



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 34 779 T2 2006.07.27

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 942 921 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 34 779.6

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/DK97/00095

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 914 164.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/033905

(86) PCT-Anmeldetag: 03.03.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 18.09.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 22.09.1999

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 30.11.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 27.07.2006

(51) Int Cl.⁸: C07K 1/30 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

29596 14.03.1996 DK

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(72) Erfinder:

NIELSSON, Stig, DK-2880 Bagsvaerd, DK;
MADSEN, Murmann, Niels, Raleigh, US; SIMPSON, Curran, Youngsville, US

(74) Vertreter:

Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, 81675 München

(54) Bezeichnung: ERHÖHTE AUSBEUTEN AN EINEM KRISTALLISIERTEN PROTEIN UNTER VERWENDEN EINES
FESTEN ADSORPTIONSMATERIALS

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein einfaches, kostengünstiges und sehr effektives Verfahren zum Kristallisieren eines Polypeptids oder Proteins, insbesondere eines Enzyms, welches aus einer Fermentationsbrühe erhalten wird, mit erhöhten Ausbeuten.

STAND DER TECHNIK

[0002] Enzyme werden für industrielle Zwecke üblicherweise als Flüssigkeiten oder amorphe Materialien bereitgestellt. Wenn sie nicht als Flüssigkeiten bereitgestellt werden, werden sie üblicherweise als amorphe Materialien bereitgestellt, da die bekannten Verfahren zur Kristallisation von Enzymen üblicherweise als zu teuer angesehen werden, als in einem industriellen Maßstab angewendet zu werden.

[0003] Es ist eine Fülle an Literatur vorhanden, welche die Kristallisation von Enzymen betrifft. Im Hinblick auf das Ergebnis von spezifischen Kristallisationsvorgehensweisen ist es schwierig zu verallgemeinern, da die Technik der Enzymkristallisation stark empirisch ist.

[0004] Kennzeichnende Merkmale der meisten bislang bekannten Proteinkristallisationsverfahren sind: Reine und konzentrierte Ausgangslösungen, sehr lange Kristallisationszeit und hoher Verbrauch an Chemikalien, wie Salzen, als Referenz siehe z. B. Biotechnology and Bioengineering 48, 1995, S. 316 – 323.

[0005] Es sind industrielle Enzymkristallisationsverfahren beschrieben worden, bei denen Polyethylenglykol verwendet wird, als Referenz siehe WO 95/01989.

[0006] Es ist ebenfalls beschrieben worden, dass es möglich ist, Enzyme zu kristallisieren, indem Salze aus der Lösung extrahiert („leaching out“) werden, gefolgt von der Einstellung des pH der Lösung auf einen Level um den pl des Enzyms herum, als Referenz siehe WO 94/22903.

[0007] Es ist bekannt, dass feste Adsorptionsmaterialen, wie Aktivkohle, effizient im Entfernen von Farbe sind, es ist bisher jedoch nicht beschrieben worden, dass solche Adsorptionsmaterialien einen tief greifenden Effekt auf Polypeptid-/Proteinkristallisationen besitzen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Mit dieser Erfindung ist überraschenderweise gefunden worden, dass eine Kohlebehandlung vor oder besonders gleichzeitig mit einem Proteinkristallisationsverfahren die Kristallisationsausbeute und Kristallisationsreinheit signifikant erhöht.

[0009] Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Kristallisieren eines aus einer Proteinlösung, die mehr als ein Protein umfasst, erhaltenen Polypeptids oder Proteins mit erhöhten Ausbeuten, umfassend:

- (a) Behandeln der Proteinlösung mit einem festen Adsorptionsmaterial; und
- (b) Kristallisieren des Polypeptids oder des Proteins, ohne das Adsorptionsmaterial zu entfernen.

AUSFÜHRLICHE OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Kristallisieren eines Proteins oder eines Polypeptids aus einer Proteinlösung, insbesondere aus einer Fermentations- (Kultur-) Brühe, mit erhöhten Ausbeuten bereit.

[0011] Eine Fermentationsbrühe enthält neben dem interessierenden Polypeptid oder Protein zahlreiche andere Verbindungen wie Substratverbindungen, z. B. Kohlenhydrate und Salze, Zellen und andere Metaboliten, wie Nukleinsäuren, und andere als die interessierenden Polypeptide und Proteine.

[0012] Bevorzugt wird das Verfahren der Erfindung auf eine Fermentationsbrühe angewendet, die zuerst Fest/Flüssig-Trenntechniken unterzogen wird, z. B. Flockung, Zentrifugation, Filtration, Mikrofiltration, Ultrafiltration, Präzipitation (Fällung), Evaporation oder einer beliebigen Kombination davon.

[0013] Da das Verfahren der Erfindung sehr gut bei relativ unreinen Lösungen arbeitet, ist es normalerweise nicht erforderlich, die Proteinlösung, welche aus der Fermentationsbrühe gewonnen wird, vor der Behandlung mit dem festen Adsorptionsmaterial unter Verwendung von chromatographischen Verfahren zu reinigen.

[0014] In einer spezielleren Ausführungsform, umfasst das Verfahren der Erfindung die Konzentrierung der Protein-enthaltenden Lösung durch Verfahren, die per se bekannt sind. Solche Verfahren schließen eine Konzentrierung durch Ultrafiltration, durch Diafiltration, durch Dialyse oder durch Evaporation ein.

[0015] Eine Konzentrierung der Protein-enthaltenden Lösung ist, obwohl sie zum Durchführen der Behandlung mit dem festen Adsorptionsmaterial nicht notwendig ist, aus der Sicht der Handhabung und Ausbeute zweckdienlich. Aus praktischen Gründen kann die Proteinenthaltende Lösung zu einem Gehalt an Proteinen von 0,1 bis 25 % w/w (% Gew./Gew.), bevorzugt von 0,5 bis 15 % w/w, insbesondere von 1 bis 10 % w/w konzentriert werden.

[0016] Das Verfahren der Erfindung kann auf jedes beliebige Kristallisierungsverfahren angewendet werden, der im Stand der Technik bekannt ist, z. B. auf eine Salzkristallisation, auf eine Kristallisation unter Verwenden eines Polymers, wie in WO 95/01989 offenbart, oder auf ein Kristallisierungsverfahren unter Verwenden des Prinzips des Extrahierens („leaching out“) von Salzen aus der Lösung, gefolgt durch die Einstellung des pH der Lösung auf einen Level, rund um den pI des Enzyms herum, als Referenz siehe WO 94/22903. Das letztgenannte Kristallisierungsverfahren wird in den Beispielen der vorliegenden Erfindung verwendet.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Verfahren der Erfindung auf die Kristallisation eines Enzyms angewendet, insbesondere eines Enzyms, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Proteasen, Peptidasen, Lipasen, Amylasen, Cellulasen, Xylanasen, Isomerasen und Oxidoreduktasen.

