



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96190502.6

[43] 授权公告日 2003 年 1 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1099841C

[22] 申请日 1996.5.15 [21] 申请号 96190502.6

[30] 优先权

[32] 1995.5.15 [33] EP [31] 95201266.4

[32] 1995.9.8 [33] EP [31] 95202442.0

[86] 国际申请 PCT/EP96/02129 1996.5.15

[87] 国际公布 WO96/36244 英 1996.11.21

[85] 进入国家阶段日期 1997.1.14

[71] 专利权人 吉斯特·布罗卡迪斯股份有限公司

地址 荷兰代尔夫特

[72] 发明人 R·F·比德克 A·K·基斯

[56] 参考文献

EP0359425A 1990.03.21 C12N15/55

GB2267033A 1993.11.24 A23K1/16

GB2267033A 1993.11.24 A23K1/16

GB2267033A 1993.11.24 A23K1/16

审查员 闫心奇

[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 张 闽

权利要求书 2 页 说明书 18 页

[54] 发明名称 磷脂酶在动物饲料中的应用

[57] 摘要

本发明公开了改善饲料利用效率和/或促进动物生长的方法，其中给动物饲喂包含含有饲料物质和现成性磷脂酶添加剂的组合物的食料。所述组合物还优选至少含有一种磷脂。所述组合物被用于改善脂肪消化力及促进动物的生长。磷脂优选为卵磷脂，优选的磷脂酶为哺乳动物磷脂酶 A2。在优选实施方案中，利用在适宜的宿主(如微生物或转基因植物)中表达酶的重组 DNA 技术来生产磷脂酶。

1. 改善饲料利用效率的方法, 其中给动物饲喂含有一种组合物的食料, 所述组合物是通过一种包括把现成性磷脂酶添加剂与饲料物质相混合的方法获得的。

2. 促进动物生长的方法, 其中给动物饲喂含有一种组合物的食料, 所述组合物是通过一种包括把现成性磷脂酶添加剂与饲料物质相混合的方法获得的。

3. 改善饲料利用效率的动物饲料组合物, 它是通过一种包括把现成性磷脂酶添加剂与饲料物质相混合的方法获得的。

4. 促进动物生长的动物饲料组合物, 它是通过一种包括把现成性磷脂酶添加剂与饲料物质相混合的方法获得的。

5. 依据权利要求3或4的组合物, 其含有磷脂。

6. 依据权利要求5的组合物, 其中磷脂含有卵磷脂。

7. 依据权利要求3-6中任意一项的组合物, 其中磷脂酶得自哺乳动物、植物或微生物。

8. 依据权利要求7的组合物, 其中磷脂酶为选择自牛、猪、小鼠、大鼠及人磷脂酶A2的哺乳动物磷脂酶A2。

9. 依据上述权利要求中任意一项的组合物, 其中磷脂酶由重组DNA在宿主生物体中的表达而得到。

10. 依据权利要求9的组合物, 其中宿主生物体为选自细菌、酵母及丝状真菌的微生物。

11. 依据权利要求10的组合物, 其中微生物为选自芽孢杆菌属、埃希氏菌属、酵母属、克鲁维酵母属、汉逊酵母属、毕赤酵母属、Yarrowia、假丝酵母属、曲霉属、木霉属、青霉属、毛霉属、镰孢属及腐质霉属中的一属。

12. 依据权利要求11的组合物, 其中微生物为大肠杆菌、酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母或黑曲霉。

