

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 1/30
C12N 9/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 97192948.3

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 31 日 [11] 授权公告号 CN 1216898C

[22] 申请日 1997.3.3 [21] 申请号 97192948.3 [30] 优先权 [32] 1996. 3. 14 [33] DK [31] 0295/1996 [86] 国际申请 PCT/DK1997/000095 1997. 3. 3 [87] 国际公布 WO1997/033905 英 1997. 9. 18 [85] 进入国家阶段日期 1998. 9. 10 [71] 专利权人 诺沃奇梅兹有限公司 地址 丹麦巴格斯瓦德 [72] 发明人 S·尼尔森 N·M·麦德森 C·辛普森 审查员 王启扬	[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
权利要求书 1 页 说明书 18 页	

[54] 发明名称 利用固体吸附材料以提高的产率结晶蛋白质的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种以提高的产率结晶从包含一种以上蛋白质的蛋白质溶液中获得的多肽或者蛋白质的方法，该方法包括：(a)利用一种固体吸附材料处理蛋白质溶液；并且(b)在除去所说的固体吸附材料之后结晶所说的多肽或所说的蛋白质；或者(c)不除去所说的吸附材料就结晶所说的多肽或所说的蛋白质。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种从发酵肉汤中获得蛋白质晶体的方法，该方法包括：
 - (a)利用一种固体吸附材料处理所述发酵肉汤；
 - (b)不除去所说的吸附材料就从所述发酵肉汤中结晶所说的蛋白质；并且
 - (c)收获步骤(b)所得的晶体。
2. 按照权利要求 1 的方法，其中在用固体吸附材料处理之前，添加一种或多种絮凝剂至所说的发酵肉汤中。
3. 按照权利要求 1 的方法，其中将所说的发酵肉汤浓缩成蛋白质含量从 0.1 到 25%w/w。
4. 按照权利要求 1 的方法，其中将所说的固体吸附材料以 0.1-2%w/w 的浓度添加。
- 5.按照权利要求 1 的方法，其中所说的固体吸附材料是一种活性碳材料。
6. 按照权利要求 1 的方法，其中所说的蛋白质是酶。
7. 按照权利要求 6 的方法，其中所说的酶是蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶、淀粉酶或者氧化还原酶。
8. 按照权利要求 1 的方法，其中所说的发酵肉汤 pH 在 3 和 10 之间。
9. 按照权利要求 1 的方法，其中将收获后的晶体重新溶解，并且经固体/液体分离技术处理，除去所说的固体吸附材料。
10. 按照权利要求 1 的方法，其中将所说的固体吸附材料放置在层析柱或过滤器中。

利用固体吸附材料以提高的产率结晶蛋白质的方法

技术领域

本发明涉及一种以提高的产率结晶多肽或者蛋白质的简单的、廉价的和十分有效的方法，特别是结晶从发酵肉汤获得的酶。

现有技术

对于工业目的，酶通常以液体或者无定形物提供。当尚未以液体提供时，它们通常以无定形物提供，因为通常认为结晶酶的已知方法太昂贵以致于不能用于工业规模。

有大量关于结晶酶的文献。由于结晶酶的技术具有高度经验性，因此要使特定结晶方法的结果一般化是困难的。

迄今为止已知蛋白质结晶方法大多数的特征性特点是：纯化的和浓缩的初始溶液，十分长的结晶时间，以及化学药品(如盐)的高消费，对于参考文献参见，例如，生物工程和生物技术 48,1995,P.316-323。

