



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02823415.4

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100385008C

[22] 申请日 2002.9.26 [21] 申请号 02823415.4

[30] 优先权

[32] 2001.9.26 [33] JP [31] 293067/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/009958 2002.9.26

[87] 国际公布 WO2003/027304 日 2003.4.3

[85] 进入国家阶段日期 2004.5.25

[73] 专利权人 富士日本精糖株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 和田正 大口真央

[56] 参考文献

CN12888484A 2001.3.21

US5478732A 1995.12.26

审查员 高 雁

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘维升 刘 冬

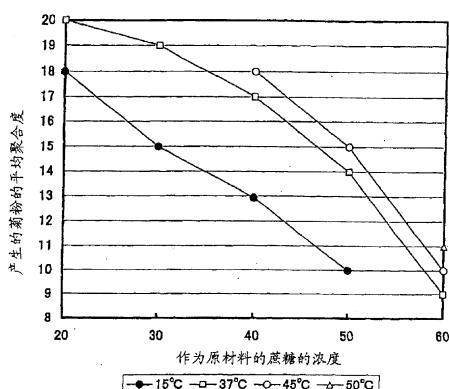
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 6 页

[54] 发明名称

制备菊粉的方法

[57] 摘要

本发明提供了通过使菊粉合酶接触蔗糖来制备菊粉的方法，其中：(1)通过控制蔗糖浓度来调节菊粉的平均聚合度；(2)通过控制上述接触时的温度来调节菊粉的平均聚合度；和/或(3)通过在上述菊粉合酶消耗上述蔗糖并且反应达到平衡状态时的阶段另外加入蔗糖，并且继续制备菊粉的反应。此外，本发明涉及通过所述制备方法获得的具有预定平均聚合度的菊粉。



1. 通过使菊粉合酶接触蔗糖而制备菊粉的方法，其中菊粉合酶具有作用和底物特异性，使得它对蔗糖作用产生菊粉，但是不对蔗果三糖，麦芽糖，乳糖，海藻糖和纤维二糖作用，并且其中通过控制蔗糖浓度来调节菊粉的平均聚合度。

2. 通过使菊粉合酶接触蔗糖而制备菊粉的方法，其中菊粉合酶具有作用和底物特异性，使得它对蔗糖作用产生菊粉，但是不对蔗果三糖，麦芽糖，乳糖，海藻糖和纤维二糖作用，并且其中通过控制接触时的温度来调节菊粉的平均聚合度。

3. 通过使菊粉合酶接触蔗糖而制备菊粉的方法，其中菊粉合酶具有作用和底物特异性，使得它对蔗糖作用产生菊粉，但是不对蔗果三糖，麦芽糖，乳糖，海藻糖和纤维二糖作用，并且其中通过在菊粉合酶消耗蔗糖并且反应达到平衡状态的阶段另外加入蔗糖，并且继续制备菊粉的反应，来提高菊粉的平均聚合度。

4. 权利要求 3 的制备菊粉的方法，其中反复进行蔗糖的另外加入。

5. 权利要求 1-4 的中任一项的制备菊粉的方法，其中菊粉合成酶是以产生菊粉合成酶的杆菌属 (*Bacillus*) 的微生物的培养液和培养细胞的形式，或者培养细胞、细胞提取物和固定细胞的破碎产物的形式应用。

6. 权利要求 5 的制备菊粉的方法，其中杆菌属的微生物是杆菌属的 217C-11 菌株。

7. 制备菊粉的方法，包括联合进行选自权利要求 1, 2 或 3 的方法中的两种或几种方法。

8. 具有预定平均聚合度在 8-25 之间的菊粉，其中聚合度范围在平均聚合度 ± 15 之内，并且其是使用权利要求 1-4、或 7 的任一项的方法获得的。

9. 具有预定平均聚合度在 8-25 之间的菊粉，其中聚合度范围在平均聚合度 ± 15 之内，并且其是使用权利要求 5 的方法获得的。

制备菊粉的方法

技术领域

本发明涉及通过引起菊粉合酶对蔗糖起作用而制备菊粉的方法，其中通过控制蔗糖浓度，控制反应时的温度，和 / 或另外加入蔗糖来调节菊粉的平均聚合度。本发明进一步涉及通过该制备方法获得的具有预定平均聚合度的菊粉。