13. 依据权利要求3-9中任意一项的组合物, 其包括含有得自转基因

植物的磷脂酶的植物材料。

14. 依据权利要求 13 的组合物，其包括含由重组 DNA 表达而得到的磷脂酶的转基因植物的种籽。

15. 依据权利要求 5 - 14 中任意一项的组合物，其含有 1,000-5,000,000 磷脂酶国际单位/千克磷脂。

16. 依据上述权利要求中任意一项的组合物，其中磷脂酶添加剂浓度范围为 100 - 1000 国际单位/千克饲料。

17. 生产依据上述权利要求中任意一项的动物饲料的方法，它包括把现成性磷脂酶与饲料物质相混合。

18. 依据权利要求 17 的方法，它包括把现成性磷脂酶与饲料物质及至少一种磷脂相混合。

19. 依据权利要求 17 或 18 的方法，其中磷脂酶由重组而生产。

20. 依据权利要求 19 的方法，其中磷脂酶以转基因植物材料的形式而加入。

21. 依据权利要求 20 的方法，其中对转基因植物材料进行加工以得到磷脂酶。

22. 应用一种组合物来饲喂非反刍动物，所述组合物是通过一种包括把现成性磷脂酶添加剂与饲料物质相混合的方法获得的。

23. 依据权利要求 22 的组合物用途，其中所述的动物是非反刍小牛。

## 磷脂酶在动物饲料中的应用

本发明涉及酶在牲畜饲料中的应用。

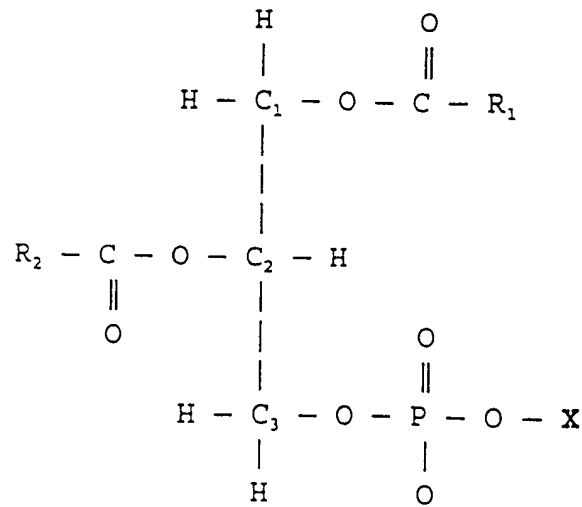
动物肠胃道中分泌出许多酶来消化食物。这些酶中的每一种都作用于一部分肠胃道特殊环境中的特殊成分。例如，胃蛋白酶在胃的酸性环境中是有活性的，而诸如胰凝乳蛋白酶和羧肽酶的其它蛋白酶则在小肠上端（pH6 - 7）处表现出活性。许多这类酶在被激活之前都需要一种前体。比如，胃蛋白酶只能在酸性环境中由胃蛋白酶原形成。胰凝乳蛋白酶和羧肽酶都是以无活性形式分泌的，并被蛋白酶胰蛋白酶所激活。

脂肪的消化是一个复杂的过程。动物食料中的大部分脂肪是以甘油三酯形式摄取的。这些甘油三酯是很难被肠完全吸收的，需要降解为甘油单酯及甘油二酯、甘油和游离脂肪酸。这种转化受到了由胰分泌的酶脂肪酶的催化。这种酶在水-油界面上是活性的。对于良好消化来说，在水包油型乳状液中具有很小滴的脂肪是必不可少的。乳化剂为表面活性物质，其可使脂肪在水相中分散。肠胃道中最重要的乳化剂是胆汁。胆汁由肝分泌，可贮存在胆囊中。胆汁含有胆汁酸及盐、胆固醇和磷脂等。胆汁成分与（剩余的）甘油三酯产物的混合物形成了小颗粒，即分子团。

这些分子团被扩散到空肠的上皮细胞，在这里分子团的内容物得到释放及吸收。在这些上皮细胞中再生出甘油三酯。它们与胆固醇、胆甾醇酯、磷脂和蛋白质一起形成了新的、水溶性、颗粒状的乳糜微粒。

磷脂例如卵磷脂在亦由胰分泌的磷脂酶 A 和 B 的作用下所酶降解。

卵磷脂是极性及中性类脂的混合物，其中极性类脂的含量至少为 60%。由于其疏水/亲水性质，极性类脂（及卵磷脂）被用作乳化剂。极性类脂包括（甘油）磷脂和糖脂。甘油磷脂的基本结构如下：



X = 胆碱

乙醇胺

肌醇

丝氨酸

氢

甘油磷脂基本上由在 C<sub>1</sub> 及 C<sub>2</sub> 位置具脂肪酸的甘油部分组成。用磷酸将 C<sub>3</sub> 位置酯化。该磷酸经常与醇基相连接，由此生成下列化合物：

- 磷脂酰乙醇胺 (PE; X = 乙醇胺)
- 磷脂酰胆碱 (PC; X = 胆碱)
- 磷脂酰丝氨酸 (PS; X = 丝氨酸)
- 磷脂酰肌醇 (PI; X = 肌醇)
- 磷脂酸 (PA; X = 氢)

只携带一个（而非通常的两个）脂肪酸残基的甘油磷脂称做溶血磷脂。

卵磷脂在包括食品及饲料在内的许多应用中被用作乳化剂。乳化剂是可使油液相在水相中发生分散的表面活性物质。乳化剂在同一分子中既含有亲水基团又含有亲油基团。亲水基团与亲油基团的比例（即 HLB 值）是乳化剂的性状标志。

脂溶性疏水乳化剂的 HLB 值范围为 0 - 低于 10，而水溶性化合物的 HLB 值为 10 以上 - 20。

把乳化剂（如卵磷脂）加入到动物饲料中可改善饲料的营养价值，或可造成液态饲料更好地发生分散作用。人们还知道在动物饲料中加入溶血

卵磷脂（商品名为 Lysoforte<sup>®</sup>，由 Kemin 公司销售），其可以改善乳化性质，引发更高的营养价值[Pluimveehouderij 24：20 - 21（1994年3月18日）]。