Proteasen

[0018] Geeignete, gemäß der vorliegenden Erfindung zu kristallisierende Proteasen schließen jede beliebige Protease ein, welche ein Fermentationsprodukt einer Zelle, wie eines Mikroorganismus, sein kann. Herkunft von Bakterien oder Pilzen ist bevorzugt. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen. Die Protease kann eine Serinprotease sein, bevorzugt eine mikrobielle alkalische Protease oder eine Trypsin-ähnliche Protease. Beispiele von alkalischen Proteasen sind Subtilisine, besonders solche, die von *Bacillus* abgeleitet sind, z. B. Subtilisin Novo, Subtilisin Carlsberg, Subtilisin 309, Subtilisin 147 und Subtilisin 168 (beschrieben in WO 89/06279). Beispiele von Trypsin-ähnlichen Proteasen sind Trypsin (z. B. Herkunft vom Schwein oder Rind) und die Protease von *Fusarium*, beschrieben in WO 89/06270.

[0019] Bevorzugte kommerziell erhältliche Proteaseenzyme schließen solche ein, die unter den Handelsnamen Alcalase, Savinase, Primase, Durazym und Esperase von Novo Nordisk A/S (Dänemark) verkauft werden, solche, die unter den Handelsnamen Maxatase, Maxacal, Maxapem und Properase von Gist-Brocades verkauft werden, solche, die unter den Handelsnamen Purafect und Purafect OXP von Genencor International verkauft werden und solche, die unter den Handelsnamen Opticlean und Optimase von Solvay Enzymes verkauft werden.

Lipasen

[0020] Geeignete, gemäß der vorliegenden Erfindung zu kristallisierende Lipasen schließen jede beliebige Lipase ein, welche ein Fermentationsprodukt einer Zelle, wie eines Mikroorganismus, sein kann. Herkunft von Bakterien oder Pilzen ist bevorzugt. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen.

[0021] Beispiele von verwendbaren Lipasen schließen eine Lipase von *Humicola lanuginosa*, z. B. wie in EP 258 068 und EP 305 216 beschrieben, eine Lipase von *Rhizomucor miehei*, z. B. wie in EP 238 023 beschrieben, eine Lipase von *Candida*, wie eine Lipase von *C. antarctica*, z. B. die Lipase A oder B von *C. antarctica*, beschrieben in EP 214 761, eine Lipase von *Pseudomonas*, wie eine Lipase von *P. alcaligenes* und *P. pseudoalcaligenes*, z. B. wie in EP 218 272 beschrieben, eine Lipase von *P. cenacia*, z. B. wie in EP 331 376 beschrieben, eine Lipase von *P. stutzeri*, z. B. wie in BP 1,372,034 offenbart, eine Lipase von *P. fluorescens*, eine Lipase von *Bacillus*, z. B. eine Lipase von *B. subtilis* (Dartois et al., (1993), *Biochimica et Biophysica acta* 1131, 253 – 260), eine Lipase von *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) und eine Lipase von *B. pumilus* (WO 91/16422), ein.

[0022] Weiterhin kann eine Anzahl klonierter Lipasen verwendbar sein, einschließlich der Lipase von *Penicil-*

lum camembertii, beschrieben von Yamaguchi et al., (1991), Gene 103, 61 – 67, der Lipase von Geotricum candidum (Schimada, Y. et al., (1989), J. Biochem., 106, 383 – 388), und verschiedene Lipase von Rhizopus, wie eine Lipase von R. delemar (Hass, M. J. et al., (1991), Gene 109, 117 – 113), eine Lipase von R. niveus (Kugimiya et al., (1992), Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716 – 719) und eine Lipase von R. oryzae.

[0023] Andere Arten von lipolytischen Enzymen, wie Cutinasen, können ebenfalls kristallisiert werden, z. B. eine Cutinase, die von Pseudomonas mendocina abgeleitet ist, wie in WO 88109367 beschrieben, oder eine Cutinase, die von Fusarium solani pisi abgeleitet ist (z. B. beschrieben in WO 90/09446).

[0024] Besonders geeignete Lipasen sind Lipasen, wie MI Lipase™, Luma fast™ und Lipomax™ (Gist-Brocades), Lipolase™ und Lipolase Ultra™ (Novo Nordisk A/S) und Lipase P „Amano“ (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.).

Amylasen

[0025] Geeignete, gemäß der vorliegenden Erfindung zu kristallisierende Amylasen (α oder β) schließen jede beliebige Amylase ein, welche ein Fermentationsprodukt einer Zelle, wie eines Mikroorganismus, sein kann. Herkunft von Bakterien oder Pilzen ist bevorzugt. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen.

[0026] Amylasen schließen zum Beispiel α -Amylasen ein, die von Bacillus erhalten werden, insbesondere einem speziellen Stamm von B. licheniformis, welche detaillierter in der Britischen Patentbeschreibung Nr. 1,296,839 beschrieben wird. Kommerziell erhältliche Amylasen sind Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ und BAN™ (erhältlich von Novo Nordisk A/S) und Rapidase™ und Maxamyl P™ (erhältlich von Gist-Brocades).

[0027] Andere verwendbare Enzyme sind die CGTasen (Cyclodextrin-glucanotransferasen, EC 2.4.1.19), die von z. B. Bacillus, Thermoanaerobacter oder Thermoanaerobacterium erhältlich sind.

Cellulasen

[0028] In dem vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „Cellulase“ auf ein Enzym, welches den Abbau von Cellulose in Glucose, Cellobiose, Triose und andere Cello-Oligosaccharide katalysiert.

[0029] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die zu kristallisierende Cellulase eine Endoglucanase (EC 3.2.1.4.), bevorzugt eine (rekombinante) einkomponentige Endoglucanase.

[0030] Bevorzugt ist die Cellulase eine mikrobielle Cellulase, stärker bevorzugt eine Cellulase von Bakterien oder Pilzen.

[0031] Verwendbare Beispiele von Cellulasen von Bakterien sind Cellulasen, die von Bakterien abgeleitet sind oder von diesen produzierbar sind, aus der Gruppe, bestehend aus Pseudomonas, Bacillus, Cellulomonas, Clostridium, Microspora, Thermotoga, Caldoccum und Actinomycetes, wie Streptomyces, Thermomonospora und Acidothermus, insbesondere aus der Gruppe, bestehend aus Pseudomonas cellulolyticus, Bacillus laetus, Cellulomonas fimi, Microspora bispora, Thermomonospora fusca, Thermomonospora cellulolyticum und Acidothermus cellulolyticus.

