



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94190299.4

[51]Int.Cl⁶

C12N 11/14

[43]公开日 1995年10月11日

[22]申请日 94.5.18

[30]优先权

[32]93.5.18 [33]NL[31]93201428.5

[32]PCT/EP94[33]01[31]42 94.5.18

[32]WO94/268[33]3 [31]英 94.11.24

[32]95.1.18[33][31]

[86]国际申请 [87]国际公布 [85]进入国家阶段日期

[71]申请人 吉斯特-布罗卡迪斯有限公司

地址 荷兰代尔夫特

[72]发明人 C·S·M·安德拉 J·费杰

M·迪利塞恩

[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 李 瑛

C12N 9/98 // C11D 3/386

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 无粉尘酶的制造方法

[57]摘要

提供了有改良性能的酶颗粒，它基于有好的孔径和孔径分布的核芯粒子，以使酶溶液进入粒子。核芯材料包括液态形状的酶，因而无加工粉状酶的缺点。它仍可得到好的流动性和计量性，含酶颗粒最好以成膜大分子材料包覆。颗粒具有低粉尘度和改进的机械强度。本发明也提供制备酶颗粒的方法。

权 利 要 求 书

1. 一种颗粒，其中核芯由多孔材料组成，存在于颗粒中的(部分)酶被核芯所吸收。

2. 权利要求 1 的颗粒，该颗粒包覆了一层保护外层。

3. 一种颗粒，其中核芯由多孔材料组成，存在于颗粒中的(部分)酶被核芯所吸收，该颗粒包覆了数层涂层，这些涂层含有例如(其它的)酶、稳定剂着色剂和控制化合物释放的层。

4. 一种生产无粉尘酶颗粒的方法，该颗粒由多孔材料组成，并使之与酶和水溶液或非水溶液或水浆接触，因而使酶被颗粒吸收；需要时将颗粒用保护外层或数层涂层包覆以便得到权利要求 2 和 3 中所述的产品。

5. 权利要求 4 的方法，其中的颗粒由多孔材料组成并使之与酶的水溶液或非水溶液或水浆接触，使酶在混合器中被颗粒所吸收。

6. 权利要求 5 的方法，其中的设备是流化床干燥器。

7. 权利要求 4 的方法，其中的颗粒以一保护外层或数层涂层包覆以便得到在混合器中进行包覆的权利要求 2 和 3 中所述的产品。

8. 权利要求 7 的方法，其中包覆是在流化床干燥器中进行

的。

9. 权利要求 4 的方法,其中整个过程是在同一设备中完成的。

10. 权利要求 9 的方法,其中整个过程是在流化床干燥器中完成的。

11. 一种包含了多孔载体的涂层,该涂层由变性纤维素(混合物)和添加剂组成,其中加入了一种或多种化合物以防止包覆过程中颗粒产生附聚和粘结。

12. 权利要求 11 的涂层,其中所加入的化合物是滑石。

13. 在载有含酶的水或非水液体的多孔材料上涂覆涂层,其粒子的强度显著增加。

说 明 书

无粉尘酶的制造方法

本发明涉及新型酶颗粒及其制备方法。

许多工业上有用的酶是用诸如细菌、酵母和真菌之类的微生物生产的。它们在清洁剂、淀粉和织物加工中特别有用，它们也应用于饲料和食品中。

应用于清洁剂中的酶包括蛋白酶、淀粉酶、脂酶和纤维素酶。这些酶是用发酵方法生产的，然后再进行回收、纯化和浓缩，使之成为液态或成为干燥状态。适合的回收技术包括过滤、离心、膜滤、沉淀、结晶、层析和喷雾干燥等。

由于可能出现与干燥酶特别是干蛋白酶制品有关的皮肤病学和其它的健康问题，在这种制品中粉尘的含量应当尽可能低。为此，这种干酶通常是做成颗粒状，为达到此目的已经研制成功数种造粒技术，请见例如 *USP Nos.* 4,009,076; 4,016,040; 4,078,368; 4,242,219 等。

为了进一步降低酶的粉尘释放并保护颗粒，在制成颗粒后将其大部分以成膜的大分子材料包覆。

颗粒基本上可以分成两种类型，第一类是把所用的化合物混

合于颗粒中,第二类是把所用的化合物置于颗粒核芯周围。很清楚,后一类型与化合物混合于颗粒中的颗粒相比,在核芯表面所用的化合物(例如,酶)的浓度是很高的。结果,如果涂层不够充分或者涂层受损时,化合物将比有均匀分布的化合物的颗粒以较高水平暴露于环境中。

