



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101707894 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 01

(21) 申请号 200880019920. 0

若阿纳·奥里韦拉·派斯

(22) 申请日 2008. 04. 09

(74) 专利代理机构 北京中北知识产权代理有限公司

(30) 优先权数据

公司 11253

103714 2007. 04. 11 PT

代理人 卢业强

(85) PCT申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2009. 12. 11

C12P 19/04 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/PT2008/000015 2008. 04. 09

FR 2617848 A, 1989. 01. 13, 全文.

(87) PCT申请的公布数据

EP 0410604 A1, 1991. 01. 30, 全文.

W02008/127134 EN 2008. 10. 23

CN 1322768 A, 2001. 11. 21, 全文.

(73) 专利权人 73100- 谢特塔伊特雷斯米尔伊塞

CN 1738904 A, 2006. 02. 22, 全文.

姆有限公司

严群等. 微生物合成中链聚羟基烷酸酯研究进展. 《生物工程学报》. 2001, 第 17 卷 (第 5 期), 485-490.

地址 葡萄牙雷阿尔城

Richard D. Ashby 等. Synthesis

(72) 发明人 玛丽亚·达申康·卡瓦略·费尔南德斯·德米兰达·雷斯

鲁伊·曼努埃尔·弗雷塔斯·奥里韦拉

克里斯蒂娜·保拉·佩雷拉·达库尼亚·罗德里格斯·奥里韦拉

of Short-/Medium-Chain-Length Poly(hydroxyalkanoate) Blends by Mixed Culture Fermentation of Glycerol.

玛丽亚·菲洛梅纳·安德拉德·德弗雷塔斯

《Biomacromolecules》. 2005, 第 6 卷 (第 4 期), 2106-2112.

维克托·曼努埃尔·德尔加多·阿尔维斯

审查员 张娜

权利要求书2页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

富半乳糖聚合物、该聚合物的制造方法及其应用

聚合物以及通过物理方式、化学方式和 / 或生物方法得到的其部分或完全降解和 / 或衍生化得到的产物即低聚半乳糖、半乳糖、鼠李糖和其他在食品、农业、纺织业和造纸业、制药业和化妆品业、在采矿业中的石油和金属的回收、工业废料处理和废水处理方面的应用。

(57) 摘要

本发明涉及一种由多聚糖组成的生物高聚物, 该多聚糖包含半乳糖 (50-90 %), 葡萄糖 (1-25 %), 甘露糖 (1-25 %) 和鼠李糖 (0.5-20%), 它还可含有微量的戊醛糖、海藻糖、核糖、树胶醛糖和 / 或果糖。该富半乳糖聚合物还包含非糖类成分, 即酰基。本发明还涉及通过利用丙三醇或富丙三醇培养基作为碳源的微生物发酵产生富半乳糖聚合物的制造方法, 以及从培养基流体中回收聚合物的方法。从产生富半乳糖聚合物的制造方法中产生细胞内生物高聚物的联产品, 即聚羟基烷酸酯。本发明还涉及富半乳糖

1. 富半乳糖聚合物,其特征在於:它包含 50—90%半乳糖单元,1—25%葡萄糖单元,1—25%甘露糖单元和 0.5—20%鼠李糖单元,它还含有微量的戊醛糖单元、核糖单元、海藻糖单元、树胶醛糖单元和 / 或果糖单元,和名为酰基的非糖单元成分。

2. 根据权利要求 1 所述的富半乳糖聚合物的制造方法,其特征在於:包括以下步骤:

a) 将假单胞菌属的细菌培养基预先注入含有碳源、氮源和无机盐的水性的营养培养基中,通风以便保持溶解氧浓度等于或高于 80%,温度控制在 5—75℃之间, pH 值在 4.0—9.0 之间,其中碳源是丙三醇或富丙三醇培养基,氮源是包含氮化合物的食品或工业废料;

b) 当培养基流体溶解氧浓度低于 50%时,向培养基供给由水性的营养培养基组成的供给溶液,所述水性的营养培养基包含碳源和无机盐,含有或不含氮源,从而保持将碳源浓度在 10—100g/L 之间,同时氮源浓度低于 0.3g/L;

c) 控制生物反应器中培养基流体中溶解氧浓度低于 30%,而且同时保持碳源浓度在 10—100g/L 之间,同时氮源浓度低于 0.3g/L。

3. 根据权利要求 2 的制造方法,其中假单胞菌属的细菌为食油假单胞菌菌株。

4. 根据权利要求 2-3 中任意一项所述的制造方法,其中假单胞菌属的细菌是提及假单胞菌属的细菌的变种体或突变体。

5. 根据权利要求 2 所述的制造方法,其中每种假单胞菌属的细菌的培养基包含几种假单胞菌属的细菌,其中至少一种假单胞菌属的细菌是权利要求 3 提及的假单胞菌属的细菌。

6. 根据权利要求 5 所述的制造方法,其中碳源为丙三醇或富丙三醇培养基,或者选择地包括至少一种下列化合物、它的混合物或它的含有丙三醇混合物之一:

a) 葡萄糖、果糖、蔗糖或乳糖;

b) 甲醇;

c) 柠檬酸盐、醋酸盐、乳酸盐或辛酸盐;

d) 己烷或辛烷。

7. 根据权利要求 5 所述的制造方法,其中碳源是含有一种或数种权利要求 6 提及化合物的食物或工业废料。

8. 根据权利要求 7 所述的制造方法,其中碳源是糖蜜、产自生物柴油生产的富丙三醇产物、乳清或橄榄油生产废料的一种或数种。

9. 根据权利要求 5 所述的制造方法,其中权利要求 1 所述的聚合物通过干燥直接从培养基流体中回收,或者通过由对培养基流体连续进行的下述步骤组成的工艺进行萃取:

a) 从培养基流体中脱除假单胞菌属的细菌细胞;

b) 通过加入极性溶剂使得多聚糖沉淀;

c) 分离沉淀出的聚合物。

10. 根据权利要求 9 所述的制造方法,其中根据权利要求 1 所述的聚合物通过包括至少一个下列步骤的制造方法提纯:

a. 透析;

b. 超滤;

c. 通过沉淀去除自由蛋白质;

d. 通过加入核酸酶去除核酸。

11. 根据权利要求9所述的制造方法,其中根据权利要求1所述的聚合物通过包括至少一个下列步骤的制造方法提纯:

- a. 透析;
- b. 超滤;

c. 通过 60 — 120°C 热处理或高压处理,或者是通过加入三氯乙酸然后离心过滤,或加入蛋白酶;

- d. 通过加入核酸酶去除核酸。

12. 根据权利要求2所述的富半乳糖聚合物的制造方法,其特征在于:同步地,产生聚羟基烷酸脂的副产品。

13. 根据权利要求5所述的获得富半乳糖聚合物的制造方法,其特征在于:包括以下步骤:

a) 将假单胞菌属的细菌培养基预先注入含有碳源、氮源和无机盐的水性的营养培养基中,通风以便保持溶解氧浓度等于或高于 80%,温度控制在 26 — 37°C 之间,pH 值在 6.0 — 7.5 之间;

b) 当培养基流体溶解氧浓度低于 50% 时,向培养基供给由水性的营养培养基组成的供给溶液,所述水性的营养培养基包含碳源和无机盐,含有或不含氮源,从而保持将碳源浓度在 10 — 20g/L,同时氮源浓度低于 0.3g/L;

c) 控制生物反应器中培养基流体中溶解氧浓度低于 10%,而且同时保持碳源浓度在 10 — 20g/L,同时氮源浓度低于 0.3g/L。

14. 根据权利要求5所述的制造方法,其中氮源是豆粉、酵母膏、麦麸或尿素。

15. 根据权利要求9所述的制造方法,其中权利要求1所述的聚合物通过干燥直接从培养基流体中回收,或者通过由对培养基流体连续进行的下述步骤组成的工艺进行萃取:

- a) 通过过滤、沉析或循环水溶解从培养基流体中脱除微生物细胞;
- b) 通过加入丙酮、乙醇或丙醇使得多聚糖沉淀;
- c) 通过过滤分离沉淀出的聚合物。

16. 根据权利要求9所述的制造方法,其中权利要求1所述的聚合物通过干燥直接从培养基流体中回收,或者通过由对培养基流体连续进行的下述步骤组成的工艺进行萃取:

- a) 通过离心过滤、沉析或循环水溶解从培养基流体中脱除微生物细胞;
- b) 通过加入丙酮、乙醇或丙醇的极性溶剂使得多聚糖沉淀;
- c) 通过离心过滤分离沉淀出的聚合物。