[0032] Eine verwendbare, zu kristallisierende Cellulase ist eine saure Cellulase, welche von Pilzen abgeleitet ist oder von diesen produzierbar ist, aus der Gruppe, bestehend aus den Gattungen Trichoderma, Myrothecium, Aspergillus, Phanaerochaete, Neurospora, Neocallimastix und Botrytis, insbesondere aus der Gruppe, bestehend aus Trichoderma viride, Trichoderma reesei, Trichoderma longibrachiatum, Myrothecium verrucaria, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Phanaerochaete chrysosporium, Neurospora crassa, Neocallimastix partriciarum und Botrytis cinerea.

[0033] Eine andere verwendbare, zu kristallisierende Cellulase ist eine neutrale oder alkalische Cellulase, bevorzugt eine neutrale oder alkalische Cellulase von Pilzen, welche von Pilzen abgeleitet ist oder von diesen produzierbar ist, aus der Gruppe, bestehend aus den Gattungen Aspergillus, Penicillium, Myceliophthora, Humicola, Irpex, Fusarium, Stachybotrys, Scopulariopsis, Chaetomium, Mycogone, Verticillium, Myrothecium, Papulospora, Gliocladium, Cephalosporium und Acremonium, insbesondere aus der Gruppe, bestehend aus Humicola insolens, Fusarium oxysporum, Myceliophthora thermophila, Penicillium janthinellum und Cephalosporium sp., bevorzugt aus der Gruppe, bestehend aus den Arten Humicola insolens, DSM 1800, Fusarium

oxysporum, DSM 2672, Myceliophthora thermophila, CBS 117.65, und Cephalosporium sp., RYM-202.

[0034] Andere Beispiele von verwendbaren, zu kristallisierenden Cellulasen sind Varianten, die als eine Elternzellulase eine Cellulase mit Herkunft von Bakterien oder Pilzen besitzen, z. B. eine Cellulase, die von einem Stamm der Pilzgattung Humicola, Trichoderma oder Fusarium ableitbar ist.

Oxidoreduktasen

[0035] Oxidoreduktasen, welche gemäß der Erfindung kristallisiert werden können, schließen Peroxidasen und Oxidasen, wie Laccasen, ein.

Peroxidasen

[0036] Ein Enzym, welches Peroxidaseaktivität aufweist, kann jedes beliebige Peroxidaseenzym sein, welches von der Enzymklassifizierung (EC 1.11.1.7) umfasst ist, oder jedes beliebige hier von abgeleitete Fragment, welches Peroxidaseaktivität aufweist.

[0037] Bevorzugt ist die Peroxidase, die in dem Verfahren der Erfindung eingesetzt wird, von Mikroorganismen, wie Pilzen oder Bakterien, produzierbar. Einige bevorzugte Pilze schließen Stämme ein, die der Untereinteilung Deuteromycotina, Klasse Hyphomycetes angehören, z. B. Fusarium, Humicola, Trichoderma, Myrothecium, Verticillum, Arthromyces, Caldariomyces, Ulocladium, Embellisia, Cladosporium oder Dreschlera insbesondere Fusarium oxysporum (DSM 2672), Humicola insolens, Trichoderma reesi, Myrothecium verrucana (IFO 6113), Verticillum alboatrum, Verticillum dahliae, Arthromyces ramosus (FERM P-7754), Caldariomyces fulmago, Ulocladium chartarum, Embellisia allii oder Dreschlera halodes.

[0038] Andere bevorzugte Pilze schließen Stämme ein, die der Untereinteilung Basidiomycotina, Klasse Basidiomycetes angehören, z. B. Coprinus, Phanaerochaete, Coriolus oder Trametes, insbesondere Coprinus cinereus f. microsporus (IFO 8371), Coprinus macrorhizus, Phanaerochaete chrysosporium (z. B. NA-12) oder Trametes (früher Polyporus genannt), z. B. T. versicolor (z. B. PR4 28-A).

[0039] Weitere bevorzugte Pilze schließen Stämme ein, die der Untereinteilung Zygomycotina, Klasse Mucoraceae angehören, z. B. Rhizopus oder Mucor, insbesondere Mucor hiemalis.

[0040] Einige bevorzugte Bakterien schließen Stämme der Ordnung Actinomycetales ein, z. B. Streptomyces sphaeroides (ATCC 23965), Streptomyces thermophilus (IFO 12382) oder Streptoverticillium verticillium ssp. verticillium.

[0041] Andere bevorzugte Bakterien schließen Bacillus pumilus (ATCC 12905), Bacillus stearothermophilus, Rhodobacter sphaeroides, Rhodomonas palustri, Streptococcus lactis, Pseudomonas purociniae (ATCC 15958) oder Pseudomonas fluorescens (NRRL B-11) ein.

[0042] Weitere bevorzugte Bakterien schließen Stämme ein, die Myxococcus angehören, z. B. M. virescens.

[0043] Insbesondere ist eine rekombinant hergestellte Peroxidase bevorzugt, z. B. eine Peroxidase, die von Coprinus sp., abgeleitet ist, insbesondere C. macrorhizus oder C. cinereus, gemäß WO 92/16634 oder eine Variante hier von, z. B. eine Variante, wie in WO 94/12621 beschrieben.

Laccasen und Laccase-verwandte Enzyme

[0044] Im Zusammenhang mit dieser Erfindung, umfassen Laccasen und Laccase-verwandte Enzyme jedes beliebige Laccaseenzym, welches von der Enzymklassifizierung (EC 1.10.3.2) umfasst ist, jedes beliebige Chatecholoxidaseenzym, welches von der Enzymklassifizierung (EC 1.10.3.1) umfasst ist, jedes beliebige Bilirubinoxidaseenzym, welches von der Enzymklassifizierung (EC 1.3.3.5) umfasst ist, oder jedes beliebige Monophenolmonooxygenaseenzym, welches von der Enzymklassifizierung (EC 1.14.18.1) umfasst ist.