JP 58—179492A 公开了有保护涂层的酶粒的制备方法。在整个过程进行干燥时,用流化床干燥器首先将例如液态酶浓缩物喷于核芯材料,然后再将含纤维素衍生物的涂料喷于颗粒上。

EP—A—0193829 叙述了含粒子的无粉尘酶的生产方法,是用酶包覆能水合的核芯粒子,然后再用成膜材料包覆。包覆是将核芯粒子悬浮于流化床干燥器中,在悬浮时将酶的水浆喷于核芯粒子上,将水分蒸发后,在粒子上留下了干燥的酶涂层。所得到的有酶包覆的粒子,当其仍悬浮于流化床中时,喷以大分子材料溶液或分散液,然后干燥,除去溶剂,得到大分子材料的涂层。

WO 9 0/09428 公开了一种清洁添加剂颗粒,它包括初级清洁添加剂(例如一种酶)的核芯,围绕其外的是由次级清洁添加剂(例如另一种酶)、粘合剂、成粒剂,还可以有填料构成的壳,以及核芯和壳之间的保护涂层。其中壳包括纤维素或人造纤维,其核芯也可以包括纤维素或人造纤维。据称该清洁添加剂颗粒呈现高的物理(力学)强度,初级和次级清洁添加剂彼此间是分离的,并/或与有害的环境因素分离。

WO 93/07263 公开了一颗粒状酶组合物，它包括核芯、酶层和外涂层。酶层含乙烯基聚合物，核芯和外涂层也可以含乙烯基聚合物。颗粒状酶组合物据称有降低形成粉尘和残留的趋向，并呈现改进的稳定性和延迟释放的特性。制备这种含酶的颗粒的方法据称可以大大减少工艺时间。

本发明提供了具有改进性能的新的酶颗粒。与以上引用的现有技术比较，本发明的颗粒具有的优点是所用的化合物不仅只在颗粒的表面。

本发明的第一方面是提供包括有酶溶液被吸附在多孔核芯材料中的酶颗粒。

含酶的颗粒宜涂以成膜大分子材料。这种颗粒具有改进的机械强度。

本发明进一步提供了新型酶颗粒的有效制备方法。

本发明的颗粒是以核芯粒子为基础的，该核芯粒子具有较好的孔径和孔径分布，以便酶溶液能进入粒子。因此，核芯材料包括液体形态的酶，从而避免了加工粉状酶的缺点。

至今所能得到的核芯材料是不具备所要求的特性的。核芯材料的孔径不应太大，因为这将特别降低粒子的强度；核芯材料孔径也不应太小，因为这将阻碍所用化合物(例如一种酶)进入孔隙。

欧洲专利申请 EP-A-0542351(1993年5月19日公开，即在本专利申请的优先权日之后)公开了一种制备盐颗粒的方法。用

此方法得到的产品在酶的应用中非常适合于用作核芯材料。从方法的经济学观点看,孔隙度水平是很重要的。

本发明的又一方面是为提供一种有效地制备新的酶颗粒的方法,该方法包括下列各步骤:

(a) 制备非水酶溶液;

(b) 将所述酶溶液施于多孔核芯材料,使酶溶液被多孔核芯材料吸收;

(c) 将得到的酶颗粒进行干燥;还可以

(d) 用大分子成膜材料包覆酶颗粒。

酶溶液的制备可以用各种方法,主要决定于所用酶的物理特性。用于本发明目的的适合溶剂包括乙二醇、丙二醇、如 PEG 200 和 PEG 400 之类的液态聚乙二醇和甘油。在某些情况下,先制备酶的水溶液并加入非水溶剂可能是适用的。然后例如用蒸发方法除去部分或全部的水。非水酶溶液可含一定量的水,例如 10—20%,但不应对颗粒的各组分特别是多孔核芯材料有不利影响。在某些例子中也可以用酶浆液代替酶溶液。对于本领域技术人员来说,这是十分清楚的。