卵磷脂的乳化特性不仅是可以通过在干饲料中加入卵磷脂而在牲畜生产中得到开发，而且还可以在其它领域中开发：其中给动物饲喂含高比例脂肪的液态饲料。这些饲料主要是给小牛的母乳替代物和小猪的母乳替代物。卵磷脂的功能在于使得脂肪在已制备好的饲料中产生更佳分散作用。更佳分散作用可引起动物对脂肪消化力的改善。除此之外，卵磷脂还表现出对液态饲料中不溶性成分的沉积的有利效果。

近年来，饲料业已开始利用工业生产的酶来补充动物胃肠道中生产的酶。其实例包括肌醇六磷酸酶、 $\alpha$ -淀粉酶、蛋白酶以及多种植物细胞壁降解酶。然而，由于动物自身已在其小肠上端分泌出大量的这些酶类，因而在现有技术中尚没有在动物饲料中直接加入磷脂酶以达到促进动物生长目的的做法。

EP - A - 0 619079 公开了尤其使用磷脂作为加入反刍动物饲料中含生物活性物质的颗粒的涂覆层。该涂覆层起到了保持瘤胃中生物活性物质的作用，使得可利用皱胃后消化器官进行随后的消化及吸收。EP - A0 619079 还公开了磷脂酶能有选择地掺入保护性涂覆层中以帮助其水解作用，然而，EP - A0 619079 并未公开或建议为了促进生长或改善饲料利用效率而在饲料中加入该磷脂酶。

GB - A - 2 267033 涉及了对生长的促进，而 GB - A - 2 267033 讲授了在青贮饲料中加入含有链霉菌菌株以及磷脂卵磷脂的套料（kit）。该文件认为，链霉菌菌株能在青贮饲料发酵期间产生磷脂酶 A2。而后，将上述套料限于动物饲料中，该饲料生产过程包括与由上述链霉菌属菌株引起的磷脂酶生产相一致的发酵阶段步骤。因此，我们仍需要有一种广用性、多用途及现成的磷脂酶饲料添加剂，以用来改善饲料利用效率和/或促进动物的生长。

本发明提供了改善饲料利用效率的方法，其中，给动物饲喂一种包含含有饲料物质及现成性磷脂酶添加剂的组合物的食料。

本发明还提供了促进动物生长的方法，其中，给动物饲喂一种包含含有饲料物质及现成性磷脂酶添加剂的组分的食料。

本发明进一步提供了动物饲料组分，它含有饲料物质和现成性磷脂酶添加剂。

此外，本发明提供了生产动物饲料的方法，其包括：在微生物或转基因植物中重组性生产磷脂酶，并将由此得到的磷脂酶与饲料物质相混合。

本发明公开了外源添加性及现成性磷脂酶在动物饲料中的应用，以改善磷脂在胃肠道中的乳化特性并因此改善饲料利用效率及/或促进动物的生长。这里的促进动物生长定义为单位时间内增重意义上（生长速率）的促进生长，和/或饲料效率（饲料转化比例）意义上的促进生长。

可用于本发明中的磷脂酶包括：磷脂酶 A1（EC.3.1.1.32）、磷脂酶 A2、磷脂酶 B（溶血磷脂酶）、磷脂酶 C 和磷脂酶 D。

本发明尤其公开了加入了磷脂酶 A2（EC 3.1.1.4）的饲料的应用。磷脂酶 A2 可由分离自诸如猪胰腺中而作为诸如胰岛素生产的一种副产物而生产出来。另外，磷脂酶 A2 还可以通过异源基因在微生物如乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）中的表达而重组性生产。可通过发酵及回收该酶用的下游处理方法而从上述微生物中得到该种酶。

把磷脂酶外源性添加到含卵磷脂的动物饲料中的另一种可能做法是加入含磷脂酶的转基因植物材料（优选为转基因种籽），其中通过异源基因表达来合成磷脂酶，为了达到这个目的，在适当的植物表达信号（例如组织特异性启动子，如种籽特异性启动子）的控制下，在植物表达载体中对编码磷脂酶的基因进行克隆。含有磷脂酶基因的表达载体随后转化到植物细胞中，据再生为全植物而对转化的植物细胞进行选择。由此得到的转基因植物生长并收获，将含有异源磷脂酶的植物的那些部分加入动物饲料中，既可以原样加入也可以进一步进行加工处理。异源磷脂酶可含于转基因植物的种籽之中，或可含于植物的其它材料之中，如根、茎、叶、木材、花、树皮及/或果实中。