[0045] Das mikrobielle Laccaseenzym kann von Bakterien oder Pilzen (einschließlich filamentösen Pilzen und Hefen) abgeleitet sein, und geeignete Beispiele schließen eine Laccase ein, die von einem Stamm von Aspergillus, Neurospora, z. B. N. crassa, Podospora, Botrytis, Collybia, Fomes, Lentinus, Pleurotus, Trametes, z. B. T. villosa und T. versicolor, Rhizoctonia, z. B. R. solani, Coprinus, z. B. C. plicatilis und C. cinereus, Pseudotyrella, Myceliophthora, z. B. M. thermophila, Schyphalidium, Polyporus, z. B. P. pinsitus, Phlebia, z. B. P. radita

(WO 92/01046) oder Coriolus, z. B. C. hirsutus (JP 2-238885) abgeleitet ist, insbesondere Laccasen, die von Trametes, Myceliophthora, Schytalidium oder Polyporus erhältlich sind.

Behandlung mit den Adsorptionsmaterialien

[0046] Wir haben überraschenderweise gefunden, dass geringe Konzentrationen eines Adsorptionsmaterials, vor oder gleichzeitig mit dem Kristallisierungsverfahren, die Kristallisierungsausbeute signifikant erhöhen kann und gleichzeitig die Reinheit der gebildeten Kristalle erhöht und den Kristallen eine Gestalt verleiht, welche leichter zu ernten ist, wie in den eingeschlossenen Beispielen gezeigt wird.

[0047] Gemäß der Erfindung kann jedes beliebige im Stand der Technik bekannte Adsorptionsmaterial verwendet werden; ein besonders verwendbares Adsorptionsmaterial ist ein Kohlematerial, insbesondere ein aktiviertes Kohlematerial („activated carbon material“). Das Kohlematerial kann in der Form von Pulver, Körnchen, Pellets oder in jeder beliebigen anderen, im Stand der Technik bekannten, Form vorliegen.

[0048] Verwendbare Arten von aktiver Kohle können Acticarbon 4S #2228, erhältlich von Elf Atochem North America, Darco carbon KB-B, erhältlich von American Norit Co. oder Calgon granular carbon, erhältlich von Pittsburgh Activated Carbon, sein.

[0049] Andere feste Adsorptionsmaterialien, welche gemäß der Erfindung verwendet werden können, schließen Diatomeenerde (Diatomid), Kieselgur, Fullererde, Bentonit und verschiedene hydrophobe Harze oder Ionenaustauschharze, ein.

[0050] In einigen Fällen kann es vorteilhaft sein, mehr als ein Adsorptionsmaterial hinzuzugeben.

[0051] In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird das feste Adsorptionsmaterial zu der Proteinlösung bei einer Konzentration von 0,05 bis 5 % w/w, bevorzugt bei einer Konzentration von 0,1 bis 2 % w/w hinzugegeben.

[0052] Das feste Adsorptionsmaterial kann in einem Schritt hinzugegeben werden oder es kann in mehr als einem Schritt hinzugegeben werden; normalerweise läuft das Verfahren zufriedenstellend ab, wenn das feste Adsorptionsmaterial in einem Schritt hinzugegeben wird.

[0053] Die Behandlung mit dem festen Adsorptionsmaterial dauert normalerweise für einen Zeitraum von bis zu 40 Stunden, insbesondere für einen Zeitraum von 1/2 bis 20 Stunden, bevorzugt für einen Zeitraum von 1 bis 10 Stunden, stärker bevorzugt für einen Zeitraum von 1 bis 5 Stunden, an, bevor es vor der Kristallisation entfernt wird oder, falls das feste Adsorptionsmaterial während des Kristallisierens in der Lösung vorliegt, liegt es in der Lösung vor, solange die Kristallisation andauert, was abhängig von dem gewählten Kristallisierungsverfahren differieren kann.

[0054] In einigen Fällen kann es vorteilhaft sein, das Adsorptionsmaterial erst hinzuzugeben, nachdem die Kristallisation begonnen hat.

[0055] Die gewählte Zeit für die feste Adsorptionsbehandlung ist von zahlreichen Faktoren abhängig, wie der Produktstabilität, den mikrobiellen Level und der Kapazität der Verfahrensausrüstung, normalerweise erfolgt sie jedoch für einen so kurzen Zeitraum, dass es nicht erforderlich ist, irgendwelche Stabilisierungsmittel oder Inhibitoren zu der Proteinlösung hinzuzugeben.

[0056] Die Temperatur der mit dem festen Adsorptionsmaterial behandelten Proteinlösung beträgt bevorzugt von 5 °C bis 50 °C, insbesondere von 10 °C bis 40 °C.

[0057] Der pH der mit dem festen Adsorptionsmaterial behandelten Proteinlösung beträgt bevorzugt von 3 bis 10.

[0058] Anstelle des Hinzugebens des festen Adsorptionsmaterials zu der Proteinlösung in Form eines Pulvers, Körnchen oder Pellets, kann es in einigen Fällen vorteilhaft sein, die Proteinlösung durch eine Säule laufen zu lassen, die mit dem Adsorptionsmaterial gefüllt ist, oder die Proteinlösung durch z. B. einen Kohlefilter durchlaufen zu lassen. Dies kann z. B. bei einem Salzkristallisierungsverfahren der Fall sein, wo es ein Vorteil sein kann, erst einiges von dem Salz hinzuzugeben, dann die Proteinlösung durch eine Kohlesäule oder einen Kohlefilter laufen zu lassen und dann das verbleibende Salz hinzuzugeben, wodurch die Kristallisierungskeim-

bildung beginnt.

Kristallisation

[0059] Unter Verwenden des Verfahrens der Erfindung haben wir gezeigt (siehe Beispiel 2), dass die Kristallisationsausbeute erhöht ist, die Reinheit der Kristalle verbessert ist, die Kristallisationszeit für die Kristallbildung reduziert ist und die Gestalt der gebildeten Kristalle verändert ist.

[0060] Beispiel 2 zeigt ebenfalls, dass der Effekt des festen Adsorptionsmaterials am größten ist, wenn die Kohle während der Kristallisation in dem Konzentrat belassen wird. Belassen der Kohle in dem Konzentrat ist ebenfalls eine Produktionsart, die zu bevorzugen ist, um die Verfahrensdauer zu reduzieren.

Gewinnung nach der Kristallisation

[0061] Das Verfahren der Erfindung bewirkt, dass das Polypeptid oder das Protein, insbesondere das Enzym, in einer reineren Form und mit einer höheren Ausbeute kristallisiert.

[0062] Falls das feste Adsorptionsmaterial während des Kristallisierens in der Lösung belassen wird, werden die Kristalle normalerweise nach der Ernte erneut aufgelöst und werden danach einem Fest/Flüssig-Trennverfahren, wie einer Filtration, unterzogen um unlösliche Materie, wie das Adsorptionsmaterial, zu entfernen.