使酶吸收到粒子中可用各种方法来完成,可自含酶的水液或水浆(例如浓缩的发酵汤)或自含酶的非水液或水浆(例如非离子剂、醇类等),或者二者的结合。

适合的多孔核芯材料包括苏打、NaCl 和硅石并有商品供应。

多孔核芯材料的制备最好是用 EP-A-0542351 中所述的方法。

将酶溶液施于多孔核芯材料上可使用各种方法，它们均为现有技术中所知，例如使用混合装置或流化床或混合器—流化床干燥器联用装置。步骤(b)和(c)可以适宜地结合起来。

需要时，可将一个或多个保护涂层施于核芯上以得到无粉尘的含酶粒子。适合的涂覆材料常见于文献中，例如 JP 58-179492A 和 EP-A-0193829。它们包括纤维素涂料或含羟丙基纤维素、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素和/或羟乙基纤维素的纤维素基涂料。也可以使用如 EUDRAGIT^(R) (Röhm Pharma) 的丙烯酸类聚合物。涂料的施用量可在相当大的范围内变化，但通常在 0.1 和 25wt% 之间。纤维素基涂料最好在 5 和 25wt% 之间。

可利用涂层将其它有用的化合物加于颗粒上，甚至可以制备各涂层有不同功能(例如稳定存在的化合物、着色等)的多涂层颗粒。

在本领域技术人员比较了解的某些应用中是适宜地使用能缓慢溶解或缓慢释放被吸收的酶的多孔核芯材料。此技术与涂覆技术相结合可使颗粒组合物能按需要依次释放几种化合物。例如将蛋白酶吸收于多孔核芯中、将脂酶涂覆在核芯上、最后将涂料层施于颗粒上的颗粒。

按本发明制备酶颗粒的整个过程(吸收、涂料和其它化合物的涂覆)可在同一设备中适当地进行，例如在混合器或流化床中进行。

本发明方法的优点是,当方法的完成不只一个步骤时,在设备之间运送颗粒时降低了(酶)粉尘的形成。此外,酶溶液或水浆在多孔颗粒中的吸收较之例如在流化床中将酶溶液或水浆喷在核芯上或将酶与多孔载体混合要快得多。

以本发明的多孔材料也可以用其它技术得到依次或受控的化合物释放,而不需调节涂层的组成或位置。

下面的实施例的提出只是为了进行说明,而非对本发明进行限制。

实验方法

在实施例中所用的蛋白酶是高碱性蛋白酶 *PB92*。(见 *USP No. Re 30, 602*),可从 *Gist - brocades N. V.* 购得,商标为 *MAXACAL*[®]。

实施例中所用的脂酶,可由类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) *M-1* (*CBS 473. 85*) 菌株得到 (见例如 *EP-B-0218272*; *USP Nos. 4,933,287* 和 *5,153,135*)。

实施例中所用的凝乳酶是用用乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces Lactis*) 的转化酵母菌株生产的,并可自 *Gits - brocades N. V.* 购得,商标为 *MAXIREN*^(R) (见例如 *EP-B-0096430* 和 *EP-B-0301669*,以及 *USP No. 4,859,596*)。

实施例 1

从 *AKZO N. V.* 分别得到孔隙率为 6 (*Soda ash Denes*^(R))、16

(*Soda ash Compact*^(R)) 和 38% (*Soda ash Sorbent*^(R)) 的苏打 (*Soda*) 核芯, 将其过筛后得到粒径为 315—710 μm 的粒子。

分别将乙二醇和丙二醇加入浓的蛋白酶水溶液中以生产酶液, 然后蒸发酶液中的水使含水量降至约 10%。液体中蛋白酶浓度为 3.7MADU/g ($=3.7 \times 10^6$ ADU/g)。将此液体喷在苏打粒子上。根据粒子的孔隙率水平使粒子完全以液体充填。

喷雾和吸收是在一旋转容器中进行的(酶液的进口温度为 30—50 $^{\circ}\text{C}$)。然后将此材料基本上按 JP—58—179492A 或 EP—A—0193829 所述的方法在流化床干燥器中进行包覆, 并制得无粉尘的酶颗粒。

生产出的乙二醇、丙二醇、PEG 400 和甘油的非水蛋白酶溶液的蛋白酶活性在 3.4 至 3.7MADU/g 之间。液体的吸收过程得到的酶产率是基于酶活性的 61% 至 98%, 决定于非水溶液中的含水量。试验分别用 6%、16% 和 38% 孔隙率的苏打(见上述)进行。

在加入含蛋白酶的液体后, 在一流化床涂覆器中(入口空气温度为 65 $^{\circ}\text{C}$, 出口温度为 40 $^{\circ}\text{C}$)包覆离子。大量生产的得率很好, 并保持高的酶活性滞留。

实施例 2

按实施例 1 的相同方法制备蛋白酶颗粒, 但用多孔的 NaCl 核芯以代替苏打核芯。NaCl 核芯的制备基本上按 EP—A—0542351 中所述的方法, 其孔隙率为 15%, 并将其充填以含活性为 3.

