料中濃度に、それぞれ10～10000；20～2000；又は100～500を掛けることによって明らかとなりうる（上記の、3つのパーセンテージの算入間隔を参照のこと）。

【0081】

前記の個々の飼料及び飼料添加物成分の、所望の終濃度、すなわち飼料中濃度についての指針を、以下の表Aに示す。

【0082】

以下のものは、これらの成分の例の非限定的な列挙である。

【0083】

脂溶性ビタミンの例は、ビタミンA、ビタミンD3、ビタミンE、及びビタミンK、例えばビタミンK3である。

【0084】

水溶性ビタミンの例は、ビタミンB12、ビオチン及びコリン、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ナイアシン、葉酸、パントテン酸、例えばパントテン酸カルシウムDである。

【0085】

微量元素の例は、マンガン、亜鉛、鉄、銅、ヨウ素、セレン、及びコバルトである。

【0086】

多量元素の例はカルシウム、リン及びナトリウムである。

【0087】

家禽類及び子ブタ/ブタで実証された、これらの栄養要求量を、以下の表Aに列記する。栄養要求量は、これらの成分が、示した濃度で食餌に提供されるべきであることを意味する。これらのデータは：

NRC, Nutrient requirements in swine, ninth revised edition 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D. C. 1988；及び

NRC, Nutrient requirements in poultry, ninth revised edition 1994, subcommittee on poultry nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D. C. 1994、

を編集したものである。

【0088】

あるいは、本発明の動物飼料添加物は、表Aで述べた少なくとも1つの個々の成分を含んで成る。少なくとも1つとは、1又は複数の、1個の、又は2個の、又は3個の、又は4個の、更にそれ以上、最大で合計13個の、あるいは最大で合計15個のいずれかの、個々の成分を意味する。

【0089】

更に具体的には、この少なくとも1つの成分は、表Aの第4列、又は第5列、又は第6列に含まれる範囲内の飼料中濃度を提供するような量で、本発明の添加物に含まれる。

【0090】

上文で説明したように、相当する飼料添加物濃度は、これらの範囲の間隔限定に10～10000；20～2000；又は100～500を掛けることによって明らかと成り得る。例えば、ビタミンAのプレミックス含有量が10～100000IU/kgに相当することを考慮すると、この練習は以下の間隔を導く：添加物1kg当たり100～10<sup>8</sup>IU；又は200～2×10<sup>7</sup>IU；又は1000～5×10<sup>6</sup>IU。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 A  
 栄養要求量及び好ましい範囲

1 kgの食餌当たり供給される栄養素	家禽類	子ブタ/ブタ /雌ブタ	範囲 1	範囲 2	範囲 3
<b>脂溶性ビタミン</b>					
ビタミンA/[IU]	-5000	1300-4000	10-10000	50-8000	100-6000
ビタミンD <sub>3</sub> /[IU]	-1100	150-200	2-3000	5-2000	10-1500
ビタミンE/[IU]	-12	11-22	0.02-100	0.2-80	0.5-50
ビタミンK/[mg]	0.5-1.5	-0.5	0.005-10.0	0.05-5.0	0.1-3.0
<b>水溶性ビタミン</b>					
B <sub>12</sub> /[mg]	-0.003	0.005-0.02	0.0001-1.000	0.0005-0.500	0.001-0.100
ビタミンB <sub>6</sub> /[mg]	0.100-0.25	0.05-0.08	0.001-10.00	0.005-5.00	0.01-1.00
コリン/[mg]	800-1600	300-600	1-10000	5-5000	10-3000
<b>微量元素</b>					
マンガン/[mg]	-60	2.0-4.0	0.1-1000	0.5-500	1.0-100
亜鉛/[mg]	40-70	50-100	1-1000	5-500	10-300
鉄/[mg]	50-80	40-100	1-1000	5-500	10-300
銅/[mg]	6-8	3.0-6.0	0.1-1000	0.5-100	1.0-25
ヨウ素/[mg]	-0.4	-0.14	0.01-100	0.05-10	0.1-1.0
セレン/[mg]	-0.2	0.10-0.30	0.005-100	0.01-10.0	0.05-1.0
<b>多量元素</b>					
カルシウム/[g]	8-40	5-9	0.1-200	0.5-150	1-100
利用可能なリン/[g]	3-6	1.5-6	0.1-200	0.5-150	1-50

## 【 0 0 9 1 】

## 動物飼料組成物

動物飼料組成物又は食餌は、比較的高い含有量のタンパク質を有する。上文で言及したNational Research Council(NRC)の刊行物に従い、家禽類及びブタの食餌は、以下の表Bの、列2～3に示すように特徴づけられ得る。魚の食餌は、表Bの列4に示すように特徴づけられ得る。更に、その様な魚の食餌はサケ科の食餌で例示され、そしてAquaculture, principles and practices, ed. T.V.R. Pillay, Blackwell Scientific Publications Ltd. 1990; Fish nutrition, second edition, ed. John E. Halver, Academic Press Inc.

10

20

30

40

50

1989に基づいて設計される。

【0092】

本発明に従う動物飼料組成物は、50～800 g/kgの含有量の粗製タンパク質を有し、そして更に本明細書の請求項に記載の、少なくとも1つのプロテアーゼを含んで成る。

【0093】

更に、又はあるいは(上文で示唆した粗製タンパク質含量に対して)、本発明の動物飼料組成物は、代謝エネルギーの含有量10～30 MJ/kg;及び/又はカルシウム含有量0.1～200 g/kg;及び/又は利用可能なリンの含有量0.1～200 g/kg;及び/又はメチオニン含有量0.1～100 g/kg;及び/又はメチオニン+システイン含有量0.1～150 g/kg;及び/又はリジン含有量0.5～50 g/kgを有する。

10

【0094】

特定の態様において、代謝エネルギー、粗製タンパク質、カルシウム、リン、メチオニン、メチオニン+システイン、及び/又はリジンの含有量は以下の表Bの範囲2、3、4又は5(R.2～5)のいずれか1つの中にある。

【0095】

粗製タンパク質は、Animal Nutrition, 4th edition, Chapter 13 (Eds. P.McDonald, R. A. Edwards and J. F. D. Greenhalgh, Longman Scientific and Technical, 1998, ISBN 0-582-40903-9)で述べられているように、6.25の因子を掛けた窒素(N)として計算され、すなわち、粗製タンパク質(g/kg) = N(g/kg) × 6.25である。窒素含有量は、ケルダール法によって決定される(A. O. A. C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC)。

20

【0096】

代謝エネルギーは、NRC publication Nutrient Requirements of Swine(1988) pp. 2-6、及びEuropean Table of Energy Values for Poultry Feedstuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, The Netherlands. Grafisch bedrijf Ponsen & Iooijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5に基づいて計算される。

【0097】

完全な動物食餌中のカルシウム、利用可能なリン及びアミノ酸の食餌含有量は、飼料の表、例えばVeevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7に基づいて計算される。

30

【0098】

特定の態様において、本発明の動物飼料組成物は、上文で定義した少なくとも1つの植物タンパク質又はタンパク質源を含む。

【0099】

更に他の特定の態様において、本発明の動物飼料組成物は、0～80%のトウモロコシ;及び/又は0～80%のモロコシ;及び/又は0～70%のコムギ;及び/又は0～70%のオオムギ;及び/又は0～30%のカラスムギ;及び/又は0～40%のダイズ粉;及び/又は0～10%の魚粉;及び/又は0～20%のホエー、を含む。

40

【0100】

動物食餌は、例えばすりつぶされた(mash)飼料(ペレット化されていない)又はペレット化された飼料として製造され得る。典型的には、ミル粉碎された飼料は混合され、そして十分な量の必須ビタミン及び鉱物は問題の種の特徴に従い加えられる。酵素は、固体又は液体酵素製剤として加えられることがある。例えば、固体酵素製剤は典型的に、混合段階の前又はその間に加えられ;そして液体酵素調製物は典型的にペレット化段階の後に加えられる。当該酵素は、飼料添加物又はプレミックス中に組み込まれることがある。食餌中の最終酵素濃度は食餌1kg当たり0.01～200mgの範囲内、例えば動物食餌1

50

kg 当たり 5 ~ 30 mg の酵素タンパク質の範囲内にある。

【0101】

動物飼料組成物の例を、例11に示す。

【表2】

**表B**

**動物食餌中のエネルギー、タンパク質及び無機物についての範囲の値**

栄養素	食禽類	子ブタ/ブタ/ 雌ブタ	魚	R. 1	R. 2	R. 3	R. 4	R. 5
	最小～ 最大	最小～最大	最小～ 最大					
代謝 エネルギー、 MJ/kg	12.1- 13.4	12.9-13.5	14-25	10-30	11-28	11-26	12-25	
粗製 タンパク質、 g/kg	124-280	120-240	300-480	50- 800	75-700	100- 600	110- 500	120- 490
カルシウム、 g/kg	8-40	5-9	10-15	0.1- 200	0.5- 150	1- 100	4-50	
利用可能 ナリツ、 g/kg	2.1-6.0	1.5-5.5	3-12	0.1- 200	0.5- 150	1- 100	1-50	1-25
チオニン、 g/kg	3.2-5.5	-	12-16	0.1- 100	0.5- 75	1-50	1-30	
チオニン トシステイン、 g/kg	4-9	2.3-6.8	-	0.1- 150	0.5- 125	1-80		
リジン、 g/kg	2.5-11	6-14	12-22	0.5- 50	0.5- 40	1-30		

10

20

30

【0102】

植物タンパク質を処理するための本発明の特定の態様において、フィターゼを加える追加の段階も含まれる。そして追加の特定の態様において、フィターゼ及びプロテアーゼを組み合わせた処理に加えて、追加の酵素が加えられることもあり、ここで、これらの酵素は他のプロテアーゼ、フィターゼ、脂肪分解酵素、及びグルコシダーゼ/カルボヒドラーゼ酵素を含んで成る群から選択される。その様な酵素の例は、W095/28850に示されている。

