



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103492552 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201280016434. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 03. 29

C12N 1/20(2006. 01)

C12N 1/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/469, 067 2011. 03. 29 US

13/433, 036 2012. 03. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 09. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/031104 2012. 03. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/135433 EN 2012. 10. 04

(71) 申请人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M·H·恒 M·波多

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 史文静 黄革生

权利要求书2页 说明书35页 附图4页

(54) 发明名称

泡沫控制方法

(57) 摘要

本发明涉及降低泡沫形成以及使生物表面活性剂在微生物中的表达最大化的方法。所述方法涵盖从微生物沉淀生物表面活性剂,这导致泡沫形成减少。



1. 一种控制生物表面活性剂的发泡的方法,所述生物表面活性剂在以下情况下发泡:在发酵培养基中通过宿主细胞生产所述生物表面活性剂期间,当所述宿主细胞胞外分泌所述生物表面活性剂并且所述生物表面活性剂可溶于所述发酵培养基时;所述方法包括在通过所述宿主细胞生产所述生物表面活性剂的同时使所述生物表面活性剂不溶解化,由此发泡受到控制,因为所述不溶解化的生物表面活性剂不会发泡。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生物表面活性剂包含疏水蛋白 II、鼠李糖脂、槐糖脂或者表面活性肽。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中泡沫减少指数大于1,和/或泡沫减少指数大于2,和/或泡沫减少指数大于3;和/或所述发酵培养基中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约1g/kg;和/或至少25%的所生产的生物表面活性剂被不溶解化;和/或所述方法在不添加消泡剂的情况下进行;和/或与不加以不溶解化而进行的方法相比,所述方法用减低量的消泡剂来进行;和/或所述方法通过加入沉淀剂和/或施加沉淀条件来进行。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法是一种连续工艺,包括:向生物反应器输入发酵培养基,加入沉淀剂或者施加沉淀条件,收集不溶解化的生物表面活性剂,并补充发酵培养基或其成分或者宿主细胞;任选地,将与不溶解化的生物表面活性剂一起被收集的任何发酵培养基或其成分或者宿主细胞进行再循环。

5. 一种控制生物表面活性剂的发泡的方法,所述生物表面活性剂在以下情况下发泡:在发酵培养基中通过宿主细胞生产所述生物表面活性剂期间,当所述宿主细胞胞外分泌所述生物表面活性剂并且所述生物表面活性剂可溶于所述发酵培养基时;所述方法包括在通过所述宿主细胞生产所述生物表面活性剂的同时使所述生物表面活性剂不溶解化,由此发泡受到控制,因为所述不溶解化的生物表面活性剂不会发泡,其中泡沫减少指数大于1,和/或泡沫减少指数大于2,和/或泡沫减少指数大于3;和/或所述发酵培养基中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约1g/kg;和/或至少25%的所生产的生物表面活性剂被不溶解化;和/或所述方法在不添加消泡剂的情况下进行;和/或与不对所述生物表面活性剂加以不溶解化而进行的方法相比,所述方法用减低量的消泡剂来进行;和/或所述方法通过加入沉淀剂和/或施加沉淀条件来进行。

6. 一种控制在生产过程中发泡的生物表面活性剂在溶液中的发泡的方法,所述方法包括:

在所述生物表面活性剂的生产过程中,在条件能引起泡沫形成的时候,与此同时将所述生物表面活性剂进行不溶解化,由此发泡受到控制,因为所述不溶解化的生物表面活性剂不会发泡。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述溶液包含发酵培养基,其中所述生产包括在所述发酵培养基中通过宿主细胞表达所述生物表面活性剂,并且其中所述宿主细胞胞外分泌所述生物表面活性剂且所述生物表面活性剂可溶于所述发酵培养基,由此,条件能引起泡沫形成。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中所述方法是一种连续工艺,包括:

向生物反应器输入发酵培养基;

加入沉淀剂或者施加沉淀条件;

收集不溶解化的生物表面活性剂;以及

补充溶液或其成分或者宿主细胞;任选地,将与不溶解化的生物表面活性剂一起被收集的任何溶液或其成分或者宿主细胞进行再循环。

9. 一种控制在生产过程中发泡的生物表面活性剂的发泡的方法,所述方法包括:

在通过宿主细胞在溶液中生产所述生物表面活性剂的同时,使所述生物表面活性剂不溶解化,

控制发泡,使得:

泡沫减少指数大于 1,和 / 或泡沫减少指数大于 2,和 / 或泡沫减少指数大于 3;和 / 或所述溶液中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约 1g/kg;和 / 或

至少 25% 的所生产的生物表面活性剂被不溶解化;和 / 或

所述方法在不添加消泡剂的情况下进行;和 / 或

与不加以不溶解化而进行的方法相比,所述方法用减低量的消泡剂来进行。

10. 根据权利要求 1、5、6 或者 9 中任一项所述的方法,其中所述生物表面活性剂包含疏水蛋白 II、鼠李糖脂、槐糖脂或者表面活性肽。

11. 根据权利要求 1、5、6 或者 9 中任一项所述的方法,其中所述宿主细胞是里氏木霉。

12. 根据权利要求 1、5、6 或者 9 中任一项所述的方法,其中所述宿主细胞是枯草芽孢杆菌。

13. 根据权利要求 1、5、6 或者 9 中任一项所述的方法,其中所述宿主细胞是地衣芽孢杆菌。

14. 根据权利要求 1、5、6 或者 9 中任一项所述的方法,其中所述宿主细胞是曲霉属的种。

泡沫控制方法

[0001] 相关申请及引用并入本文

[0002] 本申请要求 2011 年 3 月 29 日提交的美国临时专利申请系列号 61/469,067 和 2012 年 3 月 28 日提交的美国专利申请系列号 13/433,036 的优先权。参考在 2009 年 6 月 9 日提交的国际专利申请系列号 PCT/US2009/046783, 其在 2009 年 12 月 17 日公开为 PCT 公开第 W02009/152176 号, 并参考在 2010 年 8 月 10 日提交的国际专利申请系列号 PCT/US2010/044964, 其在 2011 年 2 月 17 日公开为 PCT 公开第 W02011/019686 号。

[0003] 前述申请案, 及在其中或者在其审查期间所引证的所有文件(“申请案引证文件”)及在“申请案引证文件”中所引证或者参考的所有文件, 及本文中所引证或者参考的所有文件(“本文中引证文件”)及在“本文中引证文件”中所引证或者参考的所有文件, 连同用于任何本文中所提及的产品或者在任何以引用方式并入的文件中的任何生产商指示、说明、产品规格和产品介绍, 都以引用方式并入本文, 并可在本发明的实施中采用。更具体而言, 所有参考文件被以引用方式并入至如同每一单独文件被具体且单独地指明以引用方式并入的程度。

技术领域

[0004] 本发明涉及一种控制生物表面活性剂发泡的方法, 该生物表面活性剂在以下情况下发泡: 在发酵培养基中通过宿主细胞生产该生物表面活性剂期间, 当宿主细胞胞外分泌该生物表面活性剂并且该生物表面活性剂可溶于发酵培养基时。该方法包括以下步骤或者基本上由以下步骤组成: 在通过宿主细胞生产该生物表面活性剂的同时, 使该生物表面活性剂不溶解化。以此方式, 发泡受到控制, 因为该不溶解化的生物表面活性剂不会发泡。通过这个方法, 泡沫减少指数大于 1, 和 / 或泡沫减少指数大于 2, 和 / 或泡沫减少指数大于 3。同样, 另外或者作为另一种选择, 通过这个方法, 发酵培养基中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约 1g/kg。另外或者作为另一种选择; 和 / 或至少 25% 的所生产的生物表面活性剂被不溶解化。另外或者作为另一种选择, 该方法在不添加消泡剂的情况下进行; 或者使得能够减少在不使该生物表面活性剂不溶解化的情况下所要使用的消泡剂的量, 如在不使该生物表面活性剂不溶解化的情况下所要使用的消泡剂的量减少 25% 或者 30% 或者 40% 50% 或者 60% 或者 65% 或者 70% 或者 75% 或者 80% 或者 85% 或者 90% 或者 95% 或者更多。并且另外或者作为另一种选择, 虽然本发明可以以分批方式或者补料分批方式进行, 但本发明有利地涉及连续的方法。本发明还有利地涉及其中该生物表面活性剂为疏水蛋白如疏水蛋白 II 的方法。本发明还有利地涉及其中该生物表面活性剂为糖脂如鼠李糖脂和槐糖脂或者脂肽如表面活性肽的方法。甚至另外地, 本发明涉及用于进行本发明的方法特别是本发明的连续方法的装置。还另外地, 本发明涉及其中通过添加沉淀剂如盐、醇、水混溶性有机溶剂、水溶性聚合物或者阳离子聚合物, 或者通过改变 pH, 或者通过改变温度来引起该生物表面活性剂的不溶解化的本发明方法。

背景技术

[0005] 表面活性剂是广泛用于各种工业的化学品,并且主要是化学合成的。通过多种微生物生产的表面活性剂因其独特性质而正受到关注,如与合成的对等物相比,生物可降解性更高且毒性谱更低。但是,这种生物法生产的表面活性剂的可供量(available)和成本有限,这部分地因为缺乏有效的生产方法。

[0006] 一种用于工业规模生产蛋白质或者酶的有效系统是,进行好氧深层发酵,然后进行水基回收步骤以分离目的产物。但是,泡沫控制对于实现效率是关键的。

[0007] 在化学工业中,发泡是一个严重问题,尤其是对于生化工艺而言。在多种物质如表面活性剂和蛋白质的制造中,特别是在靠近气液界面处涉及明显的剪切力的工艺中,如涉及通气、泵送或者搅拌的那些工艺中,常常有泡沫产生,这是一种不想要的结果。好氧深层发酵依靠足够的通气来供应微生物生长和产生目的产物所需要的氧。向发酵液引入空气以提供微生物所需要的氧会产生泡沫。发酵过程中泡沫的存在通常对发酵的性能有负面影响,包括发酵罐工作体积或者生产率降低,存在与“泡沫溢出”相关的污染风险,所述“泡沫溢出”例如是液态发酵液上方产生泡沫柱或者泡沫头达到足够的高度,以至于它通过通风孔或者管道排出发酵容器。

[0008] 常常使用添加剂如消泡剂或者除泡剂来减少发酵期间的泡沫形成。消泡剂按需回收步骤期间进行添加以控制泡沫。一些回收工艺因消泡剂的存在而受到负面影响,尤其是基于膜的分离工艺。取决于蛋白质或者酶的最终应用,在其生产过程中采用的消泡剂可能需要或者不需要移除。

[0009] 但是,化学类的泡沫控制方法由于其可能引起的问题(即污染、传质下降),并不总是合乎需要的,尤其是在产品质量非常重要的食品、饲料和药品行业中。因为消泡剂通常是疏水的,它们难以进行灭菌,这在食品和药品行业中会造成问题。此外,这些行业中的监管要求限制了可容许用于消泡剂和除泡剂的化学品。

[0010] 可惜的是,用于工业规模生产蛋白质或者酶的常规深层好氧发酵和回收工艺不能有效地应用于该生物表面活性剂(即生物法生产的表面活性剂分子)的生产。在相同的培养条件下,这些分子的表面活性在发酵液中产生的泡沫将比不表达该生物表面活性剂分子的相同微生物会产生的泡沫多得多。

[0011] 添加消泡剂并不总是这个问题的令人满意的解决方案。不仅需要大量的消泡剂来防止过量的泡沫形成,而且通常也需要移除消泡剂以便该表面活性剂如所预期在目标应用中起作用。在一些情况中,即使添加大量的消泡剂并在相对较低工作百分比的发酵罐体积中操作,也不能有效控制发泡。与过量发泡和不受控制的气泡相关的、因消泡剂的使用所致的挑战,在下游回收步骤中继续存在。由于人们需求的是表面活性剂的去污力,因此在生产步骤中添加的消泡剂通常必须移除。

[0012] 在本申请中引证或者确认任何文件并不是承认这种文件可作为本发明的现有技术利用。

发明内容

[0013] 本发明部分地基于申请人出乎意料的发现,即向发酵液添加沉淀剂能使生物表达的表面活性剂沉淀而且发泡减少,其中泡沫不会复发。

[0014] 本发明描述与在含水溶液的生产中控制泡沫有关的方法和/或用途,所述含水

溶液可包含一种或者多种由微生物表达的表面活性剂。这可通过对溶液进行适当调理(conditioning)而使能发泡的表面活性剂变得不可溶来实现。适当的调理可包括沉淀、结晶和/或任何其他能使表面活性剂不可溶或者减少临界胶束浓度的操作。

[0015] 本发明涵盖一种控制生物表面活性剂的发泡的方法和/或用途,该生物表面活性剂在以下情况下发泡:在发酵培养基中通过宿主细胞生产该生物表面活性剂期间,当宿主细胞胞外分泌该生物表面活性剂并且该生物表面活性剂可溶于发酵培养基时,所述方法和/或用途可包括在通过宿主细胞生产该生物表面活性剂的同时使该生物表面活性剂不溶解化,由此发泡受到控制,因为该不溶解化的生物表面活性剂不会发泡。

[0016] 本发明还涵盖一种控制生物表面活性剂的发泡的方法和/或用途,该生物表面活性剂在以下情况下发泡:在发酵培养基中通过宿主细胞生产该生物表面活性剂期间,当宿主细胞胞外分泌该生物表面活性剂并且该生物表面活性剂可溶于发酵培养基时,所述方法和/或用途可包括在通过宿主细胞生产该生物表面活性剂的同时使该生物表面活性剂不溶解化,由此发泡受到控制,因为该不溶解化的生物表面活性剂不会发泡,其中泡沫减少指数大于1,和/或泡沫减少指数大于2,和/或泡沫减少指数大于3;和/或发酵培养基中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约1g/kg;和/或至少25%的所生产的生物表面活性剂被不溶解化;和/或所述方法在不添加消泡剂的情况下进行;和/或与不使该生物表面活性剂不溶解化而进行的方法相比,所述方法用数量减低的消泡剂来进行。

[0017] 本发明提供一种通过适当选择工艺条件而降低生物表面活性剂的可溶性浓度,从而减少或者消除该生物表面活性剂在处于溶液中时所引起的泡沫形成的方法和/或用途。导致该生物表面活性剂的溶解度降低的工艺条件取决于该生物表面活性剂的性质。这种工艺条件可涵盖物理条件如温度和/或压力的适当选择。这种工艺条件还可涵盖其中存在该生物表面活性剂的液体介质的化学组成。这种组成的可能选择是众多的,并且是生物加工领域技术人员公知的。调节溶解度条件的化学方法涵盖使用能使该生物表面活性剂不可溶的添加剂,包括pH缓冲化学品、无机或者有机酸或者碱的盐、醇、有机溶剂、聚合物、多元醇、蛋白质、吸附剂、核酸、脂质。这个溶解度调节化学品名单不旨在是排他性的或者限制性的。

[0018] 本发明还涵盖制备生物表面活性剂的方法和/或用途,所述方法和/或用途包括本文所提供的泡沫控制或者其(某个或某些)方面。

[0019] 本发明因此涉及例如由微生物表达的表面活性剂(或者说生物表面活性剂)的原位不溶解化或者在表达的同时原位不溶解化,包括制备生物表面活性剂的分批工艺或者连续工艺在内,所述工艺包括该生物表面活性剂的原位不溶解化或者在表达的同时原位不溶解化。不溶解化可通过沉淀、结晶[因为EP1320595Yoneda等人;Sylatk等人/1984;Desai等人/1993]和/或任何其他能使该表面活性剂不可溶或者降低临界胶束浓度的操作。有利地,不溶解化包括添加沉淀剂或者基本上由添加沉淀剂组成,所述沉淀剂例如盐、醇、水混溶性有机溶剂、水溶性聚合物或者阳离子聚合物(如但不限于C581),或者不溶解化包括pH调节或者基本上由pH调节组成,所述pH调节例如降低pH。不溶解化可包括调节温度和/或压力,或者由调节温度和/或压力组成,所述调节温度例如提高温度或者加热。在特别有利的实施例中,消泡剂在生物表面活性剂制备中的使用得到减少或者完全避免。在有利的实施例中,生物表面活性剂例如疏水蛋白(如疏水蛋白II)以小于约0.1g/kg的浓度存在

于溶液中。

[0020] 本发明还涉及一种控制在生产过程中会发泡的生物表面活性剂在溶液中的发泡的方法和 / 或用途,所述方法和 / 或用途可包括在该生物表面活性剂的生产过程中在条件可能会引起泡沫形成的时候,与此同时将该生物表面活性剂进行不溶解化,由此发泡受到控制,因为该不溶解化的生物表面活性剂不会发泡。

[0021] 在另一个实施例中,本发明还涉及一种控制在生产过程中会发泡的生物表面活性剂的发泡的方法和 / 或用途,所述方法和 / 或用途可包括在通过宿主细胞在溶液中生产生物表面活性剂的同时将该生物表面活性剂进行不溶解化,控制发泡使得:泡沫减少指数大于 1,和 / 或泡沫减少指数大于 2,和 / 或泡沫减少指数大于 3;和 / 或溶液中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约 1g/kg;和 / 或至少 25% 的所生产的生物表面活性剂被不溶解化;和 / 或所述方法在不添加消泡剂的情况下进行;和 / 或与不加以不溶解化而进行的方法相比,所述方法用数量减低的消泡剂来进行。

[0022] 在又另一个实施例中,本发明涉及一种控制生物表面活性剂在生产过程中的发泡的方法和 / 或用途,所述方法和 / 或用途可包括在生物表面活性剂的生产过程中控制组合物的条件以减少泡沫,这可包括调节该组合物中的条件以减少发泡,使得泡沫减少指数大于 1,和 / 或泡沫减少指数大于 2,和 / 或泡沫减少指数大于 3;和 / 或发酵培养基中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约 1g/kg;和 / 或至少 25% 的所生产的生物表面活性剂被不溶解化;和 / 或所述方法在不添加消泡剂的情况下进行;和 / 或与不加以不溶解化而进行的方法相比,所述方法用数量减低的消泡剂来进行;和 / 或所述方法在约 4.0 的 pH 下进行。

[0023] 本发明的有益效果适用于生物表面活性剂处理的所有阶段,包括发酵、回收、配制、保藏、装卸和运输。具体地讲,有益效果尤其适用于涉及通气的生物表面活性剂处理阶段,如但不限于混合、泵送和排气。

[0024] 本发明还涵盖本文所描述的装置,包括在本文描述的方法或者工艺或者它们的(某个或者某些)方面的实施中采用在内。

[0025] 因此,本发明的一个目标是不将任何之前知道的产品、制造该产品的工艺或者使用该产品的的方法涵盖在本发明内,从而本申请人保留权利并据此公开对任何之前知道的产品、工艺或者方法的弃权。要进一步指出的是,本发明不旨在将任何不符合美国专利商标局 (USPTO, 35U. S. C. § 112, 第一段) 和欧洲专利局 (EPO, 欧洲专利公约 (EPC) 的第 83 条) 的书面说明和可实施性要求的产品、工艺或者该产品的制造或者使用该产品的的方法涵盖在本发明内,从而本申请人保留权利并据此公开对任何之前描述的产品、制造该产品的工艺或者使用该产品的的方法的弃权。

[0026] 应指出,在本公开说明书中特别是在权利要求书和 / 或段落中,术语“包含”(各种语法形式)可具有美国专利法中赋予它的含义;例如,它可以意指“包括”(各种语法形式);而术语“实质上由...组成”(各种语法形式)具有美国专利法中赋予它的含义,例如它允许没有明确叙及的要素,但排除在现有技术中存在的要素或者影响本发明的基本特征或者新特征的要素。

[0027] 要特别一提的是,“基本上由...组成”的使用是为了在技术可达的任何程度上区分美国专利公开第 20100151525 号及与其等同的任何文件,例如在主题上和 / 或专利法上(例如,通过作为 EP08171868 或者要求 EP08171868 的优先权或者与 EP08171868 同族)区

分。例如,在本发明中,卡拉胶的任何使用不需伴随着降低 pH (特别是例如低于 3.0 或者 3.5) 和 / 或调节离子强度;并且, pH 的任何降低不需伴随着使用卡拉胶和 / 或调节离子强度,并且离子强度的任何调节不需伴随着降低 pH 和 / 或使用卡拉胶。因此,“基本上由……组成”排除现有技术的要素,如加入卡拉胶并使 pH 低于 3.5 或者 3,或者加入卡拉胶、使 pH 低于 3.5 或者 3 并调节离子强度。

[0028] 还要一提的是,某些术语也特别意在排除在任何可能属现有技术文件中的要素。例如,术语“生物表面活性剂”特别意在排除 PCT 公开第 W02009/152176 号的酶主题。类似地,在没有或者不存在添加的消泡剂的情况下实施,这种说法是为了区分允许消泡剂存在或者添加的文件,例如美国专利公开第 20100291630 号及其任何等同文件。

[0029] 这些和其他的实施例被以下“具体实施方式”公开,或者由以下“具体实施方式”显而易见并被其所涵盖。

附图说明

[0030] 以下“具体实施方式”是以举例方式给出,并不旨在使本发明仅限于所描述的具体实施例;结合附图可更好地理解以下“具体实施方式”。

[0031] 图 1 示出混合后的疏水蛋白溶液(左)和混合并热处理后的疏水蛋白溶液(右)。

[0032] 图 2 示出用改进的发酵法生产的疏水蛋白的 MALDI-TOF 谱图。7180 处的峰对应于全长疏水蛋白分子。

[0033] 图 3A 和 3B 示出代表性的生物反应器。细胞、培养基和 / 或营养物可通过输入部件 102 提供到反应器 100。输入部件 102 可包括阀门 104,该阀门用来控制生物体和 / 或培养基向该容器的递送。细胞和培养基可通过输入部件 102 提供。多个传感器 106 可设置在反应器 100 当中的各个位置。传感器 106 给控制器 108, 110 提供数据。控制器 108, 110 能够控制细胞、培养基、营养物、沉淀剂和 / 或其他组分的量。沉淀的组分可用传感器 106 检测。在一些实施例中,在反应器 100 中可存在窗口 116 以便使用者观察反应器中的状况。控制器 108 与输出阀门 112 连接。控制器 110 可指导阀门 112 打开以让沉淀物通过输出部件 114 离开该罐。在一些实施例中,使用者的输入可让控制器指导阀门 112 按需打开和 / 或关闭。营养物可用输入部件 118 提供到反应器。输入部件 118 可连接到递送装置 120 以给反应器 100 提供营养物。一些实施例包括混合器 122 以促进反应器中的各组分的混合。

[0034] 图 4 显示如实例 20 中所描述在氯化钙处理后测得,含有表面活性肽的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 发酵液中的泡沫形成减少。

具体实施方式

[0035] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。为了清楚起见,定义了以下缩写和 / 或术语。

[0036] 本文所用的“生物表面活性剂”或者“生物法产生的表面活性剂”属于会引起发泡的物质。生物表面活性剂或者生物法产生的表面活性剂可降低表面张力,如水和疏水液体或者水和空气之间的界面张力,其可从生物系统产生或者获得。生物表面活性剂或者生物法产生的表面活性剂可以是蛋白质、糖脂、脂肽、脂蛋白、磷脂、中性脂质或者脂肪酸。生物表面活性剂包括疏水蛋白。生物表面活性剂包括脂肽和脂蛋白,如表面活性肽、肽-脂质、

沙雷湿润素 (serrawettin)、黏液菌素、枯草杆菌蛋白酶、短杆菌肽、多粘菌素。生物表面活性剂包括糖脂如鼠李糖脂、槐糖脂、海藻糖脂和纤维二糖脂。生物表面活性剂包括聚合物如乳化胶 (emulsan)、biodispersan、甘露聚糖 - 脂质 - 蛋白质、脂乳化剂 (liposan)、碳水化合物 - 蛋白质 - 脂质、蛋白质 PA。生物表面活性剂包括颗粒物如泡囊、菌毛和全细胞。生物表面活性剂包括糖苷如皂苷类。生物表面活性剂包括纤维状蛋白质如丝心蛋白。生物表面活性剂可自然产生, 或者它可以是自然界中不存在的经诱变或者遗传工程改造的变体。这包括为了降低溶解度已进行了工程改造, 以便有助于通过根据本发明降低生物表面活性剂溶解度而控制发泡的生物表面活性剂变体。生物表面活性剂包括但不限于本文所描述的相关生物表面活性剂、衍生生物表面活性剂、变体生物表面活性剂和同源生物表面活性剂。

[0037] 本文所用的“生物系统”包含活生物或者衍生自活生物, 所述活生物如微生物、植物、真菌、昆虫、脊椎动物或者通过合成生物学产生的生命形式。活生物可以通过经典育种、克隆选择、诱变和类似的用以产生遗传多样性的方法所获得的、自然界中不存在的变体, 或者它可以是通过重组 DNA 技术获得的遗传工程生物体。活生物可以整体使用, 或者它可以是诸如器官培养物、植物栽培种、混悬细胞培养物、贴壁细胞培养物或者无细胞制剂的组分的来源。

[0038] 生物系统当隔离 (sequester) 生物表面活性剂时可含有或者不含有活细胞。生物系统可从自然来源找到并采集, 它可进行耕种、培养, 或者它可在工业条件下栽培。生物系统可从所供应的前体或者营养物合成生物表面活性剂, 或者它可从它的环境富集生物表面活性剂。

[0039] 本文所用的“生产”涉及用于生产化学品和生物制品的制造方法, 包括但不限于收获、采集、压缩、放血、浸渍、均质、糖化、酿造、发酵、回收、固液分离、细胞分离、离心、过滤 (如真空过滤)、配制、保藏或者运输。

[0040] 本文所用的“工艺条件”指涉及本发明方法的溶剂和 / 或物理参数选择 (如但不限于温度、压力、混合或者 pH)。

[0041] 本文所用的“溶剂”或者“溶液”涉及可含有不溶性生物表面活性剂之外的悬浮颗粒的液体, 所述悬浮颗粒如但不限于身体部分、植物片段、活细胞或者死细胞 [因为 EP1320595Yoneda 等人 ; Syldatk 等人 /1984 ; Desai 等人 /1993]。

[0042] 本文所用的“可溶性”涉及溶解在溶剂或者溶液中的物质。

[0043] 本文所用的“泡沫”涉及通过将气泡截留在液体中、凝胶中或者半固体中而形成的物质。

[0044] 本文所用的“膨胀度 (overrun)”是一种计算值, 涉及发泡溶液的体积减去起始体积再除以起始体积, 以分数或者百分数报告。膨胀度为零意味着溶液不含泡沫。数值接近于零意味着溶液具有极少的泡沫。在初始样品已经含有泡沫的情况中, 在计算中用初始重量替代初始体积。

[0045] 本文所用的“泡沫减少指数”或者“泡沫控制指数”或者“泡沫打破指数”是某种处理在控制泡沫方面的有效性的度量。它是未处理的溶液与经处理的溶液的膨胀度之比。泡沫减少指数等于约 1 意味着未处理的和经处理的生物表面活性剂溶液具有相同的膨胀度, 换句话说, 该处理没有带来改进。任何大于 1 的数值意味着泡沫减少, 该处理带来改进。

[0046] 本文所用的“泡沫控制”、“泡沫减少”或者“泡沫打破”涉及通过防止或者阻碍或

者摧毁或者破坏泡沫来减少溶液中的泡沫的行动。

[0047] 如本文所用,术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是指通过肽键连接的包含氨基酸残基的任意长度的聚合物。本文使用氨基酸残基的常规单字母密码或三字母密码。聚合物可为直链或支链的,其可包含经修饰的氨基酸,并且其可被非氨基酸隔断。所述术语还涵盖天然改性或通过干预改性的氨基酸聚合物;所述干预例如是二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或改性,如与标记组分缀合。在所述定义中还包括(例如)包含氨基酸的一种或者多种类似物(包括,例如非天然氨基酸、D-氨基酸等)的多肽,以及本领域中已知的其他修改形式。

[0048] 本文所用的“培养物溶液”是包含目的生物表面活性剂和其他可溶性或者不溶性组分的液体。这种组分包括其他蛋白质、非蛋白质类杂质如细胞和细胞碎片、核酸、多糖、脂质、化学品如消泡剂、絮凝剂、盐、糖、维生素、生长因子、沉淀剂等。“培养物溶液”还可以被称为“蛋白质溶液”、“液体培养基”、“渗滤培养液”、“澄清培养液”、“浓缩物”、“经调理的培养基”、“发酵培养液”、“裂解培养液”、“裂解物”、“细胞培养液”或者简称“培养液 (broth)”。如果存在细胞的话,细胞可以是细菌细胞、真菌细胞、植物细胞、动物细胞、人细胞、昆虫细胞、合成细胞等。

[0049] 本文所用的术语“回收”指这么一种过程,在该过程中使包含生物表面活性剂和一种或者多种不想要的组分的液体培养物经历一些工艺,以将生物表面活性剂与不想要的组分中的至少一些分离开来,所述不想要的组分例如水、细胞和细胞碎片、其他蛋白质、氨基酸、多糖、糖、多元醇、无机或者有机盐、酸和碱、以及颗粒材料。

[0050] 本文所用的“生物表面活性剂产品”指适合提供给最终用户如消费者的生物表面活性剂制品。生物表面活性剂产品可包括细胞、细胞碎片、培养基组分、配制赋形剂如缓冲剂、盐、防腐剂、还原剂、糖、多元醇、表面活性剂等,添加或者保留所述配制赋形剂是为了延长生物表面活性剂的功能货架期或者有利于生物表面活性剂的最终应用。

[0051] 本文所用的功能上和 / 或结构上类似的生物表面活性剂被认为是“相关生物表面活性剂”。这种生物表面活性剂可衍生自不同属和 / 或种的生物,或者甚至不同类别的生物(例如细菌和真菌)。相关生物表面活性剂还涵盖通过一级序列分析确定的、通过三级结构分析确定的或者通过免疫交叉反应性确定的同源物。

[0052] 本文所用的术语“衍生生物表面活性剂”可指这样的蛋白质基生物表面活性剂,其是通过将一个或多个氨基酸添加到 C 端和 / 或 N 端、在氨基酸序列中的一个或多个不同位点处置换一个或多个氨基酸、和 / 或在该蛋白质的一端或两端或氨基酸序列中的一个或多个位点处缺失一个或多个氨基酸、和 / 或在该氨基酸序列中的一个或多个位点处插入一个或多个氨基酸而衍生自某种生物表面活性剂。生物表面活性剂衍生物的制备可通过修饰编码天然蛋白的 DNA 序列、将该 DNA 序列转化到合适的宿主中以及表达该经修饰的 DNA 序列以形成该衍生蛋白质来实现。“衍生生物表面活性剂”还可涵盖其中脂质部分或者碳水化合物部分已在合成过程中或者合成之后连接到蛋白质主链的生物表面活性剂衍生物。

[0053] 本文所用的术语“衍生生物表面活性剂”或者“变体生物表面活性剂”可指这样的脂质基和 / 或糖基生物表面活性剂,其是通过添加一个或者多个脂质和 / 或糖、在一个或者多个不同的位点处置换一个或者多个脂质和 / 或糖、和 / 或在分子的一端或者两端或者在结构内的一个或者多个位点处缺失一个或者多个脂质和 / 或糖、和 / 或在结构的一个或者

多个位点处插入一个或者多个脂质和 / 或糖而衍生自某种生物表面活性剂。

[0054] 相关(和衍生)生物表面活性剂包括“变体生物表面活性剂”。变体蛋白质基生物表面活性剂与参考 / 亲本生物表面活性剂(例如野生型生物表面活性剂)差别在于少数氨基酸残基处的置换、缺失和 / 或插入。不同的氨基酸残基的数量可以为一个或多个氨基酸残基,例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50 或更多个氨基酸残基。变体生物表面活性剂与野生型生物表面活性剂共有至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、或者甚至至少约 99% 或者更高的氨基酸序列同一性。变体生物表面活性剂与参考生物表面活性剂的差异还可在于选定的模体、结构域、表位、保守区等。

[0055] 本文所用的术语“类似序列”是指蛋白质基生物表面活性剂内的提供与生物表面活性剂相似的功能、三级结构和 / 或保守残基的序列。例如,在包含 α -螺旋或 β -片层结构的表位区域中,类似序列中的置换氨基酸优选地保持相同的特定结构。所述术语还指核苷酸序列以及氨基酸序列。在一些实施例中,开发了类似序列,使得置换氨基酸导致变体酶显示相似或改进的功能。在一些实施例中,生物表面活性剂中的氨基酸三级结构和 / 或保守残基位于目的区段或者片段之处或者附近。因此,在目的区段或片段包含(例如) α -螺旋或 β -片层结构的情况下,置换氨基酸优选地保持该特定结构。

[0056] 本文所用的术语“同源生物表面活性剂”指具有与参考生物表面活性剂相似的活性和 / 或结构的生物表面活性剂。这并不意味着各同源物一定在进化上相关。因此,意图的是该术语涵盖从不同生物体获得相同、相似或者相应的生物表面活性剂(即,就结构和功能而言)。在一些实施例中,希望鉴定具有与参考生物表面活性剂相似的四级、三级和 / 或一级结构的同源物。

[0057] 序列之间同源性的程度可使用本领域中已知的任何合适的方法确定(参见如 Smith 和 Waterman, (1981),《应用数学进展》(Adv. Appl. Math.), 2:482 ;Needleman 和 Wunsch, (1970),《分子生物学杂志》(J. Mol. Biol.), 48:443 ;Pearson 和 Lipman, (1988),《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 85:2444 ;程序,诸如在威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package, 得自威斯康星州麦迪逊市遗传学计算机小组 (Genetics Computer Group, Madison, WI)) 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA ;以及 Devereux 等人, (1984),《核酸研究》(Nucleic Acids Res.), 12:387-395。

[0058] 例如, PILEUP 是可用于测定序列同源程度的程序。PILEUP 使用渐进式逐对比对从一组相关序列产生多个序列对比。其还能够绘制显示聚类关系(用于产生比对)的树形图。PILEUP 使用 Feng 和 Doolittle 的渐进式比对方方法(Feng 和 Doolittle, (1987),《分子进化杂志》(J. Mol. Evol.), 35:351-360)。所述方法与 Higgins 和 Sharp 描述的方法类似(Higgins 和 Sharp, (1989),《计算机在生物科学中的应用》(CABIOS), 5:151-153)。可用的 PILEUP 参数包括:默认间隙权重 3.00、默认间隙长度权重 0.10, 以及加权末端间隙。可用的算法的另一个例子为 Altschul 等人描述的 BLAST 算法(Altschul 等人, (1990),《分子生物学杂志》(J. Mol. Biol.), 215:403-410 ;以及 Karlin 等人, (1993),《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 90:5873-5787)。一种特别有用的 BLAST 程序为 WU-BLAST-2 程序(参见 Altschul 等人, (1996),《酶学方法》(Meth. Enzymol.), 266:460-480)。参数“W”、“T”和“X”确定比对的灵敏度和速度。BLAST 程序使用默认值:字长(W)11、BLOSUM62 记分

矩阵(参见 Henikoff 和 Henikoff, (1989),《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 89:10915) 比对 (B)50 次、预期 (E)10、 $M' = 5$ 、 $N' = 4$, 对两条链进行比较。

[0059] 如本文所用,在至少两条核酸或多肽的情况下,短语“基本上类似”和“基本上相同”通常意味着多核苷酸或多肽包含的序列与参考(即,野生型)序列相比具有至少约 70% 的同一性、至少约 75% 的同一性、至少约 80% 的同一性、至少约 85% 的同一性、至少约 90% 的同一性、至少约 91% 的同一性、至少约 92% 的同一性、至少约 93% 的同一性、至少约 94% 的同一性、至少约 95% 的同一性、至少约 96% 的同一性、至少约 97% 的同一性、至少约 98% 的同一性、或甚至至少约 99% 的同一性或更高的同一性。序列同一性可使用诸如 BLAST、ALIGN 和 CLUSTAL 之类的已知程序,使用标准参数测定。(参见例如 Altschul 等人, (1990),《分子生物学杂志》(J. Mol. Biol.), 215:403-410 ;Henikoff 等人, (1989),《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 89:10915 ;Karin 等人, (1993),《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 90:5873 ;以及 Higgins 等人, (1988),《基因》(Gene), 73:237-244)。进行 BLAST 分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 公开获得。另外,可使用 FASTA 对数据库进行搜索 (Pearson 等人, (1988),《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 85:2444-2448)。两条多肽实质上相同的一个指示是第一多肽与第二多肽是免疫交叉反应性的。通常,因保守氨基酸置换而不同的多肽是免疫交叉反应性的。因此,一种多肽与第二多肽实质上一致,例如,在此情况下两个多肽仅因保守置换而不同。两种核酸序列实质上一致的另一个指示是两种分子在严格的条件(如,在中至高严格度的范围内)下彼此杂交。

[0060] 本文所用的“野生型”和“天然”生物表面活性剂是自然界中存在的那些生物表面活性剂。术语“野生型序列”和“野生型基因”在本文中互换使用,是指天然的或天然存在于宿主细胞内的序列。在一些实施例中,野生型序列是指为蛋白质工程项目的起始点的目的序列。编码天然形成的蛋白质的基因可依据本领域内的技术人员已知的一般方法获得。所述方法一般包括合成出具有编码生物表面活性剂区域的推定序列的标记探针,从表达该蛋白质的生物体制备基因组文库,并通过与探针的杂交对文库筛选目的基因。然后对阳性杂交克隆进行定位和测序。

[0061] 本文所用的“不溶性”或者“不溶解化的”涉及难溶或者极其难溶的化合物。可通过对 1ml 样品在 $14,000 \times g$ 下进行高速离心 10 分钟,使化合物的不溶性级分与可溶性级分分离。作为另一种选择,可通过滤过 $0.45 \mu m$ 膜过滤器(例如 Millipore Durapore1L 瓶顶过滤器),使不溶性级分与可溶性级分分离。不溶性级分在离心后会在沉淀中,或者在过滤后保留在过滤器上。作为另一种选择,可通过浊度或者混浊的出现检测之前澄清的溶液的不溶解化。作为另一种选择,可通过光学显微镜术检测不溶性颗粒如晶体或者沉淀物。

[0062] 本文所用的“沉淀”涉及通过化学反应或者通过物理条件的改变造成从化合物的溶液中形成该化合物的不可溶形式。本文所用的“沉淀剂”涉及造成沉淀的物质。

[0063] 本文所用的“CMC”涉及临界胶束浓度,其可指表面活性剂的这么一个浓度,在该浓度以上会形成胶束,几乎所有加到该系统的额外表面活性剂都进入胶束。CMC 是表面活性剂的重要特征。在达到 CMC 之前,表面张力随着表面活性剂浓度的变化而剧烈变化。在达到 CMC 之后,表面张力保持相对恒定或者以较小的斜率变化。特定分散剂在特定介质中的 CMC 的数值取决于温度、压力,并且(有时强烈地)取决于其他表面活性物质和电解质的存在

和浓度。胶束仅在临界胶束温度以上才形成。本文所用的“减低 CMC”具有与降低生物表面活性剂的溶解度相同的作用,因为它降低表面活性剂在溶液中的浓度,从而减少泡沫形成。

[0064] 本文所用的“宿主细胞”可以是任何在其中产生生物表面活性剂的细胞,无论是天然产生还是通过重组方法产生。宿主细胞可包括但不限于伞菌属 (*Agaricus* spp.) (例如双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*))、田头菇属 (*Agrocybe* spp.) (例如杨树菇 (*Agrocybe aegerita*))、阿耶罗菌属 (*Ajellomyces* spp.) (例如荚膜阿耶罗菌 (*Ajellomyces capsulatus*))、皮炎阿耶罗菌 (*Ajellomyces dermatitidis*))、曲霉属 (*Aspergillus* spp.) (例如 *Aspergillus arvii*、短柄曲霉 (*Aspergillus brevipes*))、棒曲霉 (*Aspergillus clavatus*)、硬柄曲霉 (*Aspergillus duricaulis*)、椭圆曲霉 (*Aspergillus ellipticus*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、烟束曲霉 (*Aspergillus fumisynnematus*)、迟缓曲霉 (*Aspergillus lentulus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、单侧曲霉 (*Aspergillus unilateralis*)、绿垂曲霉 (*Aspergillus viridinutans*))、芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.) (例如地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 或者枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*))、白僵菌属 (*Beauveria* spp.) (例如球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*))、假丝酵母属 (*Candida* spp.) (例如 *Candida bogoriensis*、*Candida bombicola*)、麦角菌属 (*Claviceps* spp.) (例如纺锤麦角菌 (*Claviceps fusiformis*))、球孢子菌属 (*Coccidioides* spp.) (例如 *Coccidioides posadasii*)、旋孢腔菌属 (*Cochliobolus* spp.) (例如异旋孢腔菌 (*Cochliobolus heterostrophus*))、毛皮伞属 (*Crinipellis* spp.) (例如 *Crinipellis perniciososa*)、隐丛赤壳属 (*Cryphonectria* spp.) (例如寄生隐丛赤壳菌 (*Cryphonectria parasitica*))、*Davidiella* 属 (*Davidiella* spp.) (例如 *Davidiella tassiana*)、网笔石属 (*Dictyonema* spp.) (例如光叶网笔石 (*Dictyonema glabratum*))、裸胞壳属 (*Emericella* spp.) (例如构巢裸孢壳 (*Emericella nidulans*))、埃希氏菌属 (*Escherichia* spp.) (例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*))、小火焰菌属 (*Flammulina* spp.) (例如金针菇 (*Flammulina velutipes*))、镰刀菌属 (*Fusarium* spp.) (例如黄色镰刀菌 (*Fusarium culmorum*))、赤霉属 (*Gibberella* spp.) (例如串珠状赤霉 (*Gibberella moniliformis*))、小丛壳属 (*Glomerella* spp.) (例如禾生小丛壳 (*Glomerella graminicola*))、树花菌属 (*Grifola* spp.) (例如灰树花 (*Grifola frondosa*))、汉逊酵母属 (*Hansenula* spp.) (例如多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*))、异担子属 (*Heterobasidion*spp.) (例如松根异担子 (*Heterobasidion annosum*))、肉座菌属 (*Hypocrea*spp.) (例如红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*))、*Hypocrea lixii*、绿色肉座菌 (*Hypocrea virens*))、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces* spp.) (例如乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*))、蜡蘑属 (*Laccaria* spp.) (例如双色蜡蘑 (*Laccaria bicolor*))、香菇属 (*Lentinula* spp.) (例如香菇 (*Lentinula edodes*))、巨座壳属 (*Magnaporthe* spp.) (例如稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*))、小皮伞属 (*Marasmius* spp.) (例如 *Marasmius cladophyllus*)、*Moniliophthora* 属 (*Moniliophthora* spp.) (例如 *Moniliophthora perniciososa*)、新萨托菌属 (*Neosartorya* spp.) (例如浅黄新萨托菌 (*Neosartorya aureola*)、芬尼新萨托菌 (*Neosartorya fennelliae*)、费希新萨托菌 (*Neosartorya fischeri*)、光滑新萨托菌 (*Neosartorya glabra*)、平土冢新萨托菌 (*Neosartoryahiratsukae*)、*Neosartorya*

nishimurae、*Neosartorya otanii*、假费希新萨托菌 (*Neosartorya pseudofischeri*)、四绕新萨托菌 (*Neosartorya quadricincta*)、匙囊新萨托菌 (*Neosartorya spathulata*)、刺孢新萨托菌 (*Neosartorya spinosa*)、宽脊新萨托菌 (*Neosartorya stramenia*)、*Neosartorya udagawae*)、脉孢菌属 (*Neurospora* spp.) (例如粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、陷脉孢菌 (*Neurospora discreta*)、间型脉孢菌 (*Neurospora intermedia*)、好食脉孢菌 (*Neurospora sitophila*)、四孢脉孢菌 (*Neurospora tetrasperma*)、野村菌属 (*Nomuraea* spp.) (例如莱氏野村菌 (*Nomuraea rileyi*))、长喙壳属 (*Ophiostoma* spp.) (例如新榆枯萎病菌 (*Ophiostoma novo-ulmi*)、*Ophiostoma quercus*)、副球孢子菌属 (*Paracoccidioides* spp.) (例如巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*))、钉孢属 (*Passalora* spp.) (例如 *Passalora fulva*)、桩菇菌属 (*Paxillus* spp.) (例如长丝桩菇 (*Paxillus filamentosus*)、卷边桩菇 (*Paxillus involutus*))、青霉属 (*Penicillium* spp.) (例如沙门柏干酪青霉 (*Penicillium camemberti*)、产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffeii*)、*Phlebiopsis* 属 (*Phlebiopsis* spp.) (例如大伏革菌 (*Phlebiopsis gigantea*))、毕赤酵母属 (*Pichia* spp.) (例如巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*))、豆马勃属 (*Pisolithus*) (例如彩色豆马勃 (*Pisolithus tinctorius*))、侧耳属 (*Pleurotus* spp.) (例如平菇 (*Pleurotus ostreatus*))、足孢虫属 (*Podospora* spp.) (例如鹅柄孢壳菌 (*Podospora anserina*))、泊氏孔菌属 (*Postia* spp.) (例如卧孔菌 (*Postia placenta*))、假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp.) (例如铜绿假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas pyocyanea*)、核腔菌属 (*Pyrenophora* spp.) (例如偃麦草核腔菌 (*Pyrenophora tritici-repentis*))、酵母菌属 (*Saccharomyces* spp.) (例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces* spp.) (例如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*))、裂褶菌属 (*Schizophyllum* spp.) (例如裂褶菌 (*Schizophyllum commune*))、链霉菌属 (*Streptomyces* spp.) (例如变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*))、篮状菌属 (*Talaromyces* spp.) (例如柄篮状菌 (*Talaromyces stipitatus*))、球拟酵母属 (*Torulopsis* spp.)、木霉属 (*Trichoderma* spp.) (例如棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*)、深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*)、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesii*) [以前称红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*)]、口蘑属 (*Tricholoma* spp.) (例如棕灰口蘑 (*Tricholoma terreum*))、*Uncinocarpus* 属 (*Uncinocarpus* spp.) (例如 *Uncinocarpus reesii*)、轮枝孢属 (*Verticillium* spp.) (例如大丽轮枝孢 (*Verticillium dahliae*))、*Xanthodactylon* 属 (*Xanthodactylon* spp.) (例如 (*Xanthodactylon flammeum*))、石黄衣属 (*Xanthoria* spp.) (例如 *Xanthoria calcicola*、*Xanthoria capensis*、*Xanthoria ectaneoides*、*Xanthoria flammea*、*Xanthoria karrooensis*、*Xanthoria ligulata*、石黄衣 (*Xanthoria parietina*)、*Xanthoria turbinata*) 或者亚罗酵母属 (*Yarrowia* spp.) (例如解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*))。

[0065] 本发明的方法可应用于任何生物表面活性剂从培养液的分离。有利地，生物表面活性剂是由微生物分泌的可溶性胞外生物表面活性剂。一组示例性的生物表面活性剂是疏水蛋白，其是由丝状真菌表达和 / 或衍生自丝状真菌的一类富含半胱氨酸的多肽。疏水

蛋白是小的(约 100 个氨基酸)多肽,因其在物体(包括细胞和人造材料)的表面上形成疏水覆层的能力而知名。疏水蛋白最初于 1991 年在裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 中发现,现已在多种丝状真菌中确认。基于亲水性 (hydropathy) 和其他生物物理性质的差异,疏水蛋白被归类为 I 类和 II 类。基于保守胱氨酸残基的特征性间距和疏水性模式,疏水蛋白被分为两个不同的类别(I 类和 II 类) (Kershaw 和 Talbot, 1998,《真菌遗传生物学》(*Fungal Genet Biol*), 23:18 - 23 ;以及 Wösten, 2001,《微生物学年度评论》(*Annu RevMicrobiol*), 55:625 - 646)。II 类疏水蛋白的例子参见例如 Linder 等人, (2005),《欧洲微生物学会联合会微生物学评论》(*FEMS Microbiologyreviews*), 29:877-96 ;以及 Kubicek 等人, (2008),《BMC 进化生物学》(*BMC Evolutionary Biology*), 8:4。

[0066] 疏水蛋白的表达通常需要在发酵过程中添加大量的一种或者多种消泡剂。否则,疏水蛋白多肽所产生的泡沫会使通气装置过滤器饱和,污染放气孔,造成压力积聚和降低蛋白质产率。结果,疏水蛋白的粗浓缩物常常含有残余量的消泡剂以及宿主细胞污染物,这在疏水蛋白制品中是不合需要的,尤其是当疏水蛋白要作为食品添加剂时。

[0067] 疏水蛋白可以可逆地以具有比其实际分子量大的表观分子量的形式存在,这使得疏水蛋白很适合用本发明方法进行回收。含有疏水蛋白的液体或者泡沫可如所描述连续地或者定期地从发酵罐收获以进行蛋白质回收,或者在发酵操作结束时批式收获。

[0068] 疏水蛋白可以是本领域知道的任何 I 类和 II 类疏水蛋白,例如来自以下生物的疏水蛋白:伞菌属 (*Agaricus* spp.) (例如双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*))、田头菇属 (*Agrocybe* spp.) (例如杨树菇 (*Agrocybe aegerita*))、阿耶罗菌属 (*Ajellomyces* spp.) (例如荚膜阿耶罗菌 (*Ajellomyces capsulatus*))、皮炎阿耶罗菌 (*Ajellomyces dermatitidis*)、曲霉属 (*Aspergillus* spp.) (例如 *Aspergillus arvii*、短柄曲霉 (*Aspergillus brevipes*)、棒曲霉 (*Aspergillus clavatus*)、硬柄曲霉 (*Aspergillus duricaulis*)、椭圆曲霉 (*Aspergillus ellipticus*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、烟束曲霉 (*Aspergillus fumisynnematus*)、迟缓曲霉 (*Aspergillus lentulus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、单侧曲霉 (*Aspergillus unilateralis*)、绿垂曲霉 (*Aspergillus viridinutans*))、白僵菌属 (*Beauveria* spp.) (例如球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*))、麦角菌属 (*Claviceps* spp.) (例如纺锤麦角菌 (*Claviceps fusiformis*))、球孢子菌属 (*Coccidioides* spp.) (例如 *Coccidioides posadasii*)、旋孢腔菌属 (*Cochliobolus* spp.) (例如异旋孢腔菌 (*Cochliobolus heterostrophus*))、毛皮伞属 (*Crinipellis* spp.) (例如 *Crinipellis perniciosus*)、隐丛赤壳属 (*Cryphonectria* spp.) (例如寄生隐丛赤壳菌 (*Cryphonectria parasitica*))、*Davidiella* 属 (*Davidiella* spp.) (例如 *Davidiella tassiana*)、网笔石属 (*Dictyonema* spp.) (例如光叶网笔石 (*Dictyonema glabratum*))、裸胞壳属 (*Emericella* spp.) (例如构巢裸胞壳 (*Emericella nidulans*))、小火焰菌属 (*Flammulina* spp.) (例如金针菇 (*Flammulina velutipes*))、镰刀菌属 (*Fusarium* spp.) (例如黄色镰刀菌 (*Fusarium culmorum*))、赤霉属 (*Gibberella* spp.) (例如串珠状赤霉 (*Gibberella moniliformis*))、小丛壳属 (*Glomerella* spp.) (例如禾生小丛壳 (*Glomerella graminicola*))、树花菌属 (*Grifola* spp.) (例如灰树花 (*Grifola frondosa*))、异担子属 (*Heterobasidion* spp.) (例如松根异担子 (*Heterobasidion annosum*))、肉座菌属 (*Hypocrea* spp.) (例如

红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*)、*Hypocrea lixii*、绿色肉座菌 (*Hypocrea virens*)、蜡蘑属 (*Laccaria* spp.) (例如双色蜡蘑 (*Laccaria bicolor*))、香菇属 (*Lentinula* spp.) (例如香菇 (*Lentinula edodes*))、巨座壳属 (*Magnaporthe* spp.) (例如稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*))、小皮伞属 (*Marasmius* spp.) (例如 *Marasmius cladophyllus*)、*Moniliophthora* 属 (*Moniliophthora* spp.) (例如 *Moniliophthora perniciosa*)、新萨托菌属 (*Neosartorya* spp.) (例如浅黄新萨托菌 (*Neosartorya aureola*)、芬尼新萨托菌 (*Neosartorya fennelliae*)、费希新萨托菌 (*Neosartorya fischeri*)、光滑新萨托菌 (*Neosartorya glabra*)、平土冢新萨托菌 (*Neosartorya hiratsukae*)、*Neosartorya nishimurae*、*Neosartoryaotanii*、假费希新萨托菌 (*Neosartorya pseudofischeri*)、四绕新萨托菌 (*Neosartorya quadricincta*)、匙囊新萨托菌 (*Neosartorya spathulata*)、刺孢新萨托菌 (*Neosartorya spinosa*)、宽脊新萨托菌 (*Neosartorya stramenia*)、*Neosartorya udagawae*)、脉孢菌属 (*Neurospora* spp.) (例如粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、陷脉孢菌 (*Neurospora discreta*)、间型脉孢菌 (*Neurospora intermedia*)、好食脉孢菌 (*Neurospora sitophila*)、四孢脉孢菌 (*Neurospora tetrasperma*))、野村菌属 (*Nomuraea* spp.) (例如莱氏野村菌 (*Nomuraea rileyi*))、长喙壳属 (*Ophiostoma* spp.) (例如新榆枯萎病菌 (*Ophiostoma novo-ulmi*)、*Ophiostoma quercus*)、副球孢子菌属 (*Paracoccidioides* spp.) (例如巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*))、钉孢属 (*Passalora* spp.) (例如 *Passalora fulva*)、桩菇菌属 (*Paxillus* spp.) (例如长丝桩菇 (*Paxillus filamentosus*)、卷边桩菇 (*Paxillus involutus*))、青霉属 (*Penicillium* spp.) (例如沙门柏干酪青霉 (*Penicillium camemberti*)、产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffeii*)、*Phlebiopsis* 属 (*Phlebiopsis* spp.) (例如大伏革菌 (*Phlebiopsis gigantea*))、豆马勃属 (*Pisolithus*) (例如彩色豆马勃 (*Pisolithus tinctorius*))、侧耳属 (*Pleurotus* spp.) (例如平菇 (*Pleurotus ostreatus*))、足孢虫属 (*Podospora* spp.) (例如鹅柄孢壳菌 (*Podospora anserina*))、泊氏孔菌属 (*Postia* spp.) (例如鲑色泊氏孔菌 (*Postia placenta*))、核腔菌属 (*Pyrenophora* spp.) (例如偃麦草核腔菌 (*Pyrenophora tritici-repentis*))、裂褶菌属 (*Schizophyllum* spp.) (例如裂褶菌 (*Schizophyllum commune*))、篮状菌属 (*Talaromyces* spp.) (例如柄篮状菌 (*Talaromyces stipitatus*))、木霉属 (*Trichoderma* spp.) (例如棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*)、深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*)、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesii*) [以前称红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*)]、口蘑属 (*Tricholoma* spp.) (例如棕灰口蘑 (*Tricholoma terreum*))、*Uncinocarpus* 属 (*Uncinocarpus* spp.) (例如 *Uncinocarpus reesii*)、轮枝孢属 (*Verticillium* spp.) (例如大丽花轮枝孢 (*Verticillium dahliae*))、*Xanthodactylon* 属 (*Xanthodactylon* spp.) (例如 *Xanthodactylon flammeum*)、石黄衣属 (*Xanthoria* spp.) (例如 *Xanthoria calcicola*、*Xanthoria capensis*、*Xanthoria ectaneoides*、*Xanthoria flammea*、*Xanthoria karrooensis*、*Xanthoria ligulata*、石黄衣 (*Xanthoria parietina*)、*Xanthoria turbinata*) 等。在例如以下文献中对疏水蛋白进行了综述 :Sunde, M 等人, (2008), *Micron*, 39:773-84 ;Linder, M. 等人, (2005), 《欧洲微生物学会联合会微生物学评论》 (*FEMS Microbiol Rev.*), 29:877-96 ;以及 **Wösten**, H. 等人, (2001), 《微生物学年鉴》 (*Ann. Rev.*

Microbiol. 55:625-46。

[0069] 在一个特别有利的实施例中,疏水蛋白来自木霉属 (*Trichoderma* spp.) (例如棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*)、深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*)、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) [以前称红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*)], 有利地,里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)。

[0070] I类和II类疏水蛋白都已在真菌中被鉴定为分泌蛋白,这种分泌蛋白在疏水界面处自组装成两性膜。I类疏水蛋白的聚集体一般相对不可溶,而II类疏水蛋白的聚集体容易溶解于多种溶剂中。有利地,疏水蛋白可溶于水,所谓可溶于水是指至少0.1%可溶于水,优选至少0.5%。所谓至少0.1%可溶是指当将99.9mL水中的0.1g疏水蛋白在20℃下进行30,000g离心30分钟时,没有疏水蛋白沉淀出来。

[0071] 本申请人已观察到,通过其他方法产生的疏水蛋白II会导致C末端的一个或者多个氨基酸切除。从本发明的方法,特别是如果使疏水蛋白沉淀或者不可溶的话,没有观察到切除。

[0072] 还在丝状细菌如放线菌 (*Actinomycete*) 和链霉菌属 (*Streptomyces* sp.) 中鉴定了疏水蛋白样蛋白质(例如“chaplins”) (W001/74864 ;Talbot, 2003,《当代生物学》(*Curr. Biol*), 13:R696-R698)。与真菌疏水蛋白形成对比的是,这些细菌蛋白质仅可形成最多一个二硫键,因为它们可能仅具有两个半胱氨酸残基。这种蛋白质是疏水蛋白的功能等同物的一个例子,并且是落入本文方法的生物表面活性剂范围内的另一类分子。

[0073] 鼠李糖脂是由铜绿假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 产生和/或衍生的一类糖脂,常常被引证为细菌表面活性剂当中得到最好地表征的细菌表面活性剂。主要有两类鼠李糖脂即单鼠李糖脂和双鼠李糖脂;它们分别由一个或者两个鼠李糖基团组成。鼠李糖脂已在化妆品行业中广泛用于诸如保湿剂、牙膏、避孕套润滑剂和香波的产品,并且在有机物和重金属污染场所的生物修复中有效。它们还能促进铜绿假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 对废烃如原油和植物油的降解。

[0074] 槐糖脂存在于假丝酵母属 (*Candida*) 或者相关酵母种并由这些微生物分泌到培养基中,并且已知是表面活性剂。羟基脂肪酸的性质是特征性的,羟基基团位于n或n-1碳原子上;碳链长为16、17或者18,因生长培养基的组成而变。已在 *Candida bogoriensis* 中确认了具有不饱和C18脂肪酸的槐糖苷。从球拟酵母属 (*Torulopsis* spp) 分离了独特的槐糖脂,其与已经提到的那些槐糖脂不同之处在于它是一种大环内酯,其中羟基脂肪酸的羧基基团被槐糖中的末端葡萄糖的4'羟基基团酯化。在该脂质中还可能存在两个乙酸基团。槐糖脂因其两亲结构而表现出表面活性剂活性。在槐糖脂生产菌中,*Candida bombicola* 是研究得最多的一个种,因为它能大量产生槐糖脂物质。已证实槐糖脂可用于硬质表面清洁和自动盘碟洗涤漂洗助剂配方。

[0075] 表面活性肽是一种细菌环状脂肽,是一种非常强效的表面活性剂,常用作抗生素。它是枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (产内生孢子的革兰氏阳性细菌) 所产生的24类抗生素之一。表面活性肽的结构由七个氨基酸的肽环(L-天冬酰胺、L-亮氨酸、谷氨酸、L-亮氨酸、L-缬氨酸和两个D-亮氨酸) 和长13-15个碳的疏水脂肪酸链组成,所述疏水脂肪酸链使其能够穿透细胞膜。表面活性肽与其他表面活性剂一样,能影响它被溶解于其中的液体的表面张力。它在低至20 μM的浓度下,能将水的表面张力从72mN/m降低到27mN/m。

[0076] 美国专利案 7,906,315 ;7,893,015 ;7,887,906 ;7,858,334 ;7,749,203 ;7,581,594 ;7,556,654 ;7,541,321 ;7,540,926 ;7,473,363 ;7,413,643 ;7,325,603 ;7,226,897 ;7,198,680 ;6,956,122 ;6,921,390 ;6,727,223 ;6,582,730 ;6,475,968 ;6,389,820 ;6,369,014 ;6,346,281 ;6,319,898 ;6,262,038 ;6,063,602 ;6,060,287 ;6,051,552 ;5,866,376 ;5,767,090 ;5,635,392 ;5,551,987 ;5,417,879 ;5,128,262 ;4,943,390 和 4,640,767 ;以及美国专利公开案 20110065167 ;20110027844 ;20100323928 ;20100168405 ;20100144643 ;20100143316 ;20100004472 ;20100000795 ;20090288825 ;20090269833 ;20090203565 ;20090170700 ;20090148881 ;20090098028 ;20080296222 ;20080293570 ;20080193730 ;20080085251 ;20080023044 ;20080023030 ;20080020947 ;20070249035 ;20070249034 ;20070215347 ;20070134288 ;20060106120 ;20050271698 ;20050266036 ;20050227338 ;20050176117 ;20050106702 ;20040251197 ;20040244969 ;20040231982 ;20040156816 ;20040152613 ;20040022775 ;20030096988 ;20030018306 ;20020176895 ;20020123077 和 20020120101 中所描述的生物表面活性剂,也可通过本发明的方法生产;另参见《表面活性剂科学系列第 48 卷,生物表面活性剂,生产性质应用》(Surfactant Science Series Volume 48, BIOSURFACTANTS, Production Properties Applications), Naim Kosaric 编辑, CRC Press 出版社, 1993。

[0077] 发酵生产生物表面活性剂是通过将宿主细胞或者微生物在生物反应器或者发酵罐内的液体发酵培养基中培养来进行。选择培养基的组成(例如营养物、碳源等)、温度和 pH, 以给培养物的生长和 / 或生物表面活性剂的产生提供适当的条件。通常将空气或者富氧空气喷射到培养基中, 以给培养物的呼吸供氧。

[0078] 本发明涉及向培养液添加任何造成生物表面活性剂沉淀的物质或者处理, 从而使生物表面活性剂不可溶。具体地讲, 任何造成生物表面活性剂沉淀的物质或者处理都可被本发明的方法采用。造成生物表面活性剂沉淀的物质包括但不限于盐、聚合物、酸、溶剂或者醇。造成生物表面活性剂沉淀的物理条件包括但不限于热量的变化和 pH 的变化。技术人员会理解, 造成生物表面活性剂沉淀的条件可包括沉淀剂、物理条件的改变或者这两者的组合。

[0079] 具体地讲, 本发明还涉及可通过本文描述的工艺生产的生物表面活性剂。例如, 本文给出了通过改变发酵培养基和条件对常规的发酵技术进行改进, 以使所表达的疏水蛋白在发酵仍在进行的同时在发酵液中变得不可溶, 从而防止发酵过程中泡沫溢出。使用该改进的发酵法生产的疏水蛋白的组成在图 2 中给出, 质量 7180 处的峰对应于全长疏水蛋白分子。有趣的是, 由本文给出的方法生产的疏水蛋白导致均匀的产品, 这与通常为两种变体的混合物的天然疏水蛋白不同。因此, 本发明还涵盖任何具有图 2 中示出的图谱的疏水蛋白。

[0080] 有利地, 沉淀剂是或者包括可由酸和碱的中和反应产生的、由阳离子和阴离子构成的盐—离子化合物, 例如包含任何合适阴离子和任何合适阳离子的离子化合物, 所述阴离子例如卤离子(例如氯离子、氟离子、溴离子或者碘离子); 柠檬酸根; 乙酸根; 硝酸根(或者硝酸盐)、亚硝酸盐、碳酸根; 硫酸根; 磷酸根; 氨基磺酸根; 膦酸根; 或者氨基磺酸根; 所述阳离子例如铵、钙、金属或者过渡金属如铝、铁、镁、锂、钾或者钠。盐有利地包含多原子离子, 更优选包含硫酸盐。盐可以是或者包含硫酸铵、硫酸钙、硫酸铁、硫酸镁、硫酸钾或者硫酸钠。在一个特别有利的实施例中, 盐是或者包含硫酸钠。在另一个特别有利的实施例中,

盐是或者包含硫酸铵。在其他实施例中,盐可以是乙酸盐、碳酸盐、氯盐、柠檬酸盐、甲酸盐、硝酸盐或者磷酸盐。

[0081] 在另一个实施例中,沉淀剂是醇。醇可以是一元醇或者多元醇,如一元或者多元 C_1-C_6 醇,如甲醇、乙醇或者异丙醇。

[0082] 在另一个实施例中,沉淀剂是水混溶性有机溶剂。溶剂可以是丙酮或者酮。

[0083] 在另一个实施例中,沉淀剂是水溶性聚合物。聚合物可以是聚乙二醇或者多糖如葡聚糖。在另一个实施例中,沉淀剂是阳离子聚合物,如但不限于 C581(Cytec Industries 公司,美国新泽西州伍德兰帕克 (Woodland Park, NJ07424))。

[0084] 在一个特别优选的实施例中,根据生物表面活性剂对培养液的 pH 进行调节。例如,如果生物表面活性剂为疏水蛋白,则 pH 有利地为约 4.0 ± 0.5 。pH 可在以下范围:约 3.9 ± 0.5 至约 4.1 ± 0.5 、约 3.8 ± 0.5 至约 4.2 ± 0.5 、约 3.7 ± 0.5 至约 4.3 ± 0.5 、约 3.6 ± 0.5 至约 4.4 ± 0.5 、约 3.5 ± 0.5 至约 4.5 ± 0.5 、约 3.4 ± 0.5 至约 4.6 ± 0.5 、约 3.3 ± 0.5 至约 4.7 ± 0.5 、约 3.2 ± 0.5 至约 4.8 ± 0.5 、约 3.1 ± 0.5 至约 4.9 ± 0.5 、约 3.0 ± 0.5 至约 5.0 ± 0.5 、约 2.9 ± 0.5 至约 5.1 ± 0.5 、约 2.8 ± 0.5 至约 5.2 ± 0.5 、约 2.7 ± 0.5 至约 5.3 ± 0.5 、约 2.6 ± 0.5 至约 5.4 ± 0.5 、约 2.5 ± 0.5 至约 5.5 ± 0.5 、约 2.4 ± 0.5 至约 5.6 ± 0.5 、约 2.3 ± 0.5 至约 5.7 ± 0.5 、约 2.2 ± 0.5 至约 5.8 ± 0.5 、约 2.1 ± 0.5 至约 5.9 ± 0.5 或者约 2.0 ± 0.5 至约 6.0 ± 0.5 。

[0085] 如果生物表面活性剂为鼠李糖脂或者槐糖脂,则 pH 有利地为约 2.5 ± 0.5 。pH 可在以下范围:约 2.4 ± 0.5 至约 2.6 ± 0.5 、约 2.3 ± 0.5 至约 2.7 ± 0.5 、约 2.2 ± 0.5 至约 2.8 ± 0.5 、约 2.1 ± 0.5 至约 2.9 ± 0.5 、约 2.0 ± 0.5 至约 3.0 ± 0.5 、约 1.9 ± 0.5 至约 3.1 ± 0.5 、约 1.8 ± 0.5 至约 3.2 ± 0.5 、约 1.7 ± 0.5 至约 3.3 ± 0.5 、约 1.6 ± 0.5 至约 3.4 ± 0.5 、约 1.5 ± 0.5 至约 3.5 ± 0.5 、约 1.4 ± 0.5 至约 3.6 ± 0.5 、约 1.3 ± 0.5 至约 3.7 ± 0.5 、约 1.2 ± 0.5 至约 3.8 ± 0.5 、约 1.1 ± 0.5 至约 3.9 ± 0.5 、约 1.0 ± 0.5 至约 4.0 ± 0.5 、约 0.9 ± 0.5 至约 4.1 ± 0.5 、约 0.8 ± 0.5 至约 4.2 ± 0.5 、约 0.7 ± 0.5 至约 4.3 ± 0.5 、约 0.6 ± 0.5 至约 4.4 ± 0.5 或者约 0.5 ± 0.5 至约 4.5 ± 0.5 。

[0086] 在另一个实施例中,其他表面活性剂的有利 pH 可为约 pH7.0 \pm 0.5、约 pH7.1 \pm 0.5、约 pH7.2 \pm 0.5、约 pH7.3 \pm 0.5、约 pH7.4 \pm 0.5、约 pH7.5 \pm 0.5、约 pH7.6 \pm 0.5、约 pH7.7 \pm 0.5、约 pH7.8 \pm 0.5、约 pH7.9 \pm 0.5、约 pH8.0 \pm 0.5、约 pH8.1 \pm 0.5、约 pH8.2 \pm 0.5、约 pH8.3 \pm 0.5、约 pH8.4 \pm 0.5、约 pH8.5 \pm 0.5、约 pH8.6 \pm 0.5、约 pH8.7 \pm 0.5、约 pH8.8 \pm 0.5、约 pH8.9 \pm 0.5、约 pH9.0 \pm 0.5、约 pH9.1 \pm 0.5、约 pH9.2 \pm 0.5、约 pH9.3 \pm 0.5、约 pH9.4 \pm 0.5、约 pH9.5 \pm 0.5、约 pH9.6 \pm 0.5、约 pH9.7 \pm 0.5、约 pH9.8 \pm 0.5、约 pH9.9 \pm 0.5、约 pH10.0 \pm 0.5、约 pH10.1 \pm 0.5、约 pH10.2 \pm 0.5、约 pH10.3 \pm 0.5、约 pH10.4 \pm 0.5、约 pH10.5 \pm 0.5、约 pH10.6 \pm 0.5、约 pH10.7 \pm 0.5、约 pH10.8 \pm 0.5、约 pH10.9 \pm 0.5、约 pH11.0 \pm 0.5、约 pH11.1 \pm 0.5、约 pH11.2 \pm 0.5、约 pH11.3 \pm 0.5、约 pH11.4 \pm 0.5、约 pH11.5 \pm 0.5、约 pH11.6 \pm 0.5、约 pH11.7 \pm 0.5、约 pH11.8 \pm 0.5、约 pH11.9 \pm 0.5、约 pH12.0 \pm 0.5、约 pH12.1 \pm 0.5、约 pH12.2 \pm 0.5、约 pH12.3 \pm 0.5、约 pH12.4 \pm 0.5、约 pH12.5 \pm 0.5、约 pH12.6 \pm 0.5、约 pH12.7 \pm 0.5、约 pH12.8 \pm 0.5、约 pH12.9 \pm 0.5、约 pH13.0 \pm 0.5、约 pH13.1 \pm 0.5、约 pH13.2 \pm 0.5、约 pH13.3 \pm 0.5、约 pH13.4 \pm 0.5、约 pH13.5 \pm 0.5、约 pH13.6 \pm 0.5、约 pH13.7 \pm 0.5、约 pH13.8 \pm 0.5 或者约

pH13.9±0.5。

[0087] 如前面提到，pH 的调节不需包括卡拉胶，并且卡拉胶的任何使用不需包括 pH 调节，尤其是 pH3.5 或者 3 以下。而且，任何将离子强度调节到 0.5 以下、或者 0.4 以下、或者 0.3 以下、或者 0.2 以下不需包括将 pH 调节到 3.5 或者 3 以下和 / 或使用卡拉胶。导致降低 pH 的 pH 调节可通过添加酸如硫酸来实现。

[0088] 沉淀剂，例如添加的盐、醇、水混溶性有机溶剂或者水溶性聚合物或者阳离子聚合物、和 / 或 pH 调节、和 / 或温度调节和 / 或温度提高的加入量或者 pH 调节量，要实现生物表面活性剂（例如疏水蛋白如疏水蛋白 II）的充分沉淀或者不溶解化，有利地以避免使用消泡剂。也就是说，不溶解化对于泡沫控制是有利的。换句话说，不溶解化是作为控制泡沫的手段来进行，而沉淀剂的量或者 pH 调节或者温度调节的量要能造成一定量的不溶解化以控制发泡。而且，有利的是，沉淀剂的量或者 pH 调节或者温度调节的量不会不利地影响细胞或者微生物生长和 / 或生物表面活性剂的产生。

[0089] 疏水蛋白的低溶解度的优选 pH 范围为约 3.5-4.5。对于其他表面活性剂，pH 范围可能大不相同，本领域技术人员可确定优选的 pH 范围。

[0090] 对于疏水蛋白，在 3.5-4.5 之间的 pH 范围内，硫酸铵或者硫酸钠的所需浓度是温度依赖性的。在约 30°C 至约 60°C 之间，优选的浓度为约 0.1% 至约 5%。在约 30°C 或者以下，硫酸钠的浓度有利地在 5% 以上，直至该盐的饱和极限，这对于硫酸钠而言为约 15%，对于硫酸铵而言为约 30-50%，根据温度而定。

[0091] 同样，对于其他生物表面活性剂，这些沉淀剂的温度和浓度都可能大不相同，要通过实验对每一者进行确定。

[0092] 在其他有利的实施例中，生物表面活性剂可以是鼠李糖脂、槐糖脂或者表面活性肽。有利地，鼠李糖脂可用氯化钠、氯化钙、硫酸钠和 / 或阳离子聚合物（如但不限于 C581）进行沉淀。有利地，槐糖脂可用氯化钠、氯化钙、硫酸钠和 / 或阳离子聚合物（如但不限于 C581）进行沉淀。有利地，表面活性肽可用氯化钠、氯化钙和 / 或硫酸钠进行沉淀。在另一个有利的实施例中，鼠李糖脂、槐糖脂和表面活性肽可在地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和 / 或里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 中扩增。

[0093] 疏水蛋白的无盐、浓缩溶液（达 80g/L 或者以上）可单独通过极高的温度进行沉淀以控制发泡。例如，80°C 的温度有效地破坏了在加热到该温度的过程中形成的任何泡沫，其中在该温度下 pH 在约 6-7 之间。

[0094] 疏水蛋白可用异丙醇在室温下进行沉淀。两到三体积的异丙醇当加到一体积的疏水蛋白水溶液时将使疏水蛋白沉淀。

[0095] 在另一个实施例中，物理条件是温度。

[0096] 在一个特别优选的实施例中，对培养液的温度进行调节。根据生物表面活性剂和浓度而定，在这里温度范围可很大，可在约 20°C 至约 90°C 的范围内。对于疏水蛋白，温度在 30°C 以上。对于鼠李糖脂、槐糖脂或者表面活性肽，温度可为约 20°C 至约 30°C。

[0097] 有几种方式测试泡沫控制的有效性。最容易的方式是检查表面泡沫，看是否有总体积显著减少的迹象。夹带的空气可用具有能记录液体密度随时间的变化的密度计的类似设备进行测试。

[0098] 在一个有利的实施例中,泡沫控制的有效性可通过受试溶液的膨胀度进行测量,膨胀度是一种计算值,涉及发泡溶液的体积减去起始体积再除以起始体积,以分数或者百分数报告。膨胀度为零意味着溶液不含泡沫。

[0099] 也可采用泡沫减少指数作为用于控制泡沫的處理的有效性的度量。它是未处理的溶液与经处理的溶液的膨胀度之比。

[0100] 在另一个实施例中,泡沫减少的有效性也可以是测量生物表面活性剂的绝对和相对不溶性。如果生物表面活性剂至少约 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 或者 95% 不可溶,则可认定泡沫减少有效。

[0101] 如果少于 0.1g/kg、0.5g/kg、1g/kg、2g/kg、3g/kg、4g/kg、5g/kg、6g/kg、7g/kg、8g/kg、9g/kg 或者 10g/kg 的生物表面活性剂(以 g 测量)存在于溶液(以 kg 测量)中,则可认定泡沫减少有效。

[0102] 在一个有利的实施例中,如果生物表面活性剂至少约 25% 不可溶和 / 或如果不超过 1g/kg 的生物表面活性剂存在于上清液中,则可认定泡沫减少有效。

[0103] 在一个有利的实施例中,如果生物表面活性剂是蛋白质,可通过测量沉淀物(不溶性)和上清液(可溶性)中该蛋白质的量来定量该蛋白质的不溶性。可通过定量沉淀物(不溶性)和上清液(可溶性)中的该蛋白质,来确定绝对和相对不溶性。定量蛋白质的方法是本领域技术人员知道的。

[0104] 定量沉淀物中的和溶液中的非蛋白质生物表面活性剂的方法是本领域技术人员公知的。

[0105] 多重光散射耦合垂直扫描是最广泛使用的监测产品的分散状态、从而鉴定和定量去稳定化现象的技术 [Roland 等人,《国际药物杂志》(International Journal of Pharmaceutics),263(2003)85-94 ;Lemarchand 等人,《药物研究》(Pharmaceutical Research),20-8(2003)1284-1292 ;Menguál 等人,《胶体与表面 A:物理化学和工程方面》(Colloids and Surfaces A:Physicochemical and Engineering Aspects),152(1999)111 - 123 ;Bru 等人,《颗粒尺寸测定与表征》(Particle sizing and characterisation),T.Provder 和 J.Texter 编辑,(2004)]。它对任何没有稀释的浓缩分散体适用,包括泡沫在内。当使光线穿过样品时,光线被气泡反向散射。反向散射强度与分散相的尺寸和体积分数成正比。因此,浓度的局部改变(排水、脱水收缩)和尺寸的全局改变(熟化、凝聚)被检测出和监测到。也可用电导率来监测生长培养基成分的浓度以及监测浊度。

[0106] 来自本发明的一个特别优点是,生产生物表面活性剂的工艺可以是连续的。例如,在本发明的实施中,生物反应器或者发酵罐可具有用于移除溶解的生物表面活性剂(例如疏水蛋白)的装置,例如阀门控制的流体管道,由该流体管道可从生物反应器或者发酵罐移除溶解的生物表面活性剂。阀门可与用于打开和关闭阀门的处理器或者微处理器相连而被操作。处理器或者微处理器可从传感器接收信号,如指示生物表面活性剂在溶液中的浓度或其变化或者溶液的浊度或者别的参数(如泡沫的量)的传感器,并且基于该传感器信号,处理器或者微处理器可指示阀门的打开或者关闭以移除溶解的生物表面活性剂;或者处理器或者微处理器可基于其他参数促使阀门打开或者关闭,所述其他参数例如添加或者施加沉淀剂和 / 或沉淀条件的开始时间,沉淀剂浓度的达到和 / 或沉淀条件的达到,包括在一

段时间内。生物反应器或者发酵罐还可包括用于添加沉淀剂或者流体或者其他条件以达到沉淀条件的装置,所述装置例如是阀门控制的流体管道,通过该流体管道可添加沉淀剂,例如盐(有利地在溶液中)、醇、或者能实现沉淀条件的流体(例如用于降低 pH 的酸),或者所述装置是加热器。阀门或者加热器可与用于打开和关闭阀门或者加热器的处理器或者微处理器相连。处理器或者微处理器可从传感器接收信号,如指示生物表面活性剂在溶液中的浓度或其变化或者别的参数(如泡沫)的传感器,并且基于该传感器信号,处理器或者微处理器可指示阀门或者加热器的打开或者关闭以添加沉淀剂或者流体或者其他造成溶解(solubilization)的手段;或者处理器或者微处理器可基于其他参数促使阀门打开或者关闭,所述其他参数例如移除溶解的生物表面活性剂的开始时间。此外,生物反应器或者发酵罐可包括用于添加生产生物表面活性剂的培养基和 / 或细胞或者微生物或者培养基的其他成分的装置。在移除溶解的生物表面活性剂时不可避免的是,一些生产生物表面活性剂的培养基和 / 或细胞或者微生物或者培养基的其他成分将随该溶解的表面活性剂一起失去,因此生物反应器或者发酵罐包括补充装置。这个补充装置可例如是阀门控制的流体连接装置,细胞或者生物体或者培养基或者培养基的其他成分从这个流体连接装置被输送到生物反应器或者发酵罐。阀门可与用于打开和关闭阀门的处理器或者微处理器连接。处理器或者微处理器可从传感器接收信号,如指示细胞或者微生物或者培养基的其他成分的浓度或其变化或者溶液的浊度或者别的参数的传感器,并且基于该传感器信号,处理器或者微处理器可指示阀门的打开或者关闭以进行补充;或者处理器或者微处理器可基于其他参数(如时间)促使阀门打开或者关闭。当细胞、微生物或者培养基或者培养基的成分随溶解的表面活性剂一起收获时,可将该细胞、微生物或者培养基或者培养基的成分与该溶解的生物表面活性剂分离,并例如通过补充装置循环回到发酵罐或者生物反应器。前面所述的传感器可以是生物反应器或者发酵罐中的或者与生物反应器或者发酵罐连接的一个或者多个传感器。

[0107] 这样,将用于生产和能生产生物表面活性剂(例如疏水蛋白如疏水蛋白 II、鼠李糖脂、槐糖脂或者表面活性肽)的培养基输送到生物反应器或者发酵罐,随着发泡发生或者正在发生或者在它显著发生之前或者在培养基在生物反应器或者发酵罐中一段时间后,添加或者施加沉淀剂或者沉淀条件,例如添加硫酸钠和 / 或添加醇和 / 或施加热量和 / 或调节 pH (有利地向下调节),由此泡沫得到控制,生物表面活性剂发生沉淀或者不溶解化。将不溶解化的生物表面活性剂从生物反应器或者发酵罐移除。并将培养基或其成分例如细胞或者微生物、营养物、或者培养基的其他成分输送到生物反应器或者发酵罐中,即培养基或其成分例如细胞或者微生物、营养物、或者培养基的其他成分得到补充。任选地,将随不溶解化的生物表面活性剂一起分离的培养基或其成分例如细胞或者微生物、营养物、或者培养基的其他成分循环回到生物反应器或者发酵罐。这样可以连续生产生物表面活性剂。

[0108] 该方法可在反应器例如生物反应器中进行。本文所用的“生物反应器”指任何制造的或者设计的能够支撑生物活性环境的装置或者系统。例如,生物反应器可包括其中进行一个或者多个化学和 / 或生物过程的容器。在一些实施例中,这些过程涉及生物体或者衍生自这种生物体的生化活性物质。在一些实施例中,生物体或者细胞可在生物反应器中生长。在一些实施例中,生物体可在使用过程中悬浮或者固定在反应器中。

[0109] 随这个方法使用的反应器可包括但不限于批式反应器、补料分批反应器、连续反

反应器如连续搅拌的罐式反应器、移动培养基、填充床、纤维床、膜反应器或者本领域已知的或者有待发现的任何其他系统。

[0110] 在一些实施例中,连续反应器的使用可以将物料连续泵送经过反应器。所泵送的物料的流动可以促进混合。在一些实施例中,可在反应器中使用静态混合器如挡板和 / 或机械搅拌,以促进各组分的混合。

[0111] 在一些实施例中,该方法可用生物反应器进行。细胞和培养基可通过输入部件提供到生物反应器,输入部件包括但不限于端口、输送管、管道、软管和 / 或本领域知道的其他任何输入装置。可使用多个输入部件来将细胞、培养基和 / 或营养物提供到反应器。

[0112] 可利用包括一个或者多个传感器以及一个或者多个控制器的控制系统来控制反应器内的条件。控制器可包括但不限于处理器、微处理器或者本领域知道的其他控制器。用来控制反应器条件的信息可从一个或者多个传感器和 / 或从使用者提供到控制器。

[0113] 传感器可用来测量反应器内的条件,包括但不限于温度、pH、组成、泡沫的存在、泡沫的量、压力、沉淀物的存在、沉淀物的量和 / 或本领域知道的其他任何相关测量项目。多个传感器可设置在反应器周围,以测定特定位置的条件。例如,在一些实施例中可将用来测定沉淀物的量或者存在的传感器设置为接近反应器的底部。各实施例可包括接近输入部件开口、罐内各种位置和 / 或任何目的位置的,用于测定泡沫的存在的传感器。可使用本领域知道的其他任何传感器。

[0114] 一些实施例可包括罐中的窗口或者开口以便观察。一些反应器可包括设置在反应器中的灯以便观察反应器内的条件。操作者可以能够观察罐中的条件并将数据输入到与一个或者多个控制器连接的用户界面中,以调节罐内的条件。

[0115] 例如,基于来自传感器和 / 或使用者输入部件的数据,可根据反应器中的需要打开或者关闭阀门。在一些实施例中,输入部件上的阀门可控制营养物、缓冲剂、培养基、生物体和 / 或其他组分的添加。

[0116] 一些实施例可包括让细胞在反应器的内室中生长。可将营养物、培养基和细胞以足以优化目的生物体的生长的比例加入到反应器。在一些实施例中,控制所添加的物料的组成以优化目的组分的生产。例如,目的组分可以是蛋白质或者化合物。

[0117] 在一些实施例中,随着目的组分的浓度提高,发泡可能开始出现。可利用窗口和 / 或传感器来检测反应器中的发泡。例如,可使用传感器或者窗口来确定是否出现发泡。一旦检测到发泡,控制器可指示添加沉淀剂到反应器。在一些实施例中,沉淀剂可让目的组分从溶液中沉淀出来。沉淀的组分可积累在反应器的底部。

[0118] 一些实施例可包括一个或者多个设置为接近反应器底部的传感器,以测定是否存在沉淀物和 / 或存在的沉淀物的量。这些传感器可与一个或者多个控制器通讯。控制器可使用这个输入来确定打开接近反应器底部的阀门,从而沉淀物排出反应器。

[0119] 在一些实施例中,可利用输入部件和输出部件上的泵来促进物料在输入部件和输出部件中的移动。

[0120] 如图 3 中所示,一些实施例可包括利用反应器 100 进行该方法。细胞、培养基和 / 或营养物可通过输入部件 102 提供到反应器 100。如图 3 中所示,输入部件 102 可包括用来控制生物体和 / 或培养基向容器的递送的阀门 104。在一些实施例中,可利用多个输入部件来将生物体和 / 或培养基递送到反应器的不同位置。在一些实施例中,如图 3 中所示,细胞

和培养基通过输入部件 102 提供。多个传感器 106 可设置在反应器 100 的各个位置。传感器 106 给控制器 108, 110 提供数据。控制器 108, 110 能够控制细胞、培养基、营养物、沉淀剂和 / 或其他组分的量。在一些实施例中, 控制器可作出调整以控制反应器、输入部件和 / 或输出部件中的条件。

[0121] 一些实施例可包括让细胞在反应器的内室中生长。随着目的组分的浓度提高, 发泡可能开始出现。在一些实施例中, 可利用窗口和 / 或传感器来检测反应器中的发泡。一旦检测到发泡, 可向反应器添加沉淀剂。在一些实施例中, 沉淀剂可让目的组分从溶液中沉淀出来。沉淀的组分可用传感器 106 检测。在一些实施例中, 反应器 100 中存在窗口 116 以让使用者观察反应器中的条件。

[0122] 控制器 108 连接到出口阀门 112。控制器 110 可指示阀门 112 打开以让沉淀物通过输出部件 114 离开罐。在一些实施例中, 使用者的输入可让控制器指示阀门 112 按需打开和 / 或关闭。

[0123] 如图 3 中所示, 可使用输入部件 118 向反应器提供营养物, 包括但不限于空气、氧气或者本领域知道的其他任何营养物。输入部件 118 可连接到递送装置 120 以将营养物提供到反应器 100。在一些实施例中, 递送装置可设置在反应器中的任何位置。一些实施例包括混合器 122 以促进反应器中各组分的混合。

[0124] 虽然已详细描述的本发明及其优点, 但应理解, 可在不偏离所附权利要求书中所限定的本发明精神和范围的前提下, 在这里作出各种变化、替换和变更。

[0125] 以下实例将进一步说明本发明, 这些实例仅为说明的目的给出, 并不旨在以任何方式限制本发明。

[0126] 实例

[0127] 实例 1: 澄清的未纯化的疏水蛋白溶液

[0128] 这里给出一种采用硫酸钠和 pH 调节来减少澄清的疏水蛋白溶液中的泡沫形成的方法。疏水蛋白溶液采用常规的生产方法获得。疏水蛋白溶液的浓度为 33g/kg。硫酸钠处理是通过加入无水硫酸钠至达到 2.5%w/w 的最终浓度, 伴以轻轻混合让其溶解来实现。使用 1% 硫酸将 pH 调节至 4.0。将溶液在 10°C 下混合 16 小时。将 2×5mL 的经 Na₂SO₄ 处理的浓缩物离心以除去液体部分。将每个沉淀物在水中重悬至与初始疏水蛋白浓缩物相同的体积。使用抹刀使沉淀物松开并重悬。制备 2×5mL 的未经处理的疏水蛋白浓缩物。将浓缩物之一和 Na₂SO₄ 处理的浓缩物之一进行振动混合。

[0129] 立即和在 4 小时后, 拍照片并记录每个管子的总体积。结果在表 1 中给出。经硫酸钠处理的溶液的可溶性疏水蛋白浓度为 1g/L。在加入硫酸钠后, 97% 的疏水蛋白不可溶。

[0130] 表 1

[0131]

处理	初始体积 (mL)	混合后体积保持 (mL)		膨胀度保持 (%)	
		0 小时后	4 小时后	0 小时后	4 小时后
无	5	14	14	180%	130%
经硫酸钠处理	5	6.5	6.5	30%	30%
	泡沫减少指数			6.0	6.0

[0132] 实例 2:纯化的疏水蛋白溶液

[0133] 这里给出一种使用热量来减少疏水蛋白溶液的泡沫形成的方法。疏水蛋白溶液的浓度为 130g/kg。当在 500mL Pyrex 中混合 320g 的疏水蛋白溶液时,泡沫充满瓶子的顶部空间(图 1 左边的照片)。当将另一个经类似混合的疏水蛋白溶液加热到 80℃时,沉淀物形成,泡沫崩溃(图 1 右边的照片)。结果在表 2 中给出。

[0134] 表 2

	处理	初始体积 (mL)	处理后 (mL)	膨胀度 (%)
[0135]	无	320	>500	> 56%
	经热处理	320	350	9%
		泡沫减少指数		>6.2

[0136] 实例 3:使用常规技术进行的发酵

[0137] 表 3 说明当使用常规方法将表达重组纤维素酶或者重组疏水蛋白的里氏木霉 (*Trichoderma reseei*) 进行发酵时发酵液的外观。发酵培养基和条件和收获程序相同。在两种情况中,在发酵结束时,所表达的目标分子完全可溶。表 3 显示了结果。

[0138] 表 3

[0139]

	纤维素酶	疏水蛋白
消泡剂消耗量	0.3g/kg 收获的发酵液	11.4g/kg 收获的发酵液
发酵过程中泡沫溢出	无	是
膨胀度	0%	240%

[0140] 实例 4:疏水蛋白发酵液泡沫减少

[0141] 这里给出使用硫酸钠来减少通过使用常规发酵和收获技术培养表达重组疏水蛋白的里氏木霉 (*Trichoderma reseei*) 而制备的发酵液中的泡沫,如图 3 和 4 中所示。

[0142] 将收获的发液用 2.5% 硫酸钠处理并用 10% 硫酸将 pH 调节至 3.9,在 28℃下进行 2 小时,然后在 10℃下保藏。经处理的发酵液具有 0.2g/kg 的可溶性疏水蛋白。

[0143] 实例 5:疏水蛋白发酵液泡沫减少

[0144] 以下描述使用硫酸铵来减少通过使用常规发酵和收获技术培养表达重组疏水蛋白的里氏木霉 (*Trichoderma reseei*) 而制备的发酵液中的泡沫。

[0145] 将收获的发液用 5% 硫酸铵在 22℃下处理。所得的发酵液在处理后的不含任何泡沫,含有针形的疏水蛋白晶体。

[0146] 实例 6:在疏水蛋白发酵收获过程中进行泡沫控制

[0147] 这里给出一种在常规发酵的表达重组疏水蛋白的里氏木霉 (*Trichoderma reseei*) 发酵液的收获过程中控制泡沫的方法。在收获过程中,常规的疏水蛋白发酵方法伴随的泡沫溢出问题加重。在收获过程中,必须使发酵罐的加压内容物回复到环境压力,这导致溶解的空气的释出。出乎意料的是,通过向发酵液添加沉淀剂,具体而言硫酸钠,可有效

地控制这一发泡倾向。发酵液中的疏水蛋白的沉淀使发泡减少到即使在降压过程中发泡也可控的地步。

[0148] 在发酵结束时(称为“发酵液的结束”),如下改变发酵罐操作参数:空气流由自底部输送到喷射器中改为输送到发酵罐的顶部空间中,压力保持在 20psig,温度保持在 28°C,搅拌保持在 160rpm。将 15%w/wNa₂SO₄、pH2.8 的硫酸钠储备溶液以 6 升/分钟的速度泵送到发酵罐中,直到所得的发酵液达到 Na₂SO₄=2.5% 的浓度。所得的发酵液的 pH 为 4(称为“Na₂SO₄/pH4 降压前发酵液”)。然后通过使空气流从 1600 升/分钟(LPM)降低到 100 升/分钟并同时使压力从 20psig 降低到 0psig(均是在 1 小时里线性降低),使发酵罐缓慢降压。该发酵液称为“Na₂SO₄/pH4 降压发酵液”。在降压后,将发酵液保持在 28°C 发酵罐中,在混合的同时监测 pH 并调节至 pH4,直到观察不到 pH 的变化。该发酵液称为“Na₂SO₄/pH4 收获发酵液”。

[0149] 表 4 显示在收获处理的各个阶段获取的发酵液样品的物理外观的结果。该处理使发酵液的密度从 0.605g/mL 提高到 1.042g/mL。使用起始重量计算膨胀度。经处理的发酵液可溶性疏水蛋白浓度为 0.2g/kg,比未经处理的发酵液低约 26 倍。

[0150] 表 4

[0151]

		#1	#2	#3	#4
	单位	发酵结束	Na ₂ SO ₄ pH 4 降压前	Na ₂ SO ₄ /pH 4 降压	Na ₂ SO ₄ /pH 4 收获
发酵液重量	g	99.80	99.80	100.00	100.00
发酵液体积	mL	165	120	102	102
密度	g/mL	0.605	0.832	0.980	0.980
膨胀度	%	65%	20%	2%	2%
泡沫减少指数			3.2	32.7	32.7

[0152] 实例 7:在疏水蛋白发酵过程中进行泡沫控制

[0153] 这里给出通过改变发酵培养基和条件对常规发酵技术作出修改,以使所表达的疏水蛋白在发酵仍在进行时变得在发酵液中不可溶,从而防止发酵过程中的发泡溢出。表 5 显示了所作的修改和结果。在所有作了修改的运行中,收获发酵液的上清液中的疏水蛋白浓度小于 0.5g/kg。

[0154] 表 5

[0155]

	常规			修改		
硫酸铵(g/kg)	4.3	4.3	4.3	25.0	25.0	25.0
发酵 pH	4.5	4.5	4.5	4.0	4.0	4.0
发酵过程中的泡沫溢出	是	是	是	无	无	无

[0156]

收获的发酵液消泡剂(g/kg)	10.4	> 5.9	> 11.4	4.4	5.5	5.4
-----------------	------	-------	--------	-----	-----	-----

[0157] 实例 8:在疏水蛋白发酵过程中消泡剂用量减少

[0158] 这里给出通过改变发酵培养基和条件对常规发酵技术作出修改,以使所表达的疏

水蛋白在发酵仍在进行时变得在发酵液中不可溶,从而减少为防止发泡溢出所需的消泡剂的量。

[0159] 在常规的发酵运行中测量到 33g/kg 的消泡剂,比上文“在疏水蛋白发酵过程中进行泡沫控制”中所显示的经修改的发酵法高 6.1 - 7.5 倍。

[0160] 实例 9 :疏水蛋白组成

[0161] 使用经修改的发酵法生产的疏水蛋白的组成在图 2 中示出。质量 7180 处的峰对应于全长疏水蛋白分子。

[0162] 实例 10 :鼠李糖脂澄清溶液中的泡沫减少

[0163] 澄清的鼠李糖脂(产品 JBR515 批号 110321, Jeneil Biosurfactant Co., LLC 公司惠赠, 该公司地址 :400N. Dekora Woods Blvd, Saukville, WI53080)溶液在进行了 pH 调节, 氯化钠、氯化钙、硫酸钠和阳离子聚合物 C581 (Cytec Industries 公司, 美国新泽西州伍德兰帕克 (Woodland Park, NJ07424))处理后, 对其中泡沫形成的减少进行测量。该鼠李糖脂溶液是通过将 0.21 克的 JBR515 加入到 93 克的去离子水并轻轻混合 5 分钟制备的。

[0164] 为测试泡沫形成的减少, 将 5 克的所制备溶液转移到透明的 15mL 锥形管, 加入处理化学品, 轻轻倒置混合该管, 直到化学品分散或者溶解。将经处理的溶液和未处理的溶液振摇 20 次, 立即用数码相机拍下样品的外观。对照未处理的样品, 通过目视检查评估样品的液体部分的外观。记录每个经振摇的溶液所占据的体积, 计算膨胀度和泡沫减少指数并在表 6 中显示。使用 HACH2100AN 浊度计 (Hach Company 公司, 美国科罗拉多州拉夫兰市 (Loveland)) 进行浊度测量, 并在表 6 中以 NTU (比浊法浊度单位) 值报告。

[0165]

表 6: 鼠李糖脂澄清溶液的处理条件及相应的膨胀度、泡沫减少指数和浊度

结果	处理									
	无	pH 2.75 (用硫酸)	无	1.0% NaCl	无	2.0%氯 化钙	无	4.8%硫 酸钠	无	1.0% C581
膨胀度	160%	36%	150%	104%	180%	42%	180%	30%	160%	120%
浊度(NTU)	0.468	10.8	0.468	1.89	0.468	16.9	0.468	3.02	0.468	11.3
泡沫减少指数	4.4		1.4		4.3		6.0		1.3	

[0166]

[0167] 实例 11 :槐糖脂澄清溶液中的泡沫减少

[0168] 澄清的槐糖脂(产品 SO_SOPHS 批号 10175A, SoliancE 公司, 地址 :Route de Bazancourt51110Pomacle, 法国)溶液在进行了 pH 调节, 氯化钠、氯化钙、硫酸钠和阳离子聚合物 C581 处理后, 对其中泡沫形成的减少进行测量。该槐糖脂溶液是通过将 0.28 克的 SO_SOPHS 加入到 122 克的去离子水, 并用 1N NaOH 将 pH 调节到 10.1 来制备。在进行 pH 调节的过程中, 将溶液轻轻混合。如“鼠李糖脂澄清溶液”一节中所描述, 测量泡沫形成的减少。记录每个经振摇的溶液所占据的体积, 计算膨胀度和泡沫减少指数并在表 7 中显示。使用 HACH2100AN 浊度计 (Hach Company 公司, 美国科罗拉多州拉夫兰市 (Loveland)) 进行浊度测量, 并在表 7 中以 NTU (比浊法浊度单位) 值报告。

[0169]

		处理								
结果	无	pH 2.5 (用硫酸)	无	3.9%氯 化钠	无	0.9%氯 化钙	无	4.2%硫 酸钠	无	1.0% C581
膨胀度	160%	2%	130%	40%	160%	10%	150%	90%	140%	22%
浊度 (NTU)	0.434	浑浊, 有 沉淀物	0.43	1.13	0.43	15.00	0.43	1.23	0.43	3.83
泡沫减少 指数	80.0		3.3		16.0		1.7		6.4	

[0170] 实例 12: 表面活性肽澄清溶液中的泡沫减少

[0171] 澄清的表面活性肽 (Part#S3523-50MG, 西格玛奥德里奇公 (SigmaAlrich), 地址: P. O. Box951524Dallas, TX75395-1524) 溶液在进行了 pH 调节, 氯化钠、氯化钙和硫酸钠处理后, 对其中泡沫形成的减少进行测量。表面活性肽储备溶液是通过将 2.03 克的去离子水直接加到装有表面活性肽的小瓶, 并用 1N NaOH 将 pH 调节到 6-7 之间 (用 pH 试纸条测量) 来制备的。通过将 8.9g 的去离子水加到 0.79g 的储备溶液, 将该储备溶液进一步稀释。如“鼠李糖脂澄清溶液”一节中所描述, 测量泡沫形成的减少。对照未处理的样品, 通过目视检查评估样品的液体部分的外观。表 8 显示所进行的每个处理的液体部分的膨胀度、泡沫减少指数和外观。

[0172]

		处理							
结果	无	pH 2.5 (用硫酸)	无	3.0% 氯化钠	无	0.9% 氯化钙	无	2.9% 硫酸钠	
膨胀度	50%	25%	55%	10%	63%	13%	50%	24%	
液体部分 外观	透明	浑浊, 有沉 淀物	透明	浑浊	透明	浑浊, 有沉 淀物	透明	浑浊	
泡沫减少 指数	2.0		5.5		5.0		2.1		

[0173] 表 9 显示了在室温下存放 0.5 小时的经处理溶液和未处理溶液的液体部分的膨胀度、泡沫减少指数和外观。

[0174]

表 9: 表面活性肽澄清溶液的处理条件和在室温下温育 0.5 小时后相应的膨胀度、泡沫减少指数和外观。

	处理				
结果	无	pH 2.5 (用硫酸)	3.0% 氯化钠	0.9% 氯化钙	2.9% 硫酸钠
膨胀度	40%	5%	2%	2%	6%
液体部分 外观	透明	浑浊, 有沉 淀物	浑浊, 有沉 淀物	极浑浊, 有沉 淀物	浑浊
泡沫减少 指数	-	8.0	16.0	16.0	7.2

[0175] 实例 13: 含有鼠李糖脂的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 发酵液中的泡沫减少

[0176] 含有鼠李糖脂(实例 10 中描述)的地衣芽孢杆菌发酵液在进行了 pH 调节, 氯化钠、氯化钙、硫酸钠和阳离子聚合物 C581 处理后, 对其中泡沫形成的减少进行测量。将 5.65 克的 JBR515 加到 100 克的用本领域公知技术生产的地衣芽孢杆菌发酵液, 并将溶液轻轻混合 5 分钟。该所得发酵液的溶液的 pH 为 6.52。如“鼠李糖脂澄清溶液”一节中所描述, 测量泡沫形成的减少。表 10 显示所进行的每个处理的膨胀度和泡沫减少指数。

[0177]

表 10: 含鼠李糖脂的地衣芽孢杆菌发酵液的处理条件及相应的膨胀度和泡沫减少指数。

	处理					
结果	无	pH 4.62 (用硫酸)	1.0% 氯化钠	2% 氯化钙	5% 硫酸钠	3% C581
膨胀度	90%	25%	80%	14%	58%	23%
泡沫减少 指数	-	3.6	1.1	6.4	1.6	4.0

[0178] 实例 14: 含鼠李糖脂的里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 发酵液中的鼠李糖脂

[0179] 含有鼠李糖脂(实例 10 中描述)的里氏木霉发酵液在从起始溶液进行了 pH 调节, 和 / 或进行了氯化钠、硫酸钠和阳离子聚合物 C581 处理后, 对其中泡沫形成的减少进行测量。将 6.53 克的 JBR515 加到 28 克的去离子水和 100 克的用本领域公知技术生产的里氏木霉发酵液, 将 pH 调节至 6.15, 并轻轻混合 5 分钟。如“鼠李糖脂澄清溶液”一节中所描述, 测量泡沫形成的减少。立即以及在 30 分钟(因此还存在着减少的发泡得到保持), 测量泡沫形成的减少。表 11 显示所进行的每个处理的膨胀度和泡沫减少指数。

[0180]

表 11: 含有鼠李糖脂的里氏木霉发酵液的处理条件及相应的膨胀度和泡沫减少指数

处理	pH	振摇后立即		振摇后 0.5 小时	
		膨胀度	泡沫减少指数	膨胀度	泡沫减少指数
无	6.15	42%	-	33%	-
硫酸	4.88	8%	5.3	42%	13.1
2.7%氯化钠	6.28	10%	4.2	3%	4.2
2.1%氯化钙	5.39	20%	2.1	10%	2.1
2.6%硫酸钠+硫酸	5.72	13%	3.2	20%	3.2
2.2% C581 和硫酸	4.26	10%	4.0	13%	4.0

[0181] 实例 15:含有鼠李糖脂的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 发酵液的泡沫减少

[0182] 含有鼠李糖脂(在“鼠李糖脂澄清溶液”一节中描述)的枯草芽孢杆菌发酵液在进行了 pH 调节和 / 或氯化钠、氯化钙、硫酸钠和阳离子聚合物 C581 处理后,对其中泡沫形成的减少进行测量。将 2.71 克的 JBR515 加到 40.1 克的用本领域公知技术生产的枯草芽孢杆菌发酵液,并将溶液轻轻混合 5 分钟。如“鼠李糖脂澄清溶液”一节中所描述测量泡沫形成的减少。表 12 显示所进行的每个处理的膨胀度和泡沫减少指数。

[0183]

表 12: 含有鼠李糖脂的枯草芽孢杆菌发酵液的处理条件及相应的膨胀度和泡沫减少指数

处理	pH	在振摇后立即		在振摇后 0.5 小时	
		膨胀度	泡沫减少指数	膨胀度	泡沫减少指数
无	7.4	30%	-	40%	-
硫酸	3.3	2%	22.4	2%	22.4
1.2%氯化钠和硫酸	4.66	2%	23.2	2%	23.2
1.8%氯化钙和硫酸	4.03	42%	0.9	6%	6.9
2.7%硫酸钠+硫酸	4.4	7%	5.6	5%	7.5
2.4% C581	7.4	13%	3.0	2%	26.3

[0184] 实例 16:含有槐糖脂的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 发酵液的泡沫减少

[0185] 使用 pH 调节、氯化钠、氯化钙、硫酸钠和阳离子聚合物 C581 处理,测量含有槐糖脂(在“槐糖脂澄清溶液”一节中描述)的地衣芽孢杆菌发酵液中泡沫形成的减少。将 7.63 克的 SO_SOPHS 加到 102.2 克的用本领域公知技术生产的地衣芽孢杆菌发酵液,并将溶液轻轻混合 5 分钟。将所得发酵液的 pH 调节至 7.23。如“鼠李糖脂澄清溶液”一节中所描述测量泡沫形成的减少。表 13 显示所进行的每个处理的膨胀度和泡沫减少指数。

[0186]

表 13: 含有槐糖脂的地衣芽孢杆菌发酵液的处理条件及相应的膨胀度和泡沫减少指数

结果	处理					
	无	pH 5.2 (用硫酸)	4.0% 氯化钠	1.0% 氯化钙	5.1% 硫酸钠	2.7% C581
膨胀度	36%	6%	8%	10%	24%	32%
泡沫减少 指数	-	6.2	4.5	3.6	1.5	1.1

[0187] 实例 17: 含有槐糖脂的里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 发酵液的泡沫减少

[0188] 使用 pH 调节和 / 或氯化钠、氯化钙、硫酸钠和阳离子聚合物 C581 处理, 测量含有槐糖脂(在“槐糖脂澄清溶液”一节中描述)的里氏木霉发酵液中泡沫形成的减少。将 5.5 克的 SO_SOPHS 加到 28 克的去离子水和 100.2 克的用本领域公知技术生产的里氏木霉发酵液, 并将溶液轻轻混合 5 分钟。如“鼠李糖脂澄清溶液”一节中所描述测量泡沫形成的减少。表 14 显示所进行的每个处理的膨胀度和泡沫减少指数 (ND - 未测定)。

[0189]

表 14: 含有槐糖脂的里氏木霉发酵液的处理条件及相应的膨胀度和泡沫减少指数

处理	pH	在振摇后立即		在振摇后 0.5 小时	
		膨胀度	泡沫减少指数	膨胀度	泡沫减少指数
无	7.12	42%	-	25%	-
硫酸	4.24	ND	ND	42%	ND
4.7%氯化钠	6.7	20%	2.1	ND	2.1
3.4%氯化钙	5.85	2%	25.0	20%	25.0
3.4%硫酸钠+硫酸	4.37	31%	1.4	2%	1.8
2.2% C581	6.8	30%	1.4	23%	1.9

[0190] 实例 18: 含有槐糖脂的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 发酵液的泡沫减少

[0191] 使用 pH 调节和 / 或氯化钠、氯化钙、硫酸钠和阳离子聚合物 C581 处理, 测量含有槐糖脂(在“槐糖脂澄清溶液”一节中描述)的枯草芽孢杆菌发酵液中泡沫形成的减少。将 2.61 克的 SO_SOPHS 加到 40.6 克的用本领域公知技术生产的枯草芽孢杆菌发酵液, 并将溶液轻轻混合 5 分钟。将所得发酵液的 pH 调节至 7.27。如“鼠李糖脂澄清溶液”一节中所描述测量泡沫形成的减少。表 15 显示所进行的每个处理的膨胀度和泡沫减少指数。

[0192]

表 15: 含有槐糖脂的枯草芽孢杆菌发酵液的处理条件及相应的膨胀度和泡沫减少指数

处理	pH	振摇后立即		振摇后 2.3 小时	
		膨胀度	泡沫减少指数	膨胀度	泡沫减少指数
无	7.3	22%	-	20%	-
硫酸	2.71	17%	1.2	2%	11.6
3.0%氯化钠和硫酸	5.4	19%	1.0	2%	10.4
1.2%氯化钙	6.05	10%	2.0	2%	10.0

[0193]

3.2%硫酸钠+硫酸	5.67	25%	0.8	6%	3.5
2.4% C581	6.44	9%	2.1	2%	13.2

[0194] 实例 19:含有表面活性肽的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 发酵液的泡沫减少

[0195] 含有表面活性肽(在“表面活性肽澄清溶液”一节中描述)的枯草芽孢杆菌发酵液在进行了氯化钠处理后,测量其中泡沫形成的减少。表面活性肽储备溶液是通过将 2.03 克的去离子水直接加到装有表面活性肽的小瓶,并用 1N NaOH 将 pH 调节到 6-7 之间(用 pH 试纸条测量)来制备的。通过将 0.71g 的该储备溶液加到 1.9g 的使用本领域公知技术制备的枯草芽孢杆菌发酵液,并将溶液轻轻混合 5 分钟,来将该储备溶液进一步稀释。将含有表面活性肽的发酵液振摇 20 次,并用数码相机拍下经振摇的样品的外观。将 0.022g 的 NaCl 加到相同的含有表面活性肽的发酵液,振摇 20 次并拍照。将另外的 0.046g 和 0.032g 的 NaCl 依序加到相同的发酵液,将发酵液振摇 20 次并拍照。表 16 显示在每个处理之后发酵液中的总 NaCl 浓度以及每个处理之后相应的膨胀度和泡沫减少指数。

处理	膨胀度	泡沫减少指数
无	22%	-
0.8% NaCl	3%	6.7
2.5% NaCl	1%	15.9
3.7% NaCl	0%	83.9

[0196] 实例 20:含有表面活性肽的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 发酵液的泡沫减少

[0198] 含有表面活性肽(在“表面活性肽澄清溶液”一节中描述)的地衣芽孢杆菌发酵液在进行了氯化钙处理后,测量其中泡沫形成的减少。表面活性肽储备溶液是通过将 2.03 克的去离子水直接加到装有表面活性肽的小瓶,并用 1N NaOH 将 pH 调节到 6-7 之间(用 pH 试纸条测量)来制备的。通过将 0.71g 的该储备溶液加到 1.9g 的使用本领域公知技术制备的地衣芽孢杆菌发酵液,并将溶液轻轻混合 5 分钟,来将该储备溶液进一步稀释。将含有表面活性肽的发酵液振摇 20 次,并用数码相机拍下经振摇的样品的外观。将 0.025g 的 CaCl_2 加到相同的含有表面活性肽的发酵液,振摇 20 次并拍照。将另外的 0.021g CaCl_2 加到相同的含有表面活性肽的发酵液,振摇 20 次并拍照。表 17 显示在每个处理之后发酵液中的总氯化钙浓度以及每个处理之后相应的膨胀度和泡沫减少指数。

处理	膨胀度	泡沫减少指数
无	65%	-
1.0%氯化钙	27%	2.4
1.9%氯化钙	10%	6.4

[0199] 图 4 显示在上述每个处理之后样品的外观。

[0200] 以下带编号的段落进一步描述本发明:

[0202] 1. 一种控制生物表面活性剂的发泡的方法, 该生物表面活性剂在以下情况下发泡: 在发酵培养基中通过宿主细胞生产该生物表面活性剂期间, 当宿主细胞胞外分泌该生物表面活性剂并且该生物表面活性剂可溶于发酵培养基时, 所述方法包括在通过宿主细胞生产该生物表面活性剂的同时使该生物表面活性剂不溶解化, 由此发泡受到控制, 因为该不溶解化的生物表面活性剂不会发泡。

[0203] 2. 段落 1 的方法, 其中所述生物表面活性剂包含疏水蛋白 II、鼠李糖脂、槐糖脂或者表面活性肽。

[0204] 3. 段落 2 的方法, 其中所述不溶解化包括向所述发酵培养基加入沉淀剂和 / 或降低所述发酵培养基的 pH 和 / 或提高所述发酵培养基的温度。

[0205] 4. 段落 3 的方法, 其中所述不溶解化包括向所述发酵培养基加入沉淀剂。

[0206] 5. 段落 4 的方法, 其中所述沉淀剂是盐、醇、水混溶性有机溶剂、水溶性聚合物或者阳离子聚合物。

[0207] 6. 段落 5 的方法, 其中所述沉淀剂是这样一种盐, 其包含卤离子、柠檬酸根、乙酸根、硝酸根、碳酸根; 硫酸根; 磷酸根; 氨基磺酸根; 膦酸根、氨基磺酸根或者亚硝酸盐作为其阴离子, 并包含铵、钙、铁、镁、锂、钾或者钠作为其阳离子。

[0208] 7. 段落 6 的方法, 其中所述盐包含硫酸盐或者氯盐。

[0209] 8. 段落 7 的方法, 其中所述氯盐是氯化钙或者氯化钠, 所述硫酸盐是硫酸铵或者硫酸钠。

[0210] 9. 段落 5 的方法, 其中所述沉淀剂是醇, 所述醇包含一元醇或者多元醇 C₁-C₆ 醇。

[0211] 10. 段落 5 的方法, 其中所述沉淀剂溶剂是酮。

[0212] 11. 段落 10 的方法, 其中所述酮是丙酮。

[0213] 12. 段落 5 的方法, 其中所述沉淀剂是聚乙二醇或者多糖。

[0214] 13. 段落 12 的方法, 其中所述多糖是葡聚糖。

[0215] 14. 段落 9 的方法, 其中所述沉淀剂包含甲醇、乙醇或者异丙醇。

[0216] 15. 段落 3 的方法, 其中所述不溶解化包括降低所述发酵培养基的 pH 和 / 或提高所述发酵培养基的温度。

[0217] 16. 段落 1-15 中任一个段落的方法, 其中泡沫减少指数大于 1, 和 / 或泡沫减少指数大于 2, 和 / 或泡沫减少指数大于 3; 和 / 或发酵培养基中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约 1g/kg; 和 / 或至少 25% 的所生产的生物表面活性剂被不溶解化; 和 / 或所述方法在不添加消泡剂的情况下进行; 和 / 或与不加以不溶解化而进行的方法相比, 所述方法用数量减低的消泡剂来进行; 和 / 或所述方法通过提高或者降低 pH 来进行, 和 / 或所述方法通过提高或者降低温度来进行。

[0218] 17. 段落 1-15 中任一个段落的方法, 其中所述方法是一种连续工艺, 包括: 向生物反应器输入发酵培养基, 加入沉淀剂或者施加沉淀条件, 收集不溶解化的生物表面活性剂, 并补充发酵培养基或其成分或者宿主细胞; 任选地, 将与不溶解化的生物表面活性剂一起被收集的任何发酵培养基或其成分或者宿主细胞进行再循环。

[0219] 18. 段落 16 的方法, 其中所述方法是一种连续工艺, 包括: 向生物反应器输入发酵培养基, 加入沉淀剂或者施加沉淀条件, 收集不溶解化的生物表面活性剂, 并补充发酵培养基或其成分或者宿主细胞; 任选地, 将与不溶解化的生物表面活性剂一起被收集的任何发

酵培养基或其成分或者宿主细胞进行再循环。

[0220] 19. 一种控制生物表面活性剂的发泡的方法, 该生物表面活性剂在以下情况下发泡: 在发酵培养基中通过宿主细胞生产该生物表面活性剂期间, 当宿主细胞胞外分泌该生物表面活性剂并且该生物表面活性剂可溶于发酵培养基时, 所述方法包括在通过宿主细胞生产该生物表面活性剂的同时使该生物表面活性剂不溶解化, 由此发泡受到控制, 因为该不溶解化的生物表面活性剂不会发泡, 其中泡沫降低指数大于 1, 和 / 或泡沫降低指数大于 2, 和 / 或泡沫降低指数大于 3; 和 / 或发酵培养基中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约 1g/kg; 和 / 或至少 25% 的所生产的生物表面活性剂被不溶解化; 和 / 或所述方法在不添加消泡剂的情况下进行; 和 / 或与不使该生物表面活性剂不溶解化而进行的方法相比, 所述方法用数量减低的消泡剂来进行; 和 / 或所述方法通过提高或者降低 pH 来进行, 和 / 或所述方法通过提高或者降低温度来进行。

[0221] 20. 段落 19 的方法, 其中所述生物表面活性剂包含疏水蛋白 II、鼠李糖脂、槐糖脂或者表面活性肽。

[0222] 21. 段落 19 或者 20 的方法, 其中所述不溶解化包括向所述发酵培养基加入沉淀剂或者基本上由向所述发酵培养基加入沉淀剂组成。

[0223] 22. 段落 21 的方法, 其中所述沉淀剂包含这样一种盐或者基本上由这样一种盐组成, 其包含卤离子、柠檬酸根、乙酸根、硝酸根、碳酸根; 硫酸根; 磷酸根; 氨基磺酸根; 膦酸根、氨基磺酸根或者亚硝酸盐作为其阴离子, 并包含铵、钙、铁、镁、锂、钾或者钠作为其阳离子。

[0224] 23. 段落 22 的方法, 其中所述盐包含硫酸盐或者基本上由硫酸盐组成。

[0225] 24. 段落 21 的方法, 其中所述沉淀剂包含醇或者基本上由醇组成。

[0226] 25. 一种控制在生产过程中会发泡的生物表面活性剂在溶液中的发泡的方法, 所述方法包括:

[0227] 在该生物表面活性剂的生产过程中在条件可能会引起泡沫形成的时候, 与此同时将该生物表面活性剂进行不溶解化, 由此发泡受到控制, 因为该不溶解化的生物表面活性剂不会发泡。

[0228] 26. 段落 25 的方法, 其中所述溶液包含发酵培养基, 其中所述生产包括在所述发酵培养基中通过宿主细胞表达所述生物表面活性剂, 并且其中所述宿主细胞胞外分泌所述生物表面活性剂且所述生物表面活性剂可溶于所述发酵培养基, 由此, 条件可能会引起泡沫形成。

[0229] 27. 段落 25 的方法, 其中所述生产包括真空过滤, 由此, 条件可能会引起泡沫形成。

[0230] 28. 段落 25 的方法, 其中所述生产包括收获, 由此, 条件可能会引起泡沫形成。

[0231] 29. 段落 25 的方法, 其中所述生产包括收集, 由此, 条件可能会引起泡沫形成。

[0232] 30. 段落 25 的方法, 其中所述生产包括压缩, 由此, 条件可能会引起泡沫形成。

[0233] 31. 段落 25 的方法, 其中所述生产包括放血, 由此, 条件可能会引起泡沫形成。

[0234] 32. 段落 25 的方法, 其中所述生产包括浸渍, 由此, 条件可能会引起泡沫形成。

[0235] 33. 段落 25 的方法, 其中所述生产包括均质, 由此, 条件可能会引起泡沫形成。

[0236] 34. 段落 25 的方法, 其中所述生产包括糖化, 由此, 条件可能会引起泡沫形成。

- [0237] 35. 段落 25 的方法,其中所述生产包括酿造,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0238] 36. 段落 25 的方法,其中所述生产包括回收,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0239] 37. 段落 25 的方法,其中所述生产包括固液分离,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0240] 38. 段落 25 的方法,其中所述生产包括离心,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0241] 39. 段落 25 的方法,其中所述生产包括细胞分离,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0242] 40. 段落 25 的方法,其中所述生产包括任何通气工艺,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0243] 41. 段落 25 的方法,其中所述生产包括将液体进行泵送,和 / 或将设备进行填充,和 / 或将设备进行排空,和 / 或将设备进行清洁,和 / 或将设备进行冲洗,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0244] 42. 段落 25 的方法,其中所述生物表面活性剂包含疏水蛋白 II、鼠李糖脂、槐糖脂或者表面活性肽。
- [0245] 43. 段落 25 的方法,其中将所述生物表面活性剂不溶解化包括:
- [0246] 向所述溶液加入沉淀剂;
- [0247] 降低或者提高所述溶液的 pH;和 / 或
- [0248] 降低或者提高所述溶液的温度。
- [0249] 44. 段落 25 的方法,其中将所述生物表面活性剂不溶解化包括:
- [0250] 向所述溶液加入沉淀剂。
- [0251] 45. 段落 43 或者 44 的方法,其中所述沉淀剂是盐、醇、水混溶性有机溶剂、或者水溶性聚合物或者阳离子聚合物。
- [0252] 46. 段落 43 或者 44 的方法,其中所述沉淀剂是这样一种盐,其包含卤离子、柠檬酸根、乙酸根、硝酸根、碳酸根;硫酸根;磷酸根;氨基磺酸根;膦酸根、氨基磺酸根或者亚硝酸盐作为其阴离子,并包含铵、钙、铁、镁、锂、钾或者钠作为其阳离子。
- [0253] 47. 段落 42 的方法,其中所述盐包含氯盐或者硫酸盐。
- [0254] 48. 段落 43 的方法,其中所述氯盐是氯化钙或者氯化钠,所述硫酸盐是硫酸铵或者硫酸钠。
- [0255] 49. 段落 42 的方法,其中所述沉淀剂是醇,所述醇包含一元醇或者多元醇 C_1-C_6 醇。
- [0256] 50. 段落 42 的方法,其中所述沉淀剂包含甲醇、乙醇或者异丙醇。
- [0257] 51. 段落 25 的方法,其中将所述生物表面活性剂不溶解化包括:
- [0258] 降低所述发酵培养基的 pH 和 / 或
- [0259] 提高所述发酵培养基的温度。
- [0260] 52. 段落 25-51 中任一个段落的方法,其中泡沫减少指数大于 1,和 / 或泡沫减少指数大于 2,和 / 或泡沫减少指数大于 3;
- [0261] 其中所述方法在不添加消泡剂的情况下进行;
- [0262] 其中与不加以不溶解化而进行的方法相比,所述方法用数量减低的消泡剂来进行。
- [0263] 53. 段落 25-51 中任一个段落的方法,其中所述方法是一种连续工艺,包括:

- [0264] 将发酵培养基输送到生物反应器；
- [0265] 加入沉淀剂或者施加沉淀条件；
- [0266] 收集不溶解化的生物表面活性剂；以及
- [0267] 补充溶液或其成分或者宿主细胞；任选地，将与不溶解化的生物表面活性剂一起被收集的任何溶液或其成分或者宿主细胞进行再循环。
- [0268] 54. 段落 25-51 中任一个段落的方法，其中所述溶液中的可溶性生物表面活性剂的浓度小于约 10g/kg。
- [0269] 55. 段落 25-51 中任一个段落的方法，其中所述溶液中的可溶性生物表面活性剂的浓度在约 0.1g/kg 至约 10g/kg 的范围内。
- [0270] 56. 段落 25-51 中任一个段落的方法，其中所述溶液中的可溶性生物表面活性剂的浓度在约 0.1g/kg 至约 5g/kg 的范围内。
- [0271] 57. 段落 25-51 中任一个段落的方法，其中所述溶液中的可溶性生物表面活性剂的浓度在约 0.1g/kg 至约 1.0g/kg 的范围内。
- [0272] 58. 段落 25-51 中任一个段落的方法，其中至少 50% 的所产生的生物表面活性剂被不溶解化。
- [0273] 59. 段落 25-51 中任一个段落的方法，其中至少 75% 的所产生的生物表面活性剂被不溶解化。
- [0274] 60. 段落 25-51 中任一个段落的方法，其中至少 90% 的所产生的生物表面活性剂被不溶解化。
- [0275] 61. 段落 25-51 中任一个段落的方法，其中至少 95% 的所产生的生物表面活性剂被不溶解化。
- [0276] 62. 段落 25-51 中任一个段落的方法，其中所述溶液中的可溶性生物表面活性剂的浓度在约 0.1g/kg 至约 10g/kg 的范围内，并且其中至少 50% 的所产生的生物表面活性剂被不溶解化。
- [0277] 63. 段落 25-51 中任一个段落的方法，其中所述溶液包含发酵培养基。
- [0278] 64. 一种控制在生产过程中会发泡的生物表面活性剂的发泡的方法，所述方法包括：
- [0279] 在通过宿主细胞在溶液中生产所述生物表面活性剂的同时，使所述生物表面活性剂不溶解化，
- [0280] 控制发泡，使得：
- [0281] 泡沫减少指数大于 1，和 / 或泡沫减少指数大于 2，和 / 或泡沫减少指数大于 3；和 / 或
- [0282] 所述溶液中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约 1g/kg；和 / 或
- [0283] 至少 25% 的所生产的生物表面活性剂被不溶解化；和 / 或
- [0284] 所述方法在不添加消泡剂的情况下进行；和 / 或
- [0285] 与不加以不溶解化而进行的方法相比，所述方法用数量减低的消泡剂来进行。
- [0286] 65. 段落 64 的方法，其中所述溶液是发酵培养基；
- [0287] 其中所述生产包括在所述发酵培养基中通过宿主细胞表达所述生物表面活性剂；

- [0288] 其中所述宿主细胞分泌所述生物表面活性剂 ;以及
- [0289] 其中所述生物表面活性剂可溶于所述发酵培养基中,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0290] 66. 段落 64 的方法,其中所述生产包括真空过滤,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0291] 67. 段落 64 的方法,其中所述生产包括收获,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0292] 68. 段落 64 的方法,其中所述生产包括收集,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0293] 69. 段落 64 的方法,其中所述生产包括压缩,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0294] 70. 段落 64 的方法,其中所述生产包括放血,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0295] 71. 段落 64 的方法,其中所述生产包括浸渍,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0296] 72. 段落 64 的方法,其中所述生产包括均质,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0297] 73. 段落 64 的方法,其中所述生产包括糖化,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0298] 74. 段落 64 的方法,其中所述生产包括酿造,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0299] 75. 段落 64 的方法,其中所述生产包括回收,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0300] 76. 段落 64 的方法,其中所述生产包括固液分离,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0301] 77. 段落 64 的方法,其中所述生产包括离心,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0302] 78. 段落 64 的方法,其中所述生产包括细胞分离,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0303] 79. 段落 64 的方法,其中所述生产包括任何通气工艺,由此,条件可能会引起泡沫形成。
- [0304] 80. 段落 64 或者 65 的方法,其中所述生物表面活性剂包含疏水蛋白 II、鼠李糖脂、槐糖脂或者表面活性肽。
- [0305] 81. 段落 64、64 或者 80 的方法,其中使所述生物表面活性剂不溶解化包括向所述溶液加入沉淀剂或者基本上由向所述溶液加入沉淀剂组成。
- [0306] 82. 段落 81 的方法,其中所述沉淀剂包含这样一种盐或者基本上由这样一种盐组成,其包含卤离子、柠檬酸根、乙酸根、硝酸根、碳酸根 ;硫酸根 ;磷酸根 ;氨基磺酸根 ;磷酸根、氨基磺酸根或者亚硝酸盐作为其阴离子,并包含铵、钙、铁、镁、锂、钾或者钠作为其阳离子。
- [0307] 83. 段落 82 的方法,其中所述盐包含硫酸盐或者基本上由硫酸盐组成。
- [0308] 84. 段落 81 的方法,其中所述沉淀剂包含醇或者基本上由醇组成。
- [0309] 85. 一种控制生物表面活性剂在生产过程中的发泡的方法,所述方法包括 :
- [0310] 在所述生物表面活性剂的生产过程中控制组合物的条件以减少泡沫,包括 :
- [0311] 调节所述组合物中的条件以减少发泡,使得 :
- [0312] 泡沫减少指数大于 1,和 / 或泡沫减少指数大于 2,和 / 或泡沫减少指数大于 3 ;
- [0313] 所述发酵培养基中的可溶性生物表面活性剂的浓度至多约 1g/kg ;和 / 或至少 25% 的所生产的生物表面活性剂被不溶解化 ;和 / 或
- [0314] 所述方法在不添加消泡剂的情况下进行 ;和 / 或与不加以不溶解化而进行的方法相比,所述方法用数量减低的消泡剂来进行。

- [0315] 86. 段落 85 的方法,其中调节所述组合物中的条件包括:
- [0316] 调节所述组合物的 pH;以及
- [0317] 调节所述组合物的温度。
- [0318] 87. 段落 85 的方法,包括:
- [0319] 在生产过程中监测所述组合物的物理条件,以确定何时出现发泡;以及
- [0320] 向所述组合物提供沉淀剂以减少发泡。
- [0321] 88. 段落 87 的方法,其中所述沉淀剂包含盐、醇、水混溶性有机溶剂、水溶性聚合物或者阳离子聚合物。
- [0322] 89. 段落 87 的方法,其中所述沉淀剂包含这样一种盐,其包含卤离子、柠檬酸根、乙酸根、硝酸根、碳酸根;硫酸根;磷酸根;氨基磺酸根;膦酸根、氨基磺酸根或者亚硝酸盐作为其阴离子,并包含铵、钙、铁、镁、锂、钾或者钠作为其阳离子。
- [0323] 90. 段落 89 的方法,其中所述盐包含氯盐或者硫酸盐。
- [0324] 91. 段落 90 的方法,其中所述氯盐是氯化钙或者氯化钠,所述硫酸盐是硫酸铵或者硫酸钠。
- [0325] 92. 段落 88 的方法,其中所述沉淀剂包含醇。
- [0326] 93. 段落 1、2、17-20、26、42、53、64、65 或者 80 中任一一个段落的方法,其中所述宿主细胞是里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)。
- [0327] 94. 段落 1、2、17-20、26、42、53、64、65 或者 80 中任一一个段落的方法,其中所述宿主细胞是枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。
- [0328] 95. 段落 1、2、17-20、26、42、53、64、65 或者 80 中任一一个段落的方法,其中所述宿主细胞是地衣芽孢杆菌 (*Bacilluslicheniformis*)。
- [0329] 96. 段落 1、2、17-20、26、42、53、64、65 或者 80 中任一一个段落的方法,其中所述宿主细胞是曲霉属 (*Aspergillus*) 的种。
- [0330] ***
- [0331] 已详细地描述了本发明的优选实施例,但应理解,由以上段落限定的本发明并不局限于以上描述所说明的具体细节,因为在不偏离本发明的精神或者范围的前提下可以对本发明作出许多显而易见的变型。



图 1

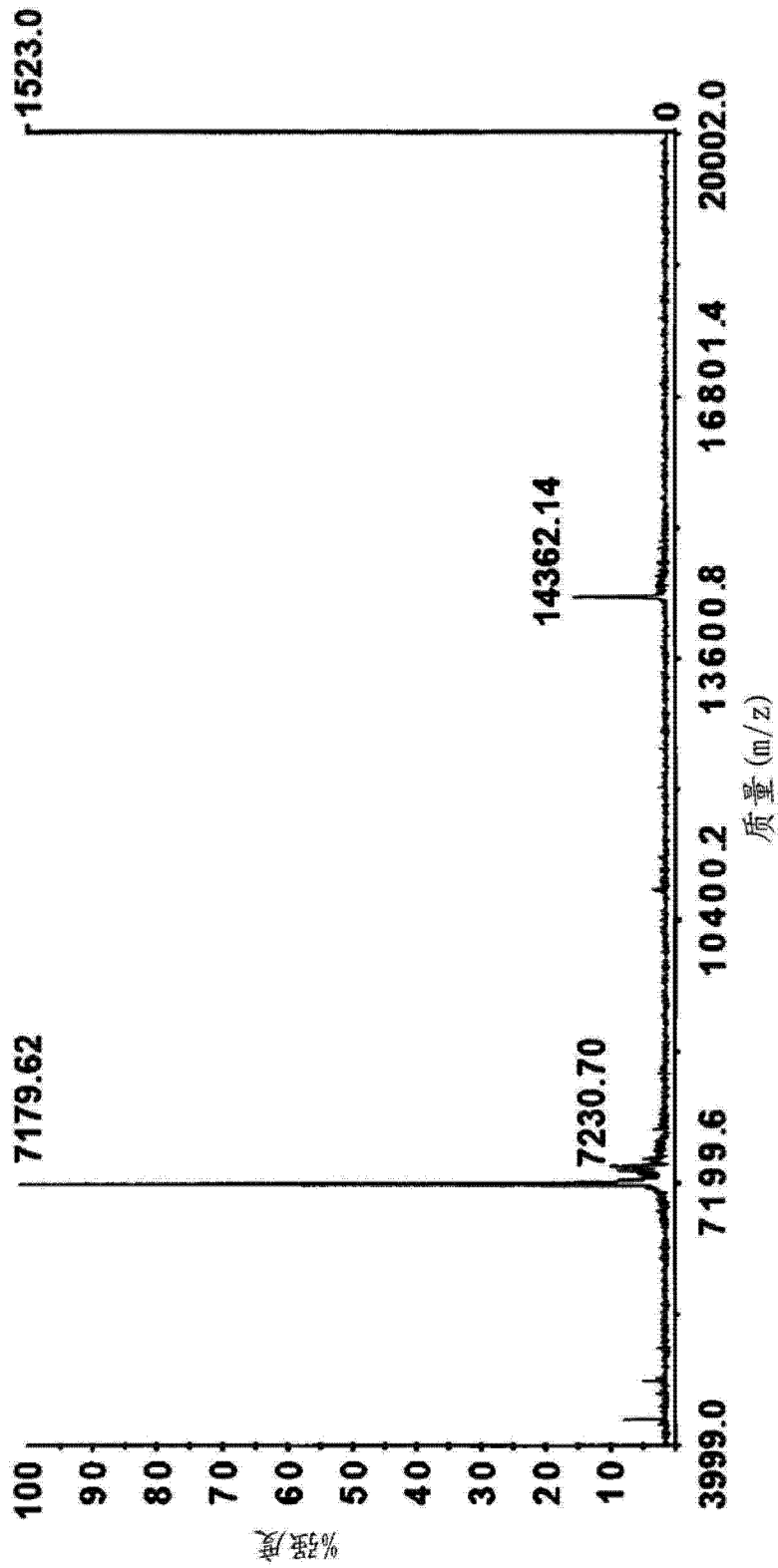


图 2

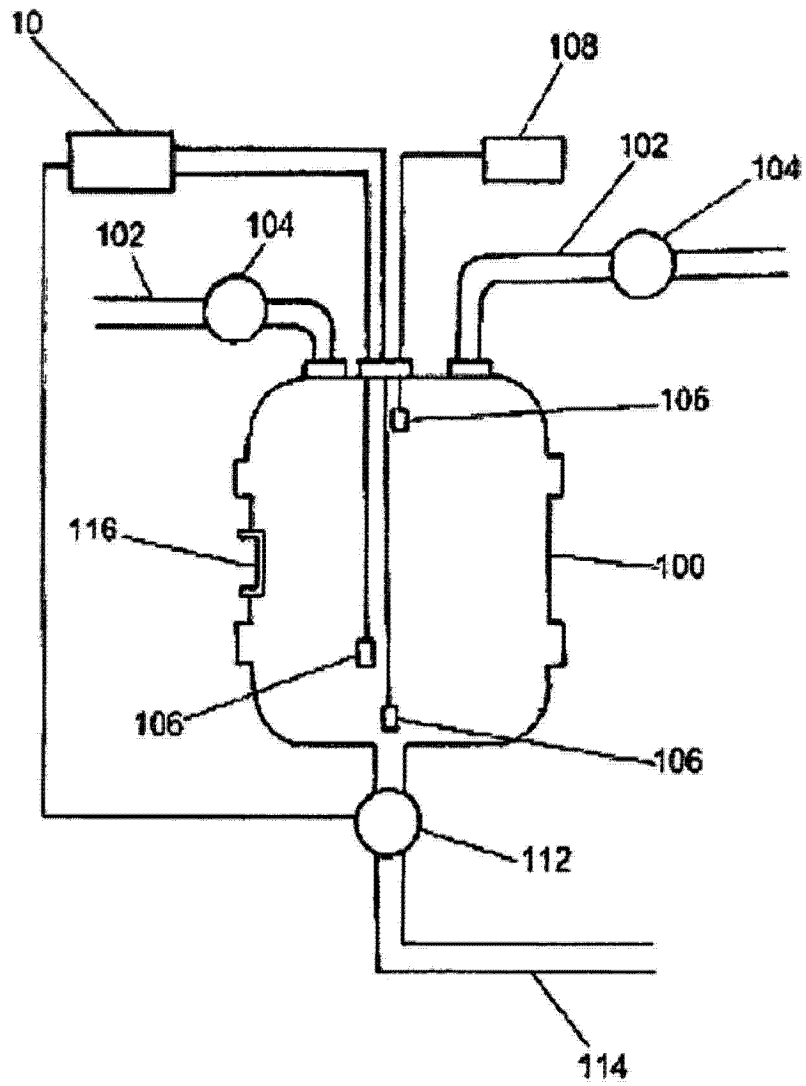


图 3A

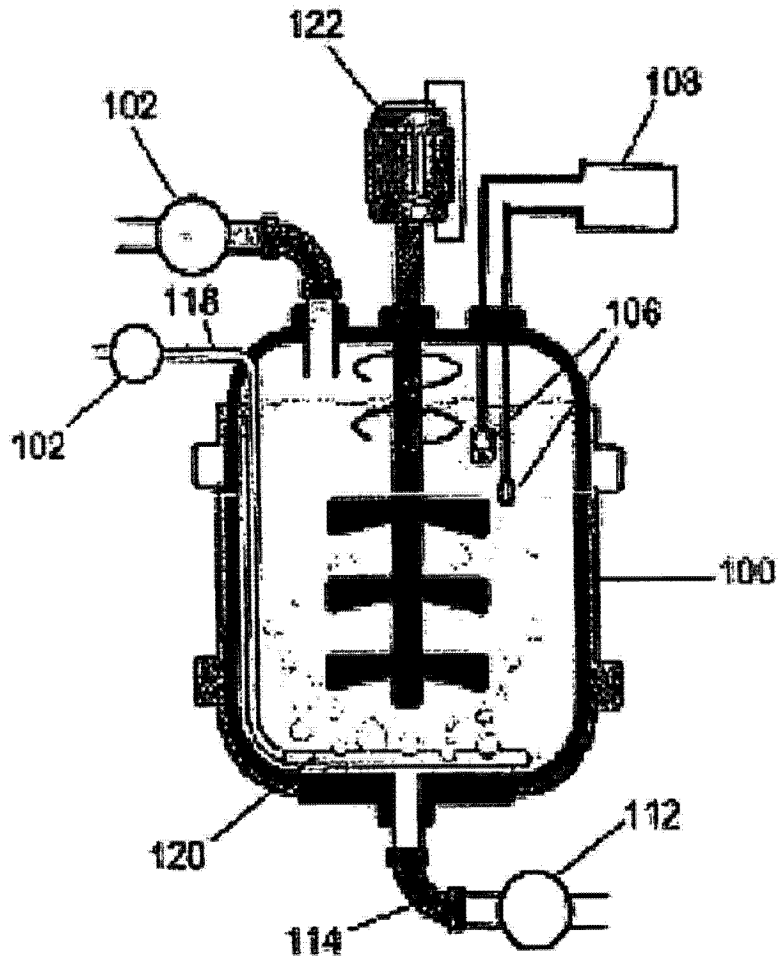


图 3B

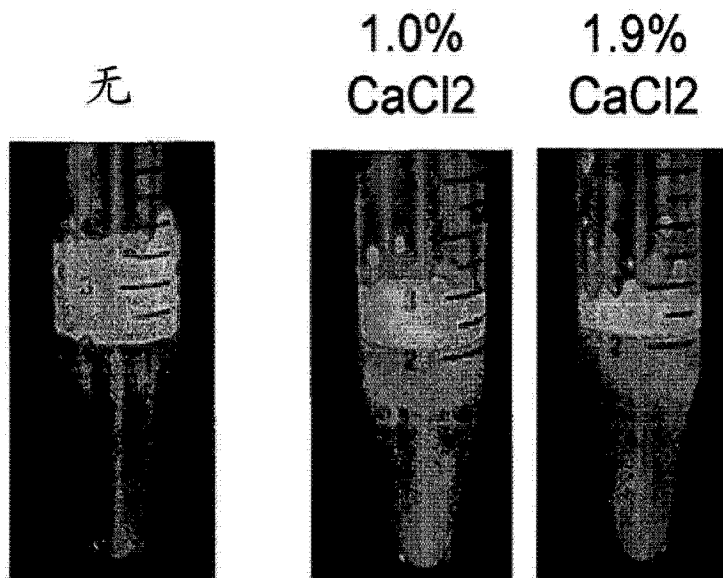


图 4