## 富半乳糖聚合物、该聚合物的制造方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物高聚物,包括由半乳糖(50-90%)、葡萄糖(1-25%)、甘露糖(1-25%)和鼠李糖(0.5-20%)组成的多聚糖,还包括微量的如木糖、海藻糖、核糖、树胶醛糖和/或果糖的中性糖以及如酰基的非糖类成份。本发明还涉及通过微生物发酵,优选使用丙三醇或富丙三醇培养基作为碳源,制造富半乳糖聚合物的制造方法。本发明还涉及上述富半乳糖聚合物及其产品在食品、农业、纺织和造纸业,药品和化妆品,采矿业中石油和金属的回收,废水处理中的应用。

### 背景技术

[0002] 多聚糖为高分子量碳水化合物,其由一个或更多形成重复单元并聚合的单糖组成。多聚糖是现存有机物中最大的高分子,其存在于所有的植物和藻类、部分动物和部分微生物中。由于它们的物化特性,也就是它们的保水量、形成膜的能力以及流变能力(黏性、胶凝、乳化等等),多聚糖很大程度上用于广泛的各种不同的工业应用中。

[0003] 目前,从植物(例如瓜尔胶、阿拉伯胶、果胶)、藻类(如藻酸盐、角叉胶、琼脂)或外壳(如壳质)中获得的多聚糖在生物高聚物市场中占据首要地位,虽然这样,在该生物聚合物市场内微生物多聚糖仍然代表一小部分。限制微生物多聚糖更广泛使用的主要因素与其生产成本,主要是培养基的成本有关,也与多数生产的菌株是致病的或者公众对于一些应用的接受比较困难的事实有关。然而,在过去的几年中,由于新的微生物多聚糖自身的物化特性和流变能力可以与传统的多聚糖竞争,人们在分离和识别这些新的微生物多聚糖方面的关注逐步增加。特别地,植物和藻类多聚糖的生产受气候和环境的影响,如污染将导致获得的聚合物数量和质量均产生较大可变性。另一方面,许多微生物多聚糖具有在植物聚合物中并没有发现的多种特性,例如具有抗癌、抗病毒、消炎或免疫刺激活性。

[0004] 被广泛研究并且目前正在进行商业开发的微生物多聚糖,包括:由木醋杆菌制得的细菌纤维素,其特性与植物纤维素的特性相似;由明串珠菌属细菌制得的右旋糖苷,以及由杆菌属、发酵单胞菌属和乳酸菌属的细菌制得的果聚糖,其是排他细菌产品;由黄单胞杆菌属的细菌制得的黄原胶,以及由少动鞘氨醇单胞菌制得的结冷胶,其相对于传统的如藻酸盐或角叉胶的多聚糖具有更好的物理特性;由马链球菌制得的透明质酸,以及由假单胞菌属、根瘤菌属、土壤杆菌属和产碱杆菌属制得的琥珀酰聚糖,由于其与真核状聚合物相似而发现其在医学、制药和化妆品中的应用。

[0005] 由于在再生资源作为化学品的供选物方面的兴趣正在逐步增长,新产品的探索无疑将被增强并且具有商业利益的新微生物多聚糖将有可能出现。多聚糖的商业价值将依赖于它的成分、产量以及萃取和加工的容易与否。工业开发将依赖于它的流变性质,即它形成黏性溶液的能力、在宽的温度范围和pH值范围内的稳定性;并依赖于它独特的生物特性和/或它们可能用在新应用中的事实。

[0006] 富半乳糖聚合物可包含在具有潜在工业利益的多聚糖之中。这些聚合物可能在植物(如阿拉伯胶),藻类(如角叉胶和琼脂)和一些部分微生物包括原生动物、真菌、酵母和

细菌中被发现。即使所包含的糖基键合类型是不同的,在微生物聚合物中出现半乳糖残留物是相当普遍的。这些多聚糖可能是半乳糖的均聚物(半乳糖体)或者是除不定数量的半乳糖之外还包含有其他糖类残余的杂聚物,其他糖类残余最普通的是葡萄糖、甘露糖、鼠李糖、树胶醛糖和/或海藻糖。许多这样的聚合物除中性糖外还包括酸性糖(如葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸)或氨基糖(如N-乙酰葡萄糖胺,N-乙酰半乳糖胺)。非糖成分的出现,像酰基(如醋酸酯、丙酮酸盐缩酮、琥珀酰半脂)或无机残留物(如硫酸盐、磷酸盐)也是相当平常的。

[0007] 半乳糖均聚物是通过细菌制成的,这些细菌如婴儿双歧杆菌(Tone-Shimokawa et al.,1996)、链状双歧杆菌(Nagaoka et al.,1996)、肺炎克雷白氏杆菌(Whitfield et al.,1991)、溶血性巴斯德氏菌(Lacroix et al.,1993)、粘质沙雷氏菌(Aucken et al.,1998)、田菁茎瘤菌(D' Haeze et al.,2004)和甲基杆菌属VTT-E-11929(Verhoef et al.,2003)。

[0008] 本发明的聚合物的主要成分是杂多糖,它除了含有半乳糖作为其主要成分外还包括其他中性糖,即葡萄糖、甘露糖和鼠李糖,这些中性糖赋予了杂多糖更高的结构复杂性。不同于用婴儿双歧杆菌和链状双歧杆菌制得的半乳糖体中半乳糖的残余物以呋喃糖环的形式存在,本发明的多聚糖包含的所有半乳糖残留物均以吡喃糖环形式存在。另一方面,由于参照的半乳糖体是细胞壁组成的,使得它们的萃取工艺相当困难,但是本发明的聚合物因为其是细胞外产物使得其萃取工艺更加容易。由肺炎克雷白氏杆菌、溶血性巴斯德氏菌和粘质沙雷氏菌制得的半乳糖体均为脂多糖,其由交替的半乳糖的吡喃糖和呋喃糖环组成。这些细菌对人类(肺炎克雷氏菌和粘质沙雷氏菌)和对动物(溶血性巴斯德氏菌)是致病的,通过它们产生的半乳糖体与它们的感染有关。

[0009] 基于这个原因,在这些聚合物方面的关注局限于通过产生细菌导致感染的发病机理的研究,其商业发展成为不可能。而且,考虑到这些聚合物是脂多糖,因此萃取和提纯工序相比本发明的细胞外聚合物的更加困难。

[0010] 含半乳糖作为其主要成分的杂聚物由广泛的微生物群即双歧杆菌属、克雷白氏杆菌属、欧文氏菌属、甲基杆菌属、假单胞菌属、乳酸菌属、产碱杆菌属和链球菌属的细菌制得。

[0011] 鼠李半乳糖体(由半乳糖和鼠李糖组成的多聚糖)是常见的由双歧杆菌属细胞壁组成的。这方面的例子是长双歧杆菌细胞壁多聚糖,该多聚糖由均以吡喃糖环形式的半乳糖(大约60%)和鼠李糖(大约40%)组成(Nagaoka et al.,1995)。本发明的聚合物除了其细胞外的性质外,还因低比例鼠李糖和还含有其他中性糖(葡萄糖和甘露糖)而不同于长双歧杆菌聚合物。

[0012] 一些克雷白氏杆菌属的细菌生产富半乳糖细胞外杂聚物,例如生产由半乳糖(45-63%)和鼠李糖(12-55%)组成的、带有不定量的丙酮酸盐成分的多聚糖的克雷白氏杆菌属菌株K32(Bryan et al.,1986);生产由半乳糖(62.5%)、葡萄糖(25%)和甘露糖(12.5%)组成的、带有少量糖醛酸的多聚糖的克雷白氏杆菌属菌株S11(Dermlim et al.,1999);和生产由半乳糖(38.2%)、甘露糖(15.9%)、葡萄糖(1.7%)、葡萄糖醛酸(17.5%)、醋酸盐(5.3%)、琥珀酸盐(2.6%)和硫酸盐(14.6%)组成的多聚糖的植物克雷白杆菌DSM3092(EP0184755)。本发明的聚合物因其成分而不同于这些多聚糖,即本发明

的聚合物同时存在半乳糖、葡萄糖、甘露糖和鼠李糖,不存在糖醛酸,这使得该聚合物区别于由植物克雷白杆菌制得的多聚糖。

[0013] 富半乳糖杂聚物的产生也存在于甲基杆菌属的细菌中。例如由嗜有机甲基杆菌制得的细胞外甲基多聚糖,其由半乳糖、葡萄糖和甘露糖(以摩尔比4:3:3)、酰基(丙酮酸盐和醋酸盐)和糖醛酸组成(US5064759)。本发明的聚合物因其更高的半乳糖含量和不存在糖醛酸而不同于甲基多聚糖。