【0103】

前記プロテアーゼは、当然ながら飼料の可溶化及び/又は栄養価を向上せしめるための有効量、すなわちそれに適した量で適用されるはずである。現段階で考えられているのは、前記酵素が1又は複数の以下の量で投与されるということである(投与範囲): 0.01 ~ 200; 又は0.01 ~ 100; 又は0.05 ~ 100; 又は0.05 ~ 50; 又は0.10 ~ 10であり、これらの範囲全てが飼料1kg当たりのプロテアーゼタンパク質(mg)である(ppm)。

【0104】

飼料1kg当たりのプロテアーゼタンパク質(mg)を決定するために、前記プロテアーゼは飼料組成物から精製され、そして精製プロテアーゼの比活性は、関連するアッセイを用いて決定される(プロテアーゼ活性、基質、及びアッセイを参照のこと)。飼料組成物自体のプロテアーゼ活性も、同一のアッセイを用いて決定され、そしてこれら2つの決定

40

50

に基づいて、飼料 1 k g 当たりのプロテアーゼタンパク質 ( m g ) の量が算出される。

【 0 1 0 5 】

同一の原則が飼料添加物中のプロテアーゼタンパク質 ( m g ) を決定するために応用される。

【 0 1 0 6 】

当然のことながら、試料が飼料添加物又は飼料を調製するために使用されるプロテアーゼに関して利用可能であるならば、比活性はこの試料から決定される ( 飼料組成物又は添加物から当該プロテアーゼを精製する必要なし ) 。

【 0 1 0 7 】

多くの植物は、抗栄養因子、例えばレクチン及びトリプシン阻害剤を含む。ダイズの最も重要な抗栄養因子はレクチンダイズ凝集素 ( S B A ) 、及びダイズトリプシン阻害剤 ( S T I ) である。

10

【 0 1 0 8 】

レクチンは、かなりの特異性を有する特異的な炭水化物含有分子と結合するタンパク質であり、そして摂取された場合、それらは腸の上皮と結合する。これは、腸細胞の生存可能性の低下及び栄養の吸収の低下を招くことがある。

【 0 1 0 9 】

S B A は約 3 0 k D a のサブユニット分子量及び N - アセチルガラクトサミンとの高い親和性を有する、グリコシル化された 4 量体レクチンである。

【 0 1 1 0 】

20

トリプシン阻害剤は、タンパク質分解に影響を及ぼしタンパク質の消化率を低下させ、そして更に膵臓からの消化酵素の分泌を増大させ、消化酵素の形態でアミノ酸の損失を招く。トリプシン阻害剤の例は、約 8 k D a の分子量を有し、7 個のジスルフィド架橋を含み、そしてトリプシン様及びキモトリプシン様プロテアーゼに特異的な 2 つの阻害性ループを有する Bowman-Birk 阻害剤である。他の例は、いわゆる Factor の kunitz 阻害剤である ( 例えばトリプシン様プロテアーゼのための 1 つの結合部位を含み、そして約 2 0 k D a の分子量を有するダイズ kunitz トリプシン阻害剤 ) 。

【 0 1 1 1 】

本発明に従う使用のためのプロテアーゼは、S B A レクチン、並びにトリプシン阻害剤である Bowman-Birk 阻害剤及びダイズ kunitz Factor の様な抗栄養因子を加水分解することが

30

証明された。実験の項の例 5 を参照のこと。

【 0 1 1 2 】

この様に、本発明はまた、抗栄養因子、例えば S B A レクチン、並びにトリプシン阻害剤、例えば Bowman-Birk 阻害剤、及び kunitz Factor、例えばダイズ kunitz Factor を加水分解し、又はその量を減少させるための酸安定性セリンプロテアーゼの使用に関する。

【 0 1 1 3 】

例 1

#### 酸安定性プロテアーゼのスクリーニング

多数のプロテアーゼが、単胃動物の酸性の胃を通過するのに必要な安定性を有するプロテアーゼを同定するために、p H 3 での安定性について解析された。

40

【 0 1 1 4 】

プロテアーゼは常用のクロマトグラフィー法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した ( 例えば Protein Purification, Principles, High Resolution Methods, and Application s. Editors: Jan-Christer Janson, Lars Ryden, VCH Publishers, 1989 を参照のこと )

。

【 0 1 1 5 】

プロテアーゼ活性は以下の通りに決定した：プロテアーゼを 1 . 6 7 % Hammarsten カゼインと一緒に、2 5 、 p H 9 . 5 で 3 0 分間インキュベートし、次に T C A ( トリクロロ酢酸 ) を 2 % ( w / w ) の終濃度で加え、混合物を濾過して沈降物を除去し、そして濾

50

液を遊離第1級アミノ基について解析した(セリンスタンダードを用いて340nmの吸光度を測定することによって、OPA(o-フタル-ジアルデヒド)に基づいた比色アッセイで決定した)(Biochemische Taschenbuch teil II, Springer-Verlag(1964), p.93 and p.102)。1カゼインプロテアーゼユニット(CPU)は標準的な条件のもと、すなわち25及びpH9.5で、1分当たり1mmolのTCA可溶性第1級アミノ基を遊離する酵素量として定義される。

#### 【0116】

前記プロテアーゼを、水中で0.6CPU/Lの活性となるよう希釈し、2つのアリコートに分け、そして各アリコートを、続いてそれぞれ100mMリン酸緩衝液、pH3及び100mMリン酸緩衝液、pH7で更に希釈した。希釈した試料を37で1時間インキュベートし、そして20µlの試料を1%スキムミルクを含む1%アガロースプレートの穴に適用した。当該プレート(pH7.0)を37で一晩インキュベートし、そして透明になった範囲を測定した。

10

#### 【0117】

42個のプロテアーゼがこの試験で良好に実施された。これらのうちのいくつかが特徴づけられた(例2, 6, 7, 及び8を参照のこと)。これらのプロテアーゼは全て、セリンプロテアーゼのズブチリシンファミリーに属する。

#### 【0118】

##### 例2

バチルスsp. NCIMB40484由来のズブチリシンプロテアーゼの特徴付け及び比較研究

20

バチルスsp. NCIMB40484由来のプロテアーゼを、W093/24623の例1に記載のように調製した。

#### 【0119】

この特徴付けの目的は、Sub. Novo、Sub. Novo(Y217L)、及びSAVINASE(商標)と比較して、それらのpH-安定性、pH-活性及び温度-活性プロファイルを研究することであった。

#### 【0120】

Sub. Novoはバチルス・アミロリクエファシエンス(*Bacillus amyloliquefaciens*)由来のズブチリシンであり、そしてSub. Novo(Y217L)はW096/05739に開示されているその変異体である。Sub. Novoは常用の方法を用いて野生型菌株の培養物から調製され、そして精製され、一方、前記変異体はEP130756の例1~2、及び15~16に記載されているように調製した。

30

#### 【0121】

SAVINASE(商標)はバチルス・クラウシイ(*Bacillus clausii*)由来のズブチリシンであり、これはNovozymes A/S(Krogshoejvej, DK-2880 Bagsvaerd, Denmark)から販売されている。その調製は米国特許第3723250に記載されている。

#### 【0122】

##### 例2A

プロテアーゼ試料のSDS-PAGE純度の決定

プロテアーゼ試料のSDS-PAGEは、以下の手順によって決定した。

40

#### 【0123】

40µlのプロテアーゼ溶液( $A_{280}$ 濃度=0.025)を、10µlの50%(w/v)TCA(トリクロロ酢酸)と氷上のエッペンドルフ管中で混合した。30分後、氷上の管を遠心し(5分、0、14,000xg)、そして上清を慎重に除去した。20µlのSDS-PAGE試料緩衝液(200µlのトリス-グリシンSDS試料緩衝液(2倍)(125mMトリス塩酸、pH6.8、4%(w/v)SDS、50ppmプロモフェノールブルー、20%(v/v)グリセロール、NOVEX(商標)のLC2676)+160µlの蒸留水+20µlのメルカプトエタノール+20µlの3Mの緩衝化されていないトリス塩基(Sigma T-1503)を沈殿物に加え、そして管を3分間煮沸した。前記管を短期間遠心し、そして10µlの試料をNOVEX(商標)の4~20%のグラジエ

50

ントトリス - グリシンプレキャストゲル (Laemmliの化学を基にしているが、ゲル中に SDS を含まない、ポリアクリルアミドグラジエントゲル (Laemmli, U.K., (1970) Nature, vol. 227, pp.680-685), EC60255) に適用した。電気泳動は、プロモフェノールブルーの追跡用色素がゲルの底面に達するまで、150 V の低電圧で、両方の緩衝液のリザーバー中で、トリス - グリシンランニング緩衝液 (2.9 g のトリス塩基、14.4 g のグリシン、1.0 g の SDS、全体で 1 L の液体となるように加えられる蒸留水) を用いて行った。電気泳動後、ゲルを 100 ml の蒸留水を用いて、穏やかに振とうすることによってそれぞれ 3 回、5 回すすいだ。次にゲルを Gelcode (商標) Blue Stain 試薬 (PIERCE の製品、コロイド性クーマシー-G-250、PIERCE のカタログ番号 24592) と共に 1 時間穏やかに振とうし、そして蒸留水を用いて 8 ~ 16 時間穏やかに振とうし、そして蒸留水を複数回交換して洗浄した。最後に、ゲルを 2 枚のセロハン間で乾燥した。乾燥したゲルを Fotolook 95 v2.08 ソフトウェアを備えた AGFA の Arcus II スキャナーでスキャンし、そして以下の設定値 (Fotolook 95 v2.08) を有する File/Acquire コマンドによってウィンドウズ用のイメージ評価ソフトウェア CREAM (商標) (カタログ番号 990001 及び 990005、Kem-En-Tec, Denmark) に取り込んだ: オリジナル = リフレクティブ、モード = カラー RGB、スキャンリゾリューション = 240 ppi、アウトプットリゾリューション = 1201 ppi、スケールファクター = 100%、レンジ = グローバルセクションによるヒストグラム並びに Min = 0 及び Max = 215、トーンカーブ = 無し、シャープネス = 無し、デスクリーン = 無し並びにフレーバー = 無し、これにより、SDS - PAGE ゲルの \*.img ピクチャーファイルが作り出され、これは CREAM (商標) で