[0063] Falls kristalline Produkte mit einer sehr hohen Reinheit gewünscht sind, kann das Verfahren der Erfindung wiederholt werden, d. h., das kristalline Endprodukt des Verfahrens der Erfindung wird erneut aufgelöst und einer oder mehreren zusätzlichen Behandlungen) mit festem Adsorptionsmaterial und/oder Kristallisierungen) unterzogen.

[0064] Das Endprodukt kann ein kristallines Produkt sein oder die Kristalle können erneut aufgelöst werden, um z. B. ein flüssiges Polypeptid- oder Proteinprodukt von hoher Reinheit herzustellen.

[0065] Die Erfindung wird weiterhin in den folgenden Beispielen dargestellt, welche nicht dazu gedacht sind, in irgendeiner Weise den Schutzbereich (Schutzmfang) der Erfindung, wie beansprucht, zu beschränken.

BEISPIEL 1

Effekt der gleichzeitigen Adsorption von Unreinheiten durch Kohle zum Verbessern des Kristallisationsdurchsatzes einer Lipase

[0066] 100 kg Kulturbrühe, welche eine Lipase von *Humicola lanuginosa* enthielt, die in *Aspergillus oryzae* exprimiert wurde, wie in EP 305 216 beschrieben, wurde, wie in nachstehender Tabelle 1 gezeigt, vorbehandelt.

	Vorbehandlung
Brühe	100 kg
Wasser	100 kg

Tabelle 1: Vorbehandlung der Lipasebrühe.

[0067] Der Herstellungsstamm wurde durch Trommelfiltration entfernt, was ein Filtrat ergab, welches sukzessive unter Verwendung von Seitz K900-Filterkissen filtriert wurde. Die mikrobielle Zahl wurde durch Filtration unter Verwendung von Seitz EK1-Filterkissen reduziert. Das resultierende Filtrat wurde über Dow DDS- (20 kD) Membranen konzentriert. Das UF-Konzentrat wurde weiter zu einer Leitfähigkeit von 0,8 mS diafiltriert.

[0068] Die Reinheit des resultierenden Konzentrats wird durch das Verhältnis von (mOD_{440nm}/g aktive Lipase) dargestellt.

	mOD_{440nm} / g aktive Lipase
UF-Konzentrat	104

Tabelle 2: Reinheit des hergestellten Konzentrats (vor dem Kristallisationsstart).

[0069] Das Konzentrat wurde verschiedenen Mengen an Acticarbon 4s #2228 ausgesetzt und unter Verwenden einer 20 % w/w Ameisensäurelösung auf pH = 4,3 eingestellt und für 24 Stunden Kristallisationszeit belassen.

[0070] Die Kristallsuspensionen wurden durch Zentrifugation geerntet und die Kristalle wurden unter Verwenden von deionisiertem Wasser gewaschen und unter Verwenden von Ameisensäure auf pH = 4,3 eingestellt. Die Kristallkuchen wurden aufgelöst und in 4-fach pro Gewicht („4 fold by weight“) einer 50 % MPG + 0,3 % w/w CaCl₂ × 2H₂O-Lösung formuliert und einer Filtration unter Verwenden von Seitz EK1-Filterkissen unterzogen, um die Kohle zu entfernen. Die resultierenden formulierten Produkte wurden unter Verwenden des Tributyrin-Tests auf OD_{440nm} und Lipaseaktivität hin analysiert:

Der Tributyrin-Test basiert auf der Hydrolyse von Tributyrin durch das Enzym, wobei der Alkaliverbrauch als eine Funktion der Zeit registriert wird. Eine Lipaseeinheit (LU) ist definiert als die Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen (d. h. bei 30,0 °C; pH 7,0; mit Gummi Arabicum als Emulgator und Tributyrin als Substrat) 1 µMol titrierbare Buttersäure pro Minute freisetzt.

[0071] Die Erträge und Reinheiten der Endprodukte sind in der nachfolgenden Tabelle 3 gezeigt.

	Ausbeute an aktiver Lipase in formuliertem Produkt	mOD_{440nm}/g aktive Lipase in formuliertem Produkt	Gestalt
0 % w/w Kohle	53 %	12,4	Diamanten
0,5 % w/w Kohle	64 %	7,2	Stäbchen
1,0 % w/w Kohle	77 %	4,5	Stäbchen

Tabelle 3: UF-Konzentrat, welches ansteigenden Mengen an Kohle ausgesetzt wurde und bei pH = 4,3 und 28 °C kristallisiert wurde, gezeigt sind Ausbeute, Reinheit und Gestalt.

[0072] Wir stellen fest, dass sowohl Ausbeute als auch Reinheit bei Verwenden von Kohle während der Kristallisation erhöht werden, was anzeigt, dass einige Unreinheiten, welche die Kristallisation der Lipase inhibieren, entfernt werden.

[0073] Der Anstieg an Reinheit wird durch die Farbreduktion (mOD_{440nm}/g aktive Lipase) in dem formulierten Produkt gesehen. Wir stellen ebenfalls eine Veränderung in der Gestalt in Richtung auf Stäbchen (aus Diamanten) fest.

[0074] Mit anderen Worten zeigt dieses Beispiel, dass wir bei Verwenden des Verfahrens der Erfindung die Ausbeute wesentlich erhöhen können und gleichzeitig eine höhere Reinheit und eine uniforme Stäbchenform der gebildeten Enzymkristalle erzielen können.

BEISPIEL 3

Effekt der Prä-Adsorption oder der gleichzeitigen Adsorption von Unreinheiten durch eine Kohlebehandlung auf die Lipasekristallisation

[0075] Ein UF-Konzentrat wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, erhalten. Das UF-Konzentrat wurde zu einer Leitfähigkeit von 1,0 mS diafiltriert.

[0076] Die Reinheit des resultierenden Konzentrats wird durch das Verhältnis von (mOD_{440nm}/g aktive Lipase), wie in nachfolgender Tabelle 4 gezeigt, dargestellt.

	mOD_{440nm} / g aktive Lipase
UF-Konzentrat	42

Tabelle 4: Reinheit des hergestellten Konzentrats (vor Kristallisationsstart)

[0077] Das Konzentrat wurde in drei Fraktionen A, B & C aufgeteilt und, wie in nachfolgender Tabelle 5 gezeigt, behandelt.