[0014] 在欧文氏菌属的植物病原体细菌中,一些产生富半乳糖多聚糖。它的例子包括:解淀粉欧文氏菌产生一种解淀粉菌,其是由半乳糖(大约80%)、葡萄糖醛酸(大约20%)、酰基(醋酸盐和丙酮酸盐)以及微量葡萄糖组成的细胞外多聚糖(Eastgate et al.,2000);梨果欧文氏菌产生类似于解淀粉菌的细胞外多聚糖,但是这样多聚糖具有高含量的醋酸盐而不含葡萄糖(Kim et al.,2002);斯氏欧文氏菌(玉米细菌性枯萎病菌)产生stewartan,一种类似于解淀粉菌但具有更高葡萄糖含量的荚膜多糖(Minogue et al.,2005);菊欧文氏菌 Ech6 产生由等量的半乳糖和海藻糖、葡萄糖以及葡萄糖醛酸组成的细胞外多聚糖(Yang et al.,2001)。本发明的聚合物除因不含葡萄糖醛酸外还因它的甘露糖和鼠李糖的含量而不同于这些聚合物。

[0015] 几种肠杆菌种(如栖水肠杆菌、阴沟肠杆菌)产生富半乳糖(21-24%)和海藻糖(16-27%)的杂多糖,它包括不定量的葡萄糖、甘露糖和鼠李糖、酰基(醋酸盐和丙酮酸盐)和糖醛酸(葡萄糖醛酸和/或半乳糖醛酸)(Verhoef et al.,2005)。由半乳糖、海藻糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸组成的可拉酸是由肠杆菌属细菌制成的典型的细胞外多聚糖(Ratto et al.,2006)。本发明的聚合物因其更高含量的半乳糖、微量或零含量的海藻糖以及不存在糖醛酸而不同于这些多聚糖。

[0016] 富半乳糖杂多糖的产生也存在于弧菌属的细菌中,例如产生主要成分是半乳糖和葡萄糖、且具有少量的鼠李糖、海藻糖、核糖、树胶醛糖、戊醛糖和甘露糖的多聚糖的哈氏弧菌(Bramhachari et al.,2006)。这种多聚糖也含有高含量的糖醛酸,即使得其区别于本发明的聚合物的半乳糖醛酸。

[0017] 来自产碱杆菌属的细菌,即产碱杆菌菌株 ATCC 31961,被提到具有产生不仅包含典型的葡萄糖和鼠李糖、而且包含葡萄糖醛酸、半乳糖、甘露糖、树胶醛糖、海藻糖和核糖的多聚糖的能力(EP0471597A1)。本发明的聚合物因不含有糖醛酸而不同于它。

[0018] 来自乳酸菌属、乳球菌属和链球菌属的一些乳酸菌产生广泛的各种杂多糖,该杂多糖的主要成分是半乳糖和葡萄糖。这些物种包括:产生一些除含有半乳糖和葡萄糖之外还含有鼠李糖和甘露糖的多聚糖的德氏乳杆菌;产生包含半乳糖和葡萄糖的多聚糖的鼠李糖乳杆菌和马乳酒乳杆菌;产生含有半乳糖和N-乙酰基氨基半乳糖的多聚糖的含副干酪乳酸菌(Faber et al.,2001;Vanhaverbeke et al.,1998;Yang,2000);产生由半乳糖和葡萄糖组成或由半乳糖、葡萄糖和鼠李糖组成的多聚糖的乳酸乳球菌乳脂亚种(Yang,2000)、甘露糖或N-乙酰基氨基半乳糖的多聚糖的;产生一些包含半乳糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖或N-乙酰基氨基半乳糖的多聚糖的链球菌属(Yang,2000);产生含有半乳糖和鼠李糖的多聚糖(Vanningelgem et al,2004)或含有半乳糖、鼠李糖和葡萄糖的多聚糖的嗜热链球菌(US5965127)。

[0019] 富半乳糖的多聚糖的产生还存在于假单胞菌属的细菌中,例如:产生一种由等摩

尔量的半乳糖和葡萄糖组成的细胞外多聚糖 marginalan 的边缘假单胞菌 (Osman et al., 1989); 产生主要成分为半乳糖、甘露糖和树胶醛糖的细胞外多聚糖的荧光假单胞菌 (Hung et al., 2005); 产生一种不仅含有典型的葡萄糖和鼠李糖而且还含有葡萄糖醛酸、半乳糖、甘露糖、树胶醛糖、海藻糖和核糖的多聚糖的少动假单胞菌 (EP0471597); 和产生一种含有摩尔比为 1.3 : 1.0 : 1.3 的甘露糖、半乳糖和葡萄糖, 10-25% 糖醛酸和 10-15% 醋酸盐的多聚糖的假单胞菌属菌 ATCC 53923 (EP0410604)。本发明的聚合物因其除包含半乳糖和葡萄糖外还包含甘露糖和鼠李糖作为主要成分而不同于 marginalan。在由荧光假单胞菌制成的多聚糖中树胶醛糖的存在使得它区别于本发明的多聚糖, 在本发明中不含有或存在极微量的树胶醛糖。本发明的聚合物也不同于那些产自少动假单胞菌和假单胞菌种 ATCC 53923 的多聚糖, 主要是因为它们不包含糖醛酸。

[0020] 本发明的聚合物具有使其与来自微生物源的其他富半乳糖多聚糖相区别的成分, 即因为其除含有半乳糖作为其主要成分外还含有葡萄糖、甘露糖和鼠李糖的中性糖, 而且不含糖醛酸和氨基糖。

[0021] 本发明的聚合物是细胞外产物, 这使得它的萃取相对于一些为细菌的细胞壁或植物或藻类细胞壁组分的多聚糖而言是一个相对容易的过程。

[0022] 由于其生物降解能力, 富半乳糖聚合物不会导致任何环境问题。本发明的多聚糖具有有利的流变性质, 即它作为假塑性流体的表现和它形成具有优异的黏性、在宽的 pH 和温度范围内具有稳定性的水溶液的能力。

[0023] 尽管由微生物制得的多聚糖的成分和数量均是遗传学确定的特性, 但是通过改变培养条件可能会影响这两者。多聚糖生产可以作为应激反应部分被诱发, 通常如下被证实: 伴随其他培养基 (如氮或磷) 的限制出现超量的碳源; 低温; 微需氧的或厌氧的条件或过度通风; 盐应力; 阳离子 (如钙离子  $\text{Ca}^{2+}$  或锶离子  $\text{Sr}^{2+}$ ) 的存在; 或者有毒化合物或微生物生长抑制剂 (如抗生素或过氧化氢) 的存在。产生多聚糖的量受媒介组成和繁殖条件影响, 特别是受细胞内和细胞外二者的碳有效性以及在碳和其他培养基之间的比率的影响。

[0024] 大多数的产生细胞外微生物多聚糖的发酵过程用纯培养基进行 (如 EP0410604、ES8701838、US2004/0197877)。尽管如此, 可以使用两种或更多微生物的混合培养, 其中至少一种微生物能产生有用的聚合物。这方面的例子是通过嗜麦芽假单胞菌 DSM2130 和根癌土壤杆菌 DSM2128 的混合培养基产生细胞外多聚糖 (US4567140)。

[0025] 微生物多聚糖的产生通常是通过需氧发酵来进行, 糖类 (如葡萄糖、蔗糖、淀粉) 为最通常使用的碳源。微生物富半乳糖多聚糖的上述大多数制造方法使用糖主要是葡萄糖或在某些情况下使用蔗糖或乳糖作为碳源。对于通过嗜有机甲基杆菌产生的甲基 (methylan) 产品, 利用甲醇作为碳源, 或者利用含甲醇和葡萄糖、甘露糖、半乳糖或琥珀酸盐的混合物作为碳源。本发明的制造方法是在微生物发酵中使用丙三醇或富丙三醇培养基作为碳源。使用丙三醇的优点是由于它允许丙三醇废料 (如来自生物柴油的富丙三醇产品) 再利用, 因此降低了与碳源相关的生产成本。本发明的制造方法也考虑利用其他碳源 (如糖、甲醇) 作为丙三醇或其混合物的供选物, 这使得制造方法适用性更强。

[0026] 在需氧发酵过程中, 培养基流体的黏性不断增加到达高黏流状态, 这个制造方法的主要困难之一是保持穿过培养基流体的氧和营养物的有效分配。这常常通过保持高通风率和 / 或高搅拌率实现。另一方面, 为了增加质量转移和回收聚合物, 黏性减少可以通过给

细胞内容物增加核酸酶或使用经过处理的能产生上述酶的微生物菌株实现。事实上,像富氧罗尔斯通氏菌、嗜有机甲基杆菌、豚鼠气单胞菌、棕色固氮菌、广泛产碱菌、大肠杆菌和克雷白氏杆菌这样的细菌,与一些来自假单胞菌的细菌一样,已经能够被基因控制使得其在聚羟基脂肪酸酯和多聚糖的生产期间产生核酸酶(W099/50389)。该方法在产生多聚糖的种类和使用的碳源方面不同于本发明。在本发明的制造方法中,富半乳糖聚合物的产生是在低溶解氧浓度下进行,其允许最小量的通风,因此降低了生产成本。

[0027] 细胞外多聚糖和名为聚羟基脂肪酸酯(PHA)的细胞内生物高聚物的联产品,,在特定的生长条件下天然出现在几种微生物中。能够同时产生多聚糖和PHA的微生物的例子包括:根瘤菌属(如苜蓿根瘤菌)的细菌,它们积累细胞内聚丁酸(PHB)的存储量并且产生由葡萄糖、半乳糖和葡萄糖醛酸组成的细胞外多聚糖(Tavernier et al.,1997);棕色固氮菌和绿脓杆菌的细菌,其产生细胞外多聚糖、藻酸盐且积累细胞内PHB(Galindo et al.,2007;Pham et al.,2004)。本发明的制造方法可以被用于产生名为PHA的细胞内聚合物,同时伴随产生富半乳糖细胞外聚合物的产品。

[0028] 细胞外微生物多聚糖的回收通常包含细胞的分离,其伴随通过易溶于水而聚合物不溶于其中的溶剂的增加来沉淀聚合物(EP0410604)。根据聚合物的预期使用,还可以经历额外的提纯处理。另一方面,存在不需要很高的纯度且聚合物可以直接取自培养基流体的应用(如US2006/0147582)。

[0029] 多聚糖被使用在大规模应用中,如在医药和食品、制药和化工工业(US0197877A1)。

[0030] 在食品业中,富半乳糖多聚糖可以用作增稠剂、接合剂、胶凝剂、织造、乳化和液体系统内的稳定剂,如色拉调味酱、醋、冰淇淋、番茄酱、芥末、脱水产品(如汤、调味汁、谷物和半流质餐)和肉类制品(如香肠)。在制药业中,富半乳糖多聚糖已经被用作接合剂和控制药物的释放。

[0031] 一些微生物多聚糖表现出絮凝化活性,并且可以单独使用或与其他聚合物如壳多糖衍生物、半乳甘露聚糖、葡甘露聚糖、藻酸盐和淀粉混合使用(EP0471597A1)。絮凝剂在胶体和细胞聚集中是有用的,如目前在水处理和食品和采矿业的工业应用中被使用。无机的和有机合成的絮凝剂是便宜的产品,但是其有低的生物降解能力。另一方面,它们中的一部分对人体健康是有危险的,即聚丙烯酰胺,它的单体是毒害神经的;和聚尿苷酸(氯化铝)导致阿尔茨海默病。尽管天然的絮凝剂通常具有较低的絮凝活性,但是它们是安全和生物可降解的,而且其应用在不久的将来一定会增加。

[0032] 像多聚糖这样的由微生物制得的聚合化合物中的大部分具有固化有毒金属的能力。这种能力依赖于生物聚合物的化学成分和分子结构。如海藻盐和黄源胶的细菌多聚糖能够固化铜化物(如钷)形成抗蚀材料聚集体。利用微生物多聚糖除去被污染的土壤和水中的有毒金属具有相当的潜在可能性,而且在这方面的关注日益增加。

[0033] 名为瓜尔胶的富半乳糖多聚糖,目前应用于其他领域,如:用于造纸业,以增强纸的性能(用于印刷的纸的强度和表面的改进);用于爆破业,在浆状炸药中作为接合剂以及在棒状炸药(如硝酸铵、硝化甘油)中作为耐水剂;用于石油业,在钻井机中作为悬浮剂;在基材生法中成为使用的泥浆的增稠剂部分;以及在纺织业,作为模压的增稠剂。

[0034] 由于多聚糖的生物降解能力,它们也被发现应用于包装的制膜准备中。如藻酸盐、

壳聚糖、淀粉、胶凝糖和胶质的生物高聚物都已经应用于食物包装用可降解薄膜的开发中，因为它们呈现出低的透气（二氧化碳和氧气）性。

[0035] 富半乳糖多聚糖也能转化为可用于食品行业的低聚糖（包含 2 至 10 个单体的聚合物）。对使用这些天然合成物作为益生元（无致癌物、不被消化以及在消化道内刺激有益显微植物群生长的低热量复合物）的关注日益增加，因为传统食物添加剂在消费者中正在变得不受欢迎。现在，获得大量低聚糖的最好方式是建立在使用物理处理（微波、加热、辐射、声波降解）、化学处理（酸解），酶反应（利用微生物酶）或通过特定的微生物反应降解多聚糖的基础上。

## 发明内容

[0036] 本发明涉及一种生物高聚物，它的主要成分是由半乳糖、葡萄糖、甘露糖和鼠李糖组成的高分子量的多聚糖。附加地，该多聚糖还可以包含微量戊醛糖、海藻糖、核糖、树胶醛糖和 / 或果糖以及如酰基的非糖类成分。本发明的聚合物不溶于有机溶剂且形成具有假塑性流体力学性的高黏性水溶液。在水溶液中的聚合物的黏性在 pH 范围 3-10 中是稳定的，当温度从 0℃ 增加至 100℃ 时黏性降低。本发明的聚合物具有絮凝化和乳化活性，而且具有形成薄膜的能力。

[0037] 本发明还描述了通过在通风且搅拌的生物反应器中利用丙三醇或富丙三醇物质作为碳源进行微生物发酵制造富半乳糖多聚物的制造方法。本发明的制造方法还预见了一些其他碳源（如糖、醇类、有机酸或烷类）作为丙三醇或与丙三醇混合物的供选物的使用。本发明的制造方法进一步预见了一些食物或工业废料例如产自生物柴油、乳清或橄榄油产品废物的富丙三醇产品的利用。

[0038] 在本发明的发酵过程中使用的微生物培养基是如来自假单胞菌属、克雷白氏杆菌属、甲基杆菌属、欧文氏菌属、产碱杆菌属、乳酸菌属、链球菌属或罗尔斯顿菌属的细菌。微生物培养基优选为食油假单胞菌菌株。只要它能够产生富半乳糖聚合物，微生物培养基可以是野生型微生物、变种或突变体。可以利用纯培养基或其中至少一种能够产生富半乳糖聚合物的几种微生物的混合培养基。

[0039] 用于产生富半乳糖聚合物的发酵过程由在通风的水营养培养基中生长微生物培养基组成。发酵以高氧溶解浓度开始，但是伴随着细胞质的增长，氧溶解浓度逐步降低并被控制在 30% 以下，优选的是 10% 以下或为零。富半乳糖聚合物在氮短缺和碳可用且同时保持低氧溶解浓度的条件下产生。

[0040] 本发明描述了在发酵过程的最后，通过在干燥工序之后直接利用培养基流体回收富半乳糖聚合物。本发明还描述了以其天然形式萃取富半乳糖聚合物的过程，以及提纯过程。本发明的聚合物的萃取过程由通过离心过滤培养基流体而分离细胞和随后通过加沉淀剂（例如乙醇、丙酮）进行的聚合物沉淀组成。聚合物提纯包含使用一种或多种额外的工序（例如聚合物水溶液的透析、超滤或过滤）。

[0041] 本发明还涉及富半乳糖聚合物在一些食品和工业应用（例如制药、采矿、造纸、纺织、爆破等等）中的使用，以及它作为低聚糖来源的应用和在生物可降解薄膜的制备中的应用。

## 附图说明

[0042] 图 1 为在 20°C、0.1M NaCl、浓度为 0.01g/ml 的条件下,在静应力扫描测试中测量的、与剪切速率对应的商用黄原胶(◇)、瓜尔胶(▽)、羧甲基纤维素(△)、藻酸盐(○)和富半乳糖聚合物(■)的溶液黏性。

[0043] 图 2 表示在为产生本发明的聚合物的发酵过程中碳源(丙三醇)和氮源(铵)的消耗、生物质的产量和天然聚合物的产量的时间过程。在发酵 20 小时之后将丙三醇和铵不断加入到生物反应器中。

[0044] 图 3 表示在发酵 96 小时时培养基流体的流变性质(黏性和应力应变相对剪切速率)。

## 具体实施方式

### [0045] 1、聚合物的特征

[0046] 本发明涉及一种生物高聚物,它的主要成分是高分子量(高于  $10^6$ )的杂多糖,包含半乳糖(50-90%)、葡萄糖(1-25%)、甘露糖(1-25%)和鼠李糖(0.5-20%)。附加地,本发明的多聚糖还可包含微量的戊醛糖、核糖、海藻糖、树胶醛糖和/或果糖。富半乳糖聚合物包含非糖成分:酰基即醋酸酯类、丙酮酸盐缩酮和琥珀酰半脂;和无机残留物即磷酸盐和金属阳离子。本发明的多聚糖的成分分析证实不存在糖醛酸和氨基糖。

[0047] 本发明的聚合物的物理性质即在水溶液中它的溶解性和它的黏性,与源于不同来源也就是植物(瓜尔胶,阿拉伯胶和胶质)、藻类(海藻酸钠、K-角叉胶和琼脂)和细菌(源自野油菜黄单胞菌的黄原胶和源自少动鞘氨醇单胞菌的结冷胶)的其他多聚糖相比较,结果已显示本发明的聚合物表现与提及的不同多聚糖相似,其不溶于有机化合物(如己烷、正丁醇、乙酸乙脂、三氯甲烷和甲苯)而且形成黏性水溶液。

[0048] 考虑到它在水溶液中的黏性,富半乳糖聚合物表现为随着剪切速率的升高具有降低的黏性和增加的剪切应力的假塑性流体。聚合物水溶液的黏性在 pH3-11 范围内几乎是不变的,因较低或较高 pH 值而部分降低。溶液黏性的降低与处于 pH 低于 3 或高于 11 状态时聚合物的部分降解有关。当温度从 100°C 降低到 4°C 时聚合物水溶液的黏度增加。在高温(80-100°C)和高压处理(在 120°C 和 1 巴下 20 分钟)后富半乳糖聚合物保持其假塑性流体的表现。

[0049] 富半乳糖聚合物溶液在接近 5Pa·s 的零剪切黏性的低剪切速率处显示出牛顿特性,但是剪切速率超过  $1s^{-1}$ (图 1)时观察到剪切降黏特性。这一流动特性实际上与瓜尔胶溶液展示的相似。就黏性增强的性能而言,本发明的聚合物的表现比羧甲基纤维素和藻酸盐更好,因为后者显示比较小的零剪切黏性和更少的剪切降黏。相反地,富半乳糖聚合物溶液比黄原胶溶液具有更小的黏性。

[0050] 富半乳糖聚合物具有絮凝化和乳化活性,而且具有形成薄膜的能力。

### [0051] 2、聚合物生产

#### [0052] 2.1 微生物培养基

[0053] 富半乳糖聚合物是通过微生物发酵获得的。微生物培养基可以是属于下面菌属中的一种细菌:假单胞菌属、克雷白氏杆菌属、甲基杆菌属、欧文氏杆菌属、产碱杆菌属、乳酸菌属、链球菌属或罗尔斯顿菌属。微生物培养基优选的为食油假单胞菌菌株。

[0054] 微生物培养基可以是野生型微生物、变种或突变体,只要其具有产生富半乳糖聚合物的能力即可。替换地,可以使用纯培养基或其两种或更多种微生物的混合培养基,这两种或更多微生物中至少有一种具有产生本发明的富半乳糖聚合物的能力。

## [0055] 2.2 培养基

[0056] 在微生物发酵过程中使用的培养基由含有碳源、氮源和无机盐的营养水介质组成。碳源优选的是丙三醇或富丙三醇培养基。或者,碳源可以是单核、二聚的或低聚的糖(例如葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖),醇(例如甲醇、乙醇、木密糖、山梨醇),有机酸(例如柠檬酸、醋酸、苹果酸、琥珀酸、乳酸、辛酸盐),链烷(例如己烷、辛烷),或它们的混合物。碳源还可以是含有一种或多种上述成分的食物或工业废料,例如糖浆、产自柴油产品、乳清或橄榄油生产废料的富丙三醇产物。

[0057] 微生物发酵中使用的氮源可以是无机盐(例如氨盐、硝酸盐)、有机氮化合物(如尿素、氨基酸)或它们的混合物或含有氮化合物的食物或工业废料,例如豆粉、酵母膏、麦麸或尿素。

[0058] 除此以外,培养基中还包含由以下阴离子: $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ 组成的盐。培养基还包括微量的金属,如钠、钾、钙、钴、锰、铁和镁。

[0059] 描述的培养基仅仅说明可以用作培养基的物质的广大的多样性,这并不认为是限制性的。

## [0060] 2.3 发酵条件

[0061] 发酵过程是在通入压缩气体通风的条件下通过在上面描述的水营养培养基中加入微生物培养基开始的。温度控制在 $5^\circ\text{C}$ – $75^\circ\text{C}$ ,优选的为在 $26$ – $37^\circ\text{C}$ 之间,而且pH值控制在 $4.0$ – $9.0$ 之间,优选的为 $6.0$ – $7.5$ 之间。作为溶解氧浓度控制的方式,在发酵期间通风率保持恒定,数值在 $0.1$ – $2.0\text{vvm}$ 之间,也可以在 $0$ – $2\text{vvm}$ 内变化。

[0062] 在发酵过程的开始,溶解氧浓度保持在 $80\%$ 以上,以便促进细菌细胞生长。伴随细胞生长,溶解氧浓度从其等于或高于 $80\%$ 的初始值逐步降低至 $50\%$ 。然后,将成分与培养基相同或含比培养基高 $2$ – $5$ 倍碳源浓度的供给溶液脉动地或连续不断地加入培养基。当培养基进入静止生长期且产生聚合物时,供给溶液中可以不包含任何氮源。结果,培养基暴露在氮短缺(氮浓度为零或低于 $0.3\text{g/L}$ ,优选的是低于 $0.1\text{g/L}$ )和可用碳(碳浓度在 $10$ – $100\text{g/L}$ 之间,优选的为 $10$ – $20\text{g/L}$ 之间)的条件下。

[0063] 随着细胞生长溶解氧浓度逐步降低,达到小于 $30\%$ ,并从该时刻起通过机械搅拌自动变量在 $0$ – $2000$ 转/分之间优选为 $400$ – $800$ 转/分控制溶解氧浓度在 $30\%$ 以下,优选的是 $10\%$ 以下或甚至是达到 $0\%$ 。在这些条件下,即氮短缺和碳可用同时溶解氧浓度为零或小于 $10\%$ 的条件下,大约 $10$ – $30$ 小时内,培养基流体黏性急剧增加,这与富半乳糖聚合物的产生有关。

[0064] 依据黏度的增强,富半乳糖聚合物的产生可以保持在发酵 $96$ – $160$ 小时的期间。在发酵的某一时刻,培养基流体变为高黏的而且这将导致在生物反应器中混合、聚集、氧和热交换方面的均匀性的损失。依据培养基、运行条件和发酵时间,以及聚合物的提纯程度,聚合物的最高产量在 $1$ – $50\text{g/L}$ 之间变化。

[0065] 富半乳糖聚合物的生产过程导致细胞内生物高聚物的联产品,即相当于多达细胞干重 $60\%$ 的聚羟基烷酸酯。

### [0066] 3. 发酵产物的萃取和提纯

[0067] 在发酵结束后,可以简单地通过在高达 80℃ 的干燥或通过冷冻干燥直接从培养基流体中回收富半乳糖聚合物。

[0068] 替换地,天然形态的富半乳糖聚合物可以从培养基流体中沉淀析出,优选的是通过添加沉淀剂,该沉淀剂由聚合物不溶于其中的溶于水的溶剂组成,例如醇(如甲醇、乙醇、异丙醇)或酮(如丙酮)。通过向每升培养基流体中加入 1-5L 的沉淀剂沉淀出富半乳糖聚合物。聚合物与细胞和盐一同沉淀,并在温度高达 80℃ 时进行干燥或进行冷却干燥。替换地,沉淀的聚合物在干燥或冷却干燥之前可以溶解在水中。

[0069] 在可选的萃取工序中,以包含通过培养基流体的离心过滤(20000 转/分,30 分钟)脱除细胞,然后加入沉淀剂(每升培养基流体加入 1-5L 沉淀剂),沉淀聚合物的方式可以部分提纯聚合物。在离心过滤之前稀释培养基流体(每升培养基流体加入 1-9L 去离子水),使得脱除细胞容易进行。在沉淀析出或溶于水中之后,沉淀的聚合物可以在温度高达 80℃ 下干燥或冷冻干燥。

[0070] 为了获得更高纯度的聚合物,聚合物又经过一道或几道以下工序:从稀的水溶液(小于 1.0g/L)中再次沉淀析出聚合物;使用蛋白水解酶(如胰蛋白酶)或细胞裂解酶(如同工酶);加入蛋白质沉淀剂(如三氯乙酸)和/或核酸;以及透析、超滤或过滤聚合物的水溶液。在提纯工序之后,在沉淀析出或溶于水中之后,聚合物可以在温度高达 80℃ 时干燥或冷却干燥。