の評価に使用された。\*.img ピクチャーファイルは、メニューコマンド アナリシス / 1 - D で評価された。2 つのスキャンラインは レーンプレイスツールで \*.img ピクチャーファイル上に据えられた: 試料スキャンライン及びバックグラウンドスキャンライン。試料スキャンラインは、アプリケーションスロットの真下からプロモフェノールブルーの追跡用色素の真上の位置の、中央の試料レーン (問題のプロテアーゼを有する) に据えられた。バックグラウンドスキャンラインは、試料スキャンラインと平行であるが、試料が全く適用されておらず、バックグラウンドスキャンラインが試料スキャンラインの開始及び終了の点に垂直な、ピクチャー形式の SDS - PAGE ゲルの位置に据えられた。バックグラウンドスキャンラインはゲルの真のバックグラウンドを表している。スキャンラインの幅及び形状は調整されていない。スキャンラインに沿った強度は、直ちに中程度の感度による 1 - D / スキャンメニューコマンドで記録された。1 - D / エディターメニューコマンドを用いて、バックグラウンドスキャンは試料スキャンからサブトレースされた。次に、1 - D / リザルトメニューコマンドが選択され、そして CREAM (商標) ソフトウェアによって計算した場合のプロテアーゼピークのエリア (%) がプロテアーゼの SDS - PAGE 純度として使用された。

10

20

30

【0124】

次の結果が得られた:

【表3】

プロテアーゼ	SDS-PAGE 純度 (面積%)
バチルス sp. NCIMB 40484 由来	96.3
Sub. Novo	95.5
Sub. Novo (Y217L)	96.0
Savinase (商標)	99.2

40

【0125】

例 2 B

pH - 活性アッセイ

50

Suc-AAPF-pNA(Sigma (商標) S-7388)は、pH - 活性プロファイルを得るために使用した。

【0126】

アッセイ緩衝液：HCl又はNaOHでpH値3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0又は11.0に調整された、100mMコハク酸(Merck 100682)、100mM HEPES(Sigma H-3375)、100mM CHES(Sigma C-2885)、100mM CABS(Sigma C-5580)、1mM CaCl<sub>2</sub>、150mM KCl、0.01% Triton(商標)X-100。

アッセイ温度：25

【0127】

300μのプロテアーゼ試料(0.01% Triton(商標)X-100中で希釈したもの)を、1.5mlのアッセイ緩衝液と各pH値で混合し、混合物のpHをアッセイ緩衝液のpHにした。反応は1.5mlのpNA基質(50mgのものを1.0mlのDMSO中で希釈し、そして0.01% Triton(商標)X-100で45倍に希釈した)を加えることによって開始し、そして混合後、A<sub>405</sub>の増大を問題のpHでのプロテアーゼ活性の測定値として分光光度計によってモニタリングした。当該アッセイは他のpH値のアッセイ緩衝液で繰り返し、そして当該活性の測定値をpHに対する相対的な活性としてプロットした。相対的な活性は最高の活性(至適pH)で標準化し、すなわち至適pHでの活性を1、又は100%に設定した。プロテアーゼ試料は、全ての活性の測定値が当該アッセイについての量応答曲線の直線部分内に収まることを保証するために希釈された。

【0128】

例2C

pH - 安定性アッセイ

Suc-AAPF-pNA(Sigma (商標) S-7388)は、pH - 安定性プロファイルを得るために使用した。

【0129】

アッセイ緩衝液：HCl又はNaOHでpH値2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0又は11.0に調整された、100mMコハク酸、100mM HEPES、100mM CHES、100mM CABS、1mM CaCl<sub>2</sub>、150mM KCl、0.01% Triton(商標)X-100。

【0130】

各プロテアーゼ試料(1mM コハク酸、2mM CaCl<sub>2</sub>、100mM NaCl、pH6.0中であり、且つ10超のA<sub>280</sub>の吸光度を有する)を、試験される各pH値のアッセイ緩衝液中でA<sub>280</sub> = 1.0に希釈した。希釈したプロテアーゼ試料を37で2時間インキュベートした。インキュベーション後、プロテアーゼ試料を100mMコハク酸、100mM HEPES、100mM CHES、100mM CABS、1mM CaCl<sub>2</sub>、150mM KCl、0.01% Triton(商標)X-100、pH9.0、中で希釈し、全試料のpHをpH9.0にした。

【0131】

以下の活性測定において、温度は25であった。

【0132】

300μlの希釈したプロテアーゼ試料は1.5mlの、pH9.0のアッセイ緩衝液と混合し、そして活性反応は1.5mlのpNA基質(50mgのものを1.0mlのDMSO中で希釈し、そして更に0.01% Triton(商標)X-100で45倍に希釈した)を加えることによって開始し、そして混合後、A<sub>405</sub>の増大を(残留)プロテアーゼ活性の測定値として分光光度計によってモニタリングした。37のインキュベーションを異なるpH値で行い、そして活性の測定値をpHに対する残留活性としてプロットした。残留活性を対応するインキュベーションの活性(コントロール)で標準化し、一方

10

20

30

40

50

当該プロテアーゼを pH 9.0 のアッセイ緩衝液中で  $A_{280} = 1.0$  に希釈し、そして他のインキュベーションとして活性測定の前に 5 で 2 時間インキュベートした。当該プロテアーゼ試料は、全ての活性の測定値が当該アッセイについての量応答曲線の直線部分内に収まることを保証するために、活性測定の前に希釈した。

【 0 1 3 3 】

例 2 D

温度 - 活性アッセイ

プロタザイム AK 錠が、温度プロファイルを得るために使用された。プロタザイム AK 錠は Megazyme によって錠剤として調製されたアズリン色素架橋型カゼインである。

【 0 1 3 4 】

アッセイ緩衝液：NaOH で pH 9.0 に調整された、100 mM コハク酸、100 mM HEPES、100 mM CHES、100 mM CABS、1 mM  $CaCl_2$ 、150 mM KCl、0.01% Triton (商標) X-100。

【 0 1 3 5 】

プロタザイム AK 錠は、穏やかに攪拌することによって 2.0 ml の 0.01% Triton (商標) X-100 中で懸濁した。500  $\mu$ l のこの懸濁液及び 500  $\mu$ l のアッセイ緩衝液をエッペンドルフ管中で混合し、そして氷上に据えた。20  $\mu$ l のプロテアーゼ試料 (0.01% Triton (商標) X-100 中で希釈したもの) を加えた。当該アッセイは、アッセイ温度に設定したエッペンドルフサーモミキサーにエッペンドルフ管を移すことによって開始した。当該管をエッペンドルフサーモミキサー上で、その最高振とう速度で 15 分間インキュベーションした。当該管を氷浴に戻すことによって、アッセイのインキュベーションを停止させた。当該管を氷令した遠心管中で数分間遠心し、そして上清の  $A_{650}$  を分光光度計で読みとった。緩衝液のブラインドは当該アッセイに含められた (酵素の代わり)。  $A_{650}$  (プロテアーゼ) -  $A_{650}$  (ブラインド) をプロテアーゼ活性の測定値とした。当該アッセイは異なる温度で実施し、そして活性の測定値をインキュベーション温度に対する相対活性としてプロットされた。相対活性は最高の活性で標準化した (至適温度)。プロテアーゼ試料は、全ての活性の測定値が当該アッセイについての量応答曲線の直線部分内に収まることを保証するべく希釈した。

【 0 1 3 6 】

至適活性の概要 (pH - 及び温度活性) を表 1 に示す。pH - 安定性、pH - 活性及び温度 - 活性プロファイルを図 1 ~ 3 に示し、そして酸性 pH 値でのプロテアーゼについての pH - 安定性の詳細な比較を表 2 に示す。

【表 4】

表 1  
様々なプロテアーゼの至適 pH 及び至適温度

プロテアーゼ	至適 pH (pNA-基質)	pH9.0 での至適温度 (Protazyme AK)
パチルス sp. NCIMB 40484 由来	9	60°C
Sub. Novo <sup>1</sup>	10	70°C
Sub. Novo (Y217L) <sup>2</sup>	9	70°C
SAVINASE 商標 <sup>3</sup>	9	70°C

【表 5】

表 2

pH2.0～5.0での様々なプロテアーゼのpH-安定性

プロテアーゼ	pH 2.0	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.0	pH 4.5	pH 5.0
バチルス sp. NCIMB 40484由来	0.001	0.001	0.428	0.940	0.991	0.989	0.991
Sub. Novo	0.007	0.003	0.000	0.000	0.024	0.784	0.942
Sub. Novo (Y217L)	0.000	0.000	0.002	0.003	0.350	0.951	0.996
Savinase (商標)	0.001	0.001	0.001	0.003	0.338	0.929	0.992

10

【 0 1 3 7 】

例 2 E

精製したプロテアーゼ試料の吸収純度

 $A_{280} / A_{260}$  比の決定精製したプロテアーゼ試料の  $A_{280} / A_{260}$  比は以下の通りに決定した。

20

【 0 1 3 8 】

$A_{260}$  は、緩衝液ブランクと比較される、1 cm の路長のキュベットにおける、260 nm でのプロテアーゼ試料の吸収を意味する。 $A_{280}$  は、緩衝液ブランクと比較される、1 cm の路長のキュベットにおける、280 nm での同一プロテアーゼ試料の吸収を意味する。

【 0 1 3 9 】

例 2 及び 6 に由来する精製したプロテアーゼ試料は、分光光度計の  $A_{280}$  の読み取りがその応答曲線の直線部分内に収まるまで緩衝液中で希釈した。 $A_{280} / A_{260}$  比は、前記の読み取りから決定された。次の結果が得られた：

【表 6】

30

プロテアーゼ/ズブチリシンの由来	$A_{280} / A_{260}$
Sub. Novo	2.11
Sub. Novo (Y217L)	2.12
SAVINASE (商標)	2.12
バチルス sp., NCIMB 40484	2.19
バチルス・アルカロフィラス、NCIMB 10438	1.92
フサリウム・オキシスポラム、IFO 4471	1.89
パエシロマイセス・リラシナス、CBS 102449	1.92
アスペルギルス sp., CBS 102448	1.96
アクレモニウム・クリソゲナム、ATCC 48272	2.04
アクレモニウム・キリエンス、ATCC 20338	1.71