已描述了利用聚乙二醇的工业酶结晶方法，对于参考文献参见 WO 95/01989。

通过从溶液中浸提出盐，随后调节溶液的 pH 到酶的 pI 水平附近来结晶酶是可能的，这一点也已描述过，参考文献可参见 WO 94/22903。

人们已经知道，固体吸附材料(如活性碳)在除色方面是有效的，但是以前没有描述过这样的吸附材料对于多肽/蛋白质结晶具有很大的作用。

发明简述

在本发明中，发明人惊奇地发现，在蛋白质结晶操作之前或尤其是同时进行碳处理时明显地提高结晶产率和结晶纯度。

因此，本发明提供一种以提高的产率结晶从包含一种以上蛋白质的蛋白质溶液中获得的多肽或者蛋白质的方法，该方法包括：

(a)利用一种固体吸附材料处理蛋白质溶液；并且

(b)在除去所说的固体吸附材料之后结晶所说的多肽或所说的蛋白

质；或者

(c)不除去所说的吸附材料就结晶所说的多肽或所说的蛋白质。

发明详述

本发明提供一种以提高的产率从蛋白质溶液中，特别从发酵(培养)肉汤中结晶蛋白质或多肽的方法。

除兴趣多肽或者蛋白质之外，该发酵肉汤包含许多诸如底物化合物之类的其它化合物，例如碳水化合物和盐类，细胞，以及其它代谢物如核酸和其它多肽和蛋白质。

优选地，应用于本发明方法的发酵肉汤首先进行固体/液体分离，例如，絮凝、离心、过滤、微量过滤、超滤、沉淀、蒸发或者它们的组合。

由于本发明的方法对相对不纯的溶液十分起作用，因此，在用固体吸附材料处理之前，利用层析方法纯化从发酵肉汤获得的蛋白质溶液通常是不必要的。

在更具体的实施方案中，本发明的方法包括用本身已知的方法浓缩包含蛋白质的溶液。这样的方法包括通过超滤、渗滤、透析或者蒸发进行浓缩。

虽然对于进行用固体吸附材料处理来说，浓缩包含蛋白质的溶液是不重要的，但是它从处理和产率方面来说却是方便的。由于实际原因，可以将包含蛋白质的溶液浓缩成蛋白质含量为 0.1 到 25%(w/w)，优选地为 0.5-15%(w/w)，特别是 1-10%(w/w)。

本发明方法可以运用于本领域中已知的任何结晶方法，例如，用于盐结晶，用于利用如 WO 95/01989 所公开的聚合物的结晶，或者用于利用从该溶液中浸提出盐的原理，随后调节溶液的 pH 到酶的 pI 水平附近的结晶方法，参考文献可参见 WO 94/22903。最后提到的结晶方法用于本发明的实施例中。

在更优选的实施方案中，将本发明的方法运用于酶的结晶，特别是选自下组的酶：蛋白酶、多肽酶、脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶、木糖聚酶、异构酶和氧化还原酶。

蛋白酶

按照本发明结晶的合适的蛋白酶包括可以来自细胞(如微生物)的发酵产物的任何蛋白酶。优选的是细菌或者真菌来源的。包括化学或者基因修饰突变体。蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶,优选的是碱性微生物蛋白酶或者胰蛋白酶样蛋白酶。碱性蛋白酶的例子是枯草菌素,尤其是那些从芽孢杆菌产生的枯草菌素,例如,枯草菌素 Novo, 枯草菌素 Carlsberg, 枯草菌素 309, 枯草菌素 147 和枯草菌素 168(在 WO89/06279 中描述)。胰蛋白酶样蛋白酶的例子是胰蛋白酶(例如猪或者牛来源的)和在 WO89/06270 中描述的镰孢属蛋白酶。

优选的市售蛋白酶包括那些 Novo Nordisk A/S(丹麦)以商品名 Alcalase, Savinase, Primase, Durazym 和 Esperase 出售的蛋白酶,那些 Gist-Brocades 以商品名 Maxatase, Maxacal, Maxapem 和 Properase 出售的蛋白酶,那些 Genencor International 以商品名 Purafect 和 Purafect OXP 出售的蛋白酶,以及那些 Solvay Enzymes 以商品名 Opticlean 和 Optimase 出售的蛋白酶。

脂肪酶

按照本发明结晶的合适的脂肪酶包括可以来自细胞(如微生物)的发酵产物的任何脂肪酶。优选的是细菌或者真菌来源的。包括化学或者基因修饰突变体。

有用脂肪酶的例子包括 *Humicola lanuginosa* 脂肪酶,例如,如 EP 258 068 和 EP 305 216 中所描述的, *Rhizomucor miehei* 脂肪酶,例如,如 EP 238 023 中所描述的,假丝酵母属(*Candida*)脂肪酶,如 *Candida antarctica* 脂肪酶,例如,如 EP 214761 所描述的 *Candida antarctica* 脂肪酶 A 或者 B,诸如产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)和假产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)脂肪酶之类的假单胞菌属(*Pseudomonas*)脂肪酶,例如,如 EP218 272 中所描述的,葱头假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*)脂肪酶,例如,如 EP331376 中所描述的, *Pseudomonas stutzeri* 脂肪酶,例如,如 BP 1,372,034 中所公开的, *Pseudomonas fluorescens* 脂肪酶,芽孢杆菌属(*Bacillus*)脂肪酶,例如,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)脂肪酶(Dartois 等,(1993),生物化学生物物

理学报 1131,253-260), 嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) 脂肪酶(JP 64/744992)和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)脂肪酶(WO 91/16422)。

此外, 一些克隆脂肪酶可能是有用的, 包括由 Yamaguchi 等描述的 *Penicillium camembertii* 脂肪酶(Yamaguchi 等, (1991), 基因 103 , 61-67), *Geotricum candidum* 脂肪酶(Schimada , Y.等, (1989), 生物化学杂志 106, 383-388), 以及各种诸如 *Rhizopus delemar* 脂肪酶(Hass M.J 等, (1991), 基因 109 , 117-113), 雪白根霉(*Rhizopus niveus*)脂肪酶(Kugimiya 等, (1992), 生物科学, 生物技术, 生物化学 56 , 716-719) 和 *Rhizopus oryzae* 脂肪酶之类的根霉属(*Rhizopus*)脂肪酶。