### [0071] 4. 富半乳糖聚合物的应用

[0072] 本发明描述的聚合物具有乳化和絮凝化活性,而且形成在 pH、离子强度和温度变动情况下具有稳定黏性的黏性溶液。这样,这种聚合物潜在地适用于与藻酸盐、角叉胶、瓜尔胶和黄原胶相同的领域,例如食品和制药行业,以及化妆品行业。

[0073] 富半乳糖聚合物可以单独或与如藻酸盐、角叉胶、瓜尔胶、胶凝糖和黄原胶的其他聚合物混合,用作增稠剂、接合剂、胶凝剂、乳化剂、纹理剂和悬浮剂。色拉味调料、醋、冰淇淋、番茄酱、芥末酱、果菜汁、脱水产品(如汤、调味汁、谷物)和肉类产品(如香肠和 full offes)是可以使用富半乳糖聚合物的食品产品的范例。

[0074] 这种聚合物也可以作为增稠剂应用于造纸行业,以便提高纸的表面密度且容易打印。与瓜尔胶类似,它可以增强纸张组织并提高纸张强度。

[0075] 富半乳糖聚合物在医药行业可以用作接合剂和崩解剂,并且在化妆品(如牙膏)中作为增稠剂。

[0076] 这种聚合物可以单独使用,也可与其他生物高聚物如淀粉、胶质、藻酸盐、角叉胶、麸质、胶凝糖和壳聚糖混合,用于生物可降解薄膜方面。因为这些薄膜具有低透气(氧和二氧化碳)性,所以它们比较适合作为特殊食品的包装材料。

[0077] 如壳聚糖、淀粉和瓜尔胶的多聚糖在可控药物释放的微球体的制备方面均已经被测试。本发明的聚合物可以单独使用或与其他聚合物混合使用。

[0078] 化学成分与本发明相似的多聚糖瓜尔胶,广泛应用在其他领域,如:

[0079] • 爆炸业,在鼓风浆中作为接合剂和和炸药柱(如硝酸铵和硝化甘油)中作为耐水剂。

[0080] • 石油工业,在钻井中作为悬浮剂。

[0081] • 基材生法,成为被使用的泥浆黏性部分中的一部分。

[0082] • 纺织印花,作为模压的增稠剂。

[0083] • 水处理和采矿业,作为絮凝剂。

[0084] 利用物理处理(微波、加热、辐射、超声波降解法)、化学处理(加酸水解)、酶反应(使用微生物酶),或通过特殊微生物的反应,富半乳糖聚合物还可以转化为低聚糖(聚合物包含 2-10 个单体)。获得的低聚糖可以具有益生元性质,该益生元性质包括在消化道内刺激显微植物群(双歧杆菌 e 乳酸杆菌),也包括抑制有害微生物(大肠杆菌,梭菌和沙门氏菌)的生长。另外,这些低聚糖具有治疗特性,即防止结肠癌和抗炎反应。

## 实施例

[0085] 实施例 1:通过在丙三醇中的食油假单胞菌发酵制造富半乳糖聚合物

[0086] 食油假单胞菌 NRRL B-14682 注入到 8 升营养培养基中。营养培养基的成分如表 1 描述。生物反应器(发酵罐 B-plus,赛多利斯)在下列条件下运行:温度控制在 30℃;通过自动加入 1 摩尔的 NaOH 或 1 摩尔的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 控制 pH 值为 6.75-7.00;恒定的通风率 4slpm(标准升每分),相当于 0.5vvm。随着细胞成长,溶解氧浓度由发酵开始时的 80% 逐步降低,在 20 小时内降至 50%。

[0087] 从那时开始,向培养基持续地加入(大约 21 毫升/分)供给溶液,该供给溶液的成分为除丙三醇的浓度为 200g/L 以外其余与表 1 描述的完全相同。以此方式,培养基暴露在氮短缺(铵浓度低于 0.3g/L)和碳可用(丙三醇浓度保持高于 20g/L)条件下。

[0088] 表 1 培养基成分

成分	浓度
丙三醇	25g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.8g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.7g/L
微量元素溶液 <sup>(1)</sup>	10mL
MgSO <sub>4</sub> 100 毫摩	10mL
(1) 微量元素溶液成分(对于 1L 氯化氢 1N): FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 2.78 g; MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 1.98 g; CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 2.81 g; CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 1.67 g; CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0.17 g; ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0.29 g)	

[0090] 随着细胞成长,溶解氧浓度逐步降低,除非其达到 10%(在发酵的 46 小时内),从那个时刻起,通过 400 到 800 转/分的搅拌率自动进行搅拌来控制溶解氧浓度低于 10%。在这样的条件下大约经过 20 小时,培养基流体黏性急剧增加,这是富半乳糖聚合物产生的结果。

[0091] 当原始形态的聚合物浓度达到 23g/L(图 2)时,富半乳糖聚合物的产生一直持续至发酵时间 96 小时。到那时,由于具有高的黏性,不可能长时间维持培养基流体的同质性,发酵过程结束。

[0092] 实施例 2:通过食油假单胞菌自丙三醇制得的富半乳糖聚合物的萃取和提纯

[0093] 在实施例 1 描述的发酵过程结束时,通过加入乙醇(1 升培养基流体加入 3 升 96%的乙醇),原始形态的富半乳糖聚合物自培养基流体中析出,该混合物被存储并保持在 -20℃达 1 小时。在这之后,析出的聚合物通过离心过滤(1000 转/分,5 分钟)回收,其中一部分在 37℃下干燥 48 小时,其余的冷冻干燥(24 小时)。通过干燥后的聚合物溶解于去电离水(浓度 1g/L),离心过滤(20000 转/分,30 分钟)以脱除细胞,依靠加入乙醇再次沉淀,最后冷却干燥的方式进一步提纯聚合物。

[0094] 实施例 3:通过食油假单胞菌自丙三醇制得的富半乳糖聚合物的化学分析

[0095] 经过实施例 1 描述的发酵过程和实施例 2 描述的萃取和提纯获得的聚合物的糖基成分通过酸甲酯化由试样制得单糖甲基配糖体的全氧三甲基硅烷基(三甲基硅烷)(TMS)衍生物的气相色谱质谱联合分析(GC/MS)进行测试。

[0096] 甲基配糖体首先开始于通过在 1 摩尔氯化氢在 80℃甲醇中甲醇分解(18-22 小时)干燥试样,然后在甲醇中与嘧啶和乙酸酐再氨基乙酰化(为检测氨基糖)。试样然后在 80℃(0.5 小时)通过 Tri-Sil(刺穿)处理被全氧三甲基硅烷基。四甲基硅烷甲基配糖体(TMS methyl glycosides)的气相质谱色谱联合分析在连接到一 5970MSD 的 HP5890 GC 气体色谱分析仪上进行,其使用 All Tech EC-I 熔融石英毛细管柱(30m×0.25mm ID)。在衍生之前纤维醇作为内标物被加入试样中(每个试样 20 μg)。单糖通过它们的保持时间与标准比较被识别,而且这些单糖的碳水化合物特性通过它们的质谱被证明。分析的试样包含大部分半乳糖,少量甘露糖、葡萄糖和鼠李糖,带有微量戊醛糖、核糖和 / 或海藻糖。

[0097] 对糖基连锁分析,干燥的试样被泛甲基化、解聚、使细胞减数分裂和乙酰化。必然发生部分甲基化的吡喃半乳糖醇乙酸酯(PMAAs)被气相色谱质谱联用仪(GC-MS)分析。最初,一份试样通过在干燥的二甲基亚砜(DMSO)中与氢氧化钠和碘甲烷反应被泛甲基化。为了帮助聚合物的完整的甲基化,泛甲基化被重复两次。接着试样检测,泛甲基材料用 2 摩尔三氟乙酸(TFA)溶解(在 121℃密封管中 2 小时),用 NaBD<sub>4</sub> 减数分裂,用乙酸酐或三氟乙酸乙酰基化。生成的 PMAAs 在被连接到 5970MSD(质量选择检测器,电子冲击电离模式)的 Hewlett Packard 5890 GC 上分析;在键合固相熔融石英毛细管柱 30 米管柱萃取装置(Supelco)2330 上进行分离。获得的结果显示聚合物具有高度复杂性而且可能是高度分枝。所有的单体均以吡喃糖环的形式存在。