背景技术

菊粉是一类多糖，广泛分布于自然界，已知在菊科植物例如大丽花，菊芋，和野生菊的块茎，和菊苣根中以胶体形式存在。菊粉的特征不同于淀粉的那些，例如事实上菊粉溶解于温水并且具有其中 D-呋喃果糖通过脱水作用而接着通过 β - (2→1) 键聚合到蔗糖的果糖侧链上的结构。聚合物根据果糖链长而不同。在从植物得到的菊粉的情况下，聚合度在大约 8 至 60 的范围内，平均聚合度（平均聚合程度）根据 The Iwanami Dictionary of Biological Science (Iwanami Seibutsugaku Jiten, IWANAMI SHOTEN, 第二版 (1978)) 所述在 32 和 34 之间，根据 Iwanami Dictionary of Physics and Chemistry (Iwanami Rikagaku Jiten, IWANAMI SHOTEN, 第三版 (1979)) 是大约 30。

菊粉引人注意是作为食用纤维，因为它是水溶性的并且难以消化。菊粉还具有促进双歧杆菌 (*Lactobacillus bifidus*) 生长的作用，因此近年随着健康取向急速发展，对其需求也在增长。国外主要常规制备菊粉。在国外，通过耕种植植物例如菊苣和菊芋并且将从根原料提取的汁干燥来制备菊粉，并且用作一般的食品原料。另一方面，在日本，这些植物的商业化种植是困难的，因此不生产菊粉。

因此，菊粉的获得必须依赖进口，而且价格比具有相似功能的其他家用物质更贵，这是工业化应用的障碍。此外，使用来自植物的菊粉还有其他问题：菊粉的产率根据收获条件而不同，因为其原材料是植物；在收获之后没有立即进行提取的情况下，菊粉含量由于自身消化或类似原因而降低。

此外，在来自植物的菊粉的情况下，由于其是通过将从植物提取

的汁初步分级分离之后将产品喷雾干燥而商品化的，所以菊粉的聚合度根据原料植物的性质而不同。因此，果糖链的聚合度范围宽，获得具有分散聚合度的菊粉（聚合度范围：大约 8 - 60），没有均一性。例如，Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35 (6), 525-552 (1995) 公开了通过 HPAEC-PAD 色谱法获得的说明来自各种各样的植物（大丽花，菊苣和菊芋）的聚合度的结果。多个峰证实来自植物的菊粉聚合度在大约 10 和 60 之间的宽范围，清楚地提示它们没有均一性。通过产生表现出根据其用途的具体聚合度高比例聚合度分布的菊粉会解决这个问题。但是，这非常难。

在使用菊粉中，当使用具有非常高聚合度的菊粉级分时，它在水中的溶解性不好，导致实际应用时不尽人意的情况。

除了上述从植物提取的方法之外，作为制备菊粉的方法，还有使用菊粉合酶化学制备菊粉或菊粉类似物的方法。例如，M. Luscher 等 (FEBS Letter 385, 39 (1996)) 报道了使用通过从植物提取而获得的酶从蔗糖制备菊粉的方法。该方法利用两种类型酶的协同作用，蔗糖：蔗糖 1-果糖基转移酶 (SST) 和 β -(2→1) 果聚糖： β -(2→1) 果聚糖 1-果糖基转移酶 (FFT)。但是，从植物体大量制备这些酶需要时间和努力，这样，工业化规模应用这种方法不现实。