因此，磷脂酶添加剂可理解为这样一种磷脂酶：它并非饲料主要物质的天然成分，也不以其天然浓度存在，例如，把磷脂酶与饲料物质分别加

入饲料中，可单独添加也可以同其它饲料添加剂组合，或者磷脂酶为饲料物质之一的组成部分，但是通过重组 DNA 技术而生产出来。

此处的现成性磷脂酶添加剂定义为一种不能在动物饲料中原位生产的添加剂。现成性磷脂酶添加剂可直接饲喂动物，或优选为与其它饲料成分混合后直接饲喂。现成性磷脂酶添加剂确实包括这样的磷脂酶，其处于非活性的前形（pro-form），但可在 G1 道中被激活，例如通过解蛋白加工作用。

优选的饲料含有磷脂，优选为存在于原材料中的卵磷脂，其实例有全脂大豆、全脂油菜籽、大豆油、油菜籽油或其它任何含油种籽或外源添加性磷脂酶之外的富含卵磷脂的油，其优选为（微生物生产的）猪磷脂酶 A2。不过，该饲料不必含有磷脂，因为胰腺已经分泌磷脂了。

本发明的另一个方面是：把磷脂酶[优选为（微生物生产的）猪磷脂酶 A2]掺入含卵磷脂的奶替代物中喂幼龄动物。这样做可改变幼龄动物对脂肪的消化能力。

本发明还有一个方面：将磷脂酶掺入鱼及甲壳动物的食料中以改善其生长和饲料转化比例。

用诸如磷脂酶 A2（PLA<sub>2</sub>）进行处理，即磷脂的 HLB 值从 7 提高到大约 8 或 9，这要归因于磷脂酶 A2 处理对卵磷脂乳化性质的有益效果。

猪磷脂酶 A2 在 pH6.0 以下并不表现出体外活性。单胃动物 G1 道中的主导 pH 值在喙囊及胃中低于 6.0。

人们不能预料添加磷脂酶 A2 会有什么有益效果，因为：

a) 由于主导 pH 和酶的 pH 依赖性之间不匹配，在喙囊及胃中添加磷脂酶预期无任何活性；

b) 动物自身在其小肠上部分泌出大量的该种酶，在那里主导 pH 与该酶的依赖性相符合。

令人惊奇的是，发现添加外源性猪磷脂酶 A2 可显著改善小鸡的饲料转化比例（实施例 3）。

除单胃动物外，磷脂酶 A2 还可有益地用于多胃动物。例如，在高产乳牛的哺乳期早期，有意在其食料中加入高量脂肪来部分补偿高值的负能量

平衡。从文献中可得知，乳牛 G1 道中脂肪酸的消化能力作为特别是饲料组成和脂肪来源的函数而有所变化。人们发现，对于在棕榈酸中高含 500 克饱和脂肪 (C16: 0) 的食料以及在硬脂酸中高含 1000 克脂肪酸 (C18: 0) 的食料而言，脂肪酸的消化能力变动为 87% - 64% (Weisbjerg 等人, Acta. Agric. Scand, Section A, Animal Science 42 P. 115-120, 1992)。

乳牛对脂肪酸消化力的大部分变化可通过小肠中消化力的变化予以解释 (Ibid, p. 114-120)。磷脂酶 A2 在乳牛小肠中的作用可能会提高脂肪酸的消化能力。

诸如酶磷脂酶 A2 的蛋白质通常会在瘤胃中得到迅速降解。其结果是，这些蛋白质可以防止在瘤胃中发生降解作用的方式而传递到小肠中。本领域熟练人员可利用许多配方方法来保护酶不在瘤胃中失活。

人们还发现，通过添加磷脂酶特别是猪磷脂酶 A2 可明显改善非反刍的小牛对脂肪的消化能力 (实施例 4)。

在鱼及甲壳动物的食料中通常也可以补充较高浓度的磷脂酶以达到可接受的生长、健康及饲料转化效果。依据本发明，也可以在这些食料中加入磷脂酶以进一步改善生长和饲料转化比例。

本发明的进一步方面为：在动物饲料中添加磷脂酶及选择性添加的磷脂可减少要掺入饲料中的昂贵的饲料配料量，例如维生素及/或着色剂。

加入饲料中的磷脂酶的浓度依磷脂的类型及浓度以及靶动物而有所不同，通常为约每千克磷脂 1,000-5,000,000 国际单位 (IU，如实施例 1 所定义)。每千克磷脂优选加入 10,000-500,000IU。一般来说，动物饲料每千克约含 1 - 2 克磷脂。结果，1-10,000IU/kg 或优选为 10 - 1,000IU/kg 饲料是适当的，不过最优选的范围为约 100 - 1,000IU/kg 饲料。接着，加入饲料中的磷脂酶剂量可据饲料中非通常性磷脂含量而加以调整。

本发明的优选实施方案中，磷脂酶是利用重组 DNA 技术得到的。可通过磷脂酶基因或 cDNA 在适宜的宿主生物体中异源表达或通过适宜内源基因的同源过度表达而重组生产出磷脂酶。

这里描述的本发明的具体实施方案应用了由异源基因在酵母乳酸克鲁维酵母中表达而产生的猪磷脂酶 A2。不过，熟练人员可理解到：由其它来

源得到的磷脂酶也可在本发明中发挥功能。这些磷脂酶可来源于其它哺乳动物（如小鼠、大鼠或人），对于它们而言，可通过本领域的技术而得到磷脂酶 A2 基因。另外，磷脂酶也可来源于哺乳动物之外的生物体，例如微生物或甚至植物磷脂酶。

相类似，用于生产本发明中所用磷脂酶的微生物并不仅限于酵母乳酸克鲁维酵母。除了乳酸克鲁维酵母之外，猪磷脂酶 A2 基因在大肠杆菌、酿酒酵母和黑曲霉中的成功异源表达已有过报导（由 Swinkels 等人综述，1993，*Antonie van Leeuwenhoek* 64, 187-201）。因此可以预期，本发明的磷脂酶的成功（异源）表达可在较宽范围的微生物中得到。用于该目的的优选微生物为芽孢杆菌属及埃希氏菌属的细菌、酵母属、克鲁维酵母属、汉逊酵母属、毕赤酵母属、*Yarrowia*、假丝酵母属的酵母，或者是曲霉属、镰孢属及木霉属的丝状真菌。

至于磷脂酶在转基因植物材料中（优选在种籽中）表达的方法，我们参考了国际申请 WO 91/14772（引入做为参考），其公开了酶在植物中（异源）表达的一般方法，包括酶的种籽特异性表达的方法。

熟练人员会理解，以转基因植物材料的形式加入磷脂酶（如含磷脂酶的转基因种籽）可能需要植物材料的处理，以得到酶，或至少改善其利用性。这样的处理技术可包括多种粉碎及研磨技术或热力学处理（如挤压或膨胀）。

本发明并不局限于能在青贮饲料发酵期间产生磷脂酶 A2 的链霉菌属菌株，此外还具有下述优点：

— 可包括任何磷脂酶在内。可以使用那些对待应用该酶的动物为内源性的磷脂酶，这将促进获得管理机构的产品许可

— 进一步能选择出最适合用作饲料添加剂的磷脂酶

— 避免为原位产生酶而必须发酵饲料的做法。这使得可以精确地控制饲料中磷脂酶添加量，这对在某些应用中考虑磷脂酶最佳浓度范围上是很重要的

— 其同样使得在配制酶添加剂及含该酶添加剂的饲料上具较大的灵活性

添加哺乳动物磷脂酶 A2 提供了对生长促进预想不到的高效果。

此处给出的实施例用于说明本发明，不以任何方式限制本发明的范围。

### 实施例 1

#### 猪磷脂酶 A2 (PLA<sub>2</sub>) 在酵母乳酸克鲁维酵母中的表达

编码猪磷脂酶 A2 蛋白质的基因之鉴定和分子克隆已由 de Geus 等人 (Nucl. Acid Res. 15, 3743-3759, 1987) 和 van den Bergh 等人 (Eur. J. Biochem 170, 241-246, 1987) 做过详细描述。

用这些特性清楚克隆之一 pCB08T (含有整体 PLA<sub>2</sub> cDNA 序列和乳酸克鲁维酵母特异遗传调控成分)，我们构建出表达盒 pKLAPLA-11，以便在酵母乳酸克鲁维酵母中得到猪 PLA<sub>2</sub> 的表达。由于 PLA<sub>2</sub> cDNA 序列及乳酸克鲁维酵母调控成分序列在公共数据库都可以调用，熟练人员就可以得到在乳酸克鲁维酵母中表达 PLA<sub>2</sub> 而构建表达盒所需的所有材料。

所有的标准从分子克隆技术 (如核酸的分离及纯化、核酸的电泳、酶的修饰、核酸的裂解及/或扩增，大肠杆菌的转化等等) 均可如文献所述进行 [Sambrook 等人 (1989) “分子克隆：实验室手册”，冷泉港实验室，冷泉港，纽约；Innis 等人 (编) (1990) 及 “PCR 方案，方法及应用指导” 学术出版社，SanDiego]。根据厂商提供的用户手册，可分别在 Applied Biosystems 380B DNA 合成仪和 373A DNA 测序仪上实施寡脱氧核苷酸的合成以及 DNA 的序列分析。