	Behandlung
Fraktion A	Keine Behandlung
Fraktion B	0,5 % Acticarbon 4S für eine Stunde bei ungefähr 20 °C hinzugegeben, dann einer Filtration unter Verwenden von EK1-Filterkissen unterzogen, um die Kohle vor der Kristallisation zu entfernen
Fraktion C	0,5 % Acticarbon 4S hinzugegeben, die während der Kristallisation belassen wurde

Tabelle 5: Die drei Fraktionen, die verschiedenen Behandlungen vor dem Kristallisationsstart unterzogen wurden.

[0078] Die drei Fraktionen wurden nachfolgend auf pH = 4,3 eingestellt und auf 28 °C erhitzt und für 24 Stunden Kristallisationszeit belassen. Die Kristallsuspensionen wurden durch Zentrifugation geerntet, und die Kristalle wurden unter Verwendung von deionisiertem Wasser gewaschen und unter Verwenden von Ameisensäure auf pH = 4,3 eingestellt. Die Kristallkuchen wurden aufgelöst und in 4-fach pro Gewicht einer 50 % MPG + 0,3 % w/w CaCl₂ × 2H₂O-Lösung formuliert und dann einer Filtration unter Verwenden von Seitz EK1-Filterkissen unterzogen, um die Kohle zu entfernen. Die resultierenden formulierten Produkte wurden auf OD_{440nm} und Lipaseaktivität hin unter Verwenden des Tributyrin-Tests analysiert:

Die Ausbeuten und Reinheiten der Endprodukte sind in nachfolgender Tabelle 6 gezeigt.

	Ausbeute an aktiver Lipase in formuliertem Produkt	mOD_{440nm} / g aktive Lipase in formuliertem Produkt	Zeit der visuellen Kristallbildung	Gestalt
Fraktion A	84 %	9,4	3 Stunden	80 % Diamanten 20 % Stäbchen
Fraktion B	89 %	6,1	1 Stunde	100 % Stäbchen
Fraktion C	93 %	4,4	1 Stunde	100 % Stäbchen

Tabelle 6: Die kristallisierten Fraktionen A, B & C, gezeigt ist ein besserer Effekt, sowohl auf die Ausbeute als auch auf die der Reinheit, wenn die Kohle während der Kristallisation in dem Konzentrat belassen wird.

[0079] Wenn Fraktion A mit Fraktion B oder Fraktion C verglichen wird, ist zu sehen, dass eine Kohlebehandlung vor der Kristallisation die Ausbeute und Reinheit erhöht, und dass der Effekt am größten ist, wenn die Kohle während der Kristallisation in dem Konzentrat belassen wird. Das Belassen der Kohle in dem Konzentrat ist ebenfalls eine Produktionsart, die zu bevorzugen ist, um die Verfahrendauer zu reduzieren.

[0080] Aus Tabelle 6 ist ebenfalls zu sehen, dass wir bei Verwenden der Kohlebehandlung, die Gestalt aus

einer Mischung von Kristallformen zu einer uniformen Kristallform steuern können, so dass bei Verwenden des Verfahrens der Erfindung die Ausbeute erhöht wird und die Gestalt gesteuert wird.

BEISPIEL 3

Bewertung des Technikummaßstabs von gleichzeitiger Adsorption von Unreinheiten durch eine Kohlebehandlung, um den Kristallisationsdurchsatz einer Lipase zu verbessern

[0081] Ein UF-Konzentrat wurde in Technikummaßstab erhalten, auf ähnliche Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben. Das UF-Konzentrat wurde zu einer Leitfähigkeit von 1,0 mS diafiltriert.

[0082] Es wurde ein Labortest unter Verwenden von ansteigenden Mengen an Kohle (Typ Darco carbon KG-B) bis zu der Menge, die in einem Versuch in einem Technikummaßstab verwendet wird, durchgeführt, wie in nachfolgender Tabelle 7 gezeigt.

	% hinzugegebene Kohle	Ausbeute an aktiver Lipase aus formuliertem Produkt	mOD_{440nm} / g aktive Lipase des formulierten Produkts
Laborkontrolle	0 %	70 %	7,9
Labortest #1	0,5 %	77 %	6,1
Labortest #2	1,0 %	86 %	4,9

Test im Versuchsmaßstab („Pilot Scale“)	1,0 %	84 %	5,0
---	-------	------	-----

Tabelle 7: Kombinierter Versuch im Labor und im Versuchsmaßstab einer Kohlebehandlung während der Kristallisation.

[0083] Tabelle 7 zeigt eine überraschend gute Übereinstimmung zwischen den Laborexperimenten und den Ergebnissen im Versuchsmaßstab bezüglich sowohl Ausbeute und Reinheit an. Es ist daher möglich, die Laborergebnisse direkt auf den Maßstab eines Verfahrens in einer Produktionsanlage zu übertragen (zu skalieren). Wiederum ist ein signifikanter Unterschied zwischen Kohlebehandlung und Kontrolle in dem Laborexperiment zu sehen.

BEISPIEL 4

Effekt der Verwendung von granulärer Kohle zur gleichzeitigen Adsorption von Unreinheiten durch eine Kohlebehandlung, um den Kristallisationsdurchsatz einer Lipase zu verbessern

[0084] Ein UF-Konzentrat wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, erhalten. Das UF-Konzentrat wurde zu einer Leitfähigkeit von 1,0 mS diafiltriert.

[0085] Die Reinheit des resultierenden Konzentrats ist durch das Verhältnis von (mOD_{440nm} / g aktive Lipase), wie in der nachfolgenden Tabelle 8 gezeigt, dargestellt.

	mOD_{440nm} / g aktive Lipase
UF-Konzentrat	69

Tabelle 8: Reinheit des hergestellten Konzentrats (vor Kristallisationsstart).

[0086] Es wurde ein Labortest unter Verwenden von ansteigenden Mengen einer granulären Form von Kohle

(Typ Calgon), wie in der nachfolgenden Tabelle 9 gezeigt, durchgeführt.

	Ausbeute an aktiver Lipase in formuliertem Produkt	mOD _{440nm} / g aktive Lipase in formuliertem Produkt
0 % w/w Kohle	75 %	7,1
1,0 % w/w Kohle	77 %	6,8
2,0 % w/w Kohle	87 %	5,8

Tabelle 9: UF-Konzentrat, welches ansteigenden Mengen an Kohle ausgesetzt wurde und bei pH = 4,3 und 28 °C kristallisiert wird, gezeigt sind Ausbeute und Reinheit.

[0087] Aus Tabelle 9 kann gesehen werden, dass bei Verwenden dieser granulären Form von Kohle während der Kristallisation, die Ausbeute signifikant erhöht ist und die Reinheit leicht erhöht ist.