也可以将诸如角质酶之类的其它类型的脂解酶进行结晶, 例如, 如 WO 88/09367 所描述的由门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)生成的角质酶, 或者由 *Fusarium solani pisi* 生成的角质酶(例如 WO 90/09446 所描述的)。

尤其合适的脂肪酶是诸如 M1 Lipase^{MT} , Luma fast^{MT} 和 Lipomax^{MT}(Gist-Brocades), Lipolase^{MT} 和 Lipolase Ultra^{MT}(Novo Nordisk A/S)的脂肪酶, 以及脂肪酶 P "Amano"(Amano 药物有限公司)。

淀粉酶

按照本发明结晶的合适的淀粉酶(α 或者 β)包括可以是来自细胞(如微生物)的发酵产物的任何淀粉酶。优选的是细菌或者真菌来源。包括化学或者基因修饰突变体。

淀粉酶包括例如, 从芽孢杆菌属(*Bacillus*)获得的 α -淀粉酶, 特别是在英国专利说明书 No.1,296,839 中更详细描述的一种地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的特定菌株。市售的淀粉酶是 DuramylTM , TermamylTM , FungamylTM 和 BANTM(由 Novo Nordisk A/S 提供的)以及 RapidaseTM 和 Maxamyl PTM(由 Gist-Brocades 提供的)。

其它有用的酶是例如从芽孢杆菌属, 热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacter* 或者 *Thermoanaerobacterium*)获得的 CGT 酶(环糊精葡聚糖转移酶, EC 2.4.1.19)。

纤维素酶

在本文中,所说的术语"纤维素酶"是指催化纤维素降解成葡萄糖,纤维二糖,丙糖和其它纤维寡糖的酶。

在本发明的一个优选的实施方案中,结晶的纤维素酶是内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4),优选的是单组分(重组)内切葡聚糖酶。

优选地,所说的纤维素酶是微生物纤维素酶,更优选的是细菌或者真菌纤维素酶。

细菌纤维素酶的有用例子是来源于下组细菌或者可由下组细菌产生的纤维素酶,这组细菌选自假单胞菌属(*Pseudomonas*),芽孢杆菌属(*Bacillus*),纤维单胞菌属(*Cellulomonas*),梭菌属(*Clostridium*), *Microspora*, 栖热袍菌属(*Thermotoga*), *Caldocellum* 以及放线菌属(*Actinomyces*)如链霉菌属(*Streptomyces*),高温单孢菌属(*Termomonospora*)和热酸菌属(*Acidothemus*),特别是解纤维假单胞菌(*Pseudomonas cellulolyticus*),灿烂芽孢杆菌(*Bacillus lautus*),粪肥纤维单胞菌(*Cellulomonas fimi*), *Microspora bispora*, 褐色高温单孢菌(*Termomonospora fusca*), *Termomonospora cellulolyticum* 和解纤维热酸菌(*Acidothemus cellulolyticus*)。

有用的结晶的纤维素酶是酸性纤维素酶,该酸性纤维素酶是来源于下组真菌或者可由下组真菌产生的,这些真菌选自由木霉属(*Trichoderma*),漆斑菌属(*Myrothecium*),曲霉属(*Aspergillus*), *Phanaerochaete*, 脉孢菌属(*Neurospora*), *Neocallimastix* 和葡萄孢属(*Botrytis*)组成的属,特别是选自绿色木霉(*Trichoderma viride*), *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Myrothecium verrucaria*, 黑曲霉(*Aspergillus niger*), 米曲霉(*Aspergillus oryzae*), *Phanaerochaete chrysosporium*, 粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*), *Neocallimastix partriciarum* 和灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)。

另一种有用的结晶的纤维素酶是中性或者碱性纤维素酶,优选的是真菌的中性或者碱性纤维素酶,该纤维素酶来源于下组真菌或可由下组真菌产生: 曲霉属(*Aspergillus*), 青霉属(*Penicillium*), 毁丝霉属

(*Myceliophthora*), 腐质霉属(*Humicola*), 耙菌属(*Irpex*), 镰孢属(*Fusarium*), *Stachybotrys*, 帚霉属(*Scopulariopsis*), 毛壳属(*Chaetomium*), 疣孢霉属(*Mycogone*), 轮枝孢属(*Verticillium*), 漆斑菌属(*Myrothecium*), *Papulospora*, 粘帚霉属(*Gliocladium*), 头孢霉属(*Cephalosporium*)和顶孢霉属(*Acremonium*), 特别是 *Humicola insolens*, 尖镰孢(*Fusarium oxysporum*), 嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*), 微紫青霉(*Penicillium janthinellum*)和 *Cephalosporium sp.*, 优选的是 *Humicola insolens*, DSM 1800, 尖镰孢, DSM 2672, 嗜热毁丝霉, CBS 117.65, 以及 *Cephalosporium sp.*, RYM-202。