为了促使 pKLAPLA - 11 的构建。利用聚合酶链式反应 (PCR) 把第一个适当的侧生限制性位点介入成熟 PLAcDNA 序列的边界处。在 5' - 边界处 (也就是前 PLA<sub>2</sub> 蛋白质及成熟 PLA<sub>2</sub> 蛋白质的裂解位点)，SmaI 以及在 3' - 边界处 (也就是终止密码子的下游处)，XhoI 及 KpnI 限制性位点被同时介入。为了做到这点，全合成出两个寡核苷酸：

#### 寡聚物 1

成熟 PLA<sub>2</sub>

5' TGT CAT GCC CGG GCA TTA TGG CAG TTT CGT 3'

SmaI



den J, 等人, 1990, *Bio/Technol*, 8, 135-139) 以及人血清白蛋白 (HSA)。为表达 HSA, 质粒 pGBHSA-20 已由 Swinkels 等人, 1993 做过构建及描述 (*Antonie van Leeuwenhoek* 64, 187-201)。

对于 HSA 在乳酸克鲁维酵母中的表达, pGBHSA - 20 中的 HSA cDNA 序列受到了乳酸克鲁维酵母 LAC4 启动子的驱动。在 3' 末端, HSAcDNA 侧接于 LAC4 终止子序列。此外, 为了转化体的选择, pGBHSA - 20 含有 Tn5 磷酸转移酶基因, 其赋予了对由酿酒酵母 ADH1 启动子 (Bennetzen 和 Hall (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3018-3025) 驱动的抗生素 G418 的抗性 (Geneticin, BRL; Reiss 等人 (1984) *EMBO J.* 3, 3317-3322)。在 LAC4 启动子 pGBHSA - 20 的独特 SstII 位点处含有大肠杆菌载体 pTZ19R, 其用于在大肠杆菌中的扩增。在乳酸克鲁维酵母转化之前, 利用 SstII 消化和琼脂糖凝胶提纯从 pGBHSA-20 中去除大肠杆菌 pTZ19R 序列。在 LAC4 启动子的 SstII 位点线性化的 pGBHSA - 20 转化进乳酸克鲁维酵母导致通过同源重组而整合入基因组 LAC4 启动子中。

为了猪 PLA<sub>2</sub> 在乳酸克鲁维酵母中的表达, 把早前期 PLA<sub>2</sub> 序列适宜地融合入 pGBHSA - 20 中的乳酸克鲁维酵母乳糖酶启动子序列。在那里用 Sa/I 和 XhoI 消化 pGBHSA - 20, 通过分子克隆用 HSAcDNA 序列来代替 pKLAPLA - 5 的 Sa/I-XhoI DNA 片段。如上所述, 该 pKLAPLA-5 的 Sa/I-XhoI DNA 片段含有早前期 PLA<sub>2</sub> 编码序列。PLA<sub>2</sub> 的最终表达载体称为 pKLAPLA - 11。

酵母转化体由我们公开的专利申请 EP - A 0 635 574 所述的程序而产生, 它是根据 ItoH. 等人的方法 (*J. Bacteriol.* 153, 163-168, 1983)。pKLAPLA - 11 经 SstII 消化而在 LAC4 启动子中线性化。经在琼脂糖凝胶中分级分离并提纯而去除掉 pTZ19r 序列。将该 DNA 片段的 15μg's 转移至乳酸克鲁维酵母菌株 CBS 2360 及 CBS 683 中, 经 30 °C 下温育 3 天后从两菌株中得到 G418 抗性菌落。

最初选择出有限量的每一宿主菌株转化体来检查活性猪 PLA<sub>2</sub> 在培养基中的表达。把转化体接种于乳酸克鲁维酵母 YEPD 培养基中, 该培养基含有: 1% (w/v) 酵母膏; 2% (w/v) 胨; 2% (w/v) 葡萄糖和 50μg/ml

G418。30℃下培养3天后收集上清液，用胰蛋白酶处理样品后，利用下述卵黄活性检验法来测试活性PLA<sub>2</sub>的存在。前肽的裂解对将非活性前酶（由乳酸克鲁维酵母转化体产生）激活成活性、成熟PLA<sub>2</sub>来说是必不可少的。

所有的转化体似乎都可产生范围为5直到40U/ml的活性猪PLA<sub>2</sub>。

一个单位（IU）定义为：标准条件下每分钟产生1毫摩尔游离脂肪酸所需的酶量；标准条件为：卵黄底物（0.4%磷脂），pH8，40℃，6mM Ca<sup>2+</sup>。

### 实施例2

#### 稳定性酶制剂的生产

对乳酸克鲁维酵母液体培养基进行平板过滤处理，而后进行超滤。在具10mM CaCl<sub>2</sub>、pH8.0的条件下用0.3%胰蛋白酶处理超滤物，时间2.5小时，结果是去除了酶原的七肽以激活酶。

在pH4.0下加入作为防腐剂的苯甲酸和山梨酸，使剩余的胰蛋白酶在70℃下失活30分钟。终产物为棕褐色，含活性为10,000 IU/ml。

可通过进一步提纯和在低温下保存来改善该制剂的稳定性。在4℃下保持一个月之后未观察到酶活性的降低。

### 实施例3

#### 磷脂酶A2在动物饲料中的应用

用小鸡进行试验来测试磷脂酶A2的效力。第1—第5天中用标准饲料饲喂雄性小鸡（Ross）。在第5天时，从该组中进行选择并将鸡分笼。计算鸡的体重及其变化。每笼的平均体重及其偏差数都是相等的。一只笼中饲养15只鸡。鸡笼位于人工加热、通风及照明的鸡舍中。每只鸡笼的面积为0.98m<sup>2</sup>，具铁丝网地面。每天对鸡舍照明24小时。在试验进行期间，光照强度逐渐降低。温度从实验第一个星期的28℃逐渐降低为最后一个星期中的23℃。实验期间鸡舍单元的湿度约为60%。分别在第1及第14天利用喷药法对鸡进行疫苗接种来抗New Castle病。该实验持续33天，包括5天的预试验期及28天的试验期。

试验饲料随机喂给鸡。水随便饮用。

饲料为冷丸剂（温度控制在 65 ℃ 以下），直径为 3mm。

该试验包括以下处理：

- a) 玉米/小麦/大豆食料（负对照）
- b) 玉米/小麦/大豆食料 + 100 IU/kg
- c) 玉米/小麦/大豆食料 + 500 IU/kg

每个处理重复 6 次（每次试验总计为 90 只鸡）。检查增重及饲料转化情况。所使用的饲料组成如表 1 所示。

表 1 小鸡试验中玉米/小麦/大豆食料的组成。

成分	含量 (%)
玉米	25.0
小麦	15.0
大豆油	3.5
动物脂肪	2.0
木薯	11.68
大豆粉 (50 %粗蛋白质)	19.45
全脂烤大豆	10.0
鱼粉	1.0
饲料用肉粉,高油性	4.0
豌豆	5.0
维生素/矿物质预混物	1.0
石灰石	0.82
磷酸一钙	1.00
盐 (NaCl)	0.30
DL - 蛋氨酸	0.25
	100.00
ME 雏鸡 (MJ/kg)	12.55
粗蛋白质 (%)	22.1
粗脂肪 (%)	9.6
细胞溶素 (可得到) (%)	1.23(1.04)
蛋氨酸 + 半胱氨酸(可得到)(%)	0.91(0.79)

酶首先与载体相混合而加入该饲料中。

结果如表2所示。

表2 玉米/小麦/大豆食料中的磷脂酶A2对5天~33天龄的雏鸡在生长和饲料转化比例方面的效果。

	饲料摄入 g	生长 g	饲料转化比例
基础食料	2613	1445	1.81
食料 + 100 IU/ kg 饲料	2569	1458	1.76
食料 + 500 IU/kg 饲料	2526	1472	1.72

进行基本等同于上述试验的第二项试验，其中表3中所述的小麦/黑麦/大豆食料被用作基础食料。

该试验包括下述处理：

- a) 小麦/黑麦/大豆食料 (负对照)
- b) 小麦/黑麦/大豆食料 + 100 IU/kg
- c) 小麦/黑麦/大豆食料 + 500 IU/kg
- d) 小麦/黑麦/大豆食料 + 1000 IU/kg

所有其它参数如上玉米/小麦/大豆试验中所述。

表3 小鸡试验中的小麦/黑麦/大豆食料的组成

<u>成分</u>	<u>含量 (%)</u>
小麦	40.0
黑麦	10.0
大豆油	1.0
动物脂肪	6.0
木薯	4.28
大豆粉 (45.4%粗蛋白质)	22.0
全脂烤大豆	10.0
饲料用肉粉(58%粗蛋白质)	3.0
维生素/矿物质预混物	1.0
石灰石	0.94
磷酸一钙	1.20
盐 (NaCl)	0.26
L-赖氨酸 HCl	0.11
DL-蛋氨酸	0.21
	<b>100.00</b>
ME 雏鸡 (MJ/kg)	11.9
粗蛋白质 (%)	21.4
粗脂肪 (%)	10.5
细胞溶素 (可得到) (%)	1.23(1.05)
蛋氨酸+半胱氨酸(可得到)(%)	0.90(0.77)