40

【 0 1 4 0 】

例 3

バチルス sp. NCIMB40484 由来のプロテアーゼの、ダイズ粉 (SBM) の不溶性部分を分解する能力

50

パチルスsp. NCIMB40484由来のプロテアーゼは、不溶性/消化不能部分を、消化酵素及び/又は加えられた外来性酵素にとって接近可能にする能力について試験された。

【0141】

その性能は、W095/02044に記載のように調製された2つのアスパラギン酸プロテアーゼ、プロテアーゼI及びプロテアーゼIIと比較された。この文書は飼料中でのそれらの使用も開示している。プロテアーゼIはアスペルギロペプシンII型プロテアーゼであり、そしてプロテアーゼIIはアスペルギロペプシンI型プロテアーゼであり(共にアスパラギン酸プロテアーゼ、すなわち非ズブチリシンプロテアーゼである)、これらはアスペルギルス・アクレアツス(Aspergillus aculeatus)由来である(上文で言及したHandbook of Proteolytic Enzymesを参照のこと)。

10

【0142】

試験物質、いわゆるダイズ残留物は、pH2でのペプシン処理、及びpH7でのパンクレアチン処理を含む、単胃動物の消化管を模倣した過程で生成した。

【0143】

パンクレアチン処理段階において、様々な市販酵素が、存在している市販酵素にとって接近可能なSBM成分を分解するために大量に加えられた。

【0144】

全てNovozymes A/S(Denmark)から購入可能な次の酵素が加えられた:ALCALASE(商標)2.4L、NEUTRASE(商標)0.5L、FLAVOURZYME(商標)1000L、ENERGEX(商標)L、BIOFEED(商標)Plus L、PHYTASE NOVO(商標)L。使用したSBMは、ペレット化された、飼料にとって標準的な48%タンパク質SBMとした。

20

【0145】

当該処理後、全タンパク質のわずかに5%が生じたダイズ残留物中に残された。

【0146】

FITC 標識プロトコール

前記残留物は、引き続き以下のようにFITC(Molecular Probes, F-143)で標識された:ダイズ残留物(25gの湿重量、~5gの乾燥重量)を100mlの0.1M炭酸緩衝液、pH9、中で懸濁され、そして40で1時間攪拌された。懸濁液をフルオレセイン5-イソチオシアネート(FITC)で一晩、暗室で処理された。カップリングしていないプローブは限外濾過(10,000Mwのカットオフ値)によって除去した。

30

【0147】

FITCアッセイ

FITC標識したダイズ残留物は、次のアッセイを用いてダイズ残留物を分解するプロテアーゼの能力を試験するために使用した:0.4mlのプロテアーゼ試料( $A_{280} = 0.1$ を有する)を、0.4mlのFITCダイズ残留物(pH6.5の0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液中で10mg/mlの懸濁液)と37で混合し、そしてインキュベーションの0時間後、そして22時間後に相対的な蛍光単位(RFU485/535nm;励起/モニタリング波長)を測定した。RFUの決定の前に、試料を20,000×Gで1分間遠心し、そして250µlの上清を黒いマイクロタイタートレーに移した。測定はVICTOR 1420 Multilabel counter(in vitro, Denmark)を用いて実施した。RFUはIain D. JohnsonによってIntroduction to Fluorescence Techniques, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Richard P. Haugland, 6<sup>th</sup> edition, 1996 (ISBN 0-9652240-0-7)において広く記載されている。

40

【0148】

ブラインド試料は、0.4mlの緩衝液を酵素試料の代わりに加えることによって調製した。

$RFU_{試料} = RFU_{試料} - RFU_{ブラインド}$  (ここで、 $RFU = RFU(22時間) - RFU(0時間)$ である)

【0149】

生じたFITC値( $RFU_{試料}$ 値)を以下の表3に示す。FITC値は、一般的に+/-

50

20,000の許容誤差を有する。プロテアーゼI及びプロテアーゼIIと反対に、バチルスsp. NCIMB40484由来のプロテアーゼは有効な程度までダイズ残留物を分解した。

【表7】

**表3**  
**プロテアーゼのダイズ残留物分解能**

プロテアーゼ	FITC (+/-20000)
バチルス sp. NCIMB 40484	61900
プロテアーゼ I	-9200
プロテアーゼ II	-1200

10

【0150】

例4

バチルスsp. NCIMB40484由来のプロテアーゼのin vitroでの試験

バチルスsp. NCIMB40484由来のプロテアーゼは、他のズブチリシンプロテアーゼ、例えばSub. Novo、SubNovo(Y217L)、SAVINASE(商標)及びALCALASE(商標)と一緒に、in vitroでの消化系(単胃動物の消化を模倣したもの)におけるトウモロコシ-SBM(トウモロコシ-ダイズ粉)タンパク質を可溶化するその能力について試験された。ブランクの処理のために、トウモロコシ-SBMを外来性ズブチリシン様プロテアーゼの非存在下でインキュベートした。

20

【0151】

前記のin vitroの系は、30個のフラスコから構成され、この中で、トウモロコシ-SBMが最初にHCl/ペプシン(胃での消化を模倣したもの)と、そして次にパンクレアチン(腸での消化を模倣したもの)と一緒にインキュベートされた。胃でのインキュベーション期間の終わりに、in vitroでの消化物の試料が除去され、そして可溶化されたタンパク質について解析された。

30

【0152】

基質

トウモロコシ-SBMの比率が6:4(w/w)の10gのトウモロコシ-SBM食餌を使用した。タンパク質含量はSBM中で43%(w/w)であり、そしてトウモロコシ粉中で8.2%(w/w)であった。10gのトウモロコシ-SBM食餌中のタンパク質の合計量は2.21gであった。

【0153】

消化酵素

ペプシン(Sigma P-7000; 539U/mg、固体)、パンクレアチン(Sigma P-7545; 8xU.S.P. (US Pharmacopeia))。

【表8】

40

in vitroでの消化手順の概要

フラスコに加えられる成分	pH	温度	時間経過	模倣した消化段階
10g トウモロコシ-SBM食餌 (6:4)、HCl/ペプシン (3000U/g 食餌)、プロテアーゼ (0.1mg プロテアーゼ酵素タンパク質/g 食餌)	3.0	40°C	t=0分	胃
NaOH	6.8	40°C	t=60分	腸
NaHCO <sub>3</sub> /パンクレアチン (8mg/g 食餌)	6.8	40°C	t=90分	
インキュベーションの停止、アリコートの除去	7.0	0°C	t=330分	

10

20

## 【0154】

酵素タンパク質の決定

プロテアーゼ酵素タンパク質の量は、S. C. Gill & P. H. von Hippel, Analytical Biochemistry 182, 319-326, (1989)で概説されている原理を用いて、 $A_{280}$ 値及びアミノ酸配列(アミノ酸組成)に基づいて計算される。

## 【0155】

in vitroモデルのための実験手順

- 10gの基質を100mlのフラスコに量り入れる。
  - 0分時に、ペプシン(3000U/g食餌)及び1mlのプロテアーゼ(0.1mg酵素タンパク質/g食餌)を含む46mlのHCl(0.1M)を混合しながら加える。フラスコを40℃でインキュベートする。
  - 30分時に、pHを測定する。
  - 45分時に、16mlのH<sub>2</sub>Oを加える。
  - 60分時に、7mlのNaOH(0.39M)を加える。
  - 90分時に、パンクレアチン(8.0mg/g食餌)を含む5mlのNaHCO<sub>3</sub>(1M)を加える。
  - 120分時に、pHを測定する。
  - 300分時に、pHを測定する。
  - 320分時に、30mlのアリコート除去し、そして遠心する(10000×G、10分、4℃)。
- 上清を除去し、そして-20℃で保存する。

30

40

## 【0156】

ゲル濾過HPLCによる可溶化されたタンパク質の推定

in vitroで消化された試料に由来する上清中の可溶化されたタンパク質の含有量は、ゲル濾過HPLCを用いて粗製タンパク質(CP)を定量することによって推定した。上清を融解し、0.45μのポリカーボネートフィルター(Sartorius)を介して濾過し、そしてH<sub>2</sub>Oで希釈した(1:50、v/v)。希釈した試料は、Superdex Peptide PE(7.5×300mm)ゲル濾過カラム(Global)を用いて、HPLCによりクロマトグラフィーにかけた。定組成溶出に使用した溶出液は、150mMのNaClを含む50mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)とした。一回の操作当たりの溶出液の合計量は26

50

mlであり、そして流速は0.4 ml / 分であった。溶出プロファイルは、214 nmで記録し、そしてプロファイル下の全面積は積分によって決定した。積分した面積からタンパク質含量を推定するために、検量曲線 ( $R^2 = 0.9993$ ) が、既知の合計タンパク質含量を有する *in vitro* で消化した参照トウモロコシ - SBM 試料の一連の希釈液から作成された。この参照試料におけるタンパク質の決定は、ケルダール法によって実施された (窒素 (%)) の決定; A. O. A. C., (1984), Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC)。

【0157】

結果

*in vitro* でのタンパク質溶解性に対する様々なプロテアーゼの結果、すなわち効果を、以下の表4に示す。 10

【0158】

可溶化されたタンパク質の相対的な量の計算は、*in vitro* での消化反応の間に、合計量75 ml に溶解した10 g のトウモロコシ - SBM 食餌中のタンパク質の合計量 (2.21 g タンパク質) を基にしている。完全なタンパク質の可溶化 (100%) を仮定すると、上清中のタンパク質含量は、体積当たり2.95%重量である。

【0159】

当該結果は、 $P = 0.0001$  の分散の一方解析によって解析された。SD = 標準偏差;  $n =$  処理当たり反復の回数 ( $n = 5$ )。 20

