

[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 97193043.0

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 31 日

[11] 授权公告号 CN 1216899C

[22] 申请日 1997.3.14 [21] 申请号 97193043.0

[30] 优先权

[32] 1996.3.15 [33] DK [31] 0305/1996

[86] 国际申请 PCT/DK1997/000113 1997.3.14

[87] 国际公布 WO1997/034919 英 1997.9.25

[85] 进入国家阶段日期 1998.9.14

[71] 专利权人 诺沃奇梅兹有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 A·兰克-马德森

M·A·劳斯特森

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 16 页

[54] 发明名称 从含蛋白质溶液中纯化蛋白质的方法

[57] 摘要

一种以晶态形式从含蛋白质溶液中纯化、分离蛋白质的方法，该方法包括：用结晶有效量的与水混溶的有机溶剂（例如一种低级脂肪醇或酮）处理含蛋白质溶液；以晶态形式分离所研究的蛋白质。

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

1. 一种从发酵肉汤中以晶态形式纯化和分离酶的方法，该方法包括：

(a) 利用 1-90%w/w 的与水混溶的有机溶剂处理所说的发酵肉汤；
并且

(b) 以晶态形式分离所研究的酶，
其条件是所说的与水混溶的有机溶剂不是水溶性聚合物，其中所说的与水混溶的有机溶剂选自乙醇、2-丙醇和丙酮中任一种。

2. 按照权利要求 1 的方法，其中在加入所说的有机溶剂之前，先浓缩所说的发酵肉汤。

3. 按照权利要求 1 的方法，其中在加入所说的有机溶剂之前，所说的酶在所说的发酵肉汤中的浓度在 0.1-25% w/w 范围内。

4. 权利要求 3 的方法，其中在加入所说的有机溶剂之前，所说的酶在所说的发酵肉汤中的浓度在 0.5-15% w/w 范围内。

5. 权利要求 4 的方法，其中在加入所说的有机溶剂之前，所说的酶在所说的发酵肉汤中的浓度在 5-15% w/w 范围内。

6. 按照权利要求 1 的方法，其中所说的结晶作用发生在 0℃ 以上。

7. 按照权利要求 1 的方法，其中所说的酶选自由蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶、淀粉酶和氧化还原酶组成的组。

从含蛋白质溶液中纯化蛋白质的方法

发明所属技术领域

本发明是一种简单、廉价并十分有效的结晶存在于含蛋白质溶液(如发酵肉汤)中的蛋白质(特别是酶)的方法。

发明背景

工业用酶通常以液体或者无定形固体形式提供。它们之所以以无定形固体而不是以结晶固体供给,主要是因为一般都认为已知的结晶酶的方法太昂贵而不能应用于工业领域。

有关酶结晶有大量文献。由于结晶酶的技术具有很强的经验性,因而很难对特定结晶过程的结果一概而论。

现在大多数已知的蛋白质结晶方法的特有的要求是:纯净的、浓缩的原始溶液; 长的结晶时间; 大量的化学药品, 例如盐(参见, 例如, 生物技术和生物工程 48 (1995)pp. 316-323)。

已描述一种工业酶的结晶过程, 其中使用了一种水溶性聚合物(如聚乙二醇)(参见 WO 95/01989)。

发明概述

本发明的目的是提供一种有效、廉价的方法, 通过该方法可从含蛋白质溶液中获得晶态蛋白质, 特别是晶态酶, 而且该方法不需要加入大量的化学药品(如盐)。本发明的方法的一个重要且十分有价值的特征是: 它能够从不纯的含蛋白质溶液(即除了含有所研究的蛋白质之外, 还含有不同的其它物质的溶液)中分离出高纯度的晶态蛋白质, 特别是晶态酶。不纯的溶液尤指含有其它蛋白质的溶液, 如来源于发酵肉汤的溶液。本发明使短结晶时间内获得高产率成为可能, 而且该方法简单、廉价、对环境无害、适合工业需求。

如前所说, 本发明提供了一种以晶态形式从含蛋白质溶液(例如包含一种以上的蛋白质溶液, 如来源于发酵肉汤的溶液)纯化、分离蛋白质的方

法, 该方法包括:

- (a) 利用结晶有效量的与水混溶的有机溶剂处理含蛋白质溶液; 然后
- (b) 以晶态形式分离所研究的蛋白质。

应该了解本发明中特别相关的含蛋白质溶液是含水溶液(即, 一般来说, 其中水构成基本上所有或至少大部分溶剂, 兴趣蛋白质溶解于该溶剂中的溶液)。

发明详述

本发明特别提供了一种结晶存在于发酵肉汤中的蛋白质(或多肽)的方法。就此而言, 术语"发酵"不仅指由微生物(如细菌或真菌)引起的分解或转化过程, 而且指由于动植物来源的细胞的作用引起的相应过程。

发酵肉汤除了包含兴趣蛋白质或多肽外, 通常还包含如底物化合物如碳水化合物、盐、细胞和其它代谢物(如核酸, 特定的兴趣蛋白质或多肽之外的蛋白质或多肽)之类的许多其它物质。

当将本发明的方法运用于发酵肉汤时, 最好首先对肉汤进行一次或多次固/液分离技术处理, 例如絮凝、离心、过滤或微量过滤, 或者是它们之间的任意组合。

本发明的方法显得对相对不纯的溶液作用效果非常好, 在使用本发明的方法之前, 通常不再需要通过层析方法(例如, 从溶液中分离出无关蛋白质)纯化发酵肉汤(或含蛋白质溶液, 通过使用固/液分离技术处理发酵肉汤获得)。

本发明的另一方面, 在用有机溶剂处理之前, 浓缩含蛋白质溶液。浓缩过程适合通过一个或多个已知的步骤来完成, 例如超滤(逆渗透)或蒸发。

本发明的又一方面, 含蛋白质溶液要经过去除低分子量物质(例如盐)的步骤。这样的处理包括渗滤和透析。

虽然含蛋白质溶液的浓缩对实施本发明的方法来说不是十分重要的, 但它经常是出于产量和易于操作观点的考虑。一般地说, 依据本发明, 兴趣蛋白质在有机溶剂处理过的含蛋白质溶液中的浓度应在 0.1-25% (重量)范围内(% w/w ; 基于含蛋白质溶液的重量), 最好是在 0.5-15 %w/w

的范围内，特别是在 5-15% w/w 范围内。

如上文所说明的，本发明中优选的蛋白质是酶，例如：

水解酶(EC 3)[包括蛋白酶(肽酶， EC 3.4)； 羧基酯水解酶(EC 3.1.1)， 如脂肪酶(例如三酰甘油脂肪酶， EC 3.1.1.3)； 糖苷酶(EC 3.2)， 如淀粉酶(例如 α -淀粉酶， EC 3.2.1.1， β -淀粉酶， EC 3.2.1.2 及葡糖淀粉酶， EC 3.2.1.3)， 纤维素酶(例如内-1,4- β -葡聚糖酶， EC 3.2.1.4)和木聚糖酶(例如内-1,3- β -木糖苷酶， EC 3.2.1.32)]；

氧化还原酶(EC 1)[包括酚氧化酶如漆酶(EC 3.10.3.2)和按 EC 1.10.3 分类的其它与漆酶有关的酶； 过氧化物酶(EC 1.11)， 如按 EC 1.11.1.7 分类的那些酶]； 以及

异构酶(EC 5)[包括木糖异构酶(EC 5.3.1.5)]。

酶：本说明书和权利要求书中使用的酶分类号(EC 号)依据国际生物化学和分子生物学联合命名委员会的推荐的命名法(1992)(学院出版公司， 1992)。

蛋白酶

按照本发明的方法可使其结晶的蛋白酶(肽酶)包括利用细胞的发酵过程获得的蛋白酶， 利用的细胞如微生物细胞， 尤其是细菌或者真菌。 也包括利用化学方法或遗传方法修饰的这些蛋白酶的突变体。

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类胰岛素蛋白酶。 碱性蛋白酶的例子是枯草杆菌蛋白酶， 尤其是那些从芽孢杆菌得来的枯草杆菌蛋白酶， 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(见 WO 89/06279 中所述)。 类胰岛素蛋白酶的例子是胰蛋白酶(例猪和牛的来源)和 WO 89/06270 中所述的镰孢属蛋白酶。

合适的市售蛋白酶包括以 Alcalase、 Savinase、 Durazym、 及 Esperase 商品名出售的蛋白酶(Novo Nordisk A/S(丹麦))； 以 Maxatase、 Maxacal、 Maxapem、 Properase 商品名出售的蛋白酶(Gist-Brocades)； 以 Purafect 与 Purafect OXP 商品名出售的蛋白酶(Genencor International)； 以及以 Opticlean 与 Optimase 商品名出售的

蛋白酶(Solvay Enzymes).