其它有用的结晶的纤维素酶的例子是纤维素酶的变体, 其母本酶是真菌或者细菌来源的纤维素酶, 例如可由真菌腐质霉属(*Humicola*), 木霉属(*Trichoderma*)或者镰孢属(*Fusarium*)的菌株产生的纤维素酶。

氧化还原酶

按照本发明结晶的氧化还原酶包括过氧化物酶和氧化酶(如漆酶)。

过氧化物酶

显示过氧化物酶活性的酶可能是任何由酶分类号 EC 1.11.1.7 所包括的显示过氧化物酶活性的过氧化物酶, 或者由此所衍生的任何片段。

优选地, 在本发明的方法所使用的过氧化物酶是可由微生物(如真菌或者细菌)产生的。一些优选的真菌包括属于半知菌亚门(*Deuteromycotina*), 丝孢菌纲(*Hyphomycetes*)的菌株, 例如, 镰孢属(*Fusarium*), 腐质霉属(*Humicola*), 木霉属(*Trichoderma*), 漆斑菌属(*Myrothecium*), 轮枝孢属(*Verticillium*), *Arthromyces*, 卡尔黑霉属(*Caldariomyces*), *Ulocladium*, *Embellisia*, 枝孢属(*Cladosporium*)或者 *Dreschlera*, 特别是尖镰孢(*Fusarium oxysporum*) (DSM 2672), *Humicola insolens*, *Trichoderma reesei*, *Myrothecium verrucaria* (IFO 6113), 黄萎轮枝孢(*Verticillium albo-atrum*), 大丽花轮枝孢(*Verticillium dahliae*), *Arthromyces ramosus* (FERM P-7754), *Caldariomyces fumigatus*, *Ulocladium chartarum*, *Embellisia alli* 或者 *Dreschlera halodes*。

其它优选的真菌包括属于担子菌亚门(*Basidiomycotina*), 担子菌纲(*Basidiomycetes*)的菌株, 例如鬼伞属(*Coprinus*), 展齿革菌属(*Phanerochaete*), 云芝属(*Coriolus*)或者栓菌属(*Trametes*), 特别是灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*) f. *microsporus*(IFO 8371), 长根鬼伞(*Coprinus macrorhizus*), *Phanerochaete chrysosporium*(例如 NA-12)或者栓菌属(以前称为多孔菌属(*Polyporus*)), 例如杂色栓菌(*Trametes versicolor*)(例如 PR4 28-A)。

进一步优选的真菌包括属于接合菌亚门(*Zygomycotina*), *Mycoraceae* 纲的菌株, 例如根霉属(*Rhizopus*)或者毛霉属(*Mucor*), 特别是冻土毛霉(*Mucor hiemalis*)。

一些优选的细菌包括放线菌目(*Actinomycetales*)的菌株, 例如, 类球形链霉菌(*Streptomyces spheroides*)(ATTC 23965), 热紫链霉菌(*Streptomyces thermoviolaceus*)(IFO 12382)或者轮丝链轮丝菌轮丝亚种(*Streptoverticillum verticillium* ssp. *verticillium*)。

其它优选的细菌包括短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)(ATCC 12905), 嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*), 球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*), *Rhodomonas palustri*, 乳链球菌(*Streptococcus lactis*), *Pseudomonas purrocinia* (ATCC 15958)或者荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)(NRRL B-11)。

进一步优选的细菌包括属于粘球菌属(*Myxococcus*)(例如, 变绿粘球菌(*Myxococcus virescens*))的菌株。

特别地, 重组产生的过氧化物酶是优选的, 例如, 从 *Coprinus* sp. 所产生的过氧化物酶, 特别是按照 WO 92/16634 的长根鬼伞(*Coprinus macrorhizus*)或者灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*), 或者其变体, 例如如 WO 93/24618 和 WO 95/10602 所描述的变体。

漆酶和漆酶相关的酶

在本发明的上下文中, 漆酶和漆酶相关的酶包括由酶分类号 EC 1.10.3.2 所包括的任何漆酶, 由酶分类号 EC 1.10.3.1 所包括的任何 catechol 氧化酶, 由酶分类号 EC 1.3.3.5 所包括的任何胆红素氧化酶或

