〔19〕中华人民共和国专利局

[11]公开号 CN 1035130A

〔12〕发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 88100803.6

[51] Int.Cl⁴
C12P 1/04

〔43〕公开日 1989年8月30日

[22]申请日 88.2.8

[71]申请人 米歇尔·胡亚里曼
地址 法国巴黎三角州路10号
共同申请人 多明妮·胡亚里曼
丹尼斯·胡亚里曼
让-诺埃尔·胡亚里曼
埃尔韦·胡亚里曼
[72]发明人 米歇尔·胡亚里曼

[74]专利代理机构 中国专利代理有限公司
代理人 杨厚昌

A23K 1/16 //(C12P 1/04,C12R 1:465)

说明书页数: 7 附图页数:

[54]发明名称 刺激胰腺活性的一种新的蛋白分解复合物的生产方法及其在畜牧业中的应用

[57]摘要

本发明涉及:

——种新的蛋白分解复合物的生产方法,此蛋白分解复合物是用一株新霉素链霉菌(Streptomyces fradiae),在培养基pH保持在7和7.5之间经过培养之后生成的,然后在一种澄清剂存在条件下过滤,再通过一种特异膜超滤,提取所述之复合物,最后进行雾化加工;

——如此获得的新的蛋白分解复物;

——其畜牧业应用,这是由于它对胰腺活性的刺激作用.

权　利　要　求　书

1.一种蛋白分解复合物的生产方法，此复合物是在一株新霉素链霉菌的作用下经发酵后生成的，其特征在于，在培养基内加入了一种无机酸或有机酸溶液，以保持 pH在7.5 和7.0 之间，在加入一种澄清剂的条件下过滤，然后在一种孔径阈值相应于分子量2,000 和12,000之间的膜上超滤，进行蛋白分解复合物的提取，取后再经过雾化加工。

2.一种根据权利要求1 的方法，其中新霉素链霉菌株是WAKSMAN 3535模式株，存放于ATCC内，存放号为10.745。

3.一种根据权利要求1 的方法，其中，在培养基内加入3 N盐酸以调节 pH。

4.一种根据权利要求1 的方法，其中超滤膜是聚砜膜，由MILLIPORE 公司销售，商品名为 PTGC。

5.根据权利要求1 的，从新霉素链霉菌获得的蛋白分解复合物。

6.根据权利要求5 的蛋白分解复合物，其效价至少相当于2000U. A./mg 。

7.根据权利要求5 或权利要求6 的蛋白分解复合物，由蛋白酶Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ型组合 ，不包含蛋白 酶 Ia、Ib 型和肽酶，其中的蛋白酶Ⅱ型至少代表40% 的蛋白分解总活性，蛋白酶Ⅲ型或Ⅳ型每种至多代表30% 的蛋白分解总活性。

8.根据权利要求5-7 中任一项的蛋白分解复合物在动物饲料添加剂中的应用。

9.供动物用的组合饲料，其中根据权利要求5-7 中任一项的蛋白分解复合物的量，相应于蛋白分解活性为40-160U. A./g 。

10. 供哺乳类动物幼畜断乳期用的组合饲料，其中，根据权利要求5-7 任一项的蛋白分解复合物的量，相应于蛋白分解活性为40-160U.A./g。

11．供怀孕期或授乳期母畜用的组合饲料，其中，根据权利要求5-7中任一项的蛋白分解复合物的量，相应于蛋白分解活性为40-160 U.A./g。

12．供怀孕期或授乳期母兔或者母猪用的组合饲料，其中，M．A．T至少达16%，并且，根据权利要求5-7 中任一项的蛋白分解复合物的量，相应于蛋白分解活性为40-160 U．A./g 。

13．供断奶期间或断奶后仔猪用的组合饲料，其中，M．A．T至少达20%，并且，根据权利要求5-7 中任一项的蛋白分解复合物的量，相应于蛋白分解活性为40-160 U．A./g 。

说　　明　　书

刺激胰腺活性的一种新的蛋白分解复合物的生产方法及其在畜牧业中的应用

申请人曾在他的法国专利№2034559 中描述过一种从新霉素链霉菌(Streptomyces fradiae)生产蛋白分解复合物的方法，以及这些复合物在畜牧业中可能具有的特殊作用。