首先将酶与载体混合而把酶加入该食料中。

结果如表 4 所示。

表 4 小麦/黑麦/大豆食料中磷脂酶 A2 对 5 天~33 天龄小鸡生长及饲料转化比例方面的效果

	饲料摄入 g	生长 g	饲料转化比例
基础食料	2752	1556	1.77
食料 + 100 IU/kg 饲料	2747	1568	1.75
食料 + 500 IU/kg 饲料	2733	1586	1.72
食料 + 1000 IU/kg 饲料	2724	1572	1.73

如表4所示,用于该特定小鸡食料中的磷脂酶浓度具有一最佳范围,即高于约100 IU/kg饲料和低于约1000 IU/kg饲料。对于其它系统可以存在着不同的最佳浓度范围,该范围可由常规的试验确定。

#### 实施例4

##### 磷脂酶A2在奶替代品中的应用

使用3组(每组5头) Friesian Dutch Holstein-Friesian 雄性小牛进行试验。

在预实验期间,饲喂以商用性奶替代品。14天后,将牛划分为接受3种处理,计算体重及体重变化。将牛喂养在各个牛栏中。牛栏自然采光,通风,温度约为18℃。

在14天中实验牛适应了其食料。而后,在连续5天中每天24小时定量收集牛粪。在实验期之前给牛套挽具。粪便就收集在联在挽具上的塑料袋中。每天称重一次粪便、汇集并在-20℃下保存。分析之前,对粪便进行充分混合并抽出子样品。

根据牛的体重按饲喂方案而单独喂养。所使用的奶替代品具下列组成:

	%
脱脂奶粉	58.5
脂肪	19.8
乳糖	17.6
淀粉, 维生素, 矿物质	4.1

ME		4450 kcal/kg
粗蛋白质	(N*6.25)	21.5%
粗脂肪		19.5%

饲喂之前用水掺混奶替代品粉，在约 40 °C 温度下饲喂。

根据该处理，脂肪由 18 % 牛脂、椰脂或猪油组成。以占脂肪含量的 10 % 的浓度加入卵磷脂。

将猪磷脂酶 A2 加入这些食料中，终浓度为 500 IU/kg 奶替代品。对脂肪的消化力进行测试。结果见表 5。

表 5 磷脂酶 A2 处理对非反刍小牛[食料中摄取 18 % 脂肪及 1.8 % 卵磷脂（脂肪含量的 10 %）] 对多种脂肪消化力的效果。磷酸脂 A2 的制备如实施例 2 所述，将 A2 以 500 IU/kg 奶替代品的终浓度加入食料中。

	无磷脂酶 A2	有磷脂酶 A2
牛脂	70.0%	73.1%
椰脂	95.6%	96.2%
猪油	79.4%	84.3%

### 序列表

#### (1) 一般信息

##### (i) 申请人:

(A) 名称 Gist-Brocades B.V.

(B) 街道: Wateringseweg 1

(C) 城市: Delft

(E) 国家: 荷兰

(F) 邮政编码: (ZIP):2611 XT

(G) 电话: + 31 - 15 - 2799111

(H) 传真: + 31 - 15 - 2793957

(ii) 发明名称: 磷脂酶在动物饲料中的应用

(iii) 序列数: 4

(iv) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: Patent In Release #1.0, Version #1.30(EPO)

## (2) SEQ ID NO:1 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

TGTCATGCCCGGGCATTATG GCAGTTTCGT

30

## (2) SEQ ID NO: 2 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 39 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 有

**(xi)序列描述: SEQ ID NO: 2:**

AGTCCTCGGT ACCTCGAGTC AGCAGTACTT CTTGGTGTC

39

**(2)SEQ ID NO: 3 的信息****(i)序列特征****(A)长度: 73 个碱基对****(B)类型: 核酸****(C)链型: 单链****(D)拓扑学: 线性****(ii)分子类型: DNA (基因组)****(iii)假设: 无****(iv)反义: 无****(xi)序列描述 SEQ ID NO: 3:**TCGACAAAAA TGAATTCCT CGTGTTGGCT GTTCTGCTCA CAGTGGGCGC TGCCAGGAA  
GGCATCAGCT CAA

73

**(2)SEQ ID NO: 4 的信息****(i)序列特征:****(A)长度: 69 个碱基对****(B)类型: 核酸****(C)链型: 单链****(D)拓扑学: 线性****(ii)分子类型: DNA (基因组)****(iii)假设: 无****(iv)反义: 有****(xi)序列描述: SEQ ID NO: 4:**TTGAGCTGAT GCCTTCCTGG GCAGCGCCCA CTGTGAGCAG AACAGCCAAC ACGAGGAATT  
TCATTTTTG

69