[0098] 在富半乳糖聚合物中酰基的存在是通过检测有机酸的高性能液相色谱仪(HPLC)检测到的。提纯聚合物的干燥试样用 99%的三氟乙酸 TFA(2mL 聚合物的水溶液使用 25 μL 三氟乙酸,在 120℃下 2 小时)溶解,而且被高性能液相色谱仪分析,使用连接到紫外检测器的多孔性阴离子交换树脂 HPX-87H(酶标测定仪)。流动相在 50℃、流速 0.6mL/min 处是 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.01N)。几种有机酸被检测,其中如丙酮酸、醋酸和琥珀酸。酰基的含量根据聚合物的纯度而定,从原始聚合物至半纯聚合物至纯聚合物而减少。

[0099] 实施例 4:通过食油假单胞菌产自丙三醇的富半乳糖聚合物水溶液黏性的测量

[0100] 在实施例 1 描述的发酵过程中使用布氏数字黏度计测量培养基流体黏性。从获得

的结果能够断定由源自丙三醇的由食油假单胞菌制得的富半乳糖聚合物产生具有假塑性流体表现的溶液(图3)。

[0101] 在不同 pH 值下对用准备的提纯的聚合物准备的 0.5g/L 溶液的黏度进行测量。通过加入酸(HCl)或碱(NaOH)使得溶液的 pH 值在 2-13 之间变化。残余物的黏度在 pH3-11 范围内几乎不变(在 12rpm 时测量,为 6.0-7.0cps 之间),而且只有在 pH 值过低或过高时显示黏度降低(在 12rpm, pH 值为 2 和 13 的条件下,测量黏度平均数值为 2.5cps)。

[0102] 温度对黏度的影响也被评估。这项研究通过用 0.5g/L 的提纯聚合物溶液在 4℃至 100℃之间加热后冷却进行。水溶液的黏度从 100℃的 2.2cps 逐渐增加,到 4℃时黏度为 21.5cps(在 12rpm 的条件下测量黏度)。周围介质温度为 20-25℃时的黏度为 11.0-13.0cps(在 12rpm 的条件下测量)。

[0103] 实施例 5:利用自丙三醇用食油假单胞菌制得的富半乳糖聚合物制备生物可降解的薄膜

[0104] 如实施例 1 描述获得的富半乳糖聚合物被如下提取:离心过滤培养基流体以脱除细胞,带有三氯乙酸,TCA(总体积 275mL 中含有 25mL100%重量重量比的三氯乙酸溶液)的蛋白质沉淀和其通过离心过滤进行分离,最后聚合物用 96%的低温乙醇(1:3)析出,和冷却干燥(24 小时)。

[0105] 在搅拌条件下提纯的聚合物(0.5g)溶解于去离子水(100mL),直至形成均匀溶液。加入少量的叠氮化钠(0.1g)以阻止微生物生长。

[0106] 为了排除气泡,溶液被置于真空条件下。混合物然后被转移至铸造容器中并且在室温条件下干燥。薄膜形成,呈现厚度为 20-50±5 μm,具有与由名为藻酸盐、胶质和角叉胶的其他多聚糖获得的薄膜相似的外表。

[0107] 一试样被置于相对湿度 58%的干燥器中,包含 15.6%的水含量。在这些条件下,薄膜的杨氏模量为 107Mpa,拉伸强度为 21.2Mpa,断裂拉伸率为 3.6%而且玻璃化温度为 73℃。

[0108] 参考文献

[0109] Aucken HM,Wilkinson SG,Pitt TL(1998)Microbiol,144,639-653. Bramhachari PV,Dubey SK(2006)Lett Appl Microbiol,43,571-577. Bryan BA,Linhardt RJ,Daniels L(1986)Appl Env Microbiol,51(6),1304-1308.

[0110] Dermlim W, Prasertsan P, Doelle H(1999)Appl Microbiol Biotechnol,52, 698-703.

[0111] D' Haeze W, Glushka J, De Rycke R, Holsters M, Carlson RW(2004) MolMicrobiol,52(2),485-500.

[0112] Eastgate JA(2000)Mol Plant Pathol,1(6),325-329.

[0113] Faber EJ,Kamerling JP,Vliegenthart JFG(2001)Carbohydr Res,331,183-194.

[0114] Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espín G(2007)MicrobialCell Factories,6(7),1-16.

[0115] Hung C-C,Santischi PH,Gillow JB(2005)Carbohydr Pol,61,141-147.

[0116] Kim W-S,Schollmeyer M,Nimtz M,Wray V,Geider K(2002)Microbiology,148, 4015-4024.

- [0117] Lacroix RP, Duncan JR, Jenkins RP, Leitch RA, Perry JA, Richards JC(1993) *Infect Immun*, 61(1), 170-181.
- [0118] Minogue TD, Carlier AL, Koutsoudis MD, von Bodman SB(2005) *Mol Microbiol*, 56(1), 189-203.
- [0119] Nagaoka M, Shibata H, Kimura I, Hashimoto S, Kimura K, Sawada H, Yokokura T(1995) *Carbohydr Res*, 274, 245-249.
- [0120] Nagaoka M, Shibata H, Kimura I, Hashimoto S, Kimura K, Sawada H, Yokokura T(1996) *Carbohydr Res*, 281, 285-291.
- [0121] Osman SF, Fett WF(1989) *J Bacteriol*, 171(3), 1760-1762.
- [0122] Pham TH, Webb JS, Rehm BHA(2004) *Microbiology*, 150, 3405-3413.
- [0123] Ratto M, Verhoef R, Suihko M-L, Blanco A, Schols HA, Voragen AGJ, Wilting R, Siika-aho M, Buchert J(2006) *J Ind Biotechnol*, 33, 359-367.
- [0124] Tavernier P, Portais J, Nava S, Courtois J, Courtois B, Barbotin J(1997) *J Appl Environ Microbiol*, 63(1), 21-26.
- [0125] Tone-Shimokawa Y, Toida T, Kawashima T(1996) *J Bacteriol*, 178(1), 317-320.
- [0126] Vanhaverbeke C, Bosso C, Colin-Morel P, Gey C, Gamar-Nourani L, Blondeau K, Simonet J-M, Heyraud A(1998) *Carbohydr Res*, 314, 211-220.
- [0127] Vaningelgem F, Van der Meulen R, Zamfir M, Adriany T, Laws AP, De Vuyst L(2004) *Int Dairy Journal*, 14, 857-864.
- [0128] Verhoef R, Waard P, Schols HA, Siika-aho M, Voragen AGJ(2003) *Carbohydr Res*, 338, 1851-1859.
- [0129] Verhoef R, Schols HA, Blanco A, Siika-aho M, Ratto M, Buchert J, Lenon G, Voragen AGJ(2005) *Biotechnol Bioeng*, 91(1), 91-105.
- [0130] Whitfield C, Richards JC, Perry MB, Clarke BR, MacLean LL(1991) *J Bacteriol*, 174(15), 4913-4919.
- [0131] Yang Z(2000) *Academic Dissertation*, University of Helsinki.
- [0132] Yang BY, Brand J, Montgomery R(2001) *Carbohydr Res*, 331, 59-67.