者由酶分类号 EC 1.14.18.1 所包括的任何一元酚单加氧酶。

微生物漆酶可能来源于细菌或者真菌(包括丝状真菌和酵母), 并且合适的例子包括可由曲霉属, 脉孢菌属(*Neurospora*)(例如 *Neurospora crassa*), 柄孢壳属(*Podospora*), 葡萄孢属(*Botrytis*), 金钱菌属(*Collybia*), 层孔菌属(*Fomes*), 香菇属(*Lentinus*), 侧耳属(*Pleurotus*), 栓菌属(*Trametes*)(例如 *Trametes villosa* 和杂色栓菌(*Trametes versicolor*)), 丝核菌属(*Rhizoctonia*)(例如立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)), 鬼伞属(*Coprinus*)(例如褶纹鬼伞(*Coprinus plicatilis*)和灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)), *Psatyrella*, 毁丝霉属(*Myceliophthora*)(例如 *Myceliophthora thermophila*), *Schytalidium*, 多孔菌属(*Polyporus*)(例如 *Polyporus pinsitus*), 射脉菌属(*Phlebia*)(例如 *Phlebia radita*(WO 92/01046)), 或者云芝属(*Coriolus*)(例如毛云芝(*Coriolus hirsutus*)(JP 2-238885))的菌株产生的漆酶, 特别是由栓菌属(*Trametes*), 毁丝霉属(*Myceliophthora*), *Schytalidium* 或者多孔菌属(*Polyporus*)可获得的漆酶。

以吸附材料处理

我们惊奇地发现, 在结晶过程之前或同时添加低浓度的吸附材料, 可以明显地提高晶体产率, 并且同时提高所形成的晶体的纯度以及给出所包括的实施例中指出的更容易获得的形态。

按照本发明, 可以利用任何本领域所熟知的固体吸附材料; 尤其有用的吸附材料是碳材料, 特别是活性碳材料。碳材料可以是粉、颗粒、小球形式或者是任何本领域所熟知的其它形式。

有用的活性碳类型可以由 Elf Atochem North America 提供的 Acticarbon 4S #2228, 由 American Norit 公司提供的 Darco 碳 KB-B, 或者由匹兹堡活性碳提供的 Calgon 颗粒碳。

按照本发明可以利用的其它固体吸附材料包括硅藻土(Kieselguhr)、漂白土、皂土和各种疏水或者离子交换树脂。

在某些情况下, 添加不止一种的吸附材料可能是有益的。

在本发明的特定实施方案中固体吸附材料是以 0.05-5% (w/w)的浓度, 优选的是以 0.1-2% (w/w)的浓度添加至蛋白质溶液中。

固体吸附材料可以以一步添加,或者可以以不止一步添加;通常当固体吸附材料以一步添加时,将令人满意地完成该过程。

通常将固体吸附材料的处理持续达 40 小时,特别是 1/2-20 小时,优选的是 1-10 小时,更优选的是 1-5 小时,在结晶之前除去该固体吸附材料,或者如果当结晶时固体吸附材料在溶液中,那么只要结晶持续它将在溶液中结晶的时间可能不同,将取决于所选择的结晶方法。

在某些情况下,结晶开始之后首先添加吸附材料可能是有益的。

所选择的固体吸附处理的时间将取决于许多因素如产物稳定性,微生物水平以及工艺设备的容量,但是通常情况下对于短时间处理来说,没有必要添加任何稳定剂或者抑制剂至蛋白质溶液中。

用固体吸附材料处理的蛋白质溶液的温度优选的是从 5 °C 到 50 °C,特别是从 10 °C 到 40 °C。

用固体吸附材料处理的蛋白质溶液的 pH 优选的是从 3-10。

代替以粉、颗粒或者小球的形式添加固体吸附材料至蛋白质溶液中,在某些情况下,让蛋白质溶液通过用吸附材料填充的层析柱或者让蛋白质溶液通过,例如碳滤器可能是有益的。例如,在盐结晶过程中,情况可能就是这样,其中首先添加一些盐,接着让蛋白质溶液通过碳柱或者碳滤器,然后添加余下的盐,成核开始,这可能是有益的。

结晶

通过利用本发明的方法我们已经证明(参见实施例 2):

提高结晶产率,改善晶体纯度,减少晶体形成的结晶时间,以及改变所形成的晶体的形态。

实施例 2 也显示如果在结晶期间将碳留在浓缩液中,固体吸附材料的作用是最大的。在浓缩液中留下碳也是为了减少操作时间的优选生产方式。

结晶后的回收

本发明的方法导致以更纯的形式和更高的产率结晶多肽或蛋白质,特别是酶。

如果当结晶时,固体吸附材料留在溶液中,那么为了除去如吸附材料

一样的不溶物质，通常在收获后将晶体重新溶解，然后将它作为固液分离方法(如过滤)的实验材料。

如果需要很高纯度的结晶产物，可以重复本发明的方法，即将本发明的方法的结晶终产物进行重新溶解，并且经一次或多次附加的固体吸附材料处理和/或结晶。

终产物可以是一种结晶产物或者为了产生如高纯度的液体多肽或蛋白质产物，可以将晶体重新溶解。

下列实施例将进一步说明本发明，该实施例不以任何方式限制如所要求的本发明的范围。

实施例 1

通过提高脂肪酶的结晶效能的碳同时吸附杂质的作用

如下表 1 所显示的，将 100kg 包含在米曲霉中表达的 *Humicola lanuginosa* 脂肪酶的培养肉汤(如 EP 305 216 所描述的)进行预处理。