4MADU/g 的含蛋白酶非水液体, 得到活性为 440,000ADU/g(酶产率 >97%) 的颗粒。经在与上述相同的条件在流化床中以纤维素基涂料(20%w/w) 包覆后, 得到活性为 397.500ADU/g 的包覆颗粒, 大量生产的得率很好(>92%)。

实施例 3

从凝乳酶进行相似实验。将凝乳酶溶于丙二醇, 液体能很好地被多孔 NaCl 吸收, 可达 NaCl 重量的 15%, 有同样好的酶产率和多孔材料负荷。

实施例 4

将粒径为 300—710 μm 的多孔核芯材料 (Soda ash Compact^(R), 600g) 导入流化床干燥器并于 38 $^{\circ}\text{C}$ 将含脂酶和非离子剂 (Triton X114^(R)) 的乙二醇溶液导入并喷在多孔粒子上。蒸发掉水分, 非离子剂和脂酶被粒子吸收, 再将涂料喷在粒子上, 得到无粉尘的颗粒。

实施例 5

按与实施例 4 相似的方法制备了蛋白酶颗粒。将含蛋白酶的乙二醇和丙二醇溶液分别直接喷入流化床中流化的多孔材料(粒径在 400—600 μm 之间)之顶部。当蛋白酶溶于乙二醇和丙二醇后, 液体均能被材料很好地吸收。

在流化床涂覆器中施以附加的纤维素基涂料 (Seppic 的 SEPIFILM^(R)) 后, 并过 300 和 600 μm 筛, 粉尘水平进一步降低。

按上述相似方法制备的并包覆纤维素基涂料(20% w/w)的四个蛋白酶颗粒样品在 *Heubach* 磨损试验仪中进行粉尘形成试验(见 WO 93/07263)。在此试验中,酶的粉尘水平低于 0.5mg/20g 为极低;总粉尘数值低于 10mg/20g 也为极低。结果给予表 1。

表 1

四种涂覆的蛋白酶成颗粒状的样品的 Heubach 磨耗水平

Heubach 磨耗水平				
样品号	1	2	3	4
酶粉尘 (4 g / 20 g 样品, 基于 300,000 ADU/g)	0.45	0.31	0.14	0.20
总粉尘 (4 g / 20 g 样品)	7.3	5.6	7.6	5.9

可以看出,在试验条件下未包覆的颗粒是被擦污涂抹的。与之相对照,包覆的粒子除了其低的粉尘水平外足以经受 *Heubach* 磨损试验中钢球的粉碎力。

实施例 6

以非水蛋白酶溶液充填不同的多孔核芯材料(苏打、*NaCl* 和硅石);用乙二醇、丙二醇作为溶剂。

Soda ash Sorbent^(R)(见实施例 1)吸收液体可达 3.7wt%(基于苏打重量计算);所用的 *NaCl* 可吸收其重量的 15%;硅石可吸收 100%。

表 2 所示是各种含酶液体被各种核芯材料吸收后的残酶活性。

表 2

不同的多孔材料部分和完全负载后测定的蛋白酶产率

	产 品	液体吸收% (重量)								
		5	10	15	20	25	30	37	100	
残留酶活性 (%)	Soda ash Sorbent ^o	100	102	90	93	93	92	94		
	NaCl	95	101	97						
	硅石									102

实施例 7

用各种非水液体得到的材料在 7°C (和环境相对湿度) 下对其蛋白酶稳定性进行试验。表 3 所示为苏打吸收蛋白酶的稳定性试验结果。

表 3

吸收的蛋白酶在表列时间的稳定性

残留活性 (%)	有蛋白酶溶解于其中的液体*	贮存时间 (月)		
		0	2	3
EG		100	92	85
PG		100	103	102
PEG		100	102	98

* EG = 乙二醇, PG = 丙二醇, PEG = 聚乙二醇 400

本申请说明书中所述的所有出版物(包括专利和专利申请)对于本发明所属领域的技术人员的技术水平是指示性的。文中所有的出版物在此均可用作参考,正如具体指出的个别出版物在此作为参考一样。

虽然本发明为了能被清楚地理解而以说明及实施例进行了一定程度的详细叙述。但很明显,对于本领域技术人员来说,在不脱离所附权利要求书的精神和范围情况下可对其做出的许多改变或改进。