实验表明，应用此专利年所得出的结果一般都是肯定的，但不规律或不够充分，以致这些复合物的使用受到很大限制。

本申请旨在描述一种能获得一种新的、特定的有更精确固定组成的复合物的方法，并确定使此新的复合物有规律地给与畜牧业以某些重要改进的条件。

本申请还涉及根据本方法获得的新的蛋白分解复合物。

SH IONOG I公司在其英国专利№1133579 中曾说明，新霉素链霉菌至少能生产5 种蛋白酶和2 种肽酶,5种蛋白酶分别用 Ia 、 Ib 、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ表示。申请人同时还从新霉素链霉菌中获得了另一些酶，这些酶实际上与 SH IONOG I的专利所描述的酶属同一类型，有着同样的普通特性。为易于说明起见，本申请采用了与上述专利同样的罗马数字来标明这些酶。

申请人曾经证实，只由蛋白酶Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型组合的复合物引起肠粘液的粘度中等降低，这是在他的原始专利中规定了的，并且这些复合物一般在畜牧业中所得出的结果是肯定的，但不规律或不够充分；在所有的这些复合物中间只有特定的其蛋白酶Ⅱ型的含量高于Ⅲ型或Ⅳ型的复合物，才可以有规律地给予畜牧学特性的重大改进。

申请人还曾证实，由5 种类型的蛋白酶和2 种类型的肽酶组成的总复

合物，引起肠粘液粘度的过分降低，并且对粘液有破坏性；因此，不可以将这些复合物用于畜牧业中。

所以，人们曾设法获得特定的，只由蛋白酶Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型组合的复合物，其中以蛋白酶Ⅱ型占优势。

生产方法

根据本发明的复合物是在下列条件下获得的：

发酵

利用一株新霉素链霉菌，例如存放在美国菌种保藏中心（缩写：ATCC），存放号为10.745的WAKSMAN3535模式株。通过经典的分离技术，在琼脂培养基上定期进行菌株的更新，以去掉偶尔出现的蛋白分解活性低的某些自生突变株。也可以用经典诱发突变的技术改良此菌株，以便提高其蛋白分解活性。

首先用细颈玻璃瓶震荡培养，然后在一中间发酵罐里制备此菌株的前培养物，接着再将前培养物接种到工业发酵罐内。生产培养基可由下列成分组成：大豆粉15g/l；葡萄糖30g/l；磷酸氢二钾1g/l；碳酸钙10g/l；灭菌后，pH约为7.0；发酵温度固定在28℃，并按培养基单位容积每分钟通入0.3 单位容积的无菌空气。

培养基 pH初始时为7.0 左右，培养初期开始下降，经过约10小时发酵后，培养基 pH下降至6.5；随后又迅速上升，约经20小时发酵后达到7.5，然后继续缓慢上升，最终达到8.2 。

已证实，至关重要的是自动加入某种酸性溶液，例如3 N盐酸，使pH保持在7.5 和7.0 之间，这就可以：

—避免菌丝体断裂以免在培养基内释放某些次生代谢产物、蛋白酶Ia 及 Ib 型和某些肽酶；这些次生代谢产物以及这些酶便仍然保留在细胞内；

—增加蛋白酶Ⅱ、Ⅲ、和Ⅳ型的产量，这些酶基本上都是胞外酶；

—获得蛋白酶Ⅱ型产量特别巨大的增长。

发酵持续时间可能在72至96小时之间变化,并且培养基的最终效价约为15,000安森单位(Unités Anson)/ml；因而大大超过法国专利№2034559 所述的3000安森单位/ml 。

在这里把1 安森单位(缩写: U. A.)定义为，定量的酶在变性的血红蛋白存在条件下，于25℃ ,pH7.5,保温10分钟，由此底物释放出1μg 酪氨酸的当量，用分光光度计测定在280nm 波长下三氯醋酸非沉淀性滤液的光吸收

提取。

通过澄清过滤，将菌丝体与生产培养基分离。

用一种较新的超滤法提取复合物，代替了用分离酶的经典技术(连续沉淀，过柱) 提取复合物。

曾研究过什么样的超滤膜才能导致最好收率；具备一个相应于30,000分子量的孔径阈值的膜，由于有50% 以上的复合物可以通过而不适用；具备一个相应于1,000 分子量的孔径阈值的膜，不能使复合物与一些低分子量次生代谢产物分离，所以也不适用；业经证实，具备一个相应于2,000和12,000分子量之间的孔径阈值的膜才适合使用；例如MILLIPORE 公司出售的聚砜膜就可以使用，这种商品名为PTGC的膜的孔径阈值相应于10,000分子量。