此外，有人报道过制备菊粉类似物的方法，是引发微生物的酶起作用。例如，获得具有菊粉型结构的物质的方法被公开，涉及处理萨氏曲霉 (*Aspergillus sydowi*) 的分生孢子或细胞 (J. Biol. Chem., 43, 171 (1920); Agric. Biol. Chem., 37, (9), 2111, (1973); JP 专利公开 (KoKai) No. 61-187797A (1986); JP 专利公开 (KoKai) No. 5-308885A (1993))。此外，据报道，属于曲霉或镰孢属的微生物产生的酶，或者属于变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 的微生物产生的另一种酶分别产生菊粉类似物 (JP 专利申请 No. 55-40193; Acta. Chem. Scand., B28, 589)。利用这些微生物产生的酶产生的物质具有类似于菊粉的结构。但是，与从植物得到的菊粉相比较，它们的分子非常大，或者它们的结合形式不同，因此上述方法不是制备菊粉的方法。

我们的待审的专利申请 PCT/JP01/01133 中公开了利用来自微生物的酶制备菊粉的方法。这是制备具有相对均匀聚合度的菊粉的方

法，涉及使用蔗糖作为原材料并且引起一种新的菊粉合酶对其作用。利用这种方法，实现了利用来自微生物的酶制备菊粉的目的，获得了与从植物提取的菊粉相比具有相对均匀的平均聚合度（平均聚合度：8 - 20）的菊粉。但是，还没有只有效获得具有预定聚合度的菊粉的方法。

本发明概述

本发明的一个目的是提供一种能在通过引起菊粉合酶对蔗糖起作用而制备菊粉的方法中制备具有预定平均聚合度的菊粉的方法。

作为解决上述问题的大量研究的结果，我们发现，在使用菊粉合酶从蔗糖制备菊粉的反应中，通过控制蔗糖浓度，控制当菊粉合酶接触蔗糖时的温度，并且在反应期间另外加入蔗糖，能调节菊粉的平均聚合度，来完成本发明。

就是，本发明提供如下（1）至（9）。

（1）通过使菊粉合酶接触蔗糖来制备菊粉的方法，其中通过控制蔗糖浓度来调节菊粉的平均聚合度。

（2）通过使菊粉合酶接触蔗糖来制备菊粉的方法，其中通过控制接触温度来调节菊粉的平均聚合度。

（3）通过使菊粉合酶接触蔗糖来制备菊粉的方法，其中通过在上述菊粉合酶消耗上述蔗糖并且反应达到平衡状态时的阶段另外加入蔗糖，并且继续产生菊粉的反应，来提高菊粉的平均聚合度。

（4）（3）的制备菊粉的方法，其中反复进行另外的蔗糖加入。

（5）（1）至（4）任一项的制备菊粉的方法，其中菊粉合酶具有作用和底物特异性，使得它对蔗糖作用产生菊粉，但是不对蔗果三糖，麦芽糖，乳糖，海藻糖和纤维二糖作用。

（6）（1）至（5）任一项的制备菊粉的方法，其中菊粉合酶是产生菊粉合酶微生物的培养物溶液或培养细胞，或者其处理过的产物。

（7）制备菊粉的方法，包括联合实施选自（1），（2）和（3）的方法的两种或几种方法。

（8）制备具有预定平均聚合度的菊粉的方法，其中使用（1）至（7）任一项的方法。

（9）具有预定平均聚合度的菊粉，其是应用（1）至（7）任一

项的方法获得的。

本说明书包括在本申请优先权文件日本专利申请 No. 2001-293067 的说明书和 / 或附图中公开的内容的部分或全部。

附图的简要说明

图 1 说明蔗糖浓度和反应温度，和菊粉的平均聚合度之间的关系。

图 2 说明蔗糖的另外加入和菊粉的平均聚合度之间的关系。

图 3 说明蔗糖的另外加入次数和菊粉的平均聚合度之间的关系。
箭头指示另外的加入的时间。

图 4 说明本发明的菊粉（平均聚合度 = 17）的 HPLC 分析的结果。

图 5 说明来自植物的 RAFTILINE ST (平均聚合度 = 11, ORAFTI) 的 HPLC 分析的结果。

图 6 说明来自植物的 RAFTILINE HP (平均聚合度 = 22, ORAFTI) 的 HPLC 分析的结果。

实施本发明的最佳方式

下面进一步描述本发明的制备菊粉的方法。

本发明的方法包括在通过使菊粉合酶接触蔗糖产生菊粉的方法中调节菊粉的平均聚合度的各种实施方案。

在本发明中，“菊粉”意指一种多糖，其中 D-呋喃果糖通过脱水作用而接着通过 β - (2 → 1) 键聚合到蔗糖的果糖侧链上，并且其中两个或多个果糖分子聚合成葡萄糖。还包括其中聚合 2 - 4 个果糖分子具有低聚合度的果糖 - 糜糖。

短语“使菊粉合酶接触蔗糖”在这里意指向含有蔗糖作为碳源的培养基或类似物加入菊粉合酶，使得它们在其中它们能在反应溶液中使用作为底物的蔗糖产生菊粉的条件下反应。

任何酶可以用作菊粉合酶，只要它具有底物特异性，使得蔗糖可以用于菊粉合成。酶的一个例子是具有作用和底物特异性使得它对蔗糖作用产生菊粉，但是不对蔗果三糖，麦芽糖，乳糖，海藻糖和纤维二糖作用的菊粉合酶。

菊粉合酶的例子还包括产生酶的微生物的培养液或培养细胞，或者其处理过的产物。“培养细胞”意指在合适的条件下培养的上述微生物。它们可以是活细胞或冻干细胞，也可以是丙酮粉末形式或类似物。培养细胞的“处理过的产物”没有具体限制，只要本发明的酶能

被收集而不丧失其功能。包括，例如，上述培养细胞，细胞提取物，和固定细胞的破碎产物。培养细胞和细胞提取物的破碎产物指通过公知的破碎方法，例如超声方法，Dynomill 破碎方法，或者弗氏压碎器破碎方法，获得的物质和提取物。此外，固定细胞指通过公知的固定方法，例如，截留方法或载体结合方法，和如果需要，交联，而固定的上述细胞。截留方法的一个例子是使用天然聚合物例如角叉菜聚糖或藻酸的一种方法。

在上述菊粉合酶中，因为从产生菊粉合酶的微生物获得的菊粉合酶具有作用和底物特异性，使得它对蔗糖作用产生菊粉，但是不对蔗果三糖，麦芽糖，乳糖，海藻糖和纤维二糖作用，具体地说，可以使用从 PCT/JP01/01133 中描述的杆菌属 217C-11 菌株 (*Bacillus sp.* 217C-11 strain) (FERM BP-7450) 的培养液或培养细胞获得的那些。

下面简要描述培养杆菌属 217C-11 菌株和制备酶的方法。

作为要向培养基中加入的碳源，可以以合适的浓度使用一般使用的任何碳源。例如，可以单独或联合使用糖，例如蔗糖，葡萄糖，果糖或麦芽糖。当使用菌株制备利用蔗糖作为底物产生菊粉的酶时，最优先的碳源是蔗糖。通过使用含有蔗糖作为主要碳源的液体培养基培养菌株，酶活性得到改善。当然，也可以使用含有蔗糖的物质，例如原料糖或糖蜜。

作为氮源，除了有机氮源，例如蛋白胨，肉膏，酵母提取物，或者玉米浆之外，可以单独或联合使用无机氮源，例如硫酸、硝酸或磷酸的铵盐。作为无机盐，可以单独或联合使用硫酸、盐酸、碳酸、硝酸、磷酸等的钾盐、钠盐、钙盐、镁盐、锰盐、铁盐等。此外可以任选地适当地使用用于正常培养的营养物源或类似物源，例如氨基酸或维生素。作为在本发明的方法中适当使用的培养基，优选使用 pH7-8 含有 0.5% 至 2% (w/v) 蔗糖，1% 蛋白胨，0.5% 酵母提取物和 0.2% 磷酸二钾的液体培养基。