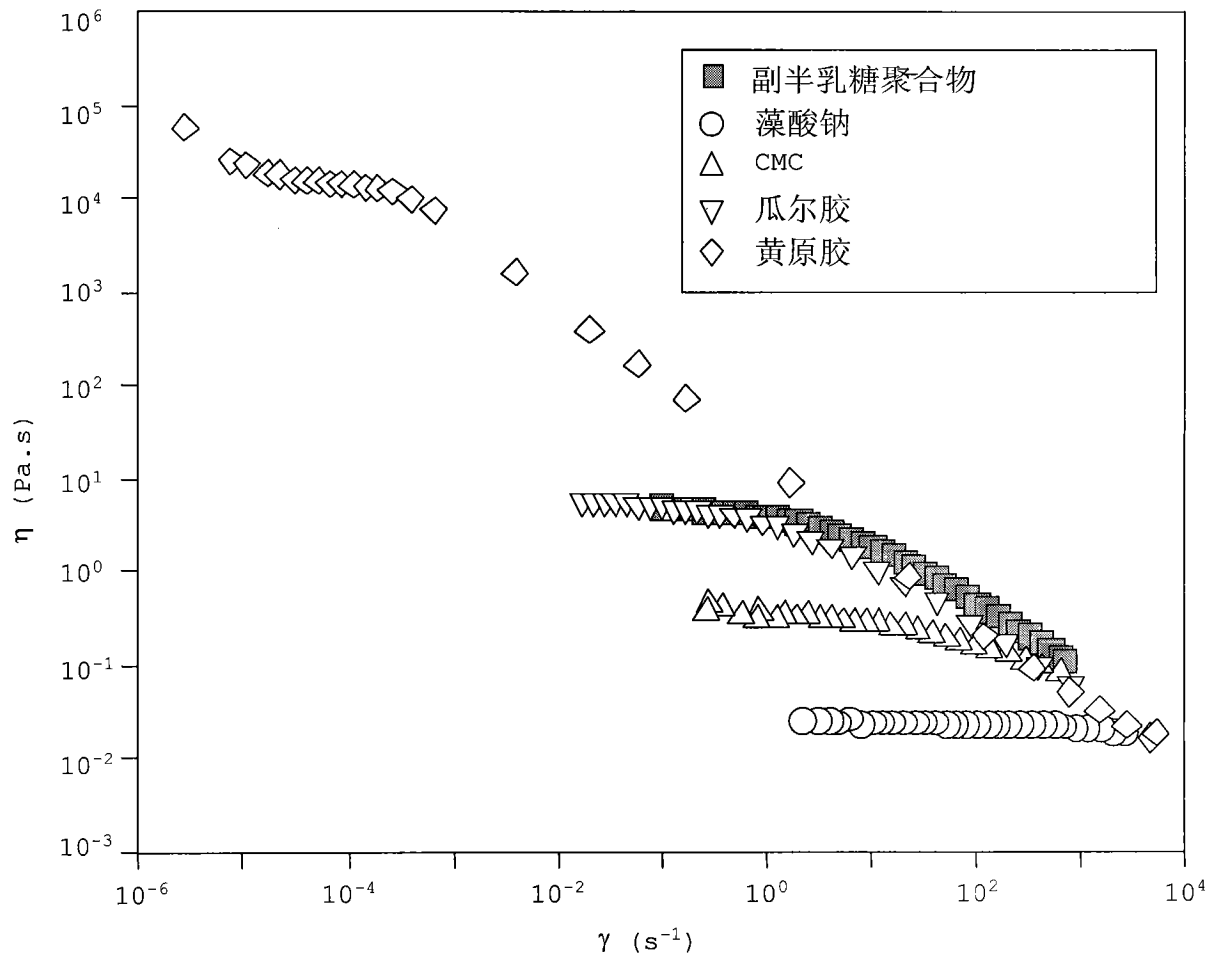


图 1

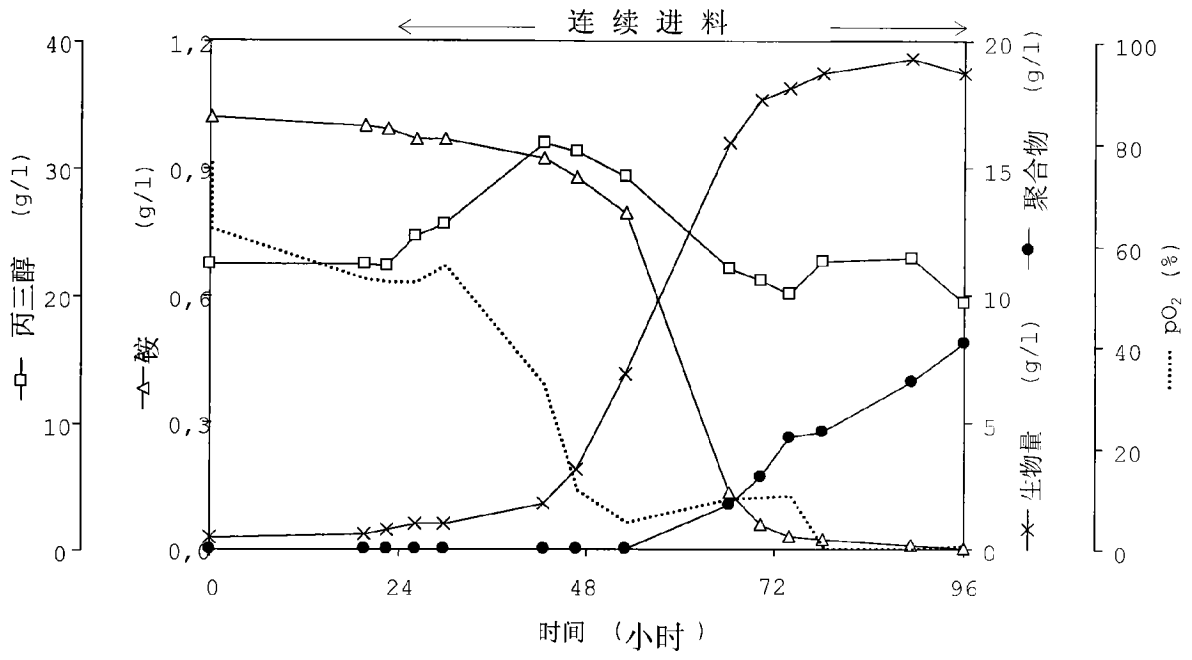


图 2

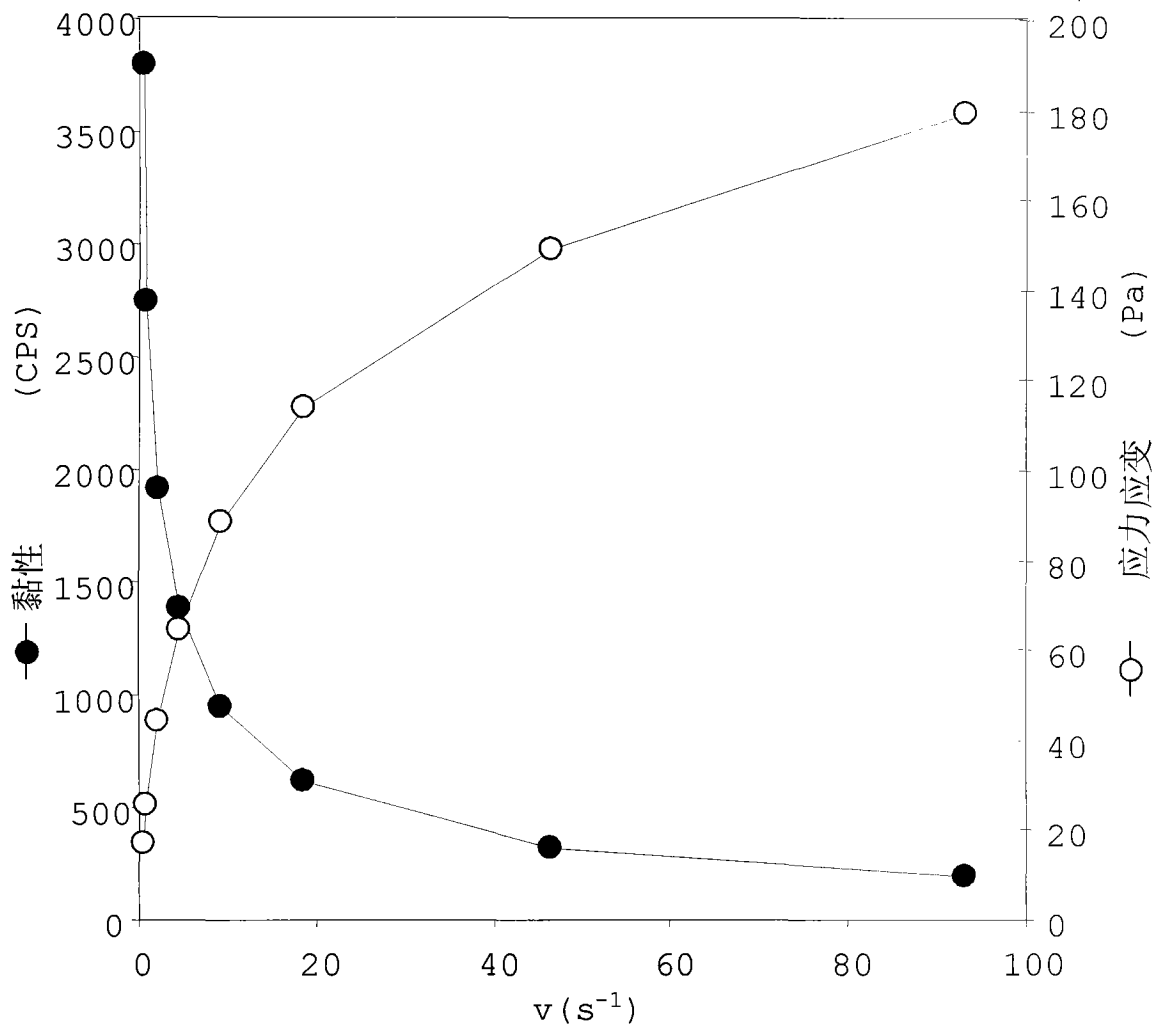


图 3