超滤获得浓缩物，接着进行雾化加工。

最后获得的复合物呈粉状，浅淡灰褐色，不算雾化前后偶尔加入的诸如经过高度干燥的淀粉之类的隋性支持物，其效价至少为2,000 U. A./mg。

蛋白分解活性的总收率约为70% ，高于通过连续沉淀或过柱法而从工业上获得的收率。

提要

要从一株新霉素链霉菌中获得所需的蛋白分解复合物，宜加入一种无机酸或有机酸溶液，保持培养基 pH在7.5 和7 之间，然后在一种澄清剂

存在条件下过滤，再用一种孔径阈值相应于2,000 和12,000之间的分子量的膜进行超过滤，提取蛋白水解复合物，最后进行雾化加工。

特别宜于使用存放于ATCC内的,存放号N.10745 的WAKSMAN 3535模式株作为新霉素链霉菌菌株，宜于用3 N盐酸使培养基 pH保持在7.5 和7 之间，并且宜采用商品名为PTGC、由MILLIPORE公司销售的一种聚砜膜作为超过滤膜。

新复合物的特性

·具有除去蛋白酶 Ia, Ib 型以及肽酶的蛋白酶Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ型(由酶电泳测定)；

·蛋白酶Ⅱ型占优势，它至少具有蛋白分解总活性的40% ，而蛋白酶Ⅲ型或Ⅳ型每种至多仅具有此总活性的30% 。

组成这种新复合物的蛋白酶的特性

·蛋白酶Ⅱ型的分子量为18,000左右，等电点为9.0 左右；于 pH 8.0 电泳，以相对缓慢的速度朝阴极方向移动。

·蛋白酶Ⅲ型的分子量为14,000左右;等电点为9.0 左右;于 pH8.0 电泳，以中等速度朝阴极方向移动；

·蛋白酶Ⅳ型的分子量为16,500左右；等电点为9.0 左右；于 pH 8.0 电泳，以相对快的速度朝阴极方向移动。

在畜牧业中的应用

按本发明所述之复合物应用于畜牧业中，一旦这些应用符合下列条件时会获得最理想的结果：

使用粗蛋白含量高的饲料

业经证实，复合物刺激动物生长，与产生脂肪比较，趋于优先生产蛋白质。例如曾试验观察到，经处理的小牛和猪肉块由于肌肉多、 脂肪少，所以常被从优确定品级，但同时也观察到这些改良是不规律的。

于是便有假设认为，复合物这种刺激蛋白质合成代谢的趋向只是在所

用的饲料含有足够量的粗蛋白条件下才能充分显示出来。实验实际肯定了，为要有规律地获得对蛋白质合成代谢显著的刺激作用，要遵循的实验条件之一在于利用一种粗蛋白相对丰富的饲料，即总含氮率较高的物质（缩写：M．A．T．）。

例如，此高比率M．A．T．应为：

饲养雏鸡用的饲料≥23%

小牛或羊羔哺乳期用的饲料≥22%

仔猪断乳期用有饲料≥20%

仅供母猪怀孕期和授乳期用的饲料≥16%

使用这样一些饲料一般说不符合当前实际，因为：

—动物不总是能够全部同化含有高比率M．A．T．的饲料；那么没有消化的蛋白质就会由于蛋白分解性细菌的过量生长发育造成肠道区系的不平衡，并造成腹泻频率的增加。使用复合物就能准确地消除这些危险，因为它赋予动物以有效地同化高比率M．A．T饲料的能力。

—高比率M．A．T饲料价格高于普通饲料，用复合物作为其添加剂，则价格还要高。可是，这种价格提高会得到补偿，因为复合物可以容许使用一种能量含量低于目前标准的饲料。随着畜牧学特性的巨大改进，无论如何，经济上总的经营结算表仍然是十分有利的。

哺乳类动物在怀孕期、授乳期和断乳期用的饲料

观察表明，在本专利申请书中描述的特定复合物刺激胰腺外分泌物活性，这从法国专利№2034599 来看，似乎是新的。在用大鼠实验期间，通过大量增加胰管分泌的胰腺内全部酶的浓度，此种刺激作用表现得尤为突出；淀粉酶的浓度增加到50%，胰蛋白酶原及胰凝乳蛋白酶原增加到70%，脂肪酶增加到80%。所以，本专利申请书所描述的这种特定复合物应被视为一种新的物质，具备一些新的和未意料到的特性。