脂肪酶

按照本发明的方法可使其结晶的脂肪酶包括利用细胞的发酵过程获得的脂肪酶，利用的细胞如微生物细胞，尤其是细菌或者真菌。也包括用化学方法或遗传方法修饰的这些脂肪酶的突变体。

合适的脂肪酶的例子，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)。

许多克隆的脂肪酶可以是本发明的兴趣酶。克隆的脂肪酶包括由 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)。

尤其令人感兴趣的脂肪酶是诸如 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

按照本发明的方法可使其结晶的淀粉酶(如 α -或 β -淀粉酶)包括利用细胞的发酵过程获得的淀粉酶, 利用的细胞如微生物细胞, 尤其是细菌或者真菌。也包括用化学方法或遗传方法修饰的这些淀粉酶的突变体。

有关的淀粉酶包括, 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)。

本发明相关的兴趣酶是例如从芽孢杆菌属, 热厌氧菌属(*Thermoanaerobactor* 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, 术语"纤维素酶"指的是催化纤维素向葡萄糖降解的酶-纤维二糖, 纤维三糖和其它纤维低聚糖。

本发明中特别合适的纤维素酶类型是内-1,4-葡糖酶(EC 3.2.1.4), 优选的是重组内-1,4-葡糖酶。

按照本发明适合结晶的纤维素酶包括微生物纤维素酶, 特别是细菌或真菌纤维素酶。细菌纤维素酶的有关例子是这样一些纤维素酶, 它们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(*Actinomycetes*)如链霉菌属(*Streptomyces*), 高温单孢菌属(*Thermomonospora*)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*, 褐色高温单胞菌(*Termomonospora fusca*), *Termomonospora cellulolyticum* 和解纤维热酸菌(*Acidothemus cellulolyticus*).

相关的纤维素酶包括这样的酸性纤维素酶, 它们来源于下组真菌或者可由下组真菌产生, 这些真菌选自木霉属(*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*).

另一种令人感兴趣的真菌纤维素酶是中性或者碱性纤维素酶, 它们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*), 例如选自 *Humicola insolens*, 尖镰孢(*Fusarium oxysporum*), 嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*), 微紫青霉(*Penicillium janthinellum*) 和 *Cephalosporium sp.* 的真菌, 优选的是选自 *Humicola insolens*, DSM 1800, 尖镰孢, DSM 2672, 嗜热毁丝霉, CBS 117.65, 以及 *Cephalosporium sp.*, RYM-202 的真菌。

其它兴趣纤维素酶是纤维素酶的变体, 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*) 的菌株产生纤维素酶。

氧化还原酶

按照本发明的方法适合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

特别令人感兴趣的显示过氧化物酶活性的酶是那些酶分类号为 EC 1.11.1.7 的酶，这些酶的片段也显示过氧化物酶活性。

通过本发明的方法适合结晶的过氧化物酶，是适宜由微生物(如真菌或细菌)产生的过氧化物酶。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(*Verticillum*)，*Arthromyces*，卡尔黑霉属(*Caldariomyces*)，*Ulocladium*，*Embellisia*，枝孢属(*Cladosporium*)或者 *Dreschlera*，特别是尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)*vertiginous* (DSM 2672)，*Humicola insolens*，*Trichoderma resii*，*Myrothecium verrucana*(IFO 6113)，黄萎轮枝孢(*Verticillum alboatrum*)，大丽花轮枝孢(*Verticillum dahlie*)，*Arthromyces ramosus*(FERM P-7754)，*Caldariomyces fumaso*，*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.

与本发明的方法相关的特定的兴趣是重组产生的过氧化物酶, 例如, 来源于 *Coprinus sp.*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.

漆酶以及与漆酶相关的酶

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.

合适的漆酶是微生物来源的漆酶, 特别是由细菌或真菌(包括丝状真菌和酵母)漆酶得来的漆酶. 合适的例子包括由曲霉属, 脉孢菌属 (*Neurospora*)(例如 *Neurospora crassa*), 柄孢壳属 (*Podospira*), 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*)(例如褶皱鬼伞 (*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。

有机溶剂

一般来说, 适合于本发明的方法使用的与水混溶的有机溶剂是这样一类物质, 其在标准大气压下, 温度为 25 °C 或在 25 °C 左右(包括温度大约达 30 °C)时是液体。水溶性聚合物, 如 WO 95/01989 中所公开的水溶性聚合物(其中一些如聚乙二醇, 其在分子量范围的低限, 在上述的温度及压力条件下可能为液体), 不在本文所说的与水混溶的有机溶剂范围之内。

本发明中适合的与水混溶的溶剂包括各种低级脂族醇, 特别是 C₁-C₃ 脂族醇, 以及低级脂族酮, 特别是 C₃-C₅ 酮。

优选的与水混溶的有机溶剂是能与水以任意比例混合的溶剂。在这一范畴之内的低级脂族醇包括所有的 C₁-C₃ 脂族醇(即甲醇, 乙醇, 1-丙醇和 2-丙醇)和 C₄ 叔丁基醇(2-甲基-2-丙醇); 甲醇, 乙醇及 2-丙醇是特别优选的。同样地, 优选的 C₃-C₅ 酮是丙酮(2-丙酮)。

其它与水混溶的低级脂族醇, 如 2-丁醇和异丁基醇(2-甲基-1-丙醇)以及与水混溶的 C₃-C₅ 酮, 如甲乙酮(2-丁酮)和二乙基酮(3-戊酮), 可能适合于在本发明的某些实施方案中使用。

本发明中另外一些令人感兴趣的与水混溶的有机溶剂包括二醇, 特别是低级脂族二醇, 如乙二醇(1,2-二羟基乙烷), 1,2-丙二醇(1,2-二羟基丙烷)和 1,3-丙二醇(1,3-二羟基丙烷; 也称为三亚甲基二醇)。

利用水溶性聚合物如聚乙二醇和聚丙二醇, 使工业用酶从含蛋白质及各种其它物质/杂质(包括其它蛋白质)溶液中结晶出来, 虽然对该方法已有所描述(参见 WO 95/01989), 但本发明的发明者并不了解以前的任何公开内容是否就表明或者意味着简单的与水混溶的有机溶剂, 如乙醇及其类似物, 能成功地、可靠地从不纯的溶液, 特别是从含其它种类蛋白质的溶液(如来源于发酵肉汤的溶液)中获得结晶蛋白质。确实, 这样的溶剂似乎

一般都被认为对水溶液中的蛋白质分子(如酶)有毒害作用(例如使其变性)。这样,例如,在 A.McPherson 的一篇有关蛋白质和核酸的结晶作用的评论性文章[欧洲生物化学杂志 189(1990), pp. 1-23]中,论述到(参见 P. 5)(附加强调):

“.....使常规分子结晶的普通方法,如蒸发或溶解,剧烈的温度变化,或加入强的有机溶剂,都是不合适的并具破坏性。必须以更温和的并受限制的技术取代它们”。

关于早期的报告中所述的利用有机溶剂作为蛋白质或者核酸的沉淀剂,后面的参考文献进一步进行了论述(参见 P.12)(附加强调):

“一般来说,使用的最普通的有机溶剂是乙醇,丙酮,丁醇和其它一些普通的实验室试剂……这里我们可能注意到,有机溶剂用于核酸结晶已属于一般的应用,特别是对 tRNA 和双链寡核苷酸。它们是促使晶体生长的重要手段。这部分是因为多核苷酸对有机溶剂的较强的耐性,以及它们的多阴离子表面对电解质作用的敏感度似乎要强于蛋白质。

唯一的规则是有机溶剂应在低温下使用,在 0 °C 或者在 0 °C 以下,且应慢慢地加入并进行充分混合.....”。

关于促进蛋白质晶体的生长, McPherson 的参考文献进一步指出(参见 P. 19)(附加强调):

“的确,促进周期性键的形成是为了确保分子群能尽可能均匀地形成晶体.....它不仅意味着除去污染了的、不必要的一些蛋白质,而且在靶群体中,所有个体都表现为物理和化学性质的绝对一致.....”。

令人感到十分惊讶的是发现:从不纯的含蛋白质溶液(如来源于发酵肉汤的溶液,包含一种以上的蛋白质)中结晶出想要的蛋白质,特别是酶,可利用一种简单的、与水混溶的有机溶剂来完成,例如乙醇,一般来说没有什么特殊要求,例如象 McPherson(loc. cit)所讲述的那样,在加入有机溶剂时在低温下操作或采取其它特殊措施。

本发明的方法所使用的与水混溶的溶剂通常以一定量加入所研究的含蛋白质溶液中,溶剂在最终混合物中的重量浓度范围为 1-50% w/w,经常是 5-50% w/w,如 10-50% w/w,例如 20-45 % w/w。然而,在某

些情况下，如当用本发明的方法使某些脂肪酶(脂解酶)结晶时，有必要使用较高的溶剂浓度，例如溶剂/含蛋白质混合溶液的对应量为 90% w/w，或可能甚至更多。

依据本发明，对含蛋白质溶液加入与水混溶的有机溶剂可通过以下方式，例如：不断地逐渐地掺入溶剂；或分相同或者不同量的几部分加入溶剂；或者一次加入全部溶剂。特别是加入溶剂方式的选择，不仅基于兴趣蛋白质或多肽的溶解性，而且基于除此之外的各种物质/杂质的溶解性。

通过例子，可以考虑这样一种情况：从一种十分不纯的含蛋白质溶液，例如包含许多组分的发酵肉汤中结晶出脂肪酶。如上所述，某种程度上在包含高比例的低级醇，如乙醇的含水媒介中，脂肪酶的溶解性经常要大于其它类型的酶；而且该脂肪酶结晶作用需要的溶剂浓度十分高，以致于在浓度达到足以使其开始结晶之前，溶液中其它组分就从中分离(例如沉淀)出来。在这种情况下，为了避免固体、脂肪酶晶体和固相杂质的污染，就希望间断地加入部分溶剂以使不需要的固相杂质分离，并随后除去(例如过滤)。当这些杂质从溶液分离并从中除去时，进一步增加有机溶剂的浓度至足够水平以便使所研究的酶开始结晶。

如果合适，不止一种与水混溶的有机溶剂适合于本发明的方法。这样，例如使用结晶有效量的两种或多种与水混溶的有机溶剂的混合物(有合适的比例)，可能引起所研究的蛋白质的结晶作用。或者，例如可以将适量不同的与水混溶的有机溶剂逐步加入含蛋白质溶液。

在本发明的方法的一些实施方案中，除与水混溶的有机溶剂之外，合适的盐可加入含蛋白质溶液中。这些合适的盐就其本身性质可促使蛋白质结晶，例如酶的结晶，这样的盐包括醋酸盐，硫酸盐($\text{HSO}_4^-/\text{SO}_4^{2-}$)，碳酸盐($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$)和磷酸盐($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$)，例如碱金属(如 Li^+ ， Na^+ 或 K^+)盐，碱土金属盐(如 Ca^{2+} 盐或 Mg^{2+} 盐)。

在本说明书中，当这样的盐与与水混溶的有机溶剂一道加入含蛋白质溶液时，将要加入盐的适当的量将特别取决于加入的有机溶剂的量。这样，例如当完成本发明的方法的一个实施方案时，其中的溶剂浓度(在含

蛋白质溶液和与水混溶的有机溶剂的混合物中)在通常的浓度范围的上限(例如在 50% w/w 附近)时, 典型的是加入正在谈论的这种类型的盐以致于盐浓度达到 0.5-1 % w/w。然而, 如果使用低浓度的有机溶剂, 增加盐浓度也可能是比较适当的。

明显地, 优选类型的与水混溶的有机溶剂在所谈论蛋白质的结晶作用完成之后, 一般将是能从余液中重新获得的(例如通过蒸馏), 同时从环境和经济的高度需求角度考虑, 本发明的方法中有关再循环和再利用这样的有机溶剂是切实可行的。

调节 pH 值

含蛋白质溶液的 pH 值, 通过加入与水混溶的有机溶剂来调节至一最理想值, 其有利于蛋白质的结晶, 且首先是有利于蛋白质的稳定。对于一种给定蛋白质(例如酶), 最理想的 pH 值取决于其确切的性质, 特别是可通过试验来确定。例如典型地从 pH10 开始完成结晶过程, 然后是 pH 9, pH 8, pH 7 ……等依次至 pH 3。如果发现, 例如一种给定酶的最理想 pH 值在 4 和 5 之间, 那便在这一 pH 范围内再做试验以更精确地确定最适 pH 值。大多数酶的最适 pH 值通常都在 pH 4-9 范围内。

在某些情况下, 可能调节 pH 值等于所谈论蛋白质的等电点(pI), 或在该值附近时比较好。这样, 在本发明的方法的某些实施方案中, 就将 pH 值调节在 $(pI-1) \leq pH \leq (pI+1)$ 范围内。

在其它情况下, 可能在结晶作用过程中逐渐改变 pH 值比较好(即使用 pH 梯度), 或者也可以在结晶作用过程中逐步地变化 pH 值。

任何合适的酸或者碱都可用来调节 pH 值。使用的酸可能是无机酸或有机酸。一些例子中使用的是盐酸, 硫酸, 亚硝酸, 磷酸, 乙酸, 柠檬酸和甲酸。优选的酸是磷酸, 甲酸, 柠檬酸和乙酸。优选的碱是氢氧化钠, 氢氧化钾和氨水, 特别是氢氧化钠。

结晶作用

不加入任何晶种开始结晶作用过程, 在不到 48 小时的结晶时间内, 经常是在 36 小时或更少时间内及在 24 小时或更少的时间内, 利用本发明的方法结晶作用结果可能达到令人满意的程度。依赖于实施的特定条

件,包括将要结晶的蛋白质或多肽的性质和存在于含蛋白质溶液中的其它物质(杂质)的性质,在12小时或更少的时间内,甚至某些情况下在6小时或更少的时间内,结晶作用结果经常也可以达到令人满意的程度。

温度

利用本发明的方法时,通常在0℃以上兴趣蛋白质(酶)自然进行结晶作用。一般来说,从中结晶蛋白质的含蛋白质溶液,其适宜的温度是0—40℃,优选0—30℃,尤其典型的是5—30℃,如大约7℃到大约28℃。

如果合适的话,可使用温度梯度。例如开始于一相对较低温度(如0—7℃范围内的任一温度),然后在合适的时间段内(如时间段为几个小时)逐渐(或也可逐步)增加温度至最后所要求的温度。本发明的方法的许多实施方案中,当使用渐进或逐步的温度增加时,最后温度经常是在25℃左右(例如大约22℃到大约28℃)

结晶后的分离

本发明的方法导致蛋白质(例如酶)的结晶。分离结晶蛋白质可通过常规方法来完成,例如离心和/或过滤,也可干燥分离产物。

如果分离的蛋白质,特别是酶,随后要成为粒状,就适合从潮湿产物开始直接进行标准成粒过程。然后在成粒过程中进行烘干。

如果要求结晶产物纯度十分高,可将本发明方法的初始结晶产物(一般具有相当高的纯度)再溶解于合适的含水介质至适当浓度,并重结晶,例如通过本发明的方法。其它用于重结晶基本上纯的蛋白质(例如酶)的方法,也可以使用。当然,按照需要重结晶可以重复一次或多次。

最后的结晶产物可能如以下方式进行分配和/或利用。例如,如果需要,有可能将晶体溶解于合适的介质中至适当浓度以便生成液相产物。

本发明进一步涉及到按照本发明的方法可获得的,或已获得的结晶蛋白质产物。

本发明的纯化/结晶方法被认为不仅适用于蛋白质或多肽,而且适用于各种其它类型物质,包括寡肽和包含寡肽序列的化合物。这样的物质包括,如某些肽激素。

下列例子将进一步说明本发明，这无意以任何方式限制本发明范围：
实施例 1

利用乙醇的 *Humicola insolens* 纤维素酶结晶作用

Humicola insolens 纤维素酶(内-1,4- β -葡聚糖酶)在米曲霉中克隆。包含正谈论的酶和其它发酵副产物的发酵肉汤进行转鼓式过滤后，再进行超滤(利用 Dow DDS Gr61pp 膜；截断值 大约 20 kD)。超滤浓缩液进一步经过 2 倍体积的去离子水渗滤去除低分子量物质(例如盐)。最后的溶液每升包含 87 克纤维素酶(溶液中干物质含量为 51 % w/w)，且 pH 值为 6.7，比电导率为 0.7 mS/cm。

45.9 g 无水(99.9 %)乙醇边搅拌边加至 100g 的纤维素酶溶液中，温度保持在 27 °C。17 小时之后，得到的晶体通过离心收获。测定再溶解于 0.1% w/w NaCl 水溶液(8 倍于晶体体积)的结晶产物的纤维素分解活性，基于此的产率是 85.4%。

为了测定纤维素分解活性(例如，用所谓的 S-CEVU 单位表示)，要测定的一份后来的酶溶液(结晶产物再溶解于 0.1% w/w 的 NaCl 中)与羧甲基纤维素(CMC；酶底物)一起温育，反应条件如下：

温度： 40 °C (恒温箱)
pH： 7.5(包含 0.1% w/w PEG 6000 的 0.1 M 磷酸缓冲液)
底物浓度： 3.11%(在 pH 为 7.5 的缓冲液中)
酶浓度范围： 0.097-0.181 S-CEVU/ml
温育时间： 30 分钟

底物的纤维素分解性降解导致粘度的降低，粘度用振动粘度计(Mivi 3000, Sofraser, 法国)测定。粘度的降低与样品的纤维素分解活性成比例。用 S-CEVU(稳定的纤维素酶粘度单位)表示的活性测定与一种合适的 Novo Nordisk A/S 纤维素分解酶标准有关。

实施例 2(对比例)

利用 PEG 300 的 *Humicola insolens* 纤维素酶的结晶作用

将 39.6g 的聚乙二醇 300(PEG 300 ; 来自 BASF)边搅拌边加至 100g 如实施例 1 中的纤维素酶溶液中, 温度保持在 27 °C。20 小时之后, 得到的晶体通过离心收获。测定方法如实施例 1 中所述, 其产率是 83%。

从上述例子明显看出, 使用乙醇导致的结晶产物产率要高于使用 PEG 300 的产率。

实施例 3

利用 2-丙醇或丙酮的 *Humicola insolens* 纤维素酶结晶作用

一批未经加工的包含 *H.insolens* 纤维素酶(内-1,4-β-葡聚糖酶)的发酵肉汤在米曲霉中克隆, 用等重量的水稀释。加入 10%(w/w)氢氧化钠水溶液调节稀释肉汤的 pH 为 9.5, 之后进行转鼓式过滤, 然后利用 Seitz EK1 滤垫进行细菌过滤。

得到的滤液进行超滤(利用 Dow DDS Gr6lpp 膜)至干物质含量为 22% w/w。超滤浓缩液进一步用 3 倍体积的自来水渗滤, 然后在 30 °C、pH 为 5.5 条件下, 用 3%(w/w)的 Picatif™ FGV 120 活性炭进行碳处理 2 小时。通过 Seitz K900 滤垫和 Seitz EK1 滤垫过滤除去碳。最后的浓缩液的比电导率为 1.06ms/cm。

给定浓缩液(含纤维素酶溶液)的纯度可通过一比值的大小来表示, 该比值为浓缩液在 440nm 处的光密度(OD)与一升溶液中活性纤维素酶的重量(单位 g)之比, 即 OD_{440}/g 活性纤维素酶。该值越高, 纯度越低。对于以上经碳处理的、过滤过的浓缩液, 这一比值是 21.7, 可与以下的测定值比较(参见以下内容)。按照本发明的方法, 分别利用 2-丙醇和丙酮作为与水混溶的有机溶剂制备结晶纤维素酶, 溶液中包含这些酶, 测定方式相同。

为了检验 2-丙醇和丙酮各自对兴趣纤维素酶结晶作用的有效性, 在调节碳处理过的, 过滤过的浓缩液 pH 值为 6.5 之后, 取出部分样品。

5 °C 条件下, 分别取出 30% w/w 和 35% w/w 量(相对浓缩液的重量的)两种溶剂, 分别加入等量的浓缩液并与之混合。保持此温度 15 分钟之后, 升高温度至 28 °C 并保持 24 小时。得到的晶体悬浮液通过离心收获, 将每种晶体块溶解在 8 倍体积的 0.1%(w/w)氯化钠水溶液中进行配制测

定每一溶液的纤维素酶活性(以 S-CEVU 计；参见实施例 1)和 OD_{440 nm}。结果总结在下表中：

溶剂量 (% w/w)	配制产物中的活性 纤维素酶的产率		配制产物中的 OD _{440 nm} /(g 活性纤维 素酶/l)	
	2-丙醇	丙酮	2-丙醇	丙酮
30	69%	70%	7.7	11.1
35	73%	76%	9.9	11.4

从以上的结果可明显看出，在本发明的方法的实施方案中，利用 2-丙醇或丙酮作为与水混溶的有机溶剂都获得了高产率和高纯度的结晶酶产物 (在此为纤维素酶)。