	预处理
肉汤	100kg
水	100kg

表 1：脂肪酶肉汤的预处理。

通过滤鼓过滤除去生产菌株，将获得的滤液利用 Seitz K900 滤板进行连续过滤。利用 Seitz EK1 滤板通过过滤减少微生物总数。将形成的滤液在 Dow DDS(20kD)膜上进行浓缩。将 UF-浓缩液进一步渗滤成传导率为 0.8 mS。

以(OD_{440nm}/g 活性脂肪酶)之比来说明形成的浓缩液的纯度。

	OD _{440nm} /g 活性脂肪酶
UF - 浓缩液	104

表 2：产生的浓缩液的纯度(结晶开始前)。

将浓缩液经不同量的 Acticarbon 4S#2228 进行处理，利用 20%w/w 甲酸溶液调节 pH=4.3，并且保持 24 小时的结晶时间。

通过离心获得晶体悬浊液，利用去离子水洗涤晶体，并且利用甲酸调节到 pH=4.3。将晶体块溶解并且配制成 4 倍(重量)的

50%MPG+0.3%w/w $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 然后利用 Seitz EK1 滤板过滤除去碳。利用三丁酸甘油酯测定分析形成的配制的产物的 $\text{OD}_{440\text{nm}}$ 和脂肪酶活性。

三丁酸甘油酯测定以所说的酶催化三丁酸甘油酯的水解为基础, 同时将碱消耗作为时间的函数。将一个脂肪酶单位(LU)定义为在标准条件(即 $30.0\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}7.0$; 用阿拉伯树胶作为乳化剂并且以三丁酸甘油酯作为底物)每分钟释放 $1\mu\text{mole}$ 可滴定的丁酸所需的酶量。

下表 3 显示终产物的产率和纯度。

	在配制的产物中 活性脂肪酶的产 率	在配制的产物中 $\text{OD}_{440\text{nm}}/\text{g}$ 活性脂肪酶	形态
0%w/w 碳	53%	12.4	菱形
0.5%w/w 碳	64%	7.2	棒状
1.0%w/w 碳	77%	4.5	棒状

表 3: 经增加量的碳处理的并且在 $\text{pH}=4.3$ 和 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 下结晶的 UF-浓缩液, 该 UF-浓缩液显示出产率、纯度和形态。

我们发现在结晶期间通过利用碳同时提高了产率和纯度, 这表明除去了抑制脂肪酶的结晶的杂质。

在配制的产物中, 通过颜色的减弱($\text{mOD}_{440\text{nm}}/\text{g}$ 活性脂肪酶)看出其纯度的提高。我们也发现在形态方面朝着棒状变化(从菱形)。

换句话说, 本实施例显示通过利用本发明的方法我们可以充分地提高产率并且同时获得更高的纯度以及形成的酶晶体是相同的棒状形状。

实施例 2

通过碳处理预吸附或同时吸附杂质对脂肪酶结晶的作用

如实施例 1 所描述的方法获得 UF-浓缩液。将 UF-浓缩液渗滤成传导率为 1.0 mS 。

如下表 4 所显示的以($\text{mOD}_{440\text{nm}}/\text{g}$ 活性脂肪酶)之比说明形成的浓缩液的纯度。

	mOD _{440nm} /g 活性脂肪酶
UF-浓缩液	42

表 4：生产的浓缩液的纯度(在结晶开始之前)。

将浓缩液集分成三个组分 A、B 和 C，并且如下表 5 所显示的进行处理。

	处理
组 分 A	没有处理
组 分 B	添加 0.5% 的 Acticarbon 4S 在约 20 °C 下保持 1 小时，然后在结晶前利用 EK1 滤板过滤除去碳
组 分 C	添加 0.5% 的 Acticarbon 4S，并且保持到结晶

表 5：在结晶开始之前经不同处理的三个组分。

然后将三个组分调节到 pH=4.3，加热到 28 °C，保持 24 小时的结晶时间。通过离心获得晶体悬浊液，用去离子水洗涤晶体，利用甲酸调节到 pH=4.3。将晶体块溶解并且配制成 4 倍（重量）的 50%MPG+0.3%w/w CaCl₂·2H₂O 溶液，然后利用 Seitz EK1 滤板过滤除去碳。利用三丁酸甘油酯测定分析形成的配制的产物的 OD_{440nm} 和脂肪酶活性。

下表 6 显示终产物的产率和纯度。

	在配制的产物中活性脂肪酶的产率	在配制的产物中 OD _{440nm} /g 活性脂肪酶	可见晶体形成的时间	形态
组分 A	84%	9.4	3 小时	80%菱形 20%棒状
组分 B	89%	6.1	1 小时	100%棒状
组分 C	93%	4.4	1 小时	100%棒状

表 6：当在结晶期间在浓缩液中留下碳时，在产率和纯度方面结晶的组分 A、B 和 C 显示更好的作用。

当比较组分 A 与组分 B 或组分 C 时，我们看到，在结晶前进行碳处理增加产率和纯度，并且如果在结晶期间将碳留在浓缩液中其效果最大。在浓缩液中留下碳也是为了减少操作时间的优选生产方式。