通过摇合培养或者使用小型发酵罐在需氧条件下进行培养。培养基的 pH 优选范围是 6 - 9，培养温度优选范围是 25°C 至 37°C，培养时间可以至少是微生物能增殖的时间，例如 5 - 96 小时，优选 15 - 72 小时。

可以在上述培养基中培养杆菌属 217C-11 菌株，可以通过离心去

除微生物，然后使用分级分离分子量为 30000 的超滤器浓缩培养上清液，这样，产物能被用作反应的酶溶液。

菊粉合酶，具有作用和底物特异性使得它对蔗糖作用产生菊粉，但是不对蔗果三糖，麦芽糖，乳糖，海藻糖和纤维二糖作用的菊粉合酶，包括从杆菌属 217C-11 菌株得到的酶具有下面物理化学性质。

分子量：45000 至 50000

最佳温度：40-50℃

热稳定性：超过 45℃ 开始逐渐失活，50℃ 时表现出 70% 残留活性，60℃ 时表现出 40% 残留活性

最佳 pH：7 - 8 (45℃)

pH 稳定性：pH6 或更高时稳定

菊粉合酶的浓度可以是反应溶液中蔗糖（底物）能够被充分利用的浓度。例如，40% - 60% (w/w) 蔗糖情况下，菊粉合酶的活性是 0.4 单位 / 毫升反应溶液的浓度是优选的。

关于使用蔗糖作为底物的产生菊粉的合适的 pH，优选使用 pH 范围是 6 - 8 之间的反应溶液。此外，为了保持反应溶液的 pH，也可以使用磷酸缓冲液。根据使用的菊粉合酶的量或其他条件适当变化反应时间，并且一般范围是 0.1 - 100 小时，优选 0.5 - 72 小时。

可以如下分析这样获得的菊粉的平均聚合度。聚合度以菊粉中糖单元（果糖和葡萄糖单元）的数目为基础。作为平均聚合度，例如，能应用通过一般分析方法例如 HPLC, GC, 或 HPAEC 而获得的分析结果中的峰顶。在这种情况下，作为柱子，可以使用例如，ULTRON PS-80N (8x300mm, SHINWA CHEMICAL INDUSTRIES 生产) (溶剂：水，流速：0.5 毫升 / 分钟，温度：50℃) 或 TSK-GEL G3000PWXL(7.8x300mm, TOSOH 生产) (溶剂：水，流速：0.5 毫升 / 分钟，温度：50℃)。使用示差折光率检测器作为检测器，并且利用使用例如 ORAFTI 的 RAFTILINE ST (平均聚合度 = 11) 和 RAFTILINE HP (平均聚合度 = 22) (来自植物的菊粉) 作为标准物质产生的校正曲线进行测定，证实产生的菊粉的聚合度。通过参考文献，例如 Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35 (6), 525-552 (1995)，也可以进行菊粉聚合度分析。

在本发明中，在上述菊粉制备方法中，通过 (1) 控制蔗糖浓度，

(2) 控制菊粉合酶与蔗糖接触时的温度，和(3)另外加入蔗糖，能调节要产生的菊粉的平均聚合度。

作为调节菊粉的平均聚合度的第一种方法，控制蔗糖浓度通过菊粉合酶与蔗糖接触而提供了一种制备菊粉的方法，其中通过控制蔗糖浓度来调节菊粉的平均聚合度。

本发明中使用的蔗糖浓度是，例如，3%至68% (w/w)之间的范围内，优选10%至60% (w/w)之间。通过将蔗糖浓度设定在低于上述范围之内，得到的菊粉的平均聚合度更高。例如，当反应温度是15℃时，用50%蔗糖浓度作为原材料获得的菊粉的平均聚合度是10，而用20%蔗糖浓度作为原材料获得的菊粉的平均聚合度是18。此外，当反应温度是37℃时，用60%蔗糖浓度作为原材料获得的菊粉的平均聚合度是9，而用20%蔗糖浓度作为原材料获得的菊粉的平均聚合度是20。因此，适当设置蔗糖浓度能产