BEISPIEL 5

Effekt der gleichzeitigen Adsorption von Unreinheiten durch eine Kohlebehandlung, um den Kristallisationsdurchsatz einer Protease zu erhöhen

[0088] 100 kg Kulturbrühe, welche eine Protease von *Bacillus latus* enthielt, die wie z. B. in US 3,723,250 beschrieben, fermentiert wurde, wurde vorbehandelt und (aus)geflockt, wie in der nachstehenden Tabelle 10 beschrieben.

	Vorbehandlung & Flockung
Brühe	100 kg
Wasser	100 kg
CaCl ₂ x 2H ₂ O	3 kg
pH	pH, eingestellt auf pH = 7,5
0,1 % superfloc C521	1 kg
0,1 % superfloc A130	1 kg

Tabelle 10: Vorbehandlung und Flockung der Proteasebrühe.

[0089] Der Herstellungsstamm wurde durch Trommelfiltration entfernt, was ein Filtrat ergab, welches sukzessive unter Verwenden von Seitz K900-Kissen filtriert wurde. Die mikrobielle Zahl wurde durch Filtration unter Verwendung von Seitz EK1-Filterkissen reduziert. Das resultierende Filtrat wurde über Asahi- (6 kD) Membranen konzentriert.

[0090] Die Reinheit wird durch die Farbe (OD_{440nm}/g aktive Protease), wie in nachfolgender Tabelle 11 gezeigt, dargestellt.

	OD _{440nm} / g aktive Protease
Konzentrat	673

Tabelle 11: Reinheit des UF-Konzentrats vor der Kristallisation.

[0091] Das UF-Konzentrat wurde verschiedenen Mengen an FGV 120-Kohle ausgesetzt und unter Verwen-

den von 7 % KAc kristallisiert und unter Verwenden einer 20 % w/w Phosphorsäurelösung auf pH = 4,9 eingestellt. Die Kristallisationen wurden mit einem Temperaturstieg, der bei 10 °C begann und bei 28 °C nach 5 Stunden endete, durchgeführt. 24 Stunden wurden als Kristallisationszeit verwendet.

[0092] Die Endkristalle wurden durch Zentrifugation geerntet und die Kristalle wurden unter Verwenden einer 5,5 % CaCl₂- (pH = 4,9) Lösung gewaschen. Die Kristallkuchen wurden aufgelöst in 10-fach pro Gewicht einer 100 % MPG-Lösung und die resultierenden Produkte wurden unter Verwenden eines kinetischen Dimethylcasein-Tests auf OD_{440nm} und Proteaseaktivität hin analysiert:

Der kinetische Dimethylcasein-Test basiert auf der Verdauung einer Dimethylcasein-Lösung durch das proteolytische Enzym. Die in diesem Verfahren gebildeten primären Aminogruppen reagieren mit Trinitrobenzensulphosäure, wodurch ein farbiger Komplex gebildet wird. Die Reaktion wird *in situ* verfolgt, damit die Veränderung des Absorptionsmaßes pro Zeiteinheit berechnet werden kann. Die Aktivität wird bezogen auf ein Standardenzym und in den gleichen Einheiten wie für den Standard bestimmt.

[0093] Die resultierenden Ausbeuten und Reinheiten sind in der nachfolgenden Tabelle 12 gezeigt.

	Ausbeute an aktiver Protease in formuliertem Produkt	OD _{440nm} / g aktive Protease in formuliertem Produkt	Gestalt
0 % Kohle	89 %	96	10 bis 15 μ Stäbchen
0,5 % Kohle	91 %	85	10 bis 15 μ Stäbchen
1,0 % Kohle	93 %	90	10 bis 20 μ Stäbchen

Tabelle 12: Proteasekonzentrat, welches während der Kristallisation ansteigenden Mengen an Kohle ausgesetzt wurde.

[0094] Aus Tabelle 12 ist zu sehen, dass ein Erhöhen der Kohledosierung die Ausbeuten erhöht. Die Reinheit, ausgedrückt durch OD_{440nm}/g aktive Protease in dem formulierten Produkt, ist leicht erhöht. Die Gestalt ist leicht verändert durch einen geringen Anstieg im Durchmesser der Kristallgröße.

BEISPIEL 6

Effekt einer gleichzeitigen Adsorption von Unreinheiten durch eine Kohlebehandlung, um den Kristallisationsdurchsatz einer Cellulase von EG1 Humicola zu verbessern.

[0095] 100 kg Kulturbrühe, welche eine Cellulase von EG1 Humicola insolens enthielt, die in *Aspergillus oryzae* exprimiert wurde, wurde, wie in der nachfolgenden Tabelle 13 gezeigt, vorbehandelt.

	Vorbehandlung
Brühe	100 kg
Wasser	100 kg
pH eingestellt unter Verwenden von 10 % NaOH	9,5

Tabelle 13: Vorbehandlung der *Aspergillus oryzae*-Brühe.

[0096] Der Herstellungsstamm wurde durch Trommelfiltration entfernt, was ein Filtrat ergab, welches sukzessive unter Verwenden von Seitz EK1-Filterkissen keimfiltriert wurde. Das resultierende Filtrat wurde über Dow DDS- (20 kD) Membranen auf einen Trockenmassegehalt von 22 % konzentriert. Das UF-Konzentrat wurde weiter unter Verwenden von 3 Volumen Leitungswasser diafiltriert und danach einer Kohlebehandlung unter Verwenden von 3 % Picatif FGV 120-Kohle bei pH = 5,5 für 2 Stunden bei 30 °C unterzogen. Die Kohle wurde durch Filtration unter Verwenden von Seitz K900-Filterkissen und Seitz EK1-Filterkissen entfernt. Das resultie-

rende Konzentrat besaß eine Leitfähigkeit von 1,06 mS.

[0097] Die Reinheit des resultierenden Konzentrats wird durch das Verhältnis von (OD_{440nm}/g aktive Cellulase) dargestellt.

	OD _{440nm} / g aktive Cellulase
Konzentrat	21,7

Tabelle 14: Reinheit des Konzentrats (vor Kristallisationsstart).

[0098] Das Konzentrat wurde verschiedenen Mengen an Picatif FGV 120-Kohle ausgesetzt und unter Verwenden einer 20 w/w % (Gew./Gew. %) Ameisensäurelösung auf pH = 5,4 eingestellt und für 24 Stunden bei 28 °C (Kristallisationszeit) belassen.