从表 6 也看出，我们通过利用碳处理可以控制从晶形混合物向一种相同的晶形变化的形态，因此利用本发明的方法提高了产率，同时又控制了形态。

实施例 3

中试规模评估通过碳处理提高脂肪酶结晶效能同时吸附杂质的作用如实施例 1 所描述的在中试规模中以一种类似的方法获得 UF-浓缩液。将 UF-浓缩液渗滤成传导率为 1.0 mS。

利用增加量的碳(Darco 碳 KB-B 型)(直到如下表 7 所显示的用于中试规模试验的量)实施实验室检验。

	% 添加的碳	来自配制的产物中活性脂肪酶的产率	配制的产物的 mOD _{440nm} /g 活性脂肪酶
实验室对照	0%	70%	7.9
实验室检验#1	0.5%	77%	6.1
实验室检验#2	1.0%	86%	4.9
中试规模检验	1.0%	84%	5.0

表 7：在结晶期间结合实验室和中试规模碳处理的试验。

表 7 表明两种产率和纯度的实验室实验和中试规模结果之间的惊人地非常一致。因此，对工业化方法生产来说，直接提高实验室结果是可能的。再者，在实验室实验中看出在碳处理和对照之间有显著的差异。

实施例 4

通过碳处理提高脂肪酶结晶效能，利用颗粒碳同时吸附杂质的作用如实施例 1 所描述的方法获得 UF-浓缩液。将 UF-浓缩液渗滤成传导率为 1.0 mS。

如下表 8 所显示的以(mOD_{440nm}/g 活性脂肪酶)之比说明形成的浓缩液的纯度。

	mOD _{440nm} /g 活性脂肪酶
UF-浓缩液	69

表 8：生产的浓缩液的纯度(在结晶开始之前)。

如下表 9 所显示的利用增加量的粒状形式的碳(Calgon 型)实施实验室检验。

	在配制的产物中活性脂肪酶的产率	配制的产物的 mOD _{440nm} /g 活性脂肪酶
0% (w/w) 碳	75%	7.1
1.0%(w/w)碳	77%	6.8
2.0%(w/w)碳	87%	5.8

表 9：经增加量的碳处理的并且在 pH=4.3 和 28 °C 下结晶的 UF-浓缩液，该 UF-浓缩液显示产率和纯度。

从表 9 看出，在结晶期间利用这种粒状形式，其产率明显地提高了，并且纯度也稍有提高。

实施例 5

通过碳处理提高蛋白酶的结晶效能同时吸附杂质的作用。

如下列表 10 所描述的，将 100kg 包含迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*) 蛋白酶的培养肉汤(例如，如 US 3,723,250 所描述的方法发酵)进行预处理。

	预处理和絮凝
肉汤	100kg
水	100kg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3kg
pH	调节到 pH=7.5
0.1%超絮凝剂 C521	1kg
0.1%超絮凝剂 A130	1kg

表 10：蛋白酶肉汤的预处理和絮凝。

通过滤鼓过滤除去生产菌株，将获得的滤液利用 Seitz K900 滤板进

行连续过滤。利用 Seitz EK1 滤板通过过滤减少微生物总数。将形成的滤液在 Asahi(6kD)膜上进行浓缩。

如下表 11 所显示的, 以颜色来说明纯度(OD_{440nm}/g 活性蛋白酶)。

	OD_{440nm}/g 活性蛋白酶
浓缩液	673

表 11: 结晶前的 UP-浓缩液的纯度。

将 UF-浓缩液经不同量的 FGV120 碳进行处理, 并且利用 7%KAc 进行结晶, 利用 20%(w/w)磷酸溶液调节到 $pH=4.9$ 。在 5 小时之后, 利用从 10 °C 开始并且到 28 °C 结束的温度梯度进行结晶。将 24 小时用作结晶时间。

通过离心获得最终晶体, 利用 5.5%的 $CaCl_2(pH=4.9)$ 溶液进行洗涤。将晶体块溶于 10 倍(重量)的 100%MPG 溶液, 并且利用动力学二甲基酪蛋白测定分析形成的产物的 OD_{440nm} 和蛋白酶活性。

动力学二甲基酪蛋白测定以通过蛋白酶消化二甲基酪蛋白溶液为基础。在这一过程中所形成的伯氨基基团与三硝基苯磺酸反应形成有色复合物。为了可以计算每个时间单位吸光度的变化, 原位进行反应。相对于酶标准品确定其活性, 并且以相同单位作为标准。

下表 12 显示形成的产率和纯度。

	在配制的产物中活性蛋白酶的产率	在配制的产物中活性蛋白酶的 OD_{440nm}	形态
0%碳	89%	96	10-15 μ 棒状
0.5%碳	91%	85	10-15 μ 棒状
1.0%碳	93%	90	10-20 μ 棒状

表 12: 在结晶期间经增加量的碳处理的蛋白酶浓缩液。

从表 12 可以看出, 增加碳剂量提高其产率。在配制的产物中以 OD_{440nm}/g 活性蛋白酶表示的纯度稍有提高。晶体的形态由于其大小的平均增加小而稍有改变。

实施例 6

通过碳处理提高 EG1 *Humicola* 纤维素酶的结晶效能同时吸附杂质的作用。

如下列表 13 所显示的, 将 100kg 包含在米曲霉中表达的 EG1 *Humicola insolens* 纤维素酶的培养肉汤进行预处理。

	预处理
肉汤	100kg
水	100kg
用 10%NaOH 调节的 pH	9.5

表 13: 米曲霉肉汤的预处理。

通过滤鼓过滤除去生产菌株, 将获得的滤液利用 Seitz EK1 滤板进行连续微生物过滤。将形成的滤液在 Dow DDS(20kD)膜上浓缩成干物质含量为 22%。将 UF-浓缩液利用 3 体积的自来水进一步渗滤, 此后在 30 ℃, pH=5.5 下利用 3%的 Picatif FGV120 碳进行碳处理 2 小时。利用 Seitz K900 滤板和 Seitz EK1 滤板通过过滤除去碳。形成的浓缩液具有 1.06 mS 的传导率。

以(OD_{440nm}/g 活性纤维素酶)之比说明形成的浓缩液的纯度。

	OD _{440nm} /g 活性纤维素酶
浓缩液	21.7

表 14: 浓缩液的纯度(结晶开始前)。

将浓缩液经不同量的 Picatif FGV 120 碳进行处理, 并且利用 20%(ww)的甲酸溶液调节到 pH=5.4, 并且在 28 ℃下保持 24 小时(结晶时间)。

通过离心获得结晶悬浊液。将晶体块在 8 倍(重量)的水和 0.1%氯化钠中溶解并且配制, 利用 0.45μ 过滤器过滤除去碳。分析形成的配制的产物的 OD_{440nm} 和纤维素酶活性。以 S-CEVU(稳定的纤维素酶粘度单位)测量纤维素酶活性, 并且利用羧甲基纤维素(CMC)作为底物确定纤维素酶活性。内纤维素酶分解 CMC。通过振动粘度计确定粘度的最终减少。在 pH=7.5, 40 ℃下, 在 0.1M 磷酸缓冲液中进行反应 30 分钟。

表 15 显示终产物的产量与纯度。

	在配制的产物中 纤维素酶的产率	在配制的产物中 OD _{440nm} /g 活性纤维素酶
0 w/w% 碳	8%	19.7
0.5 w/w% 碳	23%	19.1
1.0 w/w% 碳	44%	19.2

表 15：经增加量的碳处理的以及在 pH=5.4 和 28 ℃ 下结晶的浓缩液显示的产率和纯度。

我们惊奇地发现，在结晶期间利用碳将提高产率，即使将浓缩液在结晶之前已经进行碳处理。换句话说，实际上我们可以通过在结晶期间利用碳提高产率而不降低纯度。

实施例 7

通过硅藻土处理提高脂肪酶的结晶效能同时吸附杂质的作用。

如下列表 16 所显示的，将 50kg 包含以在米曲霉中表达的 *Humicola lanuginosa* 脂肪酶变体设计的蛋白质的培养肉汤进行预处理。

	预处理
肉汤	50kg
水	50kg

表 16.米曲霉肉汤的预处理。

在 pH=10.0(以 13%的 NaOH 调节)通过滤鼓过滤除去生产菌株，将获得的滤液利用 Seitz K25 过滤板进行连续过滤。将形成的滤液在 Dow DDS (20kD)膜上进行浓缩。利用 2 体积的自来水将 UF-浓缩液进一步渗透成传导率为 2.5mS/cm。

将浓缩液用各种量的 Hyflo Supercell 硅藻土进行处理，并且在 5 ℃ 利用 10%(w/w)磷酸溶液调节到 pH =4.7。每 30 分钟温度提高 3 ℃，直到 28 ℃ 为止，并且在这一温度下保持总共 22 小时的结晶时间。

下列表 17 中显示其产率和晶体形态。

	结晶的脂肪酶的 产率	形态
0 w/w% Hyflo Supercell	58%	单棒状
1.0 w/w% Hyflo Supercell	77%	附着于硅藻土上的形成 星形的多棒状

表 17.用增加量的硅藻土对 UF-浓缩液进行处理, 并且在 pH=4.7 用增加温度进行结晶所显示的产率和形态。

我们惊奇地发现, 在结晶时利用硅藻土提高产率。我们也发现在形态方面从棒状朝着星形变化。换句话说, 当在结晶期间利用硅藻土时, 我们可以提高产率以及获得更大的晶形。