由于这种对胰腺外分泌物活性的刺激作用，人们提出假设，当胰腺出

现有缺陷的危险时（母畜怀孕期终结时的情况），和胰腺不得不进行某种非寻常的生产工作（给许多幼畜喂奶的母畜情况）时，或提供某种非寻常的适应工作（哺乳类动物幼畜断乳期间的情况）时，这种复合物就特别有效。下列实例是与本工作假设相一致的：

a)母畜怀孕期终结时由于其子宫容积的巨大扩张，压迫了所有的消化器官，所以它们的胰腺常常是有缺陷的，把复合物加入到配给这些母畜的饲料里，就可以重新建立起一种良好的胰腺功能，而后，就可以使刚生下来的幼畜体重有所增加。

例如，在仅供母猪怀孕期或授乳期使用的，具有16% M．A．T比率的一种饲料内，按120 U．A./g 比率定量加入复合物，可使刚出生的幼畜体重增加17% ：15kg 代替12.8kg（10.7 头每头体重1.4kg 的仔猪代替10.2头每头体重1.25kg的仔猪）。

b)给许多幼畜授乳的母畜，日饲料消耗量必然迅速增加：母畜在怀孕期终结和授乳期第八天之间，日饲料消耗量应增加2.5 倍（大雌鼠45g 左右代替18g，雌兔350g代替140g，母猪6kg 代替2.4kg）。

因而，这些尚处在授乳期的母畜胰腺必然要付出可观的附加工作，恰在这些条件下，复合物的作用表现得最为明显。

例如在仅供怀孕期或授乳期母猪用的，具有17% M．A．T比率的一种饲料内，按120 U．A./g 比率的定量加入复合物，可使断乳21天的幼畜体重增加25% ：54kg 代替43kg（9.4头每头5.7kg的仔猪代替9.1头每头体重4.7kg 的仔猪）。

在相似条件下进行的、只不过断乳期28天代替21天的另一个试验中，幼畜体重增加同样也是25% 左右：断乳21天的52kg代替41kg（9.7头每头体重5.4kg 的仔猪代替8.5 头每头体重4.8kg 的仔猪），断乳28天的69kg代替55kg（9.7头每头体重7.1kg 的仔猪代替8.5 头每头体重6.5kg 的仔猪）。

幼畜体重的这种增加是与母猪保持良好状况所必须饲料消耗量的下降

并行的，整整一年，饲料消耗量下降了10% 左右(1,000kg左右代替1,100 kg。

c)哺乳类动物幼畜在断奶期间必然从食用母奶型向食用组合饲料型过渡，而且它们的胰腺也必须适应这一重大改变。这样，把复合物加入到这些组合饲料中就会使这种适应更加容易。

例如，一种供体重5 和10kg之间的断乳期仔猪用的，具有23% M. A. T的饲料,按120 U. A./g 定量加入复合物，可以获得体重日均增量(Gain de Poids Moyen Quotidien)15% 的比率(216g 代替188g),而饲料消耗指数(L' Lndice de Consommation) 下降15% (1.59 代替1.83)。

复合物在幼畜断乳时所起的作用不仅仅在于仔猪的情况，而且在小兔和反雏动物幼畜(山羊羔、小绵羊、小牛) 中也能够起到重大作用。这些动物在复合物的作用下，体重日均增量可以达到40% (5周龄小兔在断乳后的一周内,47g代替33g,2 月龄小牛在断乳后的一个月内797g代替573g)。

确定可以使用的极限定量

业经证实，为了有规律地得到一些重大改进，应按范围相当窄的定量使用复合物，定量在40-160U. A./g 。

在饲喂授乳期母猪的情况下所使用的复合物定量为120 U. A./g ，仔猪幼畜断奶21天的体重增加了25% 。如果将定量确定在200 U. A./g ，仔猪幼畜的体重增加只有4 % :49kg 代替47kg，或是8.2 头每头体重6.0 kg的仔猪代替8.4 头每头体重5.6kg 仔猪。

在饲喂仔猪的情况下，所用的定量是120 U. A./g,畜牧学特性的改进比率为15% 。如果将这一定量确定在200 U. A./g ，那么特性的改进就变得没有规律了；经3 周的试验后，改进率最多仅为15% ，而经过5 周的试验后，竟然毫无改进。