[0099] Die Kristallsuspensionen wurden durch Zentrifugation geerntet. Die Kristallkuchen wurden aufgelöst und in 8-fach pro Gewicht Wasser und 0,1 % Natriumchlorid formuliert und einer Filtration unter Verwenden von 0,45 µ Filtern unterzogen, um die Kohle zu entfernen. Die resultierenden formulierten Produkte wurden auf OD_{440nm} und Cellulaseaktivität hin analysiert. Die Cellulaseaktivität wird als S-CEVU (Stabilisierte Cellulase-Viskoseeinheit, Stabilized Cellulase Viscosity Unit) gemessen und wird unter Verwenden eines Carboxymethylcellulose-, CMC-, Substrats bestimmt. Die Endocellulase baut die CMC ab. Die resultierende Reduktion der Viskosität wird durch ein Vibrationsviscosimeter bestimmt. Die Reaktion wird bei pH = 7,5 in einem 0,1 M Phosphatpuffer bei 40 °C für 30 Minuten durchgeführt.

[0100] Die Ausbeuten und Reinheiten der Endprodukte sind in Tabelle 15 gezeigt.

	Ausbeute an aktiver Cellulase in formuliertem Produkt	OD _{440nm} / g aktive Cellulase in formuliertem Produkt
0 w/w % Kohle	8 %	19,7
0,5 w/w % Kohle	23 %	19,1
1,0 w/w % Kohle	44 %	19,2

Tabelle 15: Konzentrat, welches ansteigenden Mengen an Kohle ausgesetzt wurde und bei pH = 5,4 und 28 °C kristallisiert wurde, gezeigt sind Ausbeute und Reinheit.

[0101] Wir stellen überraschenderweise fest, dass die Ausbeute unter Verwenden von Kohle während der Kristallisation erhöht ist, obwohl das Konzentrat der Kohlebehandlung vor der Kristallisation unterzogen worden war. Mit anderen Worten können wir bei Verwenden von Kohle während der Kristallisation die Ausbeute wesentlich erhöhen, ohne an Reinheit zu verlieren.

BEISPIEL 7

Effekt der gleichzeitigen Adsorption von Unreinheiten durch eine Kieselur-Behandlung, um den Kristallisationsdurchsatz einer Lipase zu erhöhen.

[0102] 50 kg Kulturbrühe, welche eine technisch hergestellte Proteinvariante einer Lipase von *Humicola lanuginosa* enthielt, die in *Aspergillus oryzae* exprimiert wurde, wurde, wie in nachstehender Tabelle 16 gezeigt, vorbehandelt.

Vorbehandlung	
Brühe	50 kg
Wasser	50 kg

Tabelle 16: Vorbehandlung der Aspergillus oryzae-Brühe.

[0103] Der Herstellungsstamm wurde durch Trommelfiltration entfernt, bei pH = 10,0 (eingestellt mit 13 % Na-OH), was ein Filtrat ergab, welches sukzessive unter Verwenden von Seitz K250-Filterkissen filtriert wurde. Das resultierende Filtrat wurde über Dow DDS- (20 kD) Membranen konzentriert. Das UF-Konzentrat wurde weiter zu einer Leitfähigkeit von 2,5 mS/cm unter Verwenden von 2 Volumen Leitungswasser diafiltriert.

[0104] Das Konzentrat wurde verschiedenen Mengen an Hyflo Supercell Kieselgur ausgesetzt und unter Verwenden einer 10 w/w % Phosphorsäurelösung bei 5 °C auf pH = 4,7 eingestellt. Die Temperatur wurde alle 30 Minuten um 3 °C bis 28 °C erhöht und bei dieser Temperatur für eine Gesamtzeit von 22 Stunden Kristallisierungszeit belassen.

[0105] Die Ausbeuten und Kristallgestalten sind in der nachfolgenden Tabelle 17 gezeigt.

	Ausbeute an kristallisierte Lipase	Gestalt
0 w/w % Hyflo Supercell	58 %	Einzelstäbchen
1,0 w/w % Hyflo Sucercell	77 %	Mehr Fachstäbchen, angeheftet an Kieselgur, Sterne bildend

Tabelle 17: UF-Konzentrat, welches verschiedenen Mengen an Kieselgur ausgesetzt wurde und bei pH = 4,7 mit ansteigender Temperatur kristallisiert wurde, gezeigt sind Ausbeute und Gestalt.

[0106] Wir stellen überraschenderweise fest, dass die Ausbeute unter Verwenden von Kieselgur während der Kristallisation erhöht ist. Wir stellen ebenfalls eine Veränderung in der Gestalt in Richtung auf Sterne aus Stäbchen fest. Mit anderen Worten können wir die Ausbeute erhöhen und eine größere Kristallform erhalten, wenn Kieselgur während der Kristallisation verwendet wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Kristallisieren eines aus einer Proteinlösung, die mehr als ein Protein umfasst, erhaltenen Polypeptids oder Proteins mit erhöhten Ausbeuten, umfassend:
 - (a) Behandeln der Proteinlösung mit einem festen Adsorptionsmaterial; und
 - (b) Kristallisieren des Polypeptids oder des Proteins, ohne das Adsorptionsmaterial zu entfernen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Proteinlösung aus einer Fermentationsbrühe erhalten wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Fermentationsbrühe vor der Behandlung mit dem festen Adsorptionsmaterial durch Zentrifugation, Filtration, Mikrofiltration, Ultrafiltration, Fällung, Evaporieren oder eine Kombination davon gereinigt wird.
4. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 2-3, wobei ein oder mehrere Flockungsmittel vor der Behandlung mit dem festen Adsorptionsmaterial zu der Fermentationsbrühe zugegeben werden.
5. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-4, wobei die Proteinlösung bis zu einem Gehalt an Proteinen von 0,1 bis 25 % w/w, vorzugsweise von 0,5 bis 15 % w/w, insbesondere von 1 bis 10 % w/w konzentriert wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das feste Adsorptionsmaterial in einer Konzentration von 0,05-5 %

w/w, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,1-2 % w/w zugegeben wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das feste Adsorptionsmaterial ein aktiviertes Kohlenstoffmaterial ist.
8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Protein ein Enzym ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Enzym eine Protease, eine Lipase, eine Cellulase, eine Amylase oder eine Oxidoreduktase ist.
10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der pH der Proteinlösung zwischen 3 und 10 beträgt.
11. Verfahren nach Anspruch 1 (b), wobei die Kristalle nach dem Ernten erneut aufgelöst und einer fest/flüssig-Trenntechnik unterzogen werden, wodurch das feste Adsorptionsmaterial entfernt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das feste Adsorptionsmaterial in einer Säule oder in einem Filter angeordnet wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen