



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201303022 A1

(43) 公開日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 16 日

(21) 申請案號：101110866

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 28 日

(51) Int. Cl. :

C12P19/44 (2006.01)

C12P21/00 (2006.01)

C12M1/21 (2006.01)

C12Q3/00 (2006.01)

C12R1/10 (2006.01)

C12R1/125 (2006.01)

C12R1/66 (2006.01)

C12R1/885 (2006.01)

(30) 優先權：2011/03/29 美國

61/469,067

(71) 申請人：丹尼斯可美國公司 (美國) DANISCO US INC. (US)

美國

(72) 發明人：王明鳳 HENG, MENG H. (MY) ; 波多 麥克 BODO, MICHAEL (AT)

(74) 代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：4 共 92 頁

(54) 名稱

泡沫控制的方法

METHODS OF FOAM CONTROL

(57) 摘要

本發明係關於一種減少泡沫形成的方法以及使微生物中生物表面活性劑之表現(expression)最大化。該方法包含使生物表面活性劑從該微生物析出而使泡沫形成減少。





(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201303022 A1

(43) 公開日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 16 日

(21) 申請案號：101110866

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 28 日

(51) Int. Cl. : *C12P19/44 (2006.01)* *C12P21/00 (2006.01)*
 C12M1/21 (2006.01) *C12Q3/00 (2006.01)*
 C12R1/10 (2006.01) *C12R1/125 (2006.01)*
 C12R1/66 (2006.01) *C12R1/885 (2006.01)*

(30) 優先權：2011/03/29 美國 61/469,067

(71) 申請人：丹尼斯可美國公司 (美國) DANISCO US INC. (US)
 美國

(72) 發明人：王明鳳 HENG, MENG H. (MY) ; 波多 麥克 BODO, MICHAEL (AT)

(74) 代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：4 共 92 頁

(54) 名稱

泡沫控制的方法

METHODS OF FOAM CONTROL

(57) 摘要

本發明係關於一種減少泡沫形成的方法以及使微生物中生物表面活性劑之表現(expression)最大化。該方法包含使生物表面活性劑從該微生物析出而使泡沫形成減少。



六、發明說明：

【相關申請案】

本申請案主張 2011 年 3 月 29 日提出之美國臨時專利申請案 61/469,067 的優先權。參考在 2009 年 6 月 9 日提出之國際專利申請案 PCT/US2009/046783，其在 2009 年 12 月 17 日公開為 PCT 公開第 WO 2009/152176 號；且參考在 2010 年 8 月 10 日提出之 PCT/US2010/044964 號，其在 2011 年 2 月 17 日公開為 PCT 公開第 WO2011/019686 號。

前述申請案及在其中及在其審理期間所引證之所有文件（“申請案引證文件”）及在該等申請案引證文件中之所有文件及引證資料，及在本文中所引證及參考之所有文件（“本文中引證之文件”），及在本文中引證之文件中所引證或參考的所有文件，連同用於任何本文中所提及之產物的任何製造商之指示說明產品規格及產品說明書因此藉由引用方式而併入本文中，且可在本發明之實施時被利用。更具體地，所有參考的文件藉由引用方式而被併入至如同每一個別文件被特定且個別地指明以藉由引用方式而被併入的程度。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種控制生物表面活性劑發泡的方法，該表面活性劑係在以下狀況下發泡：在藉由發酵基質中之宿主細胞製造生物表面活性劑期間，當該宿主細胞將該生

物表面活性劑分泌出宿主細胞外且該生物表面活性劑係可溶於該發酵基質時。該方法包含或基本上由以下步驟組成：在藉由該宿主細胞製造該表面活性劑之同時，使該表面活性劑不可溶化。以此方式，發泡被控制，因為該不可溶化之生物表面活性劑不發泡。藉由此方法，泡沫降低指數大於 1，及/或泡沫降低指數大於 2，及/或泡沫降低指數大於 3。同樣地，另外地或可選擇地藉由本方法，在該發酵基質中可溶生物表面活性劑濃度是至多約 1 克/公斤。另外地或可選擇地；及/或至少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化。另外地或可選擇地，該方法係在不添加消泡劑之情況下進行；或提供能力以降低待使用之消泡劑的量而不使表面活性劑不可溶化，諸如降低 25%或 30%或 40%或 50%或 60%或 65%或 70%或 75%或 80%或 85%或 90%或 95%或更大量之待使用的消泡劑而不使用表面活性劑。並且另外地或可選擇地，雖然本發明可以分批或分批進料方式進行，本發明有利地係關於連續的方法。本發明也有利地係關於表面活性劑係疏水素（諸如疏水素 II）的方法。本發明也有利地係關於表面活性劑係為糖脂（諸如鼠李糖脂及槐糖脂 (sophorolipid)）或脂肽（諸如表面素 (surfactin)）。甚至另外地，本發明係關於進行本發明之方法（特別是本發明之連續方法）的裝置。另外地，本發明關於本發明之方法，其中生物表面活性劑之不可溶化係藉由添加沉澱劑（諸如鹽、醇、水可溶混之有機溶劑、水溶性聚合物、或陽離子型聚合物，或藉由改變 pH 或藉由

改變溫度引發。

【 先前技術 】

表面活性劑是用於多種工業之廣用化學品，且主要是化學合成的。藉由多種微生物所製造之表面活性劑正受到關注，因其獨特性質，諸如相較合成之對應物為高的生物分解性及低的毒性概況。然而，此種生物製造之表面活性劑的可用性及成本係部分由於缺乏有效率的製造方法而受限。

用於蛋白質或酵素之工業規模製造的有效率系統是藉由需氧浸沒（ aerobic submerged ）發酵，接著水基（ aqueous based ）回收步驟以離析所關注之產物。然而，泡沫控制對於達到該效率是重要的。

在化學工業中，發泡是一項嚴重問題，特別是對於生物化學方法而言。在多種物質（諸如表面活性劑及蛋白質）之製造中，特別是在包含空氣－液體界面附近之明顯切變力的方法中，諸如那些包含充氣、泵送、或攪拌的方法中，泡沫通常被產生而成為非想要之結果。需氧浸沒發酵依賴合適的充氣以供應微生物生長及製造所關注之產物所需的氧。空氣導入該發酵培養液以提供微生物所需之氧，產生泡沫。在發酵期間泡沫的存在對其效能有負面影響，包括發酵器作用體積或產率下降，及與“泡沫排出（ foam out ）”相關之污染危險，諸如在該液態發酵培養液以上之足夠高的泡沫塔（ foam column ）或泡沫頭（ foam head ）

的產生以致其經由通氣或管線排出該發酵槽。

普遍使用添加劑（諸如消泡劑或除泡劑）以在發酵期間減少泡沫形成。消泡劑視需要地在回收步驟期間被添加以控制泡沫。一些回收方法（特別是基於薄膜之分離方法）因消泡劑之存在而受負面影響。依照該等蛋白質或酵素之最終應用，在其製造期間所利用之消泡劑可以或可以不需要被移除。

然而，由於泡沫控制之化學方法可能引起的問題（亦即污染、質量傳輸之降低），該等方法並不總是想要的，特別是在極重視產物品質之食品、飼料及醫藥工業中。因為消泡劑經常是疏水性的，彼難以消毒而可能在食品及醫藥工業中造成問題。此外，在這些工業中的法規要求限制可用於消泡劑及除泡劑中的化學品。

可惜，一般用於工業規模之蛋白質及酵素製造的浸沒需氧發酵及回收方法不能有效率地應用至生物表面活性劑（亦即生物產生之表面活性劑分子）的製造。這些分子之表面活性在該培養狀況下，與不表現該表面活性劑分子之該微生物所引起者相比，將在該發酵培養液中引起更多的泡沫。

消泡劑之添加對該問題而言並非經常是令人滿意的解答。不僅需要大量消泡劑以防止過量泡沫形成，通常也需要移除該消泡劑以使該表面活性劑在所要之應用中能如所企圖般的起作用。在一些情況中，即使大量消泡劑之添加及在發酵器體積之相對低作用百分比下的操作對於控制發

泡並非有效的。由於使用消泡劑，與過度發泡及不受控制之發泡相關的問題持續存在下游回收步驟中。因為表面活性劑被要求要有去污力，故在製造期間所添加之消泡劑通常必須移除。

在本申請案中之任何文件的引證及確認並非承認此種文件對本發明而言係如先前技藝般可獲得。

【發明內容】

本發明部分是基於申請人之令人驚訝的發現：添加沉澱劑至發酵培養液導致經生物表現之表面活性劑的沉澱以及發泡降低，其中該泡沫並不再現。

本發明描述在可包含一或多種由微生物所表現之表面活性劑的水溶液製造中關於泡沫控制之方法及/或用途。這可以藉由合適調節該溶液以使形成泡沫之表面活性劑變為不可溶而達成。該合適之調節可包括沉澱、結晶及/或任何使表面活性劑不可溶或降低微膠（micelle）粒臨界濃度的操作。

本發明包含一種控制生物表面活性劑發泡的方法及/或用途，該表面活性劑係在以下狀況下發泡：在藉由發酵基質中之宿主細胞製造生物表面活性劑期間，當該宿主細胞將正發泡之生物表面活性劑分泌出宿主細胞外且該生物表面活性劑係可溶於該發酵基質時；該方法及/或用途包含在藉由該宿主細胞製造該表面活性劑之同時，使該表面活性劑不可溶化，藉此控制發泡，因為該經不可溶化的生

物表面活性劑不發泡。

本發明也包含一種控制生物表面活性劑發泡的方法及/或用途，該表面活性劑係在以下狀況下發泡：在藉由發酵基質中之宿主細胞製造生物表面活性劑期間，當該宿主細胞將該生物表面活性劑分泌出宿主細胞外且該生物表面活性劑係可溶於該發酵基質時；該方法及/或用途包含在藉由該宿主細胞製造該表面活性劑之同時，使該表面活性劑不可溶化，藉此控制發泡，因為該經不可溶化的生物表面活性劑不發泡，其中該泡沫減少指數大於 1，及/或該泡沫減少指數大於 2，及/或該泡沫減少指數大於 3，及/或在該發酵基質中可溶生物表面活性劑的濃度最多約 1 克/公斤；及/或至少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化；及/或該方法係在不添加消泡劑情況下進行；及/或與在無使該生物表面活性劑不可溶化的情況下所進行之方法相比，該方法在減少量之消泡劑情況下進行。

本發明提供一種用於降低或消除由該生物表面活性劑（當其係在溶液中）所造成之泡沫形成的方法及/或用途，其係藉由合適選擇處理條件以降低生物表面活性劑之可溶濃度。使該生物表面活性劑溶解度降低之處理條件依照該生物表面活性劑本質而定。此種處理條件可包含物理條件（諸如溫度及/或壓力）之合適選擇。此種處理條件可另外包含該包含生物表面活性劑之液態基質的化學組成。此種組成之可能的選擇是很多的且對精於生物處理技藝之人士是習知的。調節溶解度狀況之化學方法包含使用多種

使該生物表面活性劑不可溶化之添加劑，包括 pH 緩衝化學品、無機或有機酸或鹼之鹽、醇類、有機溶劑、聚合物、多元醇、蛋白質、吸附劑、核酸、脂質。此種溶解度改良用化學品之列述並非意圖要用於排他或限制。

本發明也包括一種製備生物表面活性劑之方法及/或用途，其包含本文中所提供之泡沫控制或其各面向。

本發明因此關於例如藉由微生物所表現之表面活性劑或生物表面活性劑之原位不可溶化或與表現同時之原位不可溶化，其包括用於製備生物表面活性劑之分批方法或連續方法，該等方法包含該生物表面活性劑之原位不可溶化或與表現同時之原位不可溶化。該不可溶化可以藉由沉澱、結晶[由於 EP 1320595 Yoneda 等人； Syldatk 等人/1984； Desai 等人/1993]及/或任何其他使該表面活性劑不可溶或使該嚴格微膠粒濃度降低之操作。有利地，該不可溶化包含添加沉澱劑（諸如鹽、醇、與水溶混之有機溶劑、水溶性聚合物或陽離子型聚合物（諸如但不限於 C581））或基本上由該添加步驟組成，或該不可溶化包含或由 pH 調節（諸如減低 pH）組成。該不可溶化可包含或基本上由調節溫度及/或壓力組成，例如提高溫度或加熱。在特別有利之具體例中，在製備該生物表面活性劑時消泡劑之使用被減少或全部避免。在有利具體例中，該生物表面活性劑（例如疏水素，諸如疏水素 II）包含在溶液，其濃度少於約 0.1 克/公斤。

本發明也關於一種控制在製造期間發泡之溶液中生物

表面活性劑發泡的方法及/或用途，其包含在溶液中藉由該宿主細胞製造該生物表面活性劑的同時，在可引起泡沫形成之條件時，使該生物表面活性劑不可溶化，藉此發泡受控制，因為該經不可溶化之生物表面活性劑不發泡。

在另一具體例中，本發明也關於一種控制在製造期間發泡之生物表面活性劑發泡的方法及/或用途，其可包含在溶液中藉由該宿主細胞製造生物表面活性劑的同時，使該生物表面活性劑不可溶化，控制發泡以致：該泡沫減少指數大於 1，及/或該泡沫減少指數大於 2，及/或該泡沫減少指數大於 3，及/或在該溶液中可溶生物表面活性劑的濃度最多約 1 克/公斤；及/或至少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化；及/或該方法係在不添加消泡劑情況下進行；及/或與在無使不可溶化的情況下所進行之方法相比，該方法在減少量之消泡劑情況下進行。

在另一具體例中，本發明係關於一種在製造期間控制生物表面活性劑發泡之方法及/或用途，其可包含在控制生物表面活性劑製造期間之組成物狀況以減少泡沫，其可包含調節該組成物中之狀況以減少發泡，以致該泡沫減少指數大於 1，及/或該泡沫減少指數大於 2，及/或該泡沫減少指數大於 3，及/或在該發酵基質中可溶生物表面活性劑的濃度最多約 1 克/公斤；及/或至少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化；及/或該方法係在不添加消泡劑情況下進行；及/或與在無使不可溶化的情況下所進行之方法相比，該方法在減少量之消泡劑情況下進行；及/

或該方法係在約 4.0 之 pH 下進行。

本發明之益處適用於生物表面活性劑之所有處理階段，包括發酵、回收、調配、儲存、處置及運輸。特別地，該等益處特別適用於包含充氣之生物表面活性劑處理階段，諸如但不限於氣體之混合、泵送及釋出。

本發明另外包含如在本文中所述之裝置，包括在如本文中所述之方法或程序或其各面向之實施中所用者。

因此，本發明之目的是要使任何先前已知之產物、該產物之製造方法、或該產物之使用方法不包含在本發明中，以致申請人保留權利且藉此表示放棄任何先前已知之產物、程序或方法。另外注意：本發明並不意圖包含任何不符合 USPTO (35 U.S.C. §112 第一段) 或 EPO (EPC 之第 83 條款) 之書面說明及實現要求的任何產物、程序、或產物製造或產物之使用方法，以致申請人保留權利且藉此表示放棄任何先前描述之產物、該產物之製造方法、或該產物之使用方法。

注意：在本揭示中及特別在申請專利範圍及/或段落中，諸如“包含”、“被包含”、“其包含”及類似用詞可具有在美國專利法中所賦予之屬性的意義；例如彼可指“包括”、“被包括”、“其包括”及類似用詞；諸如“其基本上由…組成”及“基本上由…組成”之用語具有在美國專利法中對其所描述之意義，例如彼使各元素能不用明確地列舉，但排除在先前技藝中所發現或影響本發明之基本或新穎特性的元素。

特別提及“其基本上由…組成”及“基本上由…組成”之使用以在技藝可得之任何程度上區分美國專利公開第 20100151525 號及與其對等之文件，例如經由標的及/或專利法（例如藉由成爲或主張與 EP08171868 相同家族之優先權）。例如，在本發明中，紅藻膠之使用不需伴隨降低 pH，特別是例如低於 3.0 或 3.5，及/或調節離子強度，且 pH 之降低不需伴隨紅藻膠之使用及/或調節離子強度，且離子強度之任何調節不需伴隨降低 pH 及/或紅藻膠之使用。因此，“其基本上由…組成”及“基本上由…組成”排除先前技藝之元素，諸如添加紅藻膠且使 pH 低於 3.5 或 3，或添加紅藻膠，使 pH 低於 3.5 或 3 且調節離子強度。

也提及：某些用詞也特別用來排除在任何可能爲先前技藝之文件中的元素。例如，“生物表面活性劑”是特別用來排除 PCT 公開第 WO 2009/152176 號之酵素標的。同樣地，在沒有或不含經添加之消泡劑狀況下實施之表現方式是要區分多個使消泡劑之存在或添加能可行之文件，例如美國專利公開第 20100291630 號及與其對等之任何文件。

這些及其他具體例被揭示且由以下詳細描述所顯明且包含在以下詳細描述中。

本發明之詳細說明

除非另外定義，否則在本文中所用之所有技術及科學用詞與一般精於此技藝之人士普遍了解的有相同意義。爲澄清之故，定義以下簡稱及/或用詞。

如本文中所用的，“生物表面活性劑”或“生物製造之表面活性劑”係關於一種引起發泡之物質。生物表面活性劑或生物製造之表面活性劑可減少表面張力，諸如在水及疏水性液體間或水及空氣間之界面張力，且其可從生物系統製造或獲得。生物表面活性劑或生物製造之表面活性劑可以是蛋白質、糖脂、脂肽、脂蛋白、磷脂、中性脂質、或脂肪酸。生物表面活性劑包括疏水素。生物表面活性劑包括脂肽及脂蛋白，諸如表面素、肽-脂質、斯拉威素（serrawettin）、黏液菌素（viscosin）、枯草溶菌素、短桿菌素、多黏菌素。生物表面活性劑包括糖脂，諸如鼠李糖脂、槐糖脂、海藻脂（trehalolipids）及纖維生脂（cellobiolipids）。生物表面活性劑包括聚合物，諸如因目森（emulsan）、拜耳迪斯波森（biodispersan）、甘露聚糖-脂質-蛋白質、立波森（liposan）、碳水化合物-蛋白質-脂質、蛋白質 PA。生物表面活性劑包括顆粒，諸如泡囊、細毛及全細胞。生物表面活性劑包括醣苷，諸如皂角苷。生物表面活性劑包括纖維蛋白質，諸如絲蛋白。生物表面活性劑可以是天然生成或彼可以是在自然界中未發現之經誘變處理或基因處理變異型。這包括已處理成較低溶解度之生物表面活性劑的變異型以依照本發明藉由降低生物表面活性劑之溶解度而幫助控制發泡。生物表面活性劑包括但不限於如本文中所述之相關之生物表面活性劑、生物衍生的表面活性劑、變異的生物表面活性劑及同源的生物表面活性劑。

如本文中所用的，“生物系統”包含或衍生自活的有機體，諸如微生物、植物、真菌、昆蟲、脊椎動物、或藉由合成生物學所產生之生命形式。該活的有機體可以是在自然界中未發現之變異型，其係藉由典型的繁殖、複製選擇、突變誘發、及類似方法以產生基因多元性而獲得，或彼可以是藉由 DNA 重組技術所得之經基因工程處理的有機體。該活的有機體可整個被使用或彼可以是各成分之來源，諸如組織培養物、植物栽培品種、懸浮的細胞培養物、黏著的細胞培養物、或不含細胞之製劑。

該生物系統可以或可以不含有活的細胞，當其析出該生物表面活性劑時。該生物系統可從天然來源發現且收集，彼可以被種植、栽培或彼可以在工業條件下被種植。該生物系統可以從所供應之先質或營養物合成該生物表面活性劑或彼可由其環境增加該生物表面活性劑。

如本文中所用的，“產生”係關於用於化學及生物產物之產生的製造方法，其包括但不限於收穫（harvest）、收集、緊壓、放血、浸解、勻化、壓碎、釀造、發酵、回收、固液分離、細胞分離、離心、過濾（諸如真空過濾）、調配、儲存或運送。

如本文中所用的，“處理條件”係指在本發明方法中所牽涉之溶劑及/或物理參數（諸如但不限於溫度、壓力、混合或 pH）之選擇。

如本文中所用的，“溶劑”或”溶液”係指一種液體，其可含有不可溶生物表面活性劑以外之懸浮粒子，諸如但不

限於主體部分 (body part) 、 植物碎片、活或死的細胞 [因爲 EP1320595 Yoneda 等人 ; Syldatk 等人 /1984 ; Desai 等人 /1993] 。

如本文中所用的，“可溶的”係關於一種物質，其被溶解於溶劑或溶液中。

如本文中所用的，“泡沫”係關於一種物質，其藉由在液體中、在凝膠中或在半固體中截留氣泡而形成。

如本文中所用的，“膨脹率”是一種經計算之值，其係關於經發泡之溶液體積減去起初體積，再除以該起初體積，以分率或百分比形式報告。零膨脹率意指該溶液不含泡沫。接近零之數目意指該溶液具有極少泡沫。若起初樣品已含有泡沫，則在計算時以以起初重量代替起初體積。

如本文中所用的，“泡沫減少指數”或“泡沫控制指數”或“泡沫消除指數”是一種用於控制泡沫之處理有效性的量度。彼是未經處理之溶液對經處理之溶液的比率。約等於 1 之泡沫減少指數意指未經處理及經處理之生物表面活性劑溶液具有相同膨脹率，換言之，該處理不具改良性。任何大於 1 之數目意指有泡沫減少，該處理具改良性。

如本文中所用的，“泡沫控制”、“泡沫減少”或“泡沫消除”係關於藉由抑制或防止或摧毀或破壞泡沫以減少溶液中之泡沫的作用。

如本文中所用的，“多肽”或“蛋白質”二用詞可交換地被使用以指明包含藉由肽鍵結連接之胺基酸殘基的任何長度的聚合物。在本文中使用一般之用於胺基酸殘基的單一

字母或三字母編碼。該聚合物可以是直鏈型或支鏈型的，彼可包含經改質之胺基酸聚合物，其可被非胺基酸所阻斷。該等用詞也包含已天然地或藉由介入（intervention）改質的胺基酸聚合物；例如二硫化物鍵結形成、糖化、脂質化、乙醯化、磷酸化或任何其他操作或改質，諸如與標示成份接合。該定義也包括例如含有一或多個胺基酸類似物（包括例如非天然胺基酸、D-胺基酸等）之多肽以及在此技藝中已知的其他改質物。

如本文中所用的，“培養液”是一種包含所關注之生物表面活性劑及其他可溶或不可溶成份的液體。此種成分包括其他蛋白質、非蛋白質的雜質（諸如細胞或細胞碎片、核酸、多醣、脂質）、化學品（諸如消泡劑、絮凝劑、鹽類、糖類、維生素、生長因子、沉澱劑）、及類似者。“培養液”也可稱為“蛋白質溶液”、“液態基質”、“透析過濾之培養液”、“澄清化之培養液”、“濃縮液”、“調節之基質”、“發酵培養液”、“溶解的培養液”、“溶解產物”、“細胞培養液”、或簡稱“培養液”。該細胞若存在則可以是細菌性、真菌性、植物性、動物性、人類的、昆蟲性、合成性等。

如本文中所用的，“回收”一詞是指一種方法，其中包含對生物表面活性劑及一或多種無用成分之液態培養物進行各種處理以將該表面活性劑由至少一些無用成分（諸如水、細胞及細胞碎片、其他蛋白質、胺基酸、多醣類、糖類、多元醇類、無機或有機鹽類、酸類及鹼類、及粒狀材

料) 分離出。

如本文中所述的，“生物表面活性劑產物”是指適合提供給最終使用者（諸如消費者）之生物表面活性劑製劑。生物表面活性劑產物可包括細胞、細胞碎片、基質成份、調和賦形劑（諸如緩衝劑、鹽類、防腐劑、還原劑、糖類、多元醇類、表面活性劑及類似者），這些被添加或保留以延長該表面活性劑之功能保存期或促進最終應用。

如本文中所述的，功能及/或結構類似之生物表面活性劑被認為是“相關生物表面活性劑”。此種生物表面活性劑可衍生自不同屬及/或不同種之有機體，或甚至不同類別之有機體（例如細菌及真菌）。相關之生物表面活性劑也包含藉由初級序列分析所測定，藉由三級結構分析所測定，或藉由免疫交叉反應性所測定之同系物。

如本文中所述的，“衍生的生物表面活性劑”可指一種以蛋白質為底質之生物表面活性劑，其係藉由將一或多種胺基酸添加至 N-及 C-末端之任一者或二者，在該胺基酸序列中之一或多個不同位置上一或多個胺基酸之取代，及/或在該蛋白質之任一或二末端上或在該胺基酸序列中之一或多個位置上的一或多個胺基酸的去除，及/或在該胺基酸序列中之一或多個位置上一或多個胺基酸的插入。生物表面活性劑衍生物之製備可藉由以下方式達成：修飾供天然蛋白質編碼之 DNA 序列，將該 DNA 序列轉殖至成適合的宿主，及表現該經修飾之 DNA 序列以形成該衍生之蛋白質。“衍生的生物表面活性劑”也可包含生物表面活性

劑衍生物，其中脂質或碳水化合物部分已在合成期間或之後連接至蛋白質主幹。

如本文中所用的，“衍生的生物表面活性劑”或“變異的生物表面活性劑”可指一種以脂質及/或糖為底質之生物表面活性劑，其藉由一或多種脂質類及/或糖類之添加，在一或多個不同位置上之一或多個脂質及/或糖類之取代，及/或在該分子之任一或二末端上或在該結構內之一或多個位置上一或多個脂質及/或糖類之去除，及/或在該結構內之一或多個位置上一或多個脂質類及/或糖類的插入，衍生自生物表面活性劑。

相關的（衍生的）生物表面活性劑包括“變異的生物表面活性劑”。以蛋白質為底質之變異的生物表面活性劑不同於參考/親代（reference/parent）生物表面活性劑（例如野生型生物表面活性劑）係在於在少數胺基酸殘基上之取代、去除及/或插入。不同之胺基酸殘基的數目可以是一或多個，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50 或更多胺基酸殘基。變異的生物表面活性劑有至少約 70%、至少約 75%、至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%、或甚至至少約 99%、或更多之胺基酸序列與野生型生物表面活性劑相同。變異的生物表面活性劑也可在所選擇之基本結構、範圍、抗原決定區、保存區及類似方面不同於參考的生物表面活性劑。

如本文中所用的，“同功序列（analogous sequence）”是指在以蛋白質為底質之表面活性劑內之序列，其提供與該生物表面活性劑類似功能、三級結構及/或保存殘基。例如，在含有 α -螺旋或 β -片結構之抗原決定區中，在同功序列中胺基酸的代替較佳保留相同之特定結構。該詞也是指核苷酸序列以及胺基酸序列。在一些具體例中，發展同功序列以致該代替的胺基酸導致顯出類似或改良功能的變異酵素。在一些具體例中，在該生物表面活性劑中之該胺基酸之三級結構及/或保存殘基係位於所關注之片段或碎片上或附近。因此，在所關注之片段或碎片含有例如 α -螺旋或 β -片結構的情況中，該代替的胺基酸較佳保留該特定結構。

如本文中所用的，“同系生物表面活性劑”是指具有與參考的生物表面活性劑類似活性及/或結構的生物表面活性劑。不限定同系物一定要在發展上有相關。因此，意圖使該詞包含由不同有機體所得的相同、類似或對應之生物表面活性劑（亦即鑑於結構及功能）。在一些具體例中，想要確認具有與該參考的生物表面活性劑類似之四級、三級及/或初級結構的同系物。

各序列間之同系程度可以藉由使用在此技藝中已知之任何適合方法測定（參見例如 Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482；Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.*, 48:443；Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444；程式諸如 GAP, BESTFIT,

FASTA, 及 TFASTA 於 Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI); 及 Devereux 等人之 (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:387-397)。

例如, PILEUP 是一種決定序列同系程度的有用程式。PILEUP 使用連續的逐對準線 (pair-wise alignment), 從一組相關序列產生多個序列準線。彼也可繪製一種樹狀圖, 其顯出用於產生該準線之集合關係 (clustering relationship)。PILEUP 使用 Feng 及 Doolittle 之簡化的連續準線方法 (Feng and Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35: 351-360)。該方法類似於 Higgins 及 Sharp 所描述的 (Higgins and Sharp (1989) *CABIOS* 5: 151-153)。有用的 PILEUP 參數包括 3.00 之預設的間隙重量、0.10 之預設的間隙長度重量及經秤重之末端間隙。有用的演算法的另一實例是 BLAST 演算法, 其係由 Altschul 等人所描述 (Altschul 等人 (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; 及 Karlin 等人 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787)。特別有用之 BLAST 程式是 WU-BLAST-2 程式 (參見 Altschul 等人 (1996) *Meth. Enzymol.* 266: 460-480)。參數 “W”、“T”及 “X”測定該準線之敏感度及速度。該 BLAST 程式使用以下作為預設值: 11 字長 (word-length)(W), 50 之 BLOSUM62 劃線矩陣 (scoring matrix) (參見 Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) 準線 (B), 10 之預期值 (E), M'5、N'-4 及二股之比

較。

如本文中所用的，在至少二個核酸類或多肽類之背景中“基本上類似”及“基本上同一”二用語典型意指：多核苷酸或多肽包含一序列，其與參考（亦即野生型）序列比較時具有至少約 70%同一性、至少約 75%同一性、至少約 80%同一性、至少約 85%同一性、至少約 90%同一性、至少約 91%同一性、至少約 92%同一性、至少約 93%同一性、至少約 94%同一性、至少約 95%同一性、至少約 96%同一性、至少約 97%同一性、至少約 98%同一性、或甚至至少約 99%同一性、或更多同一性。序列同一性可以使用已知程式（諸如 BLAST ALIGN 及 CLUSTAL），使用已知標準參數測定。（參見例如 Altschul 等人(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410；Henikoff 等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915；Karin 等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873；及 Higgins 等人(1988) *Gene* 73:237-244）。用於進行 BLAST 分析之軟體可經由 National Center for Biotechnology Information 公開獲得。並且，使用 FASTA 搜尋資料庫（Pearson 等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448）。二個多肽基本上係同一的一指示是：第一多肽是與第二多肽免疫交叉反應的。典型地，在保留性胺基酸取代上有差異之多肽是免疫交叉反應的。因此，例如在二多肽僅在保留性取代上有差異的狀況中，一多肽與第二多肽係基本上同一的。二個核酸序列係基本上同一的另一指示是：在嚴苛條件下二分子互相雜交（例

如在中等至高度嚴苛範圍內)。

如本文中所用的，“野生型”及“天然的”生物表面活性劑是那些在自然界中發現的。“野生型序列”及“野生型基因”在本文中交換地使用以指明在宿主細胞中天然的或天然發生的序列。在一些具體例中，野生型序列係指一種關注的序列，其是蛋白質工程設計之起點。基因編碼 (gene encoding) 之天然發生的蛋白質可以依照精於此技藝者已知之一般方法獲得。該方法通常包含：合成具有該生物表面活性劑之推斷的序列編碼區的經標示探針，由表現該蛋白質之有機體製備基因組程式庫，及藉由雜交至該探針篩選該程式庫以得所關注之基因。然後，正 (positive) 雜交株被繪製 (mapped) 且定序 (sequenced)。

如本文中所用的，“不可溶的”或“不可溶化”係關於低或極低可溶之化合物。化合物之不可溶部分可藉由在 $14,000 \times g$ 下高速離心 1 毫升樣品 10 分鐘而從可溶部分分離出。可選擇地，該不可溶部分可藉由透過 0.45 微米薄膜濾紙 (諸如 Millipore Durapore 1 公升之瓶頂濾紙) 之過濾而由可溶部分分離出。該不可溶部分在離心後可呈丸狀或在過濾後仍留在濾紙上。可選擇地，事先澄清溶液之不可溶化作用可以藉由渾濁度之出現而偵測。可選擇地，不可溶之粒子 (諸如晶體或沉澱物) 可藉由光顯微鏡法偵測。

如本文中所用的，“沉澱作用”係關於因化學反應或物理條件改變所引起之不可溶型化合物從該化合物之溶液形

成。如本文中所用的，“沉澱作用劑”或“沉澱劑”係關於引起沉澱之作用劑。

如本文中所用的，“CMC”係關於微膠粒臨界濃度，其可指明表面活性劑之濃度，在此濃度以上微膠粒形成且幾乎所有之添加至該系統之另外的表面活性劑成爲微膠粒。該 CMC 是表面活性劑之重要特性。在達到該 CMC 之前，表面張力隨著表面活性劑濃度強烈地改變。在達到該 CMC 之後，表面張力維持相對固定或以較平緩坡度改變。對於在特定基質中之特定分散劑而言，CMC 之值依照溫度、壓力而定且（有時強烈地）依照其他表面活性物質及電解質之存在及濃度而定。微膠粒僅在微膠粒臨界溫度以上形成。如本文中所用的，降低 CMC 具有與降低該生物表面活性劑溶解度相同效果，因爲彼降低表面活性劑在溶液中之濃度且因此降低泡沫形成。

如本文中所用的，“宿主細胞”可以是任何天然地或藉由重組方法產生生物表面活性劑之細胞。宿主細胞可包含但不限於蘑菇屬（例如洋磨菇）、田頭菇屬（例如茶新菇）、亞加羅美施菌屬（*Ajellomyces* spp.）（例如卡波殊拉特氏（*capsulatus*）亞加羅美施菌、德馬特地氏（*dermatitidis*）亞加羅美施菌、曲黴菌屬（阿維（*arvii*）曲黴菌、撥瑞維波氏（*brevipes*）曲黴菌、棒狀曲黴菌、杜瑞克里氏（*duricaulis*）曲黴菌、橢圓曲黴菌、黃曲黴菌、熏烟色曲黴菌、富米絲內馬特氏（*fumisynnematus*）曲黴菌、連土拉氏（*lentulus*）曲黴菌、黑曲黴菌、米曲黴菌

、優尼拉特若李氏 (*unilateralis*) 曲黴菌、微瑞第納坦氏 (*viridinutans*) 曲黴菌)、芽孢桿菌 (例如地衣型芽孢桿菌或枯草芽苞桿菌)、白僵菌屬 (例如巴塞納 (*bassiana*) 白僵菌)、念珠菌屬 (例如波哥瑞恩夕氏 (*bogoriensis*) 念珠菌、朋比可拉 (*bombicola*) 念珠菌)、梭菌屬 (羊栖菜梭菌)、球孢子菌 (例如波沙達西 (*posadasii*) 球孢子俊)、胡麻葉枯病菌屬 (例如玉蜀黍胡麻葉枯病菌)、克瑞尼配利氏菌屬 (*Crinipellis* spp.) (例如婆尼塞沙 (*perniciosa*) 克瑞尼配利氏菌)、栗菌屬 (栗疫病菌)、大衛黛拉菌屬 (*Davidiella* spp.) (例如它塞納 (*tassiana*) 大衛黛拉菌)、網筆石菌屬 (例如加拉那頓 (*glabratum*) 網筆石菌)、愛莫瑞瑟拉菌屬 (*Emericella* spp.) (例如尼杜蘭氏 (*nidulans*) 愛莫瑞瑟拉菌)、大腸桿菌屬 (例如大腸桿菌)、金針菇屬 (例如冬菇)、鐮菌屬 (例如卡莫榮 (*culmorum*) 鐮菌)、赤黴菌屬 (例如稻赤黴菌)、炭疽病菌屬 (例如格蘭妮可拉 (*graminicola*) 炭疽病菌)、格瑞弗拉菌屬 (*Grifola* spp.) (例如佛郎多沙 (*frondosa*) 格瑞弗拉菌)、漢遜氏酵母菌屬 (例如多態 (*polymorpha*) 漢遜氏酵母菌)、黑措巴施狄翁菌屬 (*heterobasidion* spp.) (例如安諾孫 (*annosum*) 黑措巴施狄翁菌)、麥角菌屬 (傑可瑞納 (*jecorina*) 麥角菌、栗克斯 (*lixii*) 麥角菌、微任氏 (*virens*) 麥角菌)、路佛羅麥氏菌屬 (*Kluyveromyces* spp.) (例如拉克提氏 (*lactis*) 路佛羅麥氏菌)、拉卡瑞亞菌屬 (*Laccaria* spp.)

(例如雙色 (bicolor) 拉卡瑞雅菌)、藍廷納拉菌屬 (Lentinula spp.) (例如愛多得氏 (edodes) 藍廷納拉菌)、馬納波特菌屬 (Magnaporthe spp.) (例如歐沙 (oryzae) 馬納波特菌)、蓬萊蕈屬 (Cladophyllus) 蓬萊蕈)、莫尼賴瑟拉菌屬 (Moniliophthora spp.) (例如波尼希沙 (perniciosa) 莫尼賴瑟拉菌)、尼歐沙托亞菌屬 (Neosartorya spp.) (奧羅拉 (aureola) 尼歐沙托亞菌、凡那立 (fennelliae) 尼歐沙托亞菌、費雪若 (fisheri) 尼歐沙托亞菌、革拉巴 (glabra) 尼歐沙托亞菌、海拉殊克 (hiratsuae) 尼歐沙托亞菌、尼序姆雷 (nishimurae) 尼歐沙托亞菌、歐他尼 (otanii) 尼歐沙托亞菌、蓄多非雪瑞 (pseudofisheri) 尼歐沙托亞菌、瓜椎新它 (quadricincta) 尼歐沙托亞菌、斯帕土拉它 (spathulata) 尼歐沙托亞菌、斯賓諾沙 (spinosa) 尼歐沙托亞菌、斯挫美尼亞 (stramenia) 尼歐沙托亞菌、烏達嘉瓦 (udagawae) 尼歐沙托亞菌)、紅黴菌屬 (例如紅麵包黴菌、迪斯克瑞他 (discreta) 紅黴菌、因特米地亞 (intermedia) 紅黴菌、希托菲拉 (sitophila) 紅黴菌、貼翠絲波馬 (tetrasperma) 紅黴菌)、歐菲歐斯托馬菌屬 (Ophiostoma spp.) (例如諾佛屋米 (novoulmi) 歐菲歐斯托馬菌)、副球黴菌屬 (巴西副球黴菌)、帕沙羅拉菌屬 (Passalora spp.) (例如發華 (fulva) 帕沙羅拉菌)、絲狀銀杏葉形蕈、因佛路特氏 (involutus) 銀杏葉形蕈)、青黴素屬 (例如藍色青黴素、瑞梭精 (

chrysogenum) 青黴素、馬內非 (*marneffeii*) 青黴素)、樂必歐西斯菌屬 (*Phlebiopsis* spp.) (例如金將替 (*gigantea*) 樂必歐西斯菌)、畢赤酵母菌屬 (例如帕斯托瑞斯 (*pastoris*) 畢赤酵母菌)、畢梭利踏斯菌屬 (*Pisolithus* spp.) (例如汀托瑞斯 (*tinctorius*) 畢梭利踏斯菌)、側耳屬 (例如鮑魚菇)、波多史波拉菌屬 (*Podospora* spp.) (例如安色雷納 (*anserina*) 波多史波拉菌)、波史提亞菌屬 (*Postia* spp.) (例如波拉申塔 (*placenta*) 波史提亞菌)、假單孢菌屬 (例如鏽色假單孢菌、螢光假單孢菌、派歐塞安亞 (*pyocyanea*) 假單孢菌)、派瑞諾佛拉菌屬 (*Pyrenophora* spp.) (例如脆替施-瑞片提施 (*tritici-repentis*) 派瑞諾佛拉菌)、酵母菌屬 (例如啤酒酵母菌)、施趣若沙洽羅玫失菌屬 (*Schizosaccharomyces* spp.) (例如彭伯 (*pombe*) 施趣若沙洽羅玫失菌屬)、施趣若非蘭菌屬 (*Schizophyllum* spp.) (可謬 (*commune*) 施趣若非蘭菌)、鏈黴菌 (例如力威但氏 (*lividans*) 鏈黴菌)、塔拉羅梅氏菌屬 (*Talaromyces* spp.) (例如施替皮他特氏 (*stipitatus*) 塔拉羅梅氏菌)、圓酵母菌屬、木黴屬 (例如阿斯佩若蘭 (*asperellum*) 木黴、阿挫爲瑞德 (*atroviride*) 木黴、微瑞德 (*viride*) 木黴、裡氏木黴 [前爲傑柯瑞納 (*jecorina*) 麥角菌])、翠卻羅馬菌屬 (*Tricholoma* spp.) (例如特瑞 (*terreum*) 翠卻羅馬菌)、昂施諾卡波氏菌屬 (*Uncinocarpus* spp.) (例如裡氏 (*reesii*) 昂施諾卡卡波氏

菌)、輪黴菌屬(例如大理菊萎凋病菌)、山色大台隆菌屬(*Xanthodactylon* spp.) (例如佛蘭謬(*flammeum*)山色大台隆菌)、黃衣菌屬(例如卡西可拉(*calcicola*)黃衣菌)、卡片西氏(*capensis*)黃衣菌、艾克坦歐(*ectaneoides*)黃衣菌、佛蘭米亞(*flammea*)黃衣菌、卡盧安西氏(*karrooensis*)黃衣菌、栗加拉塔(*ligulata*)黃衣菌、帕瑞提那(*parietina*)黃衣菌、特必納塔(*turbinata*)黃衣菌)、或亞羅亞菌屬(*Yarrowia* spp.) (例如利波來提卡(*lipolytica*)亞羅亞菌)。

本發明之方法可應用於任何生物表面活性劑由培養物溶液之離析。有利地,該生物表面活性劑是一種由微生物所分泌之可溶的細胞外生物表面活性劑。一組例示的生物表面活性劑是疏水素,其為一類藉由絲狀真菌所表現及/或衍生自絲狀真菌之富半胱氨酸之多肽類。疏水素是小的(約100個胺基酸)多肽類,因其在物體(包括細胞及人造材料)表面上形成疏水塗層的能力而知名。在1991年在可謬施趣若非蘭菌(*Schizophyllum commune*)中首先發現的,疏水素現已在很多絲狀真菌中確認出。基於水療法及其他生物物理性質上之不同,疏水素被分類成I類或II類。疏水素係基於保留胱氨酸殘基的特性間隔(*spacing*)及疏水性方式被分成二不同類別(I或II)(Kershaw and Talbot 1998, *Fungal Genet Biol* 23:18-23 及 Wösten 2001, *Annu Rev Microbiol* 55:625-646)。例如對於II類疏水素而言,參見例如 Linder 等人(2005)之 FEMS

Microbiology 評論:29:877-96 及 Kubicek 等人(2008)之 BMC Evolutionary Biology, 8:4。

疏水素的表現一般在發酵期間需要大量之一或多種消泡劑的添加。否則，藉由疏水素多肽類所產生之泡沫使通氣層 (breather) 濾紙飽和，污染排氣口，引起壓力累積 (build-up) 且降低蛋白質產率。結果，粗製之疏水素濃縮液一般含有殘留量的消泡劑以及宿主細胞污染物，這是疏水素製備中是不良的，特別是在該疏水素意圖作為食品添加劑時。

疏水素可以可逆地以具有比其真實分子量更大之表觀分子量型式存在，而使疏水素極適於使用本方法回收。含疏水素之液體或泡沫可連續地或週期地從發酵器收穫以如所述地供蛋白質回收，或在發酵操作結束時分批地收穫。

該疏水素可以是在此技藝中已知之任何 I 類或 II 類疏水素，例如得自以下之疏水素：蘑菇屬 (例如洋磨菇)、田頭菇屬 (例如茶新菇)、亞加羅美施菌屬 (*Ajellomyces* spp.) (例如卡波殊拉特氏 (*capsulatus*) 亞加羅美施菌、德馬特地氏 (*dermatitidis*) 亞加羅美施菌、曲黴菌屬 (阿維 (*arvii*) 曲黴菌、撥瑞維波氏 (*brevipes*) 曲黴菌、棒狀曲黴菌、杜瑞克里氏 (*duricaulis*) 曲黴菌、橢圓曲黴菌、黃曲黴菌、熏烟色曲黴菌、富米絲內馬特氏 (*fumisynnematus*) 曲黴菌、連土拉氏 (*lentulus*) 曲黴菌、黑曲黴菌、優尼拉特若李氏 (*unilateralis*) 曲黴菌、微瑞第納坦氏 (*viridinutans*) 曲黴菌)、白僵菌屬 (例如巴塞

納 (*bassiana*) 白僵菌)、梭菌屬 (羊栖菜梭菌)、球孢子菌 (例如波沙達西 (*posadasii*) 球孢子菌)、胡麻葉枯病菌屬 (例如玉蜀黍胡麻葉枯病菌)、克瑞尼配利氏菌屬 (*Crinipellis* spp.) (例如婆尼塞沙 (*perniciosa*) 克瑞尼配利氏菌)、栗菌屬 (栗疫病菌)、大衛黛拉菌屬 (*Davidiella* spp.) (例如它塞納 (*tassiana*) 大衛黛拉菌)、網筆石菌屬 (例如加拉那頓 (*glabratum*) 網筆石菌)、愛莫瑞瑟拉菌屬 (*Emericella* spp.) (例如尼杜蘭氏 (*nidulans*) 愛莫瑞瑟拉菌)、金針菇屬 (例如冬菇)、鐮菌屬 (例如卡莫榮 (*culmorum*) 鐮菌)、赤黴菌屬 (例如稻赤黴菌)、炭疽病菌屬 (例如格蘭妮可拉 (*graminicola*) 炭疽病菌)、格瑞弗拉菌屬 (*Grifola* spp.) (例如佛郎多沙 (*frondosa*) 格瑞弗拉菌)、黑措巴施狄翁菌屬 (*heterobasidion* spp.) (例如安諾孫 (*annosum*) 黑措巴施狄翁菌)、麥角菌屬 (傑可瑞納 (*jecorina*) 麥角菌、栗克斯 (*lixii*) 麥角菌、微任氏 (*virens*) 麥角菌)、拉卡瑞亞菌屬 (*Laccaria* spp.) (例如雙色 (*bicolor*) 拉卡瑞雅俊)、藍廷納拉菌屬 (*Lentinula* spp.) (例如愛多得氏 (*edodes*) 藍廷納拉菌)、馬納波特菌屬 (*Magnaporthe* spp.) (例如歐沙 (*oryzae*) 馬納波特菌)、蓬萊蕈屬 (卡拉多非拉氏 (*cladophyllus*) 蓬萊蕈)、莫尼賴瑟拉菌屬 (*Moniliophthora* spp.) (例如波尼希沙 (*perniciosa*) 莫尼賴瑟拉菌)、尼歐沙托亞菌屬 (*Neosartorya* spp.) (奧羅拉 (*aureola*) 尼歐沙托亞菌、凡那立 (*fennelliae*)

尼歐沙托亞菌、費雪若 (*fisheri*) 尼歐沙托亞菌、革拉巴 (*glabra*) 尼歐沙托亞菌、海拉殊克 (*hiratsuae*) 尼歐沙托亞菌、尼序姆雷 (*nishimurae*) 尼歐沙托亞菌、歐他尼 (*otanii*) 尼歐沙托亞菌、蓄多非雪瑞 (*pseudofisheri*) 尼歐沙托亞菌、瓜椎新它 (*quadricincta*) 尼歐沙托亞菌、斯帕土拉它 (*spathulata*) 尼歐沙托亞菌、斯賓諾沙 (*spinosa*) 尼歐沙托亞菌、斯挫美尼亞 (*stramenia*) 尼歐沙托亞菌、烏達嘉瓦 (*udagawae*) 尼歐沙托亞菌)、紅黴菌屬 (例如紅麵包黴菌、迪斯克瑞他 (*discreta*) 紅黴菌、因特米地亞 (*intermedia*) 紅黴菌、希托菲拉 (*sitophila*) 紅黴菌、貼翠絲波馬 (*tetrasperma*) 紅黴菌)、歐菲歐斯托馬菌屬 (*Ophiostoma* spp.) (例如諾佛屋米 (*novoulmi*) 歐菲歐斯托馬菌)、副球黴菌屬 (巴西副球黴菌)、帕沙羅拉菌屬 (*Passalora* spp.) (例如發華 (*fulva*) 帕沙羅拉菌)、絲狀銀杏葉形蕈、因佛路特氏 (*involutus*) 銀杏葉形蕈)、青黴素屬 (例如藍色青黴素、瑞梭精 (*chrysogenum*) 青黴素、馬內非 (*marneffeii*) 青黴素)、樂必歐西斯菌屬 (*Phlebiopsis* spp.) (例如金將替 (*gigantea*) 樂必歐西斯菌)、畢梭利踏斯菌屬 (*Pisolithus* spp.) (例如汀托瑞斯 (*tinctorius*) 畢梭利踏斯菌屬)、側耳屬 (例如鮑魚菇)、波多史波拉菌屬 (*Podospora* spp.) (例如安色雷納 (*anserina*) 波多史波拉菌)、波史提亞菌屬 (*Postia* spp.) (例如波拉申塔 (*placenta*) 波史提亞菌)、派瑞諾佛拉菌屬 (*Pyrenophora*

spp.) (例如脆替施-瑞片提施 (*tritici-repentis*) 派瑞諾佛拉菌)、施趣若非蘭菌屬 (*Schizophyllum* spp.) (可謬 (*commune*) 施趣若非蘭菌)、塔拉羅梅氏菌屬 (*Talaromyces* spp.) (例如施替皮他特氏 (*stipitatus*) 塔拉羅梅氏菌)、木黴屬 (例如阿斯佩若蘭 (*asperellum*) 木黴、阿挫爲瑞德 (*atroviride*) 木黴、微瑞德 (*viride*) 木黴、裡氏木黴 [前爲傑柯瑞納 (*jecorina*) 麥角菌])、翠卻羅馬菌屬 (*Tricholoma* spp.) (例如特瑞 (*terreum*) 翠卻羅馬菌)、昂施諾卡波氏菌屬 (*Uncinocarpus* spp.) (例如裡氏 (*reesii*) 昂施諾卡卡波氏菌)、輪黴菌屬 (例如大理菊萎凋病菌)、山色大台隆菌屬 (*Xanthodactylon* spp.) (例如佛蘭謬 (*flammeum*) 山色大台隆菌)、黃衣菌屬 (例如卡西可拉 (*calcicola*) 黃衣菌)、卡片西氏 (*capensis*) 黃衣菌、艾克坦歐 (*ectaneoides*) 黃衣菌、佛蘭米亞 (*flammea*) 黃衣菌、卡盧安西氏 (*karrooensis*) 黃衣菌、栗加拉塔 (*ligulata*) 黃衣菌、帕瑞提那 (*parietina*) 黃衣菌、特必納塔 (*turbinata*) 黃衣菌)、類似者。在例如 Sunde, M 等人 (2008) 之 *Micron* 39:773-84; Linder, M. 等人 (2005) 之 *FEMS Microbiol Rev.* 29:877-96; 及 Wösten, H. 等人 (2001) 之 *Ann. Rev. Microbiol* 55:625-46 中評論疏水素。

在特別有利的具體例中，該疏水素是來自木黴屬 (例如阿斯佩若蘭 (*asperellum*) 木黴、阿挫爲瑞德 (*atroviride*) 木黴、微瑞德 (*viride*) 木黴、裡氏木黴 [前爲

傑柯瑞納 (jecorina) 麥角菌]) ，有利地是裡氏木黴。

I 類及 II 類疏水素皆已在真菌中被確認為經分泌之蛋白質，其在疏水性介面上被自動組合成兩親膜。I 類疏水素之組合物通常是相對不溶的，但 II 類疏水素的組合物則易溶於很多溶劑中。有利地，疏水素可溶於水中，此意指：彼是至少 0.1% 可溶於水中，較佳地至少 0.5%。至少 0.1% 可溶是指：當 0.1 克疏水素在 99.9 毫升水中在 20°C 下進行 30,000g 之離心作用 30 分鐘時，並無疏水素沉澱。

申請人已觀察到：藉由其他方法所製造之疏水素 II 可以使一或多個胺基酸夾在 C 端上。由本發明之方法，特別地，若使疏水素沉澱或不溶化，則沒有觀察到夾合 (clipping) 。

類似疏水素之蛋白質 (例如 “ 恰柏林 (chaplins) ”) 也已在絲狀細菌 (諸如放線菌屬及鏈黴菌屬) 中確認 (WO01/74864 ; Talbor, 2003, Curr. Biol, 13:R696-R698) 。與真菌性疏水素相反地，這些細菌性蛋白質可僅形成至多 1 個二硫化物橋 (disulphide bridge) ，因為彼可僅具有 2 個半胱胺酸殘基。此種蛋白質是疏水素之功能等同物的實例，且是本文方法之生物表面活性劑範圍內之另一型分子。

鼠李糖脂是藉由鏽色假單孢菌所產製及 / 或所衍生之糖脂類，其常被列為具最佳特性之細菌性表面活性劑。有二個主要類別的鼠李糖脂 - 單鼠李糖脂及二鼠李糖脂；二

者分別由一或二個鼠李糖基組成。鼠李糖脂已廣泛地用在諸如保濕劑、牙膏、保險套、潤滑劑、及洗髮精之產物的化妝品工業中且在有機及重金屬污染位址的生物矯正上是有效的。彼也促進鏽色假單孢菌降解廢烴類（諸如粗製油及植物油）。

槐糖脂被發現且藉由念珠菌屬或相關酵母菌屬分泌於培養基中且已知是表面活性劑。該羥基脂肪酸之本質特徵是：羥基位在 n 或 $n-1$ 碳原子上；16、17 或 18 之碳鏈長藉由成長基質組成物進行改良。具有不飽和 C18 脂肪酸之槐糖苷已在波哥瑞恩夕氏 (*bogoriensis*) 念珠菌中被確認。獨特的槐糖脂由圓酵母菌屬離析出，其與那些已被提及者不同點是在於彼是巨環內酯 (*macrocyclic lactone*)，其中該羥基脂肪酸之羧基係用槐糖中之末端葡萄糖的 4' 羥基酯化。二個乙酸酯基也存在於該液體中。槐糖脂顯現出表面活性劑活性，因彼之兩性結構。在槐糖脂生產者之間，波哥瑞恩夕氏念珠菌是最常被研究的物種，因為彼大量地產生槐糖脂物質。槐糖脂在硬表面清潔及自動洗碗機清洗輔助調合物中顯出是有用的。

表面素 (*surfactin*) 是一種細菌性的環脂肽 (*cyclic lipopeptide*)，其是一般作為抗生素之極有效力的表面活性劑。彼是由革蘭 - 正內孢子形成細菌枯草芽苞桿菌所產生之 24 型抗生素之一。表面素結構係由 7 個胺基酸 (L-天冬醯胺、L-白胺酸、麩胺酸、L-白胺酸、L-纈胺酸、及二種 D-白胺酸) 之肽環 (*loop*) 及 13 至 15 個碳長之疏水

性脂肪酸鏈（其使該結構有能力穿透細胞膜）組成。表面素與其他表面活性劑類似的，影響溶解表面素之液體的表面張力。彼在如 $20\mu\text{M}$ 一般低之濃度下可將水之表面張力從 72 毫牛頓/公尺降低至 27 毫牛頓/公尺。

如美國專利 7,096,315 ; 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 及 4,640,767 ; 以及美國
專利公開第 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 及 20020120101 號中所描述之生物表面活性劑也可藉由本發明之方法製造 ; 也參見

Surfactant Science Series Volume 48, BIOSURFACTANTS, Production Properties Applications, Naim Kosaric, editor, CRC Press 1993 。

藉由在生物反應器或發酵器內部之液態發酵基質中培養宿主細胞或微生物，進行發酵以製造生物表面活性劑。選擇該基質之組成（例如營養物、碳源等）、溫度及 pH 以提供用於培養物生長及 / 或該生物表面活性劑製造之合適的條件。空氣及富氧空氣一般噴入該基質中以提供用於該培養物呼吸的氧氣。

本發明係關於添加任何引起生物表面活性劑沉澱之作用劑或處理至培養溶液以使生物表面活性劑不可溶。特別地，本發明之方法可利用任何引起生物表面活性劑沉澱之作用劑或處理。引起生物表面活性劑沉澱之作用劑包括但不限於鹽、聚合物、酸、溶劑或醇。引起生物表面活性劑沉澱的物理條件包括但不限於熱之改變或 pH 之改變。熟練之技術人員會了解：引起生物表面活性劑沉澱之條件可包括沉澱劑、物理條件之改變或二者之組合。

特別地，本發明也關於可藉由本文中所述之方法製造的生物表面活性劑。例如，本文中呈現一般發酵技術之改良，其係藉由改變發酵基質及條件以使所表現之疏水素在

培養液中變為不可溶且同時使發酵仍持續在發酵期間防止泡沫釋出。使用經改良之發酵所製造之疏水素的組成係在圖 2 中呈現且在質量 7180 點之峰對應於全長疏水素分子。有趣地，藉由本文所呈現之方法所製造之疏水素導致均質產物，此係不同於天然發生之疏水素，後者經常是二變異型之混合物。因此，本發明也包含任何具有在圖 2 中所描述之光譜的疏水素。

有利地，沉澱劑是或包括鹽—離子化合物，其得自包含陽離子及陰離子之酸及鹼的中和反應，例如離子化合物，其包含任何適合陰離子（諸如鹵離子，例如氯、氟、溴或碘離子；檸檬酸根；乙酸根；硝酸根（或硝酸鹽）、含氮之酸鹽、碳酸根；硫酸根；磷酸根；胺磺酸根；膦酸；或胺磺酸根）；以及任何適合陽離子（例如銨、鈣、金屬或過渡金屬（諸如鋁、鐵、鎂、鋰、鉀、或鈉）。該鹽有利地包含多原子離子，且更加地包含硫酸鹽。該鹽可以是或包含硫酸銨、硫酸鈣、硫酸鐵、硫酸鎂、硫酸鉀、或硫酸鈉。在特別有利之具體例中，該鹽是或包含硫酸鈉。在另一特別有利之具體例中，該鹽是或包含硫酸銨。在其他特別有利具體例中，該鹽可以是乙酸鹽、碳酸鹽、氯鹽、檸檬酸鹽、甲酸鹽、硝酸鹽、或磷酸鹽。

在另一具體例中，該沉澱劑是醇。該醇可以是單羥或多羥醇，諸如單羥或多羥 C₁-C₆ 醇，諸如甲醇、乙醇、或異丙醇。

在另一具體例中，該沉澱劑是與水溶混之有機溶劑。

該溶劑可以是丙酮或酮。

在另一具體例中，該沉澱劑是水可溶聚合物。該聚合物可以是聚乙二醇或多醣（諸如葡聚糖）。在另一具體例中，該沉澱劑是陽離子型聚合物，諸如但不限於 C581（Cytec Industries, Woodland Park, NJ 07424）。

在特佳具體例中，該培養溶液之 pH 依照該生物表面活性劑被調節。例如，若該生物表面活性劑是疏水素，則該 pH 有利地約 4.0 ± 0.5 。該 pH 範圍可以在約 3.9 ± 0.5 至 4.1 ± 0.5 ，約 3.8 ± 0.5 至 4.2 ± 0.5 ，約 3.7 ± 0.5 至 4.3 ± 0.5 ，約 3.6 ± 0.5 至 4.4 ± 0.5 ，約 3.5 ± 0.5 至 4.5 ± 0.5 ，約 3.4 ± 0.5 至 4.6 ± 0.5 ，約 3.3 ± 0.5 至 4.7 ± 0.5 ，約 3.2 ± 0.5 至 4.8 ± 0.5 ，約 3.1 ± 0.5 至 4.9 ± 0.5 ，約 3.0 ± 0.5 至 5.0 ± 0.5 ，約 2.9 ± 0.5 至 5.1 ± 0.5 ，約 2.8 ± 0.5 至 5.2 ± 0.5 ，約 2.7 ± 0.5 至 5.3 ± 0.5 ，約 2.6 ± 0.5 至 5.4 ± 0.5 ，約 2.5 ± 0.5 至 5.5 ± 0.5 ，約 2.4 ± 0.5 至 5.6 ± 0.5 ，約 2.3 ± 0.5 至 5.7 ± 0.5 ，約 2.2 ± 0.5 至 5.8 ± 0.5 ，約 2.1 ± 0.5 至 5.9 ± 0.5 ，約 2.0 ± 0.5 至 6.0 ± 0.5 。

若該生物表面活性劑是鼠李糖脂或槐糖脂，則該 pH 有利地約 2.5 ± 0.5 。該 pH 範圍可以在約 2.4 ± 0.5 至 2.6 ± 0.5 ，約 2.3 ± 0.5 至 2.7 ± 0.5 ，約 2.2 ± 0.5 至 2.8 ± 0.5 ，約 2.1 ± 0.5 至 2.9 ± 0.5 ，約 2.0 ± 0.5 至 3.0 ± 0.5 ，約 1.9 ± 0.5 至 3.1 ± 0.5 ，約 1.8 ± 0.5 至 3.2 ± 0.5 ，約 1.7 ± 0.5 至 3.3 ± 0.5 ，約 1.6 ± 0.5 至 3.4 ± 0.5 ，約 1.5 ± 0.5 至 3.5 ± 0.5 ，約 1.4 ± 0.5 至 3.6 ± 0.5 ，約 1.3 ± 0.5 至 3.7 ± 0.5 ，約 1.2 ± 0.5 至 3.8 ± 0.5 ，約 1.1 ± 0.5 至 3.9 ± 0.5 ，約 1.0 ± 0.5 至 4.0 ± 0.5 ，約 0.9 ± 0.5 至

4.1±0.5，約 0.8±0.5 至 4.2±0.5，約 0.7±0.5 至 4.3±0.5，
約 0.6±0.5 至 4.4±0.5，約 0.5±0.5 至 4.5±0.5。

在另一具體例中，其他表面活性劑之 pH 有利的可以是約 pH7.0±0.5，約 pH7.1±0.5，約 pH7.2±0.5，約 pH7.3±0.5，約 pH7.4±0.5，約 pH7.5±0.5，約 pH7.6±0.5，約 pH7.7±0.5，約 pH7.8±0.5，約 pH7.9±0.5，約 pH8.0±0.5，約 pH8.1±0.5，約 pH8.2±0.5，約 pH8.3±0.5，約 pH8.4±0.5，約 pH8.5±0.5，約 pH8.6±0.5，約 pH8.7±0.5，約 pH8.8±0.5，約 pH8.9±0.5，約 pH9.0±0.5，約 pH9.1±0.5，約 pH9.2±0.5，約 pH9.3±0.5，約 pH9.4±0.5，約 pH9.5±0.5，約 pH9.6±0.5，約 pH9.7±0.5，約 pH9.8±0.5，約 pH9.9±0.5，約 pH10.0±0.5，約 pH10.1±0.5，約 pH10.2±0.5，約 pH10.3±0.5，約 pH10.4±0.5，約 pH10.5±0.5，約 pH10.6±0.5，約 pH10.7±0.5，約 pH10.8±0.5，約 pH10.9±0.5，約 pH11.0±0.5，約 pH11.1±0.5，約 pH11.2±0.5，約 pH11.3±0.5，約 pH11.4±0.5，約 pH11.5±0.5，約 pH11.6±0.5，約 pH11.7±0.5，約 pH11.8±0.5，約 pH11.9±0.5，約 pH12.0±0.5，約 pH12.1±0.5，約 pH12.2±0.5，約 pH12.3±0.5，約 pH12.4±0.5，約 pH12.5±0.5，約 pH12.6±0.5，約 pH12.7±0.5，約 pH12.8±0.5，約 pH12.9±0.5，約 pH13.0±0.5，約 pH13.1±0.5，約 pH13.2±0.5，約 pH13.3±0.5，約 pH13.4±0.5，約 pH13.5±0.5，約 pH13.6±0.5，約 pH13.7±0.5，約 pH13.8±0.5，約 pH13.9±0.5。

如稍早提及的，pH 之調節無需包括紅藻膠，且紅藻

膠之使用不需包括 pH 之調節，特別是低於 pH3.5 或 3。並且，至低於 0.5，或低於 0.4，或低於 0.2 之離子強度的任何調節並不需包括調節 pH 至低於 3.5 或 3 及 / 或紅藻膠之使用。使 pH 降低之 pH 的調節可以藉由添加酸（諸如硫酸）達成。

有利地添加沉澱劑（例如所添加之鹽、醇、互溶有機溶劑、或水溶性聚合物、或陽離子型聚合物）、及 / 或 pH 調節、及 / 或溫度調節、及 / 或溫度增高，或大幅地進行 pH 調節以達成該生物表面活性劑（例如疏水素，諸如疏水素 II）之充分的沉澱作用或不可溶化作用，而避免消泡劑之使用。亦即，不可溶化作用對於泡沫控制是有利地。換言之，進行不可溶化作用以作為控制泡沫之措施，且沉澱劑之量或 pH 調節程度或溫度調節程度是要引起大量的不可溶化作用以控制發泡。並且，沉澱劑之量或 pH 調節程度或溫度調節程度對於細胞或微生物生長及 / 或生物表面活性劑之產生並無負面影響。

對於低溶解度之疏水素而言較佳 pH 範圍是約 3.5-4.5。對其他表面活性劑而言，pH 範圍可以相當地不同且最佳之 pH 範圍可以由精於此技藝之人士決定。

對於疏水素而言，在 3.5 至 4.5 之間的 pH 範圍內，硫酸銨或硫酸鈉之所需濃度與溫度相關。在約 30°C 至約 60°C 之間，較佳濃度是約 0.1% 至約 0.5%。在約 30°C 或更低之溫度下，硫酸鈉濃度有利地高於 5% 至該鹽之飽和限度（依照溫度而定，對於硫酸鈉而言其是約 15%，且對硫

酸銨而言約 30-50%)。

再次，對於其他生物表面活性劑而言，這些沉澱劑之溫度及濃度可以相當地不同且分別必須實驗地測定。

在其他有利的具體例中，該生物表面活性劑可以是鼠李糖脂、槐糖脂或表面素。有利地，可以利用氯化鈉、氯化鈣、硫酸鈉及/或陽離子型聚合物（諸如但不限於 C581）使鼠李糖脂沉澱。有利地，可以使用氯化鈉、氯化鈣、硫酸鈉及/或陽離子型聚合物（諸如但不限於 C581）使槐糖脂沉澱。有利地，可以利用氯化鈉、氯化鈣及/或硫酸鈉使表面素沉澱。在另一有利具體例中，可以在地衣芽孢桿菌、枯草芽苞桿菌及/或裡氏木黴中繁殖鼠李糖脂、槐糖脂或表面素。

不含鹽之濃的疏水素溶液（在約 80 克/升或以上）可以僅藉由極高溫度被沉澱以控制發泡。例如，80°C 之溫度有效地破壞任何在加熱至該溫度期間所形成之泡沫，其中在該溫度下 pH 介於約 6 至 7 之間。

在室溫下，可以利用異丙醇使疏水素沉澱。當添加至 1 體積之疏水素水溶液時，2 至 3 體積之異丙醇將使疏水素沉澱。

在另一具體例中，物理條件是溫度。在特佳具體例中，調節培養液溫度。在此溫度範圍依照生物表面活性劑及濃度是廣的且可以在約 20°C 至約 90°C 範圍內。對於疏水素而言，溫度高於 30°C。對於鼠李糖脂、槐糖脂或表面素而言，溫度可以是約 20°C 至 30°C。

有數種測試泡沫控制有效性的方式。最容易的是檢查表面泡沫以供證實總體積之明顯降低。被截留之空氣可以利用類似裝置測試，該裝置具有可隨時間記錄液體密度改變的密度計。

在有利具體例中，泡沫控制之有效性可以藉由經處理溶液之膨脹率測量，這是與以下相關之計算值：經發泡之溶液體積減去起初體積，再除以起初體積，以分率或百分比報告。零膨脹率意指不含泡沫。

也可利用泡沫減少指數以作為控制泡沫之處理有效性的量度。彼是未經處理之溶液對經處理溶液的膨脹率。

在另一具體例中，泡沫減少之有效性也可以是測量生物表面活性劑之絕對及相對不可溶性。泡沫減少可被決定是有效的，若生物表面活性劑是至少約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或 95% 不可溶。

泡沫減少可以被決定是有效的，若在溶液（測量單位是公斤）中含有少於 0.1 克/公斤、0.5 克/公斤、1 克/公斤、2 克/公斤、3 克/公斤、4 克/公斤、5 克/公斤、6 克/公斤、7 克/公斤、8 克/公斤、9 克/公斤、或 10 克/公斤之生物表面活性劑（測量單位是克）。

在有利具體例中，泡沫減少可被決定是有效的，若生物表面活性劑是至少約 25% 不可溶及 / 或在上清液中含有不多於 1 克/公斤之生物表面活性劑。

在有利具體例中，若生物表面活性劑是蛋白質，則蛋

白質之不可溶性可藉由測量沉澱物（不可溶）及上清液（可溶）中蛋白質的量而量化。絕對及相對不可溶性可藉由將在沉澱物（不可溶）及上清液（可溶）中蛋白質量化而決定。將蛋白質量化之方法對精於此技藝之人士是已知的。

將在沉澱物及在溶液中之非蛋白質生物表面活性劑量化之方法對精於此技藝之人士是已知的。

與垂直掃描配合之多重光散射是最被廣泛使用之監控產物分散狀態的技術，因此確認及量化去安定化現象 [Roland et al. *International Journal of Pharmaceutics* 263 (2003) 85-94, Lemarchandel al. *Pharmaceutical Research*, 20-8 (2003) 1284-1292, Mengual et al. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 152 (1999) 111-123, Bru et al. *Particle sizing and characterisation* Ed T. Provder and J. Texter (2004)]。無需稀釋，彼對任何濃縮之分散液即是可行的，包括泡沫。當光經由該樣品傳送時，彼被該泡沫被後散射（backscattered）。後散射強度與經分散相之大小及體積分率呈正比。因此，濃度的局部改變（排水、脫水收縮）及大小之總體改變（成熟、凝聚）被偵測且監控。也可以使用傳導性以監控在成長基質中之各成分的濃度，以及濁度。

由本發明所得之特別優點是：製造生物表面活性劑之方法是可以連續的。例如，在進行本發明時，生物反應器

或發酵器可具有移除經可溶化之生物表面活性劑（例如疏水素）之裝置，例如閥控制之流體導管，經可溶化之生物表面活性劑可經由此導管從生物反應器或發酵器移除。該閥可在連接處理器或微處理器之情況下被操作以供打開或關閉該閥。該處理器或微處理器可以接收感應器（諸如指示溶液中生物表面活性劑濃度或濃度改變或溶液濁度或其他諸如泡沫量之參數的感應器）之訊號，且基於該訊號，該處理器或微處理器可指示閥之打開或關閉以供移除經溶化之生物表面活性劑；或該微處理器或處理器可基於其他參數（諸如從沉澱劑及/或沉澱條件被添加或被應用時、沉澱劑濃度達成或沉澱條件達成時算起之時間，包括一段時間）使該閥打開或關閉。該生物反應器或發酵器也可包括用於添加沉澱劑或流體或其他調節以達成沉澱條件的裝置，例如閥控制之流體導管，藉由此導管可以添加沉澱劑，例如鹽（有利地是在溶液中）、醇或達成沉澱條件之流體（例如酸以降低 pH），或加熱器。閥或加熱器可與處理器或微處理器相連以打開或關閉該閥或啓動或關掉該加熱器。該處理器或微處理器可接收來自感應器（諸如指示在溶液中生物表面活性劑之濃度或濃度改變或其他諸如泡沫之參數的感應器）之訊號，且基於該感應器訊號，該處理器或微處理器可以指示閥之打開或關閉或該用於添加沉澱劑或流體之加熱器或其他引起可溶化之裝置的啓動或關掉；或該微處理器或處理器可基於其他參數（諸如從經可溶化之生物表面活性劑被移除時算起的時間）使該閥打開

或關閉。另外，該生物反應器或發酵器可包括用於添加基質、及/或細胞或微生物或產生生物表面活性劑之基質的其他成分的裝置。無可避免地，在移除經可溶化之生物表面活性劑時，一些基質、及/或細胞或微生物或產生生物表面活性劑之基質的其他成分會隨著該經可溶化之表面活性劑一起損失，且該生物反應器或發酵器包括補充用裝置。此補充用裝置可以例如是閥控制之流體連通裝置，細胞或微生物或基質或基質之其他成分經由此裝置送至生物反應器或發酵器。該閥可以與處理器或微處理器連接以供該閥之打開及關閉。該處理器或微處理器可接收來自感應器（諸如指示細胞或微生物或基質之其他成分之濃度或濃度改變的感應器或溶液濁度或其他參數的感應器），且基於該感應器訊號，該處理器或微處理器可指示該閥打開或關閉以供補充；或該微處理器或處理器可基於其他參數（諸如時間）使該閥打開或關閉。當細胞、微生物、或基質或基質之其他成分與經溶化之表面活性劑一同收獲時，此等細胞、微生物、或基質或基質之其他成分可由該經溶化之生物表面活性劑分離出且例如經由補充裝置循環回該發酵器或生物反應器。先前討論之感應器可以是在該生物反應器或發酵器內部或與彼連接之一或多個感應器。

以此方式，將用於製造且製造該生物表面活性劑（例如疏水素，諸如疏水素 II、鼠李糖脂、槐糖脂或表面素）之基質送至該生物反應器或發酵器，當泡沫發生或正發生時或在泡沫明顯發生之前或在該基質置於該生物反應器或

發酵器之後，在沉澱劑或沉澱條件被添加或應用之後，例如在硫酸鈉被添加及/或醇被添加及/或熱被應用及/或 pH 被調節之後，有利地是在下游的點上，藉此泡沫受控制且生物表面活性劑沉澱或不可溶化。經不可溶化之生物表面活性劑由該生物反應器或發酵器移除。並且，基質或其成分（例如細胞或微生物、營養物或該基質之其他成分）被送入該生物反應器或發酵器，亦即有補充基質或其成分（例如細胞或微生物、營養物或該基質之其他成分）。隨意地，與該經不可溶化之生物表面活性劑一同排出的基質或其成分（例如細胞或微生物、營養物或該基質之其他成分）循環回該生物反應器或發酵器。因此可以有生物表面活性劑之連續製造。

該方法可以在反應器（例如生物反應器）中進行。如本文中所用的，“生物反應器”是指任何經製造或設計之能支持生物活性環境的裝置或系統。例如，生物反應器可包括槽，其中進行一或多種化學及/或生物方法。在一些具體例中，這些方法牽涉有機體或衍生自此種有機體之生物化學活性物質。在一些具體例中，有機體或細胞可在該生物反應器中成長。在一些具體例中，在使用期間有機體可以被懸浮或固定在反應器內。

與此方法結合使用之反應器可包括但不限於分批反應器、饋送分批反應器、連續反應器（諸如連續攪拌槽反應器）、移動的基質、填充床、纖維床、薄膜反應器、或在此技藝中已知或尚待發現的任何其他系統。

在一些具體例中，連續反應器之使用讓材料能連續地被泵送經過該反應器。經泵送之材料流動可促進混合。在一些具體例中，在反應器中可以使用靜態混合機（諸如擋板）及/或機械攪拌作用以促進各成分混合。

在一些具體例中，可使用生物反應器進行該方法。可經由輸入裝置（包括但不限於通口、導管、管道、軟管、及/或在此技藝中已知之任何其他輸入裝置）將細胞或基質提供給生物反應器。可以使用多個輸入裝置以將細胞、基質、及/或營養物提供給該反應器。

可以利用包括一或多個感應器、及一或多個控制器之控制系統以控制反應器內部之狀況。控制器可包括但不限於處理器、微處理器或在此技藝中已知之其他控制器。可以將用於控制該反應器狀況之資訊由一或多個感應器及/或由使用者提供給該控制器。

可以利用感應器以測量反應器內部狀況，包括但不限於溫度、pH、組成、泡沫存在、泡沫量、壓力、沉澱物存在、沉澱物的量及/或在此技藝中已知之任何其他相關量度。多個感應器可定位在反應器周圍以測定在特定位置上之狀況。例如，在一些具體例中，測定沉澱物之量或存在的感應器可定位在該反應器底部附近。具體例可包括在輸入裝置開口附近、在槽內多個位置及/或所關注之任何位置上之測定泡沫存在的感應器。可以使用在此技藝中已知的任何感應器。

一些具體例可包括在槽內之用於觀察的窗或開口。一

些反應器可包括定位在反應器內之燈以供觀察反應器內部之狀況。操作人員可以能觀察槽內部狀況且將數據輸入一連接至一或多個控制器之使用者介面以調節該槽內部狀況。

例如，基於來自感應器及/或使用者輸入之數據，閥基於反應器中之需要被打開或關閉。在一些具體例中，在輸入裝置上之閥可控制營養物、緩衝劑、基質、有機體、及/或其他成分之添加。

一些具體例可包括使該等細胞在該反應器內室中成長。可以在足以使所關注之有機體成長最佳化之比率下添加營養物、基質及細胞。在一些具體例中，控制所添加之材料組成以使所關注之成分製造最佳化。例如，所關注之成分可以是蛋白質或化合物。

在一些具體例中，隨著所關注之成分濃度增加，可開始發生泡沫。可以利用窗及/或感應器以偵測反應器中之發泡。例如，可以使用感應器或窗以測定是否發生泡沫。一旦偵測到發泡，控制器可引導以將沉澱劑添加至該反應器。在一些具體例中，該沉澱劑可使所關注之成分從該溶液沉澱出。經沉澱之成分可累積在反應器底部。

一些具體例可包括定位在該反應器底部附近之一或多個感應器以測定沉澱物是否存在及/或所存在之沉澱劑的量。這些感應器可與一或多個控制器連絡。控制器可使用此輸入以決定是否打開在該反應器底部附近之閥，以使沉澱物排出該反應器。

在一些具體例中，泵與輸入裝置及輸出裝置一同被利用以促進在該等輸入裝置及輸出裝置中之材料的移動。

如圖 3 中所示的，一些具體例可包括進行該利用反應器 100 的方法。可以經由輸入裝置 102 將細胞、基質及/或營養物提供給反應器 100。如圖 3 中所示的，輸入裝置 102 可包括用以控制有機體及/或基質輸送至該槽的閥 104。在一些具體例中，可以利用多個輸入裝置以輸送有機體及/或基質至該反應器之不同位置。在一些具體例中，如圖 3 中所描繪的，經由輸入裝置 102 提供細胞及基質。多個感應器 106 可定位在整個反應器 100 之多個位置上。感應器 106 將數據提供給控制器 108、110。控制器 108、110 能控制細胞、基質、營養物、沉澱劑及/或其他成分之量。在一些具體例中，控制器可調節控制反應器、輸入裝置、及/或輸出裝置內之狀況。

一些具體例可包括使細胞在該反應器內室中成長。隨著所關注之成分濃度增加，發泡可開始發生。在一些具體例中，可利用窗及/或感應器以偵測反應器中之發泡。一旦偵測到發泡，可將沉澱劑添加至該反應器。在一些具體例中，沉澱劑可使所關注之成分由該溶液沉澱出。可使用感應器 106 偵測經沉澱之成分。在一些具體例中，在反應器 100 內可以有窗 116 以讓使用者能觀察反應器內之狀況。

控制器 108 可連接至輸出閥 112。控制器 110 可導引閥 112 打開以使沉澱物經由輸出裝置 114 離開該槽。在一

些具體例中，使用者之輸入可能視需要地控制導引閥 112 打開及/或關閉。

如圖 3 中所示的，可以使用輸入裝置 118 將營養物（包括但不限於空氣、氧或任何其他在此技藝中已知之營養物）提供給反應器。輸入裝置 118 可偶合至輸送裝置 120 以將營養物提供給反應器 100。在一些具體例中，該輸送裝置可定位在反應器內之任何位置上。一些具體例包括混合器 122 以促進反應器內各成分之混合。

雖然本發明及其優點已詳細地被描述，應了解在本文中可進行多種改變、取代及變換，卻不偏離如所附之申請專利範圍內所定義之本發明的精神及範圍。

本發明將另外在以下實例中闡明，該等實例僅供說明且絕無意限制本發明。

【實施方式】

實例 1：澄清化之未純化的疏水素溶液

在本文中呈現一種使用硫酸鈉及 pH 調節以降低澄清化之疏水素溶液中泡沫形成的方法。使用一般製造方法獲得該疏水素溶液。該疏水素溶液濃度是 33 克/公斤。該硫酸鈉處理係藉由以下方式達成：在溫和混合下添加無水硫酸鈉以達到 2.5% w/w 之終濃度且使之溶解。使用 1% 硫酸將該 pH 調節成 4.0。該溶液在 10°C 下混合 16 小時。2×5 毫升之經 Na_2SO_4 處理之濃縮液被離心以移除液態部分。每一沉澱物再次被懸浮成與起初之疏水素/水的濃縮液相

同體積。使用刮勺以使沉澱物鬆散及再懸浮。製備 2×5 毫升之未處理之疏水素濃縮液。該濃縮液之一及該經 Na_2SO_4 處理的濃縮液之一被搖盪混合。

立即地或在 4 小時後，拍攝一照片且紀錄每一管子之總體積。結果呈現於表 1 中。經硫酸鈉處理之溶液具有 1 克/公斤之可溶疏水素濃度。在添加硫酸鈉後，97%之疏水素是不可溶的。

表 1

處理	起初體積 (毫升)	混合後體積, 在保持...後 (毫升)		在保持...後 之膨脹率 (%)	
		0 小時	4 小時	0 小時	4 小時
無	5	14	14	180%	180%
經酸鈉處理的	5	6.5	6.5	30%	30%
泡沫減少指數				6.0	6.0

實例 2：經純化之疏水素溶液

在本文中呈現使用熱以降低疏水素溶液之泡沫形成的方法。該疏水素溶液具有 130 克/公斤之濃度。當 320 克之疏水素/500 毫升 Pyrex 的溶液被混合時，泡沫充滿該瓶之上方空間（圖 1 左方之照片）。當另一同樣地被混合的疏水素溶液被加熱至 80°C 時，形成沉積物且泡沫崩解（圖 1 右方之照片）。結果呈現於表 2 中。

表 2

處理	起初體積 (毫升)	處理後 (毫升)	膨脹率 (%)
無	320	>500	> 56%
經熱處理的	320	350	9%
泡沫減少指數			> 6.2

實例 3：使用習知之發酵

表 3 描述在用於發酵裡氏木黴（其表現重組纖維素酶或重組疏水素）之一般措施中，培養液之培養液外觀。該發酵基質及狀況及收獲程序是相同的。在發酵結束時，在二情況中，被表現之標的分子是完全可溶的。表 3 顯示結果。

表 3

	纖維素酶	疏水素
消泡劑消耗	0.3 克/公斤收獲之培養液	11.4 克/公斤收獲之培養液
發酵期間之泡沫出現	無	是
膨脹率	0%	240%

實例 4：疏水素發酵培養液泡沫減少

如圖 3 及 4 中所描繪的，在本文中呈現使用硫酸鈉以降低發酵培養液中之泡沫，該發酵培養液係藉由使用一般發酵及收獲技術以培養表現重組疏水素之裡氏木黴而製備。

所收獲之培養液以 2.5% 硫酸鈉處理且在 28℃ 下，經過 2 小時，利用 10% 硫酸將 pH 調節至 3.9，且在 10℃ 下儲存。經處理之培養液具有 0.2 克/公斤之可溶疏水素。

實例 5：疏水素發酵培養液泡沫減少

以下描述使用硫酸銨以減少發酵培養液中的泡沫，該發酵培養液係藉由使用一般發酵及收獲技術培養裡氏木黴

而製備，該裡氏木黴表現重組疏水素。所收獲之培養液在 22℃ 下以 5% 硫酸銨處理。所得之培養液在處理後不含有任何泡沫，含有針狀疏水素晶體。

實例 5：在疏水素發酵收獲期間之泡沫控制

在本文中呈現在經一般發酵之表現重組疏水素之裡氏木黴培養液之收獲期間，控制泡沫的方法。與疏水素之一般發酵方法相關之泡沫出現問題在收獲期間惡化。在收獲期間，發酵器之經加壓的內容物必須恢復回常壓，導致經溶解之空氣的逸出。令人驚訝地，此發泡傾向可以藉由添加沉澱劑（特別是硫酸鈉）至發酵培養液而得控制。在該培養液中疏水素之沉澱甚至在減壓期間將發泡減至一個發泡仍可控制的點上。

在發酵結束（稱為發酵培養液結束）時，發酵器操作參數被改變如下：空氣流從新從底部進料口導入噴霧器以饋入該發酵器之上方空間，壓力保持在 20 psig 下，溫度保持在 28℃ 下，且攪動保持在 160 rpm 下。15% w/w 之 Na_2SO_4 及 pH2.8 之硫酸鈉儲備溶液以 6 升/分鐘之速率抽入該發酵器直至所得培養液已達 $\text{Na}_2\text{SO}_4=2.5\%$ 之濃度。所得之培養液具有 pH4（稱為“在經減壓之培養液前的 $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{pH4}$ ”）。然後，藉由將空氣流從 1600 LPM 減至 100LPM，同時將壓力從 20 psig 降至 0 psig（二者經過 1 小時皆是線性的），發酵器緩慢地被減壓。該培養液稱為“ $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{pH4}$ 之經減壓培養液”。在減壓之後，該培養液在

進行混合的同時保留在 28°C 下之該發酵器中，同時 pH 被監控且調節至 pH4 直至沒有觀察到 pH 改變。該培養液係稱為“Na₂SO₄/pH4 之收獲培養液”。

表 4 顯示在該收獲處理之各個階段所取得之培養液樣品的物理外觀。該處理使該培養液密度從 0.605 克/毫升增至 1.042 克/毫升。使用開始之重量計算膨脹率。經處理之培養液的可溶疏水素濃度是 0.2 克/公斤，比未處理之培養液低約 26 倍。

表 4

		#1	#2 Na ₂ SO ₄ / pH 4	#3 Na ₂ SO ₄ / pH 4 經減壓	#4 Na ₂ SO ₄ / pH 4 收獲
培養液重量	單位	發酵結束	在經減壓前		
克	99.80	99.80	100.00	100.00	
培養液體積	毫升	165	120	102	102
密度	克/毫升	0.605	0.832	0.980	0.980
膨脹率	%	65%	20%	2%	2%
泡沫減收指數			3.2	32.7	32.7

實例 7：在疏水素發酵期間之泡沫控制

在本文中呈現一般發酵技術之改良，其係藉由改變發酵基質及狀況以使經表現之疏水素在該培養液中變為不可溶，同時該發酵仍在發酵期間防止泡沫出現。表 5 顯示該改良及結果。對於具有改良之所有測試而言，在該收獲之培養液的上清液中之疏水素的濃度是低於 0.5 克/公斤。

表 5

	習知			改良型		
硫酸銨 (克/公斤)	4.3	4.3	4.3	25.0	25.0	25.0
發酵 pH	4.5	4.5	4.5	4.0	4.0	4.0
發酵期間之泡沫出現	是	是	是	無	無	無
收獲之培養液消泡劑 (克/公斤)	10.4	>5.9	>11.4	4.4	5.5	5.4

實例 8：在疏水素發酵期間消泡劑使用之減少

本文中呈現一般發酵技術之改良，其係藉由改變發酵基質及狀況以使經表現之疏水素在該培養液中變為不可溶，同時該發酵仍持續減少用以防止泡沫出現所需之消泡劑的量。

在一般發酵測試中測量到 33 克/公斤之消泡劑，此相較於在以上“在疏水素發酵期間泡沫控制”中所顯示之經改良的發酵高 6.1-7.5 倍。

實例 9：疏水素組成

使用經改良之發酵所製造之疏水素的組成在圖 2 中呈現。在質量 7180 之峰對應於全長之疏水素分子。

實例 10：在澄清化之鼠李糖脂溶液中泡沫減少

在 pH 調節、氯化鈉、氯化鈣、硫酸鈉及陽離子聚合物 C581 (Cytec Industries, Woodland Park, NJ 07424) 處理之後，測量在澄清化之鼠李糖脂 (Product JBR515 Lot # 110321, 得自 Jeneil Biosurfacant Co., LLC, 400 N. Dekora Woods Blvd, Saukville, WI 53080) 溶液中泡沫形成之減少。該鼠李糖脂溶液係藉由添加 0.21 克 JBR515 至 93 克去離子水被製備且溫和混合 5 分鐘。

為測試泡沫形成之減少，5 克所製備之溶液傳至 15 毫升之清澈的錐形管，添加處理用化合物，且藉由倒轉溫和

混合該管直至化學品被分散且溶解。經處理之溶液及未經處理之溶液被搖盪 20 次且該樣品外觀立即用數位相機拍攝。該樣品之液化體部分的外觀藉由目視檢查比對該未經處理樣品而分析。每一經搖盪溶液所佔據之體積被記錄且膨脹率及泡沫減少指數被計算且顯示於表 6 中。濁度測量係使用 HACH 2100AN 濁度計 (Hach Company, Loveland, Colorado) 進行且在表 6 中紀錄為 NTU (濁度的單位) 值。

表 6: 處理狀況及在澄清化之鼠李糖脂溶液中之膨脹率、泡沫減少指數及濁度

	處理									
結果	無	pH 2.75 (利用硫酸)	無	1.0% NaCl	無	2.0% 氯化鈣	無	4.8% 硫酸鈉	無	1.0% C581
膨脹率	160%	36%	150%	104%	180%	42%	180%	30%	160%	120%
濁度 (NTU)	0.468	10.8	0.468	1.89	0.468	16.9	0.468	3.02	0.468	11.3
泡沫減少指數	4.4		1.4		4.3		6.0		1.3	

實例 11：在澄清槐糖脂溶液中之泡沫減少

在 pH 調節、氯化鈉、氯化鈣、及陽離子聚合物 C581 處理之後，測量在澄清化之槐糖脂 (Product SO_SOPHS Lor# 10175A, SoliancE, Route de Bazancourt 51110 Pomacle, France) 溶液中泡沫的減少。該槐糖脂溶液係藉由添加 0.28 克之 SO_SOPHS 至 122 克之去離子水而製備，且使用 1N NaOH 將 pH 調節至 10.1。在 pH 調節期間溫和混合該溶液。如在澄清之鼠李糖脂溶液部分中所述的，

測量泡沫形成之減少。每一經搖盪溶液所佔據之體積被記錄且膨脹率及泡沫減少指數被計算且顯示於表 7 中。濁度測量係使用 HACH 2100AN 濁度計 (Hach Company, Loveland, Colorado) 進行且在表 7 中紀錄為 NTU (濁度的單位) 值。

處理										
結果	無	pH 2.5 (利用硫酸)	無	3.9% 氯化鈉	無	0.9% 氯化鈣	無	4.2% 硫酸鈉	無	1.0% C581
膨脹率	160%	2%	130%	40%	160%	10%	150%	90%	140%	22%
濁度 (NTU)	0.434	具有沉澱物 之混濁	0.43	1.13	0.43	15.00	0.43	1.23	0.43	3.83
泡沫減少指數	80.0		3.3		16.0		1.7		6.4	

實例 12: 在澄清之表面素溶液中之泡沫減少

在 pH 調節、氯化鈉、氯化鈣、硫酸鈉處理之後，測量在澄清化之表面素 (Part #S3523-50MG, Sigma Alrich, P.O. Box 951524 Dallas, TX 75395-1524) 溶液中泡沫形成之減少。表面素儲備溶液係藉由直接添加 2.03 克去離子水至含有表面素之管形瓶而製備且使用 1N NaOH 將調至 6-7 之間 (如藉由 pH 試紙所測量的)。該儲備溶液藉由添加 8.9 克去離子水至 0.79 克之該儲備溶液而進一步稀釋。如在經澄清之鼠李糖脂溶液部分中所述的測量泡沫形成之減少。該樣品之液體部分的外觀藉由目是檢查比對該未處理之樣品而分析。表 8 顯示對於所進行之每一處理，液

體部分的膨脹率、泡沫減少指數、及外觀。

結果	處理							
	無	pH 2.5 (利用硫酸)	無	3.0% 氯化鈉	無	0.9% 氯化鈣	無	2.9% 硫酸鈉
膨脹率	50%	25%	55%	10%	63%	13%	50%	24%
液體部分外觀	清澈	帶有顆粒 之混濁	清澈	混濁	清澈	帶有顆粒 之混濁	清澈	混濁
泡沫減少指數	2.0		5.5		5.0		2.1	

表 9 顯示對於保存在室溫下 0.5 小時之經處理及未處理之溶液而言，液體部分之膨脹率、泡沫減少指數、及外觀。

結果	處理				
	無	pH 2.5 (利用硫酸)	3.0% 氯化鈉	0.9% 氯化鈣	2.9% 硫酸鈉
膨脹率	40%	5%	2%	2%	6%
液體部分外觀	清澈	混濁帶有 顆粒	混濁帶有 顆粒	極混濁而 帶有顆粒	混濁
泡沫減少指數	-	8.0	16.0	16.0	7.2

實例 13：在含有鼠李糖脂之地衣芽孢桿菌發酵培養液中泡沫之減少

在 pH 調節、氯化鈉、氯化鈣、硫酸鈉及陽離子型聚合物 C581 處理之後，測量在含有鼠李糖脂（如實例 10 中

所述的)之地衣芽孢桿菌發酵培養液中泡沫之減少。將 5.65 克 JBR515 添加至 100 克之使用在此技藝中已知的技術所製造之地衣芽孢桿菌發酵培養液，且該溶液溫和地混合 5 分鐘。所得之培養液溶液具有 pH6.52。如在經澄清化之鼠李糖脂溶液部分中所述地測量泡沫形成之減少。表 10 顯示對於所進行之每一處理而言，膨脹率及泡沫減少指數。

表 10: 處理狀況及在含有鼠李糖脂之地衣芽孢桿菌發酵培養液中之對應膨脹率及泡沫減少指數

	處理					
結果	無	pH 4.62 (利用硫酸)	1.0% 氯化鈉	2% 氯化鈣	5% 硫酸鈉	3% C581
膨脹率	90%	25%	80%	14%	58%	23%
泡沫減少指數	-	3.6	1.1	6.4	1.6	4.0

實例 14：在含有鼠李糖脂之裡氏木黴發酵培養液中之鼠李糖脂

在由起始溶液的 pH 調節及 / 或氯化鈉、硫酸鈉及陽離子型聚合物 C581 處理之後，測量在含有鼠李糖脂（如實例 10 中所述的）之裡氏木黴發酵培養液中泡沫之減少。將 6.53 克 JBR515 添加至 28 克去離子水及 100 克之使用在此技藝中已知的技術所製造之裡氏木黴發酵培養液，pH 調節至 6.15 且該溶液溫和地混合 5 分鐘。如在經澄清化之鼠李糖脂溶液部分中所述地測量泡沫形成之減少。立即地或在 30 分鐘後測量泡沫形成之減少，因此也保留減少

之發泡。表 11 顯示對於所進行之每一處理而言，膨脹率及泡沫減少指數。

處理	pH	在搖盪後立即		在搖盪後 0.5 小時	
		膨脹率	泡沫減少指數	膨脹率	泡沫減少指數
無	6.15	42%	-	33%	-
硫酸	4.88	8%	5.3	42%	13.1
2.7% 氯化鈉	6.28	10%	4.2	3%	4.2
2.1% 氯化鈣	5.39	20%	2.1	10%	2.1
2.6% 硫酸鈉+硫酸	5.72	13%	3.2	20%	3.2
2.2% C581 及硫酸	4.26	10%	4.0	13%	4.0

實例 15：在含有鼠李糖脂之枯草芽苞桿菌發酵培養液中之泡沫減少

在 pH 調節及 / 或氯化鈉、氯化鈣、硫酸鈉及陽離子型聚合物 C581 處理之後，測量在含有鼠李糖脂（如澄清化之鼠李糖脂溶液部分中所述的）之枯草芽孢桿菌發酵培養液中泡沫之減少。將 2.71 克 JBR515 添加至 40.1 克之使用在此技藝中已知的技術所製造之枯草芽苞桿菌發酵培養液，且該溶液溫和地混合 5 分鐘。如在經澄清化之鼠李糖脂溶液部分中所述地測量泡沫形成之減少。表 12 顯示對於所進行之每一處理而言，膨脹率及泡沫減少指數。

表 12: 處理狀況及含在鼠李糖脂之枯草芽孢桿菌發酵培養液中之對應膨脹率及泡沫減少指數

處理	pH	在搖盪後立即		在搖盪後 0.5 小時	
		膨脹率	泡沫減少指數	膨脹率	泡沫減少指數
無	7.4	30%	-	40%	-
硫酸	3.3	2%	22.4	2%	22.4
1.2 % 氯化鈉及硫酸	4.66	2%	23.2	2%	23.2
1.8% 氯化鈣及硫酸	4.03	42%	0.9	6%	6.9
2.7% 硫酸鈉+硫酸	4.4	7%	5.6	5%	7.5
2.4% C581	7.4	13%	3.0	2%	26.3

實例 16：在含有槐糖脂之地衣芽孢桿菌發酵培養液中泡沫之減少

使用 pH 調節、氯化鈉、氯化鈣、硫酸鈉及陽離子型聚合物 C581 處理，測量在含有槐糖脂（如在澄清化之槐糖脂溶液部分中所述的）之地衣芽孢桿菌發酵培養液中泡沫之減少。將 7.63 克 SO_SOPHS 添加至 102.2 克之使用在此技藝中已知的技術所製造之地衣芽孢桿菌發酵培養液，且該溶液溫和地混合 5 分鐘。所得之培養液溶液調節至 pH7.23。如在經澄清化之鼠李糖脂溶液部分中所述地測量泡沫形成之減少。表 13 顯示對於所進行之每一處理而言，膨脹率及泡沫減少指數。

表 13: 處理條件及在含槐糖脂之地衣芽孢桿菌發酵培養液中之對應膨脹率及泡沫減少指數

結果	處理					
	無	pH 5.2 (利用硫酸)	4.0% 氯化鈉	1.0% 氯化鈣	5.1% 硫酸鈉	2.7% C581
膨脹率	36%	6%	8%	10%	24%	32%
泡沫減少指數	-	6.2	4.5	3.6	1.5	1.1

實例 17: 在含有槐糖脂之裡氏木黴發酵培養液中泡沫之減少

使用 pH 調節及 / 或氯化鈉、氯化鈣、硫酸鈉及陽離子型聚合物 C581 處理，測量在含有槐糖脂（如在澄清化之槐糖脂溶液部分中所述的）之裡氏木黴發酵培養液中泡沫之減少。將 5.5 克 SO_SOPHS 添加至 28 克去離子水及 100.2 克之使用在此技藝中已知的技術所製造之裡氏木黴發酵培養液，且該溶液溫和地混合 5 分鐘。如在經澄清化之鼠李糖脂溶液部分中所述地測量泡沫形成之減少。表 14 顯示對於所進行之每一處理（ND 未測定）而言，膨脹率及泡沫減少指數。

表 14: 處理狀況及在含槐糖脂之裡氏木黴發酵培養液中之對應膨脹率及泡沫減少指數

處理	pH	在搖盪後立即		在搖盪後 0.5 小時	
		膨脹率	泡沫減少指數	膨脹率	泡沫減少指數
無	7.12	42%	-	25%	-
硫酸	4.24	ND	ND	42%	ND
4.7 % 氯化鈉	6.7	20%	2.1	ND	2.1
3.4 % 氯化鈣	5.85	2%	25.0	20%	25.0
3.4% 硫酸鈉+硫酸	4.37	31%	1.4	2%	1.8
2.2% C581	6.8	30%	1.4	23%	1.9

實例 18：在含有槐糖脂之枯草芽孢菌發酵培養液中泡沫之減少

使用 pH 調節及 / 或氯化鈉、氯化鈣、硫酸鈉及陽離子型聚合物 C581 處理，測量在含有槐糖脂（如在澄清化之槐糖脂溶液部分中所述的）之枯草芽孢桿菌發酵培養液中泡沫之減少。將 2.61 克 SO_SOPHS 添加至 40.6 克之使用在此技藝中已知的技術所製造之枯草芽孢桿菌發酵培養液，且該溶液溫和地混合 5 分鐘。所得之培養液溶液之 pH 是 7.27。如在經澄清化之鼠李糖脂溶液部分中所述地測量泡沫形成之減少。表 15 顯示對於所進行之每一處理而言，膨脹率及泡沫減少指數。

表 15: 處理條件及含在槐糖脂之枯草芽孢桿菌發酵培養液中之對應膨脹率及泡沫減少指數

處理	pH	在搖盪後立即		在搖盪後 2.3 小時	
		膨脹率	泡沫減少指數	膨脹率	泡沫減少指數
無	7.3	22%	-	20%	-
硫酸	2.71	17%	1.2	2%	11.6
3.0% 氯化鈉及硫酸	5.4	19%	1.0	2%	10.4
1.2% 氯化鈣	6.05	10%	2.0	2%	10.0
3.2% 硫酸鈉+硫酸	5.67	25%	0.8	6%	3.5
2.4% C581	6.44	9%	2.1	2%	13.2

實例 19：在含有表面素之枯草芽孢桿菌發酵培養液中之泡沫減少

在氯化鈉處理之後測量在含有表面素（在澄清化之表面素溶液部分中所述的）之枯草芽孢桿菌發酵培養液中之泡沫減少。表面素儲備溶液藉由直接添加 2.03 克去離子水至含有表面素之管形瓶製備且 pH 使用 1N NaOH 調節於 6-7 之間（藉由 pH 試紙測量）。該儲備溶液另外藉由添加 0.71 克之該儲備溶液至 1.9 克之使用在此技藝中已知之技術製備的枯草芽孢桿菌發酵培養液且溫和地混合該溶液 5 分鐘而稀釋。該含表面素之培養液被搖盪 20 次且經搖盪之樣品的外觀使用數位相機拍攝。0.022 克之 NaCl 被添加至該含表面素之培養液，搖盪 20 次且照相。另外之 0.046 克及 0.032 克之 NaCl 被順序地添加至該培養液且該培養液被搖盪 20 次且照相。表 16 顯示在每一處理後在該培養液中 NaCl 的總濃度及在每一處理後對應之膨脹率及泡沫

減少指數。

處理	膨脹率	泡沫減少指數
無	22%	-
0.8% NaCl	3%	6.7
2.5% NaCl	1%	15.9
3.7% NaCl	0%	83.9

實例 20：在含有表面素之地衣芽孢桿菌發酵培養液中之泡沫減少

在氯化鈣處理之後測量在含有表面素（在澄清化之表面素溶液部分中所述的）之地衣芽孢桿菌發酵培養液中之泡沫減少。表面素儲備溶液藉由直接添加 2.03 克去離子水至含有表面素之管形瓶製備且 pH 使用 1N NaOH 調節於 6-7 之間（藉由 pH 試紙測量）。該儲備溶液另外藉由添加 0.71 克之該儲備溶液至 1.9 克之使用在此技藝中已知之技術製備的地衣芽孢桿菌發酵培養液且溫和地混合該溶液 5 分鐘而稀釋。該含表面素之培養液被搖盪 20 次且經搖盪之樣品的外觀使用數位相機拍攝。0.025 克之 CaCl_2 被添加至該含表面素之培養液，搖盪 20 次且照相。另外之 0.021 克 CaCl_2 被添加至該培養液、搖盪 20 次且照相。表 17 顯示在每一處理後在該培養液中 NaCl 的總濃度及在每一處理後對應之膨脹率及泡沫減少指數。

表 17: 處理狀況和在含表面素之地衣芽孢桿菌發酵培養液中之對應膨脹率及泡沫減少指數

處理	膨脹率	泡沫減少指數
無	65%	-
1.0% 氯化鈣	27%	2.4
1.9% 氯化鈣	10%	6.4

圖 4 顯示在上述每一處理後之樣品的外觀。

本發明另外藉由以下編號之段落描述。

1. 一種控制生物表面活性劑發泡的方法，該表面活性劑係在以下狀況下發泡：在藉由發酵基質中之宿主細胞製造生物表面活性劑期間，當該宿主細胞將該生物表面活性劑分泌出細胞外且該生物表面活性劑係可溶於該發酵基質時；該方法包含在藉由該宿主細胞製造該生物表面活性劑之同時，使該生物表面活性劑不可溶化，藉此控制發泡，因為該經不可溶化的生物表面活性劑不發泡。

2. 如段落 1 之方法，其中該生物表面活性劑包含疏水素 II、鼠李糖脂、槐糖脂或表面素。

3. 如段落 2 之方法，其中該不可溶化包含添加沉澱劑至該發酵基質及/或降低該發酵基質之 pH 及/或提高該發酵基質之溫度。

4. 如段落 3 之方法，其中該不可溶化包含添加沉澱劑至該發酵基質。

5. 如段落 4 之方法，其中該沉澱劑是鹽、醇、與水溶混之有機溶劑、水可溶聚合物或陽離子型聚合物。

6. 如段落 5 之方法，其中該沉澱劑是一種包含鹵離子、檸檬酸根、乙酸根、硝酸根、碳酸根、硫酸根、磷酸根、胺基磺酸、磷酸、胺基磺酸作為其陰離子之鹽或是一種亞硝酸鹽及銨、鈣、鐵、鎂、鋰、鉀或鈉作為其陽離子。

7. 如段落 6 之方法，其中該鹽包含硫酸鹽或氯鹽。

8. 如段落 7 之方法，其中該氯鹽是氯化鈣或氯化鈉且該硫酸鹽是硫酸銨或硫酸鈉。

9. 如段落 5 之方法，其中該沉澱劑是醇且該醇包含單羥基醇或多羥基醇 C₁-C₆ 醇。

10. 如段落 5 之方法，其中該沉澱劑溶劑是酮。

11. 如段落 10 之方法，其中該酮是丙酮。

12. 如段落 5 之方法，其中該沉澱劑是聚乙二醇或多醣。

13. 如段落 12 之方法，其中該多醣是聚葡萄糖。

14. 如段落 9 之方法，其中該沉澱劑包含甲醇、乙醇或異丙醇。

15. 如段落 3 之方法，其中該不可溶化包含降低該發酵基質之 pH 及/或提高該發酵基質之溫度。

16. 如任一段落 1-15 之方法，其中該泡沫減少指數大於 1，及/或該泡沫減少指數大於 2，及/或該泡沫減少指數大於 3，及/或在該發酵基質中可溶生物表面活性劑的濃度最多約 1 克/公斤；及/或至少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化；及/或該方法係在不添加消泡劑（

antifoam) 情況下進行；及/或與在無使不可溶化的情況下所進行之方法相比，該方法在減少量之消泡劑情況下進行；及/或藉由提升或降低該 pH 進行該方法；及/或藉由提升或降低該溫度進行該方法。

17. 如任一段落 1-15 之方法，其中該方法是包含以下步驟之連續方法：將發酵基質送至生物反應器，添加沉澱劑或應用沉澱條件，收集經不可溶化之生物表面活性劑，及補足發酵基質或其成分或宿主細胞；及隨意地再循環與經不可溶化之生物表面活性劑一同收集之任何發酵基質或其成分或宿主細胞。

18. 如段落 16 之方法，其中該方法是包含以下步驟之連續方法：將發酵基質送至生物反應器，添加沉澱劑或應用沉澱條件，收集經不可溶化之生物表面活性劑，及補足發酵基質或其成分或宿主細胞；及隨意地再循環與經不可溶化之生物表面活性劑一同收集之任何發酵基質或其成分或宿主細胞。

19. 一種控制生物表面活性劑發泡的方法，該表面活性劑係在以下狀況下發泡：藉由發酵基質中之宿主細胞製造生物表面活性劑期間，當該宿主細胞將該生物表面活性劑分泌出宿主細胞外且該生物表面活性劑係溶於該發酵基質時；該方法包含在藉由該宿主細胞製造該生物表面活性劑之同時，使該生物表面活性劑不可溶化，藉此控制發泡，因為該經不可溶化之生物表面活性劑不發泡，其中該泡沫減少指數大於 1，及/或該泡沫減少指數大於 2，及/或該

泡沫減少指數大於 3，及/或在該發酵基質中可溶生物表面活性劑的濃度最多約 1 克/公斤；及/或至少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化；及/或該方法係在不添加消泡劑情況下進行；及/或與在無使該生物表面活性劑不可溶化的情況下所進行之方法相比，該方法在減少量之消泡劑情況下進行；及/或藉由提升或降低 pH 進行該方法，及/或藉由提升或降低溫度進行該方法。

20. 如段落 19 之方法，其中該生物表面活性劑包含疏水素 II、鼠李糖脂、槐糖脂或表面素。

21. 如段落 19 或 20 之方法，其中該不可溶化包含添加沉澱劑至該發酵基質或基本上由此步驟組成。

22. 如段落 21 之方法，其中該沉澱劑包含以下之鹽或基本上由該鹽組成：包含鹵離子、檸檬酸根、乙酸根、硝酸根、碳酸根、硫酸根、磷酸根、胺基磺酸、膦酸、胺基磺酸作為其陰離子之鹽或是一種亞硝酸鹽及鉍、鈣、鐵、鎂、鋰、鉀或鈉作為其陽離子。

23. 如段落 22 之方法，其中該鹽包含硫酸鹽或基本上由硫酸鹽組成。

24. 如段落 21 之方法，其中該沉澱劑包含純或基本上由醇組成。

25. 一種控制在製造期間發泡之溶液中生物表面活性劑發泡的方法，其包含：

在該生物表面活性劑製造期間，在可引起泡沫形成之狀況時，同時使該生物表面活性劑不可溶化，藉此控制發

泡，因為該經不可溶化的生物表面活性劑不發泡。

26. 如段落 25 之方法，其中該溶液包含發酵基質，其中該製造包含藉由發酵基質中之宿主細胞來表現生物表面活性劑，且其中該宿主細胞將該生物表面活性劑分泌出宿主細胞外且該生物表面活性劑可溶於該發酵基質，藉此狀況可引起泡沫形成。

27. 如段落 25 之方法，其中該製造包含真空過濾，藉此狀況能引起泡沫形成。

28. 如段落 25 之方法，其中該製造包含收獲（harvesting），藉此狀況能引起起沫形成。

29. 如段落 25 之方法，其中該製造包含收集，藉此狀況能引起起沫形成。

30. 如段落 25 之方法，其中該製造包含緊壓，藉此狀況能引起起沫形成。

31. 如段落 25 之方法，其中該製造包含放血，藉此狀況能引起起沫形成。

32. 如段落 25 之方法，其中該製造包含浸解，藉此狀況能引起起沫形成。

33. 如段落 25 之方法，其中該製造包含勻化，藉此狀況能引起起沫形成。

34. 如段落 25 之方法，其中該製造包含壓碎（mashing），藉此狀況能引起泡沫形成。

35. 如段落 25 之方法，其中該製造包含釀造，藉此狀況能引起泡沫形成。

36. 如段落 25 之方法，其中該製造包含回收，藉此狀況能引起泡沫形成。

37. 如段落 25 之方法，其中該製造包含固-液分離，藉此狀況能引起泡沫形成。

38. 如段落 25 之方法，其中該製造包含離心，藉此狀況能引起泡沫形成。

39. 如段落 25 之方法，其中該製造包含細胞分離，藉此狀況能引起泡沫形成。

40. 如段落 25 之方法，其中該製造包含任何經充氣的過程，藉此狀況能引起泡沫形成。

41. 如段落 25 之方法，其中該製造包含泵送液體、及/或填充設備、及/或清空設備、及/或清潔設備、及/或清洗設備，藉此狀況能引起泡沫形成。

42. 如段落 25 之方法，其中該生物表面活性劑包含疏水素 II、鼠李糖脂、槐糖脂或表面素。

43. 如段落 25 之方法，其中使該生物表面活性劑不可溶化包含：

將沉澱劑添加至該溶液；

降低或提升該溶液之 pH；及/或

減低或增加該溶液溫度。

44. 如段落 25 之方法，其中使該生物表面活性劑不可溶化包含：

添加沉澱劑至該溶液。

45. 如段落 43 或 44 之方法，其中該沉澱劑是鹽、醇

、與水溶混之有機溶劑或水可溶聚合物或陽離子型聚合物。

46. 如段落 43 或 44 之方法，其中該沉澱劑是以下之鹽：包含鹵離子、檸檬酸根、乙酸根、硝酸根、碳酸根、硫酸根、磷酸根、胺基磺酸、膦酸、胺基磺酸作為其陰離子之鹽或是一種亞硝酸鹽及銨、鈣、鐵、鎂、鋰、鉀或鈉作為其陽離子。

47. 如段落 42 之方法，其中該鹽包含氯鹽或硫酸鹽。

48. 如段落 43 之方法，其中該氯鹽是氯化鈣或氯化鈉且該硫酸鹽是硫酸銨或硫酸鈉。

49. 如段落 42 之方法，其中該沉澱劑是醇且該醇包含單羥基或多羥基醇 C₁-C₆ 醇。

50. 如段落 42 之方法，其中該沉澱劑包含甲醇、乙醇、或異丙醇。

51. 如段落 25 之方法，其中使該生物表面活性劑不可溶化包含：

降低該發酵基質之 pH 及 / 或

提高該發酵基質之溫度。

52. 如任一段落 25-51 之方法，其中該泡沫減少指數大於 1，及 / 或該泡沫減少指數大於 2，及 / 或該泡沫減少指數大於 3；

其中該方法係在不添加消泡劑之狀況下進行；

其中與在無使可溶化之情況下所進行之方法相比，該

方法在減少量之消泡劑情況下進行。

53. 如任一段落 25-51 之方法，其中該方法是包含以下步驟之連續方法：

將發酵基質送至生物反應器；

添加沉澱劑或應用沉澱條件；

收集經不可溶化之生物表面活性劑；及

補足溶液或其成分或宿主細胞；及隨意地在循環與該經不可溶化之生物表面活性劑一同收集之任何溶液或其成分或宿主細胞。

54. 如任一段落 25-51 之方法，其中可溶生物表面活性劑在該溶液中之濃度是低於約 10 克/公斤。

55. 如任一段落 25-51 之方法，其中可溶生物表面活性劑在該溶液中之濃度是在約 0.1 克/公斤至約 10 克/公斤之範圍內。

56. 如任一段落 25-51 之方法，其中可溶生物表面活性劑在該溶液中之濃度是在約 0.1 克/公斤至約 5 克/公斤之範圍內。

57. 如任一段落 25-51 之方法，其中可溶生物表面活性劑在該溶液中之濃度是在約 0.1 克/公斤至約 1.0 克/公斤之範圍內。

58. 如任一段落 25-51 之方法，其中至少 50%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化。

59. 如任一段落 25-51 之方法，其中至少 75%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化。

60. 如任一段落 25-51 之方法，其中至少 90%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化。

61. 如任一段落 25-51 之方法，其中至少 95%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化。

62. 如任一段落 25-51 之方法，其中可溶生物表面活性劑在該溶液中之濃度是在約 0.1 克/公斤至約 10 克/公斤之範圍內且其中至少 50%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化。

63. 如任一段落 25-51 之方法，其中該溶液包含發酵基質。

64. 一種控制在製造期間發泡之生物表面活性劑之發泡的方法，其包含：

在溶液中藉由宿主細胞製造生物表面活性劑的同時，使該生物表面活性劑不可溶化，

控制發泡以使：

泡沫減少指數大於 1，及/或該泡沫減少指數大於 2，及/或該泡沫減少指數大於 3，及/或

在該溶液中可溶生物表面活性劑的濃度最多約 1 克/公斤；及/或

至少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化；及/或

該方法係在不添加消泡劑情況下進行；及/或

與在無使不可溶化的情況下所進行之方法相比，該方法在減少量之消泡劑情況下進行。

65. 如段落 64 之方法，其中該溶液是發酵基質，
其中該製造包含藉由發酵基質中之宿主細胞來表現生物表面活性劑，

其中該宿主細胞將該生物表面活性劑分泌出宿主細胞外，

其中該生物表面活性劑可溶於該發酵基質，藉此狀況能引起泡沫形成。

66. 如段落 64 之方法，其中該製造包含真空過濾，
藉此狀況能引起泡沫形成。

67. 如段落 64 之方法，其中該製造包含收獲，藉此狀況能引起起沫形成。

68. 如段落 64 之方法，其中該製造包含收集，藉此狀況能引起起沫形成。

69. 如段落 64 之方法，其中該製造包含緊壓，藉此狀況能引起起沫形成。

70. 如段落 64 之方法，其中該製造包含放血，藉此狀況能引起起沫形成。

71. 如段落 64 之方法，其中該製造包含浸解，藉此狀況能引起起沫形成。

72. 如段落 64 之方法，其中該製造包含勻化，藉此狀況能引起起沫形成。

73. 如段落 64 之方法，其中該製造包含壓碎，藉此狀況能引起泡沫形成。

74. 如段落 64 之方法，其中該製造包含釀造，藉此

狀況能引起泡沫形成。

75. 如段落 64 之方法，其中該製造包含回收，藉此狀況能引起泡沫形成。

76. 如段落 64 之方法，其中該製造包含固-液分離，藉此狀況能引起泡沫形成。

77. 如段落 64 之方法，其中該製造包含離心，藉此狀況能引起泡沫形成。

78. 如段落 64 之方法，其中該製造包含細胞分離，藉此狀況能引起泡沫形成。

79. 如段落 64 之方法，其中該製造包含任何經充氣的過程，藉此狀況能引起泡沫形成。

80. 如段落 64 或 65 之方法，其中該生物表面活性劑包含疏水素 II、鼠李糖脂、槐糖脂或表面素。

81. 如段落 64、65 或 80 之方法，其中使該生物表面活性劑不可溶化包含添加沉澱劑至該溶液或基本上由添加沉澱劑至該溶液組成。

82. 如段落 81 之方法，其中該沉澱劑包含或基本上以下之鹽組成：包含鹵離子、檸檬酸根、乙酸根、硝酸根、碳酸根、硫酸根、磷酸根、胺基磺酸、膦酸、胺基磺酸作為其陰離子之鹽或是一種亞硝酸鹽及銨、鈣、鐵、鎂、鋰、鉀或鈉作為其陽離子。

83. 如段落 82 之方法，其中該鹽包含或基本上由硫酸鹽組成。

84. 如段落 81 之方法，其中該沉澱劑包含或基本上

由醇組成。

85. 一種控制製造期間生物表面活性劑發泡的方法，其包含

控制在該生物表面活性劑製造期間組成物的狀況以減少泡沫，其包含：

調節該組成物中之狀況以減少發泡，以致：

泡沫減少指數大於 1，及/或該泡沫減少指數大於 2，及/或該泡沫減少指數大於 3，

在該發酵基質中可溶生物表面活性劑的濃度最多約 1 克/公斤；及/或至少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化；及/或

該方法係在不添加消泡劑情況下進行；及/或與在無使不可溶化的情況下所進行之方法相比，該方法在減少量之消泡劑情況下進行。

86. 如段落 85 之方法，其中調節在該組成物中之狀況包含：

調節該組成物之 pH；及

調節該組成物之溫度。

87. 如段落 85 之方法，其包含：

在製造期間監控該組成物之物理狀況以決定發泡何時發生；及

將沉澱劑提供給該組成物以減少發泡。

88. 如段落 87 之方法，其中該沉澱劑是鹽、醇、與水溶混之有機溶劑或水可溶聚合物或陽離子型聚合物。

89. 如段落 87 之方法，其中該沉澱劑是以下之鹽：包含鹵離子、檸檬酸根、乙酸根、硝酸根、碳酸根、硫酸根、磷酸根、胺基磺酸、膦酸、胺基磺酸作為其陰離子之鹽或是一種亞硝酸鹽及銨、鈣、鐵、鎂、鋰、鉀或鈉作為其陽離子。

90. 如段落 89 之方法，其中該鹽包含氯鹽或硫酸鹽。

91. 如段落 90 之方法，其中該氯鹽是氯化鈣或氯化鈉且該硫酸鹽是硫酸銨或硫酸鈉。

92. 如段落 88 之方法，其中該沉澱劑是醇。

93. 如任一段落 1、2、17-20、26、42、53、64、65 或 80 之方法，其中該宿主細胞是裡氏木黴。

94. 如任一段落 1、2、17-20、26、42、53、64、65 或 80 之方法，其中該宿主細胞是枯草芽孢桿菌。

95. 如任一段落 1、2、17-20、26、42、53、64、65 或 80 之方法，其中該宿主細胞是地衣芽孢桿菌。

96. 如任一段落 1、2、17-20、26、42、53、64、65 或 80 之方法，其中該宿主細胞是曲黴菌類。

在因此已詳細描述本發明之較佳具體例後，要了解藉由以上段落所定義之本發明不限於在以上描述中所列之特定細節，因為其很多明顯的改變是可能的，卻不偏離本發明之精神及範圍。

【圖式簡單說明】

最好可連同所附之圖式了解以下所給予之詳細描述，其係藉由實例給予，但不意圖將本發明僅限於所描述之特定具體例。

圖 1 說明在混合後（左）之疏水素溶液及在混合及熱處理後（右）之疏水素溶液。

圖 2 說明使用經改良之發酵所製造之疏水素的 MALDI-TOF 光譜。在 7180 之峰對應於全長之疏水素分子。

圖 3A 及 3B 說明代表性之生物反應器。可經由輸入裝置 102 將細胞、基質、及/或營養物提供至反應器 100。輸入裝置 102 可包括用以控制有機體及/或基質輸送至該槽的閥 104。可以經由輸入裝置 102 提供細胞及基質。多個感應器 106 可定位在整個反應器 100 之多個位置上。感應器 106 將數據提供給控制器 108、110。控制器 108、110 能控制細胞、基質、營養物、沉澱劑及/或其他成分之量。經沉澱之成分可使用感應器 106 偵測。在一些具體例中，在反應器 100 中可具有窗 116 以讓使用者能觀察反應器內之狀況。控制器 108 連接至輸出閥 112。控制器 110 可引導閥 112 打開以使沉澱物經由輸出裝置 114 離開該槽。在一些具體例中，使用者輸入可控制導引閥 112 以視需要地打開及/或關閉。可使用輸入裝置 118 將營養物提供至反應器。輸入裝置 118 可耦合至輸送裝置 120 以將營養物提供至反應器 100。一些具體例包括混合器 122 以促進反應器中之各成份的混合。

圖 4 顯示在含有表面素 (surfactin) 之地衣芽孢桿菌發酵培養液中泡沫形成之減少，其係在如實例 20 中所述之氯化鈣處理後所測得的。

【主要元件符號說明】

100：反應器

102：輸入裝置

104：閥

106：感應器

108, 110：控制器

112：輸出閥

114：輸出裝置

116：窗

118：輸出裝置

120：輸送裝置

122：混合器

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101110866

C12P 19/44 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12M 1/21 (2006.01)
C12Q 3/00 (2006.01)
C12R 1/10 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)
C12R 1/66 (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)

※申請日：101年03月28日

※IPC分類：

一、發明名稱：(中文／英文)

泡沫控制的方法

Methods of foam control

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種減少泡沫形成的方法以及使微生物中生物表面活性劑之表現(expression)最大化。該方法包含使生物表面活性劑從該微生物析出而使泡沫形成減少。

三、英文發明摘要：

The invention relates to a method for decreasing foam formation as well as maximizing expression of a biosurfactant in a microorganism. The methods encompasses precipitating a biosurfactant from the microorganism which results in decreased form formation.

七、申請專利範圍：

1. 一種控制生物表面活性劑發泡的方法，該表面活性劑係在以下狀況下發泡：在藉由發酵基質中之宿主細胞製造生物表面活性劑期間，當該宿主細胞將該生物表面活性劑分泌出宿主細胞外且該生物表面活性劑係可溶於該發酵基質時；該方法包含在藉由該宿主細胞製造該生物表面活性劑之同時，使該生物表面活性劑不可溶化，藉此控制發泡，因為該經不可溶化的生物表面活性劑不發泡。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該生物表面活性劑包含疏水素 II (hydrophobin II)、鼠李糖脂、槐糖脂 (sophorolipid)、或表面素 (surfactin)。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該泡沫減少指數大於 1，及/或該泡沫減少指數大於 2，及/或該泡沫減少指數大於 3，及/或在該發酵基質中可溶生物表面活性劑的濃度最多約 1 克/公斤；及/或至少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化；及/或該方法係在不添加消泡劑 (antifoam) 情況下進行；及/或與在無使不可溶化的情況下所進行之方法相比，該方法在減少量之消泡劑情況下進行；及/或藉由添加沉澱劑及/或應用沉澱條件進行該方法。

4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該方法是包含以下步驟之連續方法：將發酵基質送至生物反應器，添加沉澱劑或應用沉澱條件，收集經不可溶化之生物表面活性劑，及補足發酵基質或其成分或宿主細胞；及隨意地再

循環與經不可溶化之生物表面活性劑一同收集之任何發酵基質或其成分或宿主細胞。

5. 一種控制生物表面活性劑發泡的方法，該表面活性劑係在以下狀況下發泡：藉由發酵基質中之宿主細胞製造生物表面活性劑期間，當該宿主細胞將該生物表面活性劑分泌出宿主細胞外且該生物表面活性劑係可溶於該發酵基質時；該方法包含在藉由該宿主細胞製造該生物表面活性劑之同時，使該生物表面活性劑不可溶化，藉此控制發泡，因為該經不可溶化之生物表面活性劑不發泡，其中該泡沫減少指數大於 1，及/或該泡沫減少指數大於 2，及/或該泡沫減少指數大於 3，及/或在該發酵基質中可溶生物表面活性劑的濃度最多約 1 克/公斤；及/或至少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化；及/或該方法係在不添加消泡劑情況下進行；及/或與在無使該生物表面活性劑不可溶化的情況下所進行之方法相比，該方法在減少量之消泡劑情況下進行；及/或藉由添加沉澱劑及/或應用沉澱條件進行該方法。

6. 一種控制在製造期間發泡之溶液中生物表面活性劑發泡的方法，其包含：

在該生物表面活性劑製造期間，在可引起泡沫形成之狀況時，同時使該生物表面活性劑不可溶化，藉此控制發泡，因為該經不可溶化的生物表面活性劑不發泡。

7. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該溶液包含發酵基質，其中該製造包含藉由發酵基質中之宿主細胞來

表現生物表面活性劑，且其中該宿主細胞將該生物表面活性劑分泌出宿主細胞外且該生物表面活性劑可溶於該發酵基質，藉此狀況可引起泡沫形成。

8. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該方法是包含以下步驟之連續方法：

將發酵基質送至生物反應器，

添加沉澱劑或應用沉澱條件，

收集經不可溶化之生物表面活性劑，及

補足溶液或其成分或宿主細胞；及隨意地再循環與該經不可溶化之生物表面活性劑一同收集之任何溶液或其成分或宿主細胞。

9. 一種控制在製造期間發泡之生物表面活性劑發泡的方法，其包含：

在溶液中在藉由宿主細胞製造該生物表面活性劑的同時，使該生物表面活性劑不可溶化，

控制發泡以致：

該泡沫減少指數大於 1，及/或該泡沫減少指數大於 2，及/或該泡沫減少指數大於 3，及/或在該溶液中可溶生物表面活性劑的濃度最多約 1 克/公斤；及/或

最少 25%之所製造的生物表面活性劑係經不可溶化；及/或

該方法係在不添加消泡劑情況下進行；及/或

與在無使不可溶化的情況下所進行之方法相比，該方法在減少量之消泡劑情況下進行。

10. 如申請專利範圍第 1、5、6 或 9 項中任一項的方法，其中該生物表面活性劑包含疏水素 II、鼠李糖脂、槐糖脂或表面素。

11. 如申請專利範圍第 1、5、6 或 9 項中任一項的方法，其中該宿主細胞是裡氏木黴。

12. 如申請專利範圍第 1、5、6 或 9 項中任一項的方法，其中該宿主細胞是枯草芽孢桿菌。

13. 如申請專利範圍第 1、5、6 或 9 項中任一項的方法，其中該宿主細胞是地衣芽孢桿菌。

14. 如申請專利範圍第 1、5、6 或 9 項中任一項的方法，其中該宿主細胞是曲黴菌類。

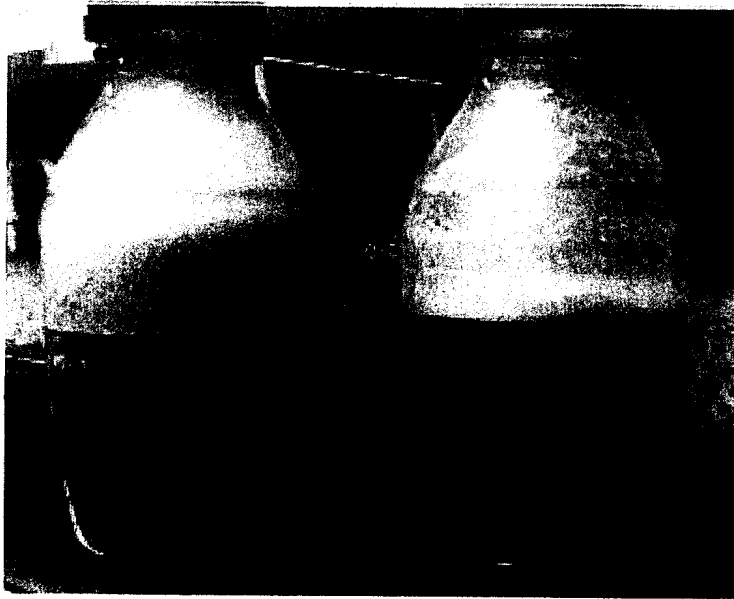


圖 1

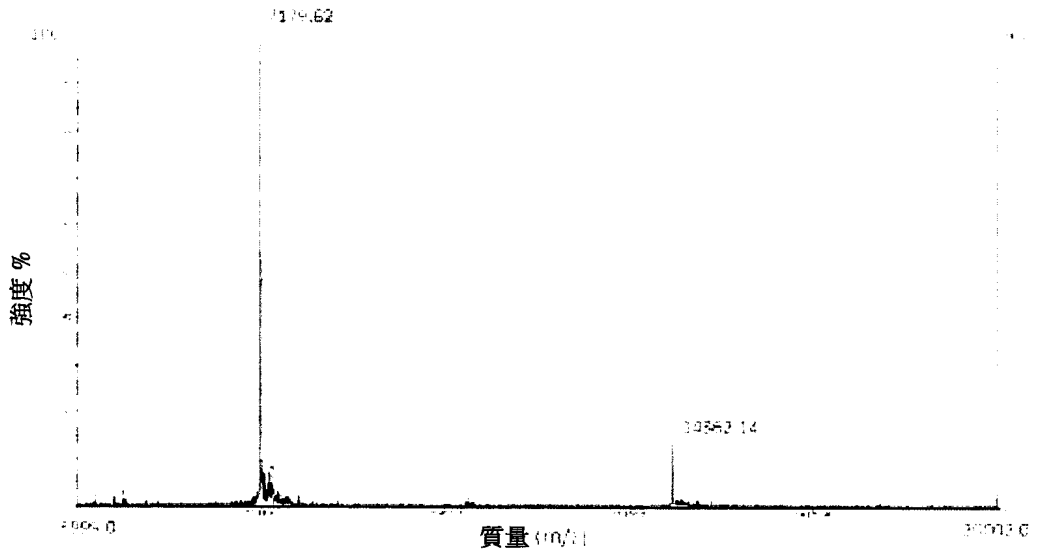


圖2

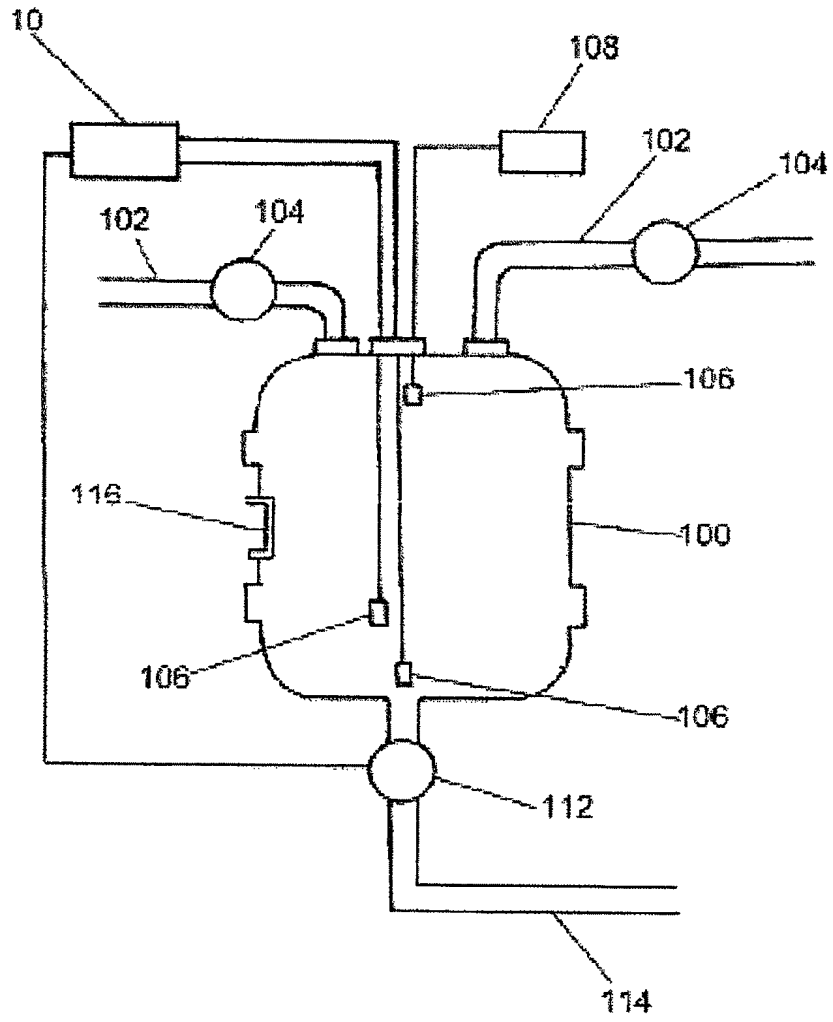


圖3A

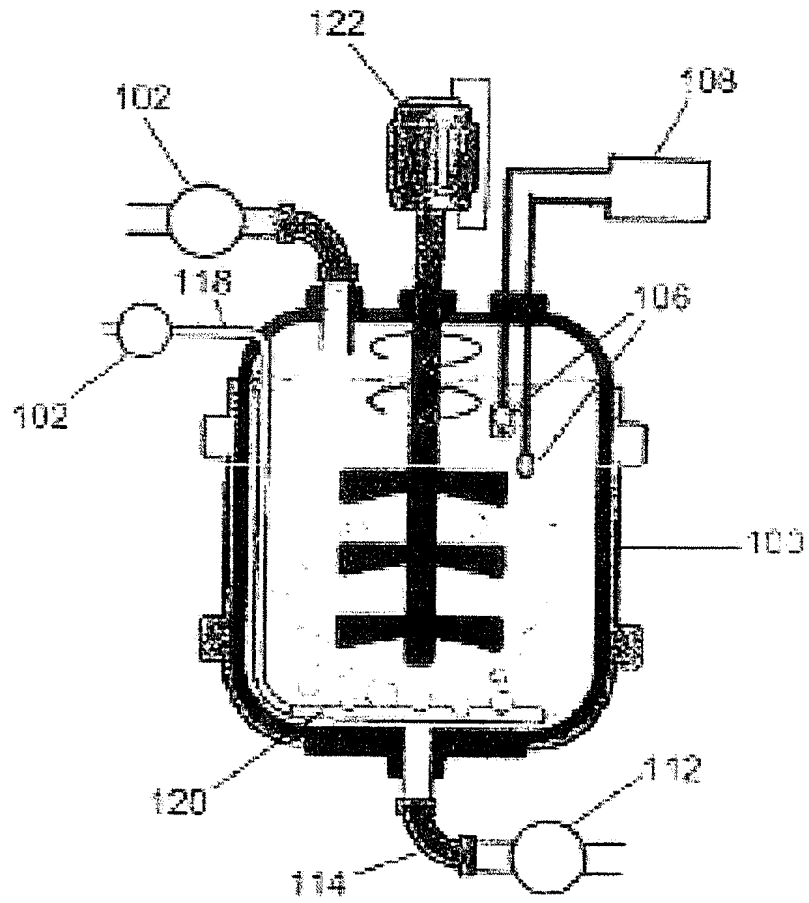


圖 3B

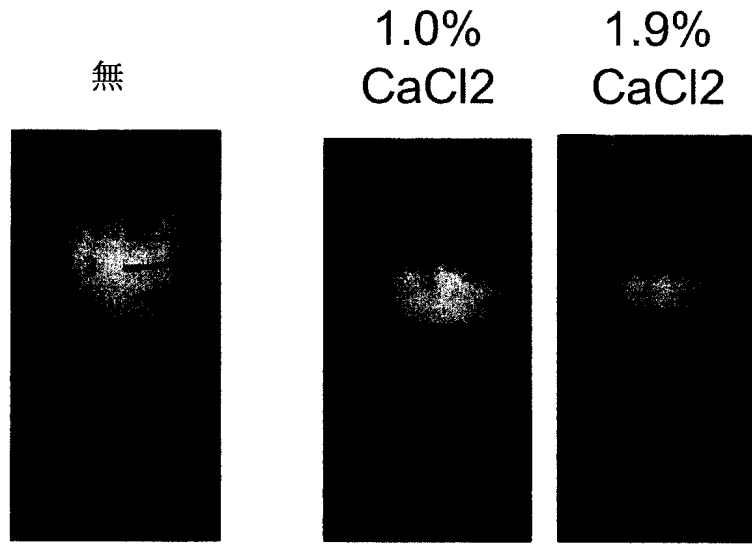


圖4

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二) 本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無