【0160】

パチルス sp. NCIMB 40484 由来のプロテアーゼは、他のプロテアーゼと比較した場合に、タンパク質の可溶化に対して有意なより優れた効果を有する。

【表9】

表4

酵素	可溶性 CP (合計(%))	SD
パチルス sp. NCIMB 40484 由来のプロテアーゼ	78.8 <sup>A</sup>	0.48
Sub. Novo	76.7 <sup>B</sup>	0.37
ALCALASE (商標)	73.9 <sup>C</sup>	1.04
Sub. Novo (Y217L)	75.8 <sup>B</sup>	0.91
SAVINASE (商標)	75.8 <sup>B</sup>	0.85
ブランク	76.6 <sup>B</sup>	0.88

A, B, C: 共通の添字を共有していない値は有意に異なる  
( $P < 0.05$ ) 30

【0161】

例5

レクチン SBA 並びにダイズ Bowman-Birk 及び kunitz 阻害剤の分解

パチルス sp. NCIMB 40484 由来のプロテアーゼの、ダイズ凝集素 (SBA) 並びにダイズ Bowman-Birk 及び kunitz トリプシン阻害剤を加水分解する能力が試験された。

【0162】

純粋 SBA (Fluka 61763)、Bowman-Birk 阻害剤 (Sigma T-9777) 又は kunitz 阻害剤 (ダイズ由来のトリプシン阻害剤、Boehringer Mannheim 109886) を、前記プロテアーゼと一緒に 37 で2時間、pH 6.5 でインキュベートした (プロテアーゼ: 抗栄養因子 = 1 40

: 10、A<sub>280</sub>に基づく)。インキュベーション緩衝液：50 mMジメチルグルタル酸、150 mM NaCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>、0.01% Triton X-100、pH 6.5。

【0163】

SBA及びプロテアーゼ阻害剤を分解するプロテアーゼの能力は、SDS-PAGEゲル上の天然SBA及びトリプシン阻害剤のバンドの消失並びに低分子量分解産物の出現から推定した。ゲルはクーマシーブルー染色し、そしてバンドの強度をスキャニングによって決定した。

【0164】

分解した抗栄養因子の%としての結果を、以下の表5に示す。

10

【0165】

ダイズ中の抗栄養因子を分解する能力はまた、ダイズ粉と候補プロテアーゼとのインキュベーション後に、SBA、Bowman-Birk阻害剤又はkunitz阻害剤に対する抗体を用いるウェスタン技術を利用することによって推定され得る(W098/56260を参照のこと)。

【表10】

**表5**

プロテアーゼの由来	SBA	Bowman-Birk 阻害剤	Kunitz 阻害剤
バチルス sp. NCIMB 40484	21	41	100

20

【0166】

例6

更に酸安定性のズブチリシンの調製

バチルス・アルカロフィラスプロテアーゼの調製

凍結乾燥した培養物に由来するバチルス・アルカロフィラスNCIMB10438が、以下の組成を有する100 mlのBPX培地を含む振とうフラスコ内に接種された：水道水中、ジャガイモデンプン100 g/l、オオムギ粉50 g/l、BAN800 MG (Novozymes A/Sから入手可能) 0.05 g/l、カゼイン酸ナトリウム10 g/l、ダイズ粉20 g/l、リン酸二ナトリウム9 g/l、Pluronic PE 6100 0.1ml/l。pHは、接種前に各振とうフラスコフラスコ中で、10 mlの1 Mセスキ炭酸ナトリウムを用いてpH 9.7に調整された。菌株は、30、300 rpmで4日間醗酵された。この培養物を、10 mlのBPX培地を含む新しい振とうフラスコに接種し、そして3日間醗酵した。

30

【0167】

精製

1 Lビーカー中の培養液を10000 × gで30分間遠心した。上清を合わせ、そして更にSeitz K-250 depthフィルタープレートを通過する濾過によって清澄にした。透明な濾液を3 kDaカットオフポリエーテルスルホンカセット (Filtron) 上での限外濾過によって濃縮した。濃縮した酵素を、G25 Sephadexカラム(Amersham Pharmacia Biotech)上で、50mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、5mM 3,3'-ジメチルグルタル酸、1mM CaCl<sub>2</sub>, pH7 (緩衝液A)に移し、そして緩衝液A中で平衡化したパシトラシンアガロースカラム(Upfront Chromatography A/S)にかけた。結合していないタンパク質を除去するために緩衝液Aでパシトラシンカラムを洗浄した後、前記プロテアーゼは、25% 2-プロパノール及び1 M塩化ナトリウムを添加した緩衝液Aを用いてカラムから溶出した。プロテアーゼ活性を有するパシトラシンカラム由来の画分を集め、そしてG25 Sephadexカラム(Amersham Pharmacia Biotech)上でのクロマトグラフィーによって20mM CH<sub>3</sub>COOH/NaOH、1mM CaCl<sub>2</sub>、pH4.5 (緩衝液B)に移した

40

50

。緩衝液を交換したプロテアーゼのプールを、緩衝液 B で平衡化したSOURCE 30Sカラム (Amersham Pharmacia Biotech) にかけた。緩衝液 B でSOURCE 30Sカラムを洗浄した後、緩衝液 B 中の直線 NaCl 勾配 (0 ~ 0.5 M) を増大させてプロテアーゼを溶出した。カラム由来の画分をプロテアーゼ活性について試験し、そしてプロテアーゼ含有画分を SDS-PAGE で解析した。純粋な画分を集め、そして更なる特徴付けに使用した。

【0168】

他の酸安定性ズブチリシンの調製

フサリウム・オキシスポラム IFO 4471 ; バチルス・アルカロフィラス NCIMB10438 ; パエシロマイセス・リラシナス CBS 102449、アスペルギルス sp. CBS 102448、アクレモニウム・クリソゲナム ATCC 48272、及びアクレモニウム・キリエンス ATCC 20338 のプロテアーゼは、

10

【0169】

配列

次の部分的なアミノ酸配列が決定された：

配列番号 1

アクレモニウム・クリソゲナム ATCC 48272 由来のプロテアーゼの N 末端：ALVTQNGAPWGLGT ISHRQPGSTSYIY；

配列番号 2

バチルス・アルカロフィラス NCIMB10438 由来のプロテアーゼの N 末端：NQVTPWGITRVQAPTA W；

20

配列番号 3

パエシロマイセス・リラシナス CBS 102449 由来のプロテアーゼの N 末端：AYTQQPGAPWGLGR ISH；

配列番号 4

フサリウム・オキシスポラム IFO 4471 由来のプロテアーゼの N 末端：ALTTQSGATWGLGTVSHR SRGS.

【0170】

バチルス sp. NCIMB40484 由来のプロテアーゼのアミノ酸配列である、本明細書の配列番号 5 は、既に決定されている (米国特許第 5,650,326 号の配列番号 4,6 及び 8 を参照のこと)。

30

【0171】

関連配列についての公的なタンパク質のデータベースのサーチは、次の事を明らかにした：

配列番号 6

Geneseq/r65936 (EP 623672 のパエシロマイセス・リラシナス CBS143.75 のプロテアーゼを引用) - 配列番号 3 と関連。

配列番号 7

Geneseq/r74334 (JP-07095882 のバチルス sp. THS-1001 のプロテアーゼを引用) - 配列番号 2 と関連。

40

【0172】

パエシロマイセス・リラシナス及びアスペルギルス sp. の菌株は、ブダペスト条約に従い、特許手続のための微生物の寄託の国際承認により、Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), P. O Box 273, 3740 AG Baarn, The Netherlands に以下の通りに寄託された。

寄託日：2000年1月17日

CBS 番号：アスペルギルス sp. 102448

寄託日：2000年1月17日

CBS 番号：パエシロマイセス・リラシナス 102449

【0173】

50

当該寄託はNovozyme A/Sによって行われ、そして後にHoffmann-La Roche AGに譲渡された。

【0174】

当該寄託はNovozyme A/Sによって行われ、そして後にHoffmann-La Roche AGに譲渡された。

【0175】

例7

更なるズブチリシンプロテアーゼの特徴付け及び比較研究

バチルス・アルカロフィラスNCIMB10438；フサリウム・オキシスポラムIFO 4471；パエシロマイセス・リラシナスCBS 102449、アスペルギルスsp. CBS 102448、アクレモニウム・クリソゲナムATCC 48272、及びアクレモニウム・キリエンスATCC 20338から調製したプロテアーゼは、全てズブチリシンである。

10

【0176】

当該プロテアーゼ試料の純度は、例2に記載の通りに決定した。次の結果が得られた。

【表11】

プロテアーゼ	SDS-PAGE 純度(面積%)
バチルス・アルカロフィラス NCIMB 10438	100.0
フサリウム・オキシスポラム IFO 4471	n. d.
パエシロマイセス・リラシナス CBS 102449	98.3
アスペルギルス sp. CBS 102448	n. d.
アクレモニウム・クリソゲナム ATCC 48272	98.6
アクレモニウム・キリエンス ATCC 20338	n. d.

20

n. d. =未決定

【0177】

アッセイ

pH - 活性、pH - 安定性、及び温度 - 活性のアッセイは例2に記載されている(pNA基質Suc-AAPF-pNA(Sigma S-7388)はpH - 活性及び - 安定性のプロファイルのために、全てのプロテアーゼについて使用したが、プロタザイムAK錠は温度のプロファイルに使用した)。

30

【0178】

至適活性(pH - 及び温度 - 活性)の概要を表6に示す。pH - 活性、pH - 安定性、及び温度 - 活性のプロファイルは図4 ~ 6に示し、そして酸性pH値での当該プロテアーゼのpH - 安定性のデータの詳細な比較は、表7に示す。

【表12】

40

**表6**  
**様々なプロテアーゼの至適pH及び至適温度**

プロテアーゼ	至適pH	至適温度 (°C)
バチルス・アルカロフィラス NCIMB 10438	9	70
フサリウム・オキシスポラム IFO 4471	11	60
パエシロマイセス・リラシナス CBS 102449	8	60
アスペルギルス sp. CBS 102448	10	60
アクレモニウム・クリソゲナム ATCC 48272	9	70
アクレモニウム・キリエンス ATCC 20338	11	70

10

【表13】

**表7**  
**pH2.0~5.0での様々なプロテアーゼのpH安定性**

20

プロテアーゼ\pH	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
バチルス・アルカロフィラス NCIMB 10438	0.007	0.005	0.175	0.844	0.965	1.017	1.038
フサリウム・オキシスポラム IFO 4471	0.000	0.000	0.003	0.649	0.929	1.030	1.056
パエシロマイセス・リラシナス CBS 102449	0.002	0.003	0.005	0.450	0.897	1.000	0.947
アスペルギルス sp. CBS 102448	0.002	0.002	0.002	0.532	0.860	0.970	0.976
アクレモニウム・クリソゲナム ATCC 48272	0.002	0.001	0.001	0.809	0.894	0.972	1.005
アクレモニウム・キリエンス ATCC 20338	0.008	0.003	0.023	0.412	0.843	0.955	1.009

30

【0179】

例8

40

ストレプトミセスズブチリシン阻害剤 (SSI) によるプロテアーゼの阻害

pNA基質: Suc-AAPF-pNA (Sigma (商標) S-7388) が、阻害後の残留活性を測定するのに使用された。

アッセイ緩衝液: 100 mM コハク酸 (Merck 100682)、100 mM HEPES (Sigma H-3375)、100 mM CHES (Sigma C-2885)、100 mM CABS (Sigma C-5580)、1 mM CaCl<sub>2</sub>、150 mM KCl、0.01% Triton (商標) X-100、pH 9.0。

アッセイ温度: 25

【0180】

SSIは、ストレプトミセス・アルボグリセオラス (*Streptomyces albogriseolus*) FERM P-1

50

205(S-3253)の醗酵液の上清から、クロマトグラフィーによって精製した。使用したSSI調製物は、95%超の純度を有しており、当該純度は例2Aに記載の手順によって決定した。あるいは、SSIは日本のwakoから、カタログ番号303-05201で入手することもできる(製造業者Daiwa Kasei k.K.)(例えば、<http://search.wako-chem.co.jp/lifebe/lifedocs/e/44834.asp>を参照のこと)。

## 【0181】

次の阻害アッセイの前に、SSIを0.01% Triton X-100中で $A_{280}$ 濃度=0.010まで希釈した。

プロテアーゼ：使用したプロテアーゼは95%超の純度を有しており、当該純度は例2Aに記載の手順によって決定した。次の阻害アッセイの前に、当該プロテアーゼを0.01% Triton X-100中で $A_{280}$ 濃度=0.010まで希釈した。

## 【0182】

ストレプトミセスズブチリシン阻害剤(SSI)による当該プロテアーゼの阻害は、以下の手順で決定した。

## 【0183】

300 $\mu$ lのプロテアーゼ試料( $A_{280}$ 濃度=0.010)を、300 $\mu$ lのSSI( $A_{280}$ 濃度=0.010)及び1.5mlのアッセイ緩衝液と混合した。室温での15分間のインキュベーション後、残留活性は1.5mlのpNA基質(50mgのものを1.0mlのDMSO中で希釈し、そして0.01% Triton(商標)X-100で45倍に希釈した)を加えることによって測定され、そして混合後、 $A_{405}$ の増大を分光光度計によってモニタリングした。コントロール(SSI無し)として、300 $\mu$ lの0.01% Triton X-100をSSIの代わりに使用した。

## 【0184】

残留活性はコントロール活性(SSI無し)で標準化し、すなわちSSIによる阻害無しは100%の残留活性を示し、そしてSSIによる完全な阻害は0%の残留活性を示す。次の結果が得られた。

## 【表14】

プロテアーゼ、ズブチリシンの由来	残留活性(%)
バチルス sp., NCIMB 40484	4.3
バチルス・アミロリクエファシエンス	0.1
バチルス・アミロリクエファシエンス(Y217L)	0.0
バチルス・クラウシイ、(Savinase(商標))	0.0
バチルス・アルカロフィラス、NCIMB 10438	0.0
フサリウム・オキシスポラム IF0 4471	0.1
パエシロマイセス・リラシナス、CBS 102449	0.1
アスペルギルス sp., CBS 102448	0.1
アクレモニウム・クリソゲナム、ATCC 48272	0.1
アクレモニウム・キリエンス、ATCC 20338	n. d.*

\* 未決定

## 【0185】

## 例9

更に酸安定性ズブチリシンの、ダイズ粉(SBM)の不溶性部分を分解する能力

例6に記載の様に調製した更に酸安定性ズブチリシンは、不溶性/消化不能部分を、消化酵素及び/又は加えられた外来性酵素にとって接近可能にする能力について、例3に記載の様に試験された。

## 【 0 1 8 6 】

得られた結果を以下の表 8 に示す。比較のために、プロテアーゼ I 及び II について例 3 で得られた結果を更に表 8 に含める。

## 【表 1 5】

**表 8**  
**追加のプロテアーゼのダイズ残留物分解能**

プロテアーゼ、ズブチリシンの由来	FITC/(+/-20000)
バチルス・アルカロフィラス NCIMB 10438	81300
フサリウム・オキシスポラム IFO 4471	102200
パエシロマイセス・リラシナス CBS 102449	98700
アスペルギルス sp. CBS 102448	123400
アクレモニウム・クリソゲナム ATCC 48272	89600
アクレモニウム・キリエンス ATCC 20338	94600
プロテアーゼ I	-9200
プロテアーゼ II	-1200

10

20

## 【 0 1 8 7 】

## 例 1 0

ブロイラーのニワトリの成長能力に対するバチルス sp. NCIMB 40484 由来の酸安定性ズブチリシンの効果

生きている動物を用いる実験のための公的なフランスの指南書に従う試みを、Roche Research Center for Animal Nutrition (CRNA, F-68305 Village-Neuf, France) で行う。性別毎に分けられた、生まれて 1 日目のブロイラーのニワトリ (「Ross PM3」) は、商業的な孵化場から供給される。

30

## 【 0 1 8 8 】

ニワトリは、環境的に調節された部屋に維持されている、ワイヤーが床に敷かれたバッテリーケージ内で飼育する。試料及び水道水は適宜供給する。

## 【 0 1 8 9 】

8 日目に、ニワトリを体重毎に 6 匹のニワトリの群に分け、これを酵素無しの実験用食餌を受けるコントロール処理、又は飼料 1 k g 当たり 1 0 0 m g のバチルス sp. NCIMB40484 のプロテアーゼの酵素タンパク質を添加した実験用食餌を受ける酵素処理のいずれかが割り当てられた。

## 【 0 1 9 0 】

各処理は、各性別毎に 6 つの群の、1 2 の群で繰り返された。当該群は 8 日目及び 2 9 日目に秤量された。中間期の飼料消費量が決定され、そして体重の増加及び飼料変換率が計算された。

40

## 【 0 1 9 1 】

実験食餌は、主成分としてトウモロコシデンブン及びダイズ粉 ( 4 4 % 粗製タンパク質 ) ( 表 9 ) CRNA で製造された。飼料は約 7 0 でペレット化された ( ダイの構成 : 3 × 2 0 m m ) 。適当な量のバチルス sp. NCIMB40484 のプロテアーゼを一定量の水で希釈し、そしてペレット化された飼料に噴霧した。コントロール処理の場合、適切な量の水が同様の方法で当該処理を扱うために使用された。

## 【 0 1 9 2 】

統計的な評価のために、2 つの変動因子の解析 ( 因子 : 処置及び性別 ) が、S A S パッケ

50

ージのGLMプロシージャ(SAS Institute Inc., 1985)を用いて実施された。有意な処置効果( $p < 0.05$ )が示唆された場合、処置平均間の差異はダンカン試験で解析した。技術的な理由により、前記酵素処理の1つのケージは統計的な評価から除外された。

【0193】

表2において、8日目から29日目までのブロイラーのニワトリの成長能力についての結果を列記する。処置と性別の間に相互関係は存在せず、それ故に両性別の集計結果を示す。パチルスsp. NCIMB40484プロテアーゼによる実験食餌の補足は、数字の上で6.6%体重増加を改善した。当該プロテアーゼの追加は、飼料の摂取をわずかに3.1%増加させた。パチルスsp. NCIMB40484プロテアーゼは、ブロイラーのニワトリの飼料変換をわずかに3.4%改善した。

10

【0194】

トウモロコシデンプンが高度に消化可能な成分であることを考慮して、観察された効果が、主にダイズ粉に対する当該酵素の作用によるものであると考えられる。従って、当該結果は、ダイズ分の栄養価がパチルスsp. NCIMB40484プロテアーゼによって向上したことを示した。

【0195】

結論として、当該研究は、大量のダイズ粉を含有するブロイラー飼料への、パチルスsp. NCIMB40484プロテアーゼの100mg酵素タンパク質/kg飼料での添加が、体重増加の数字上の増大及び飼料変換の有意な改善をもたらしたことを証明した。

【0196】

20

引用文献

EEC(1986):Directive de la Commission du 9 avril 1986 fixant la methode de calcul de la valeur energetique des aliments composes destines a la volaille. Journal Officiel des Communautés Europeennes, L130, 53-54

SAS Institute Inc. (1985):SAS(商標) User's Guide, Version 5 Edition. Cary NC

【表16】

表9  
実験食餌の組成

<u>成分 (%) :</u>	
トウモロコシデンプン	45.80
ダイズ粉 44 <sup>1</sup>	44.40
獣脂	3.20
ダイズ油	1.00
DL-メチオニン	0.18
MCP	0.76
塩	0.05
結合剤	1.00
ビタミンと無機物のプレミックス	3.55
Avatec(商標)15% CC <sup>2</sup>	0.06
<u>理論上の含有量 :</u>	
粗製タンパク質 (%)	19.3
N補正したME、(MJ/kg) <sup>3</sup>	12.2
粗製脂肪 (%)	5.3

<sup>1</sup> 理論上の含有量 : 90.6%乾燥物質、45.3%粗製タンパク質、2.0%粗製脂肪、4.9%粗製繊維

<sup>2</sup> 抗コクシジウム剤として90mgラサロシドナトリウム/kg飼料に相当するもの

<sup>3</sup> 理論上の栄養素の含有量に基づいて計算したもの (EC-equation ; EEC, 1986)。

【 0 1 9 7 】

飼料成分の供給元

【表 1 7】

10

20

30

トウモロコシデンプン: Roquettes Frères, F-62136 Lestrem, France  
 ダイズ粉 44: Rekasen GmbH, D-07338 Kaulsdorf, Germany  
 獣脂: Fonderies Gachot SA, F-67100 Strasbourg, France  
 ダイズ油: Ewoco Sarl, F-68970 Guemar, France  
 DL-メチオニン: Produit Roche SA, F-92521 Neuilly-sur-Seine, France  
 MCP: Brenntag Lorraine, F-54200 Toul, France  
 塩: Minoterie Moderne, F-68560 Hirsingue, France  
 結合剤: Minoterie Moderne, F-68560 Hirsingue, France  
 プレミックス(AM vol chair NS 4231): Agrobase, F-01007 Bourg-en-Bresse, France  
 Avatec: Produit Roche SA, F-92521 Neuilly-sur-Seine, France

10

【表 1 8】

20

**表 1 0**

**8～29日目のブロイラーのニワトリの能力**  
**両方の性別の結果を集計；平均±SD**

生成物	コントロール	バチルス sp. NCIMB 40484 プロテアーゼ
1 kgの飼料当たりの用量	0	100 mg 酵素タンパク質
ケージ×トリ	12 × 6	11 × 6 <sup>1</sup>
体重増加 (g/トリ) (%)	1155 <sup>A</sup> ± 94 100.0	1231 <sup>A</sup> ± 98 106.6
飼料摂取 (g/トリ) (%)	1941 <sup>A</sup> ± 108 100.0	2002 <sup>A</sup> ± 145 103.1
飼料変換 (g 飼料/g 増加) (%)	1.684 <sup>A</sup> ± 0.069 100.0	1.627 <sup>B</sup> ± 0.031 96.6

30

40

共通の上付き文字を共有していない、行の中の平均は有意に異なる  
 (p < 0.05)。

<sup>1</sup> 技術的な理由により、1つのケージが統計学的な評価から除外された。

【 0 1 9 8 】

50

## 例 1 1

酸安定性ズブチリシンプロテアーゼを添加したシチメンチョウ及びサケのためのプレミックス及び食餌

次の組成のプレミックスを調製する（1 kg 当たりの含量）：

## 【表 1 9】

5000000	IE	ビタミン A	
1000000	IE	ビタミン D3	
13333	mg	ビタミン E	
1000	mg	ビタミン K3	10
750	mg	ビタミン B1	
2500	mg	ビタミン B2	
1500	mg	ビタミン B6	
7666	mg	ビタミン B12	
12333	mg	ナイアシン	
33333	mg	ビオチン	
300	mg	葉酸	
3000	mg	パントテン酸カルシウム D	
1666	mg	Cu	20
16666	mg	Fe	
16666	mg	Zn	
23333	mg	Mn	
133	mg	Co	
66	mg	I	
66	mg	Se	
5.8	%	カルシウム	

## 【0 1 9 9】

このプレミックスに対して、例 2 に記載のように調製したバチルス sp. NCIMB40484 のプロテアーゼを、10 g のプロテアーゼ酵素タンパク質 / kg に相当する量で加える。

## 【0 2 0 0】

以下の表（Leeson and Summers, 1997 を基にしたものであるが、最適化プログラムである AGROSOFT（商標）を用いることによって肉粉無しで再計算がされた）に示す組成を有し、そして 1 kg 当たり 100 mg のプロテアーゼ酵素タンパク質を有する、ペレット化したシチメンチョウの開始用食餌及び生育用食餌を以下のように調製する：

## 【0 2 0 1】

製粉したトウモロコシ、ダイズ粉、魚粉及び植物性脂肪をカスケードミキサー内で混合する。石灰岩、リン酸カルシウム及び塩 10 g / kg 食餌の量の上記プレミックスと一緒に加え、続いて混合する。生じた混合物をペレット化する（蒸気条件にペレット化段階が続く）。

## 【表 2 0】

30

40

成分	開始用食餌、 g/kg	生育用食餌、 g/kg	終了用食餌
トウモロコシ	454.4	612.5	781.0
ダイズ粉	391	279	61.7
魚粉	70	29.9	70
植物性脂肪	21	21	46
石灰岩	19	16.9	9
リン酸カルシウム	30	25.9	16.8
塩 (NaCl)	2	2	2
ビタミンと無機物の プレミックス	10	10	10
リジン	1.3	1.49	
メチオニン	1.3	1.3	3.6
理論上の栄養素			
粗製タンパク質 g/kg	279	213	152
代謝エネルギー MJ/kg	12.3	12.7	14.1
カルシウム、g/kg	15.8	12.7	9
利用可能なリン、 g/kg	8.2	6.4	4.6
リジン、g/kg	17.6	12.8	7.5
メチオニン、g/kg	6.1	4.9	6.9

10

20

30

## 【0202】

サケ用の2つの食餌が、上文で広く概説されているように更に調製される。実際の組成を以下の表に示す(Refstie et al(1998), Aquaculture, vol.162, p.301-302から編集した)。推定される栄養分は、AGROSOFT(商標)の飼料最適化プログラムを用いることによって再計算される。

## 【0203】

例2に記載のように調製したバチルスsp. NCIMB40484のプロテアーゼが、1kg当たり100mgのプロテアーゼ酵素タンパク質に相当する量で食餌に加えられる。

## 【表21】

成分	魚粉を有する常用の食餌	ダイズ粉を有する代替食餌
小麦	245.3	75.2
魚粉	505.0	310.0
ダイズ粉	-	339.0
魚油	185.0	200.0
メチオニン	13.9	23.0
第一リン酸カルシウム	-	2.0
ビタミンと無機物のプレミックス+ペレット結合剤及びアスタキサンチン	50.8	50.8
理論上の栄養素 (生体重ベース)		
粗製タンパク質 g/kg	401	415
粗製脂肪 g/kg	232	247
代謝エネルギー MJ/kg	16.9	16.5
カルシウム、g/kg	13.9	9.8
リン、g/kg	10.8	9.0
リジン、g/kg	27.7	26.7
メチオニン、g/kg	24.4	31.6

10

20

## 【0204】

## 例12

## プロテアーゼ含有酵素産物の純度の決定

プロテアーゼ含有酵素産物、例えばプロテアーゼ調製物、例えば市販の多成分酵素産物の純度が、サイズ排除カラム上でのプロテアーゼ含有酵素産物の分画に基づいた方法によって決定される。ゲル濾過クロマトグラフィーとしても知られるサイズ排除クロマトグラフィーは、サイズにおいて分離され得るタンパク質分子に匹敵する孔のサイズ分布を有する、多孔性ゲルマトリックス（カラム内に詰め込まれる）を基にしている。比較的小さいタンパク質分子は、周囲の溶液からゲルの内部に拡散することがあり、一方、より大きな分子は、それらのサイズによって、同程度までゲル内部に拡散することが妨害されるだろう。結果として、タンパク質分子は、それらのサイズに従い、より大きな分子と分離され、より小さいものより前に当該カラムから溶出する。

30

## 【0205】

## タンパク質濃度アッセイ

プロテアーゼ含有酵素産物のタンパク質濃度は、PIERCEのBCAタンパク質アッセイキット（PIERCEのカタログ番号23225と同一のもの）によって決定される。ピシンコニン酸のナトリウム塩（BCA）は、アルカリ性の環境で第一銅イオン（ $Cu^{1+}$ ）と強力な紫色の複合体を形成し得る、安定な水溶性化合物である。BCA試薬は、タンパク質とアルカリ $Cu^{2+}$ の反応（ビウレット反応）で産生する第一銅イオンをモニタリングし得るBCAタンパク質アッセイキットの根底を成す。この反応から生まれる色は安定性があり、そしてタンパク質濃度の増大と共に比例の態様で増大する（Smith, P. K., et al. (1985), Analytical Biochemistry, vol. 150, pp 76-85）。BCA検量用溶液は、50部の試薬Aと1部の試薬Bを混合することによって作成される（試薬AはPIERCEのカタログ番号23

40

50

223であり、アルカリ性炭酸緩衝液中にBCA及び酒石酸塩を含み；試薬BはPIERCEのカタログ番号23224であり、4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を含む)。300  $\mu\text{l}$ の試料が3.0 mlのBCA検量用溶液と混合される。37 で30分放置した後、当該試料を室温に冷却し、そして $A_{490}$ を当該試料中のタンパク質濃度の測定値として読み取る。ウシ血清アルブミン（PIERCEのカタログ番号23209）の希釈液をスタンダードとして本アッセイに含める。

#### 【0206】

##### 試料の前処理

プロテアーゼ含有酵素産物が固体である場合、当該産物は、最初に20倍量の100 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、10 mM  $\text{Na}_3\text{C}_2\text{O}_4$ 、3,3'-ジメチルグルタル酸、2 mM  $\text{CaCl}_2$ 、pH 6（緩衝液A）中で少なくとも15分間、5 で溶解/懸濁され、そしてこの段階での酵素が懸濁液である場合、当該懸濁液は0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過され、透明な溶液を与える。当該溶液は、この時点から、液体プロテアーゼ含有酵素産物として処理される。

#### 【0207】

当該プロテアーゼ含有酵素産物が液体である場合、当該産物は最初に6~8000 Daのカットオフ値の、SpectraPorの透析チューブ（Spectrum Medical Industriesのカタログ番号132670）内で、100倍量の緩衝液A + 150 mMのNaCl（緩衝液B）に対して、プロテアーゼ含有酵素産物を高粘度にし得る、サイズ排除クロマトグラフィーにとって有害な製剤化合物を除去するために5 で少なくとも5時間透析される。

#### 【0208】

透析されたプロテアーゼ含有酵素産物は、沈殿物が透析の間形成した場合、0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターを介して濾過される。透析された酵素産物のタンパク質濃度は、上述のタンパク質濃度アッセイで決定され、そして当該酵素産物は緩衝液Bで希釈され、5 mg/mlのタンパク質濃度を有するサイズ排除クロマトグラフィーに直ちに使用可能な試料を与える。当該酵素産物が5 mg/ml未満のタンパク質濃度を透析後に有する場合、そのまま使用される。

#### 【0209】

##### サイズ排除クロマトグラフィー

300 mlのHiLoad26/60 Superdex75pgカラム（Amersham Pharmacia Biotech）を緩衝液Bで平衡化する（流速：1 ml/分）。1.0 mlのプロテアーゼ含有酵素試料をカラムに適用し、そして当該カラムを緩衝液Bで溶出する（流速：1 ml/分）。2.0 mlの画分を、適用した試料全てがカラムから溶出されるまで、カラムの出口から回収する。回収した画分は、適当なアッセイによってタンパク質含量（上文のタンパク質濃度アッセイを参照のこと）及びプロテアーゼ活性について解析される。適当なアッセイの例はSuc-AA PF-pNAアッセイである（例2Bを参照のこと）。他の適当なアッセイは、例えばCPUアッセイ（例1を参照のこと）、及びプロタザイムAKアッセイ（例2Dを参照のこと）である。プロテアーゼ活性アッセイについての条件、例えばpHは、分画された試料中の、出来る限り多くのプロテアーゼを測定できるように調整される。上文で言及したアッセイの条件は、適当な条件の例である。他の適当な条件は、上記のプロテアーゼ活性の測定を扱う項目で挙げられている。1又は複数のプロテアーゼアッセイにおける活性を有するタンパク質のピークは、プロテアーゼピークとして定義される。プロテアーゼピークの純度は、全ての同定されたプロテアーゼピーク中の全タンパク質量で割ったピークのタンパク質量として計算される。

#### 【0210】

プロテアーゼ含有酵素産物の純度は、上記の手順を用いて、全ての同定されたプロテアーゼピーク中のタンパク質量で割った酸安定性プロテアーゼピーク中のタンパク質量として計算される。

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、37 の温度、及びpH 2~pH 11の範囲のpH値での、2時間のインキュベーション後の、4つのプロテアーゼ（バチルスsp. NCIMB40484由来のズブチリ

10

20

30

40

50

シンファミリーの1つの酸安定性プロテアーゼ(PD498)、及び3つの参照プロテアーゼ(Sub. Novo、及びSub. Novo(Y217L)(共にバチルス・アミロリクエファシエンス由来)、及びSAVINASE(商標))の、pH-安定性曲線、すなわち残留プロテアーゼ活性を示す；当該活性はpH9.0、及び5での2時間のインキュベーション後の残留活性に関連する。

【図2】 図2は、pH3~pH11の間のpH-活性曲線、すなわちプロテアーゼ活性を示し、これは同じ4つのプロテアーゼの至適pHでのプロテアーゼ活性と関連する。

【図3】 図3は、15から80の間の、pH9.0での温度-活性曲線、すなわちpH9.0でのプロテアーゼ活性を示し、これは同じ4つのプロテアーゼの至適温度でのプロテアーゼ活性と関連する。

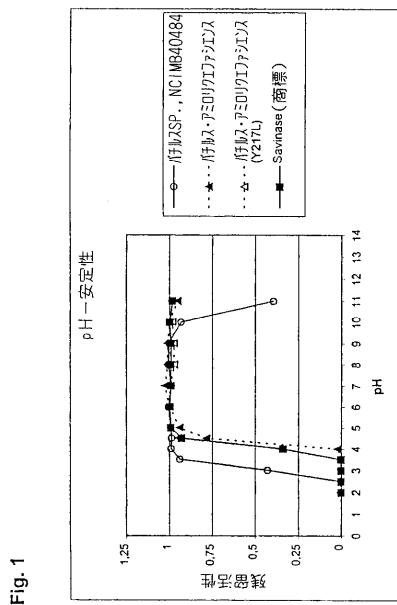
10

【図4】 図4は、図1に類似しているが、バチルス・アルカロフィラスNCIMB10438、フサリウム・オキシスポラムIFO 4471、パエシロマイセス・リラシナスCBS 102449、アスペルギルスsp. CBS 102448、アクレモニウム・クリソゲナムATCC 48272、及びアクレモニウム・キリエンスATCC 20338由来のズブチリシンファミリーの、6つの他の酸安定性プロテアーゼについてのpH-安定性曲線を示す。

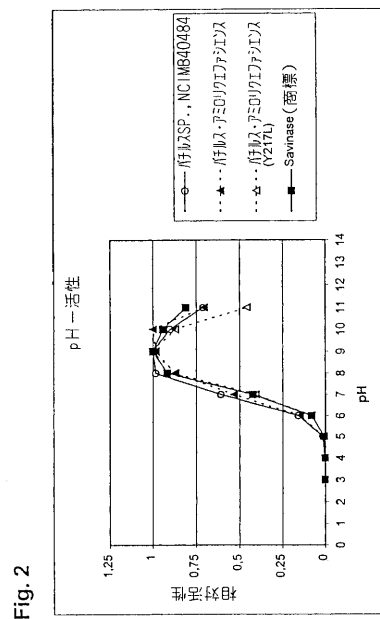
【図5】 図5は図2に類似しているが、図4と同じプロテアーゼについてのpH-活性曲線を示す。

【図6】 図6は、図3に類似しているが、図4と同じプロテアーゼについての、pH9.0での温度-活性曲線を示す。

【図1】



【図2】



【 図 3 】

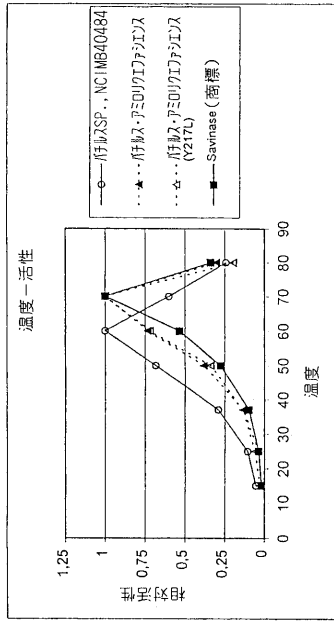


Fig. 3

【 図 4 】

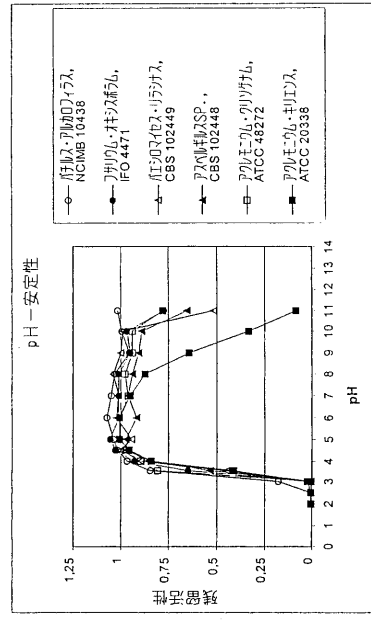


Fig. 4

【 図 5 】

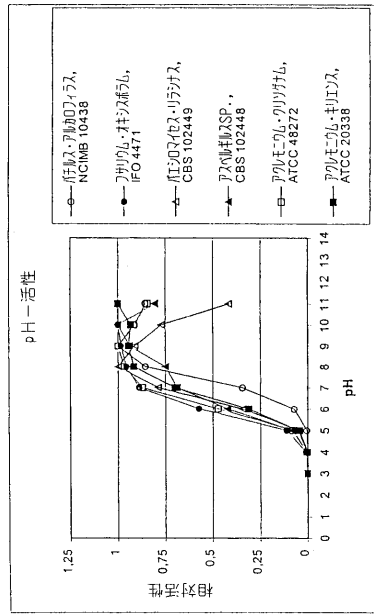


Fig. 5

【 図 6 】

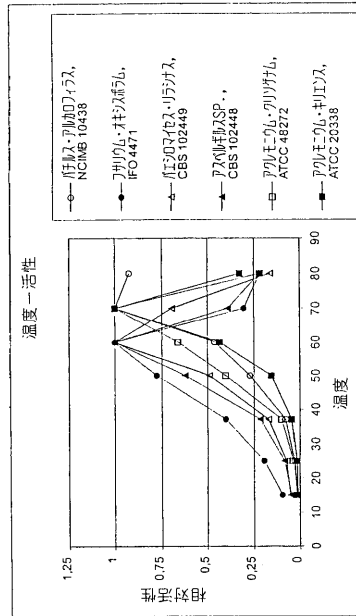


Fig. 6

【配列表】

0004933013000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 オエステルガード, ペーター ラーベク  
デンマーク国, デーコー - 2 8 3 0 ビルム, クバエデバイ 1 1 1
- (72)発明者 ショエホルム, カーステン  
デンマーク国, デーコー - 3 4 5 0 アレロエズ, アレロエズバイ 1 7
- (72)発明者 クルエンター, アンナ - マリー  
ドイツ連邦共和国, 7 9 5 4 1 ローラハ, イム レ 2アー

審査官 村田 泰利

- (56)参考文献 国際公開第95/028850 (WO, A1)  
特開平08-242777 (JP, A)  
特開平11-127797 (JP, A)  
国際公開第96/005739 (WO, A1)  
国際公開第95/021540 (WO, A1)  
国際公開第99/053038 (WO, A1)  
P. E. KOLATFUKUDY, J. D. LEE, LINDA M. ROGERS, PETER ZIMMERMAN, SARAH CESELSKI, BARRY FOX, BARRY STEIN, AND EDWARD A. COPELAN, Evidence for Possible Involvement of an Elastolytic SerineProtease in Aspergillosis, INFECTION AND IMMUNITY, 米国, 1993年 6月, Vol. 61, No. 6, p. 2357-2368  
Bonants PJ, Fitters PF, Thijs H, den Belder E, Waalwijk C, Henfling JW., A basic serine protease from Paecilomyces lilacinus with biological activity against Meloidogyne ha pla eggs, Microbiology, 英国, 1995年, Vol.141, p.775-784  
JOOP C. VAN DER LAAN, GIJS GERRITSE, LEO J. S. M. MULLENERS, RUUD A. C. VAN DER HOEK, WIM J. QUAX, Cloning, Characterization, and Multiple Chromosomal Integration of a Bacillus Alkaline Protease Gene, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 米国, 1991年 4月, Vol. 57, No. 4, p.901-909

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A23K 1/00-3/04

C12P 21/00

C12N 9/56

UniProt/GeneSeq

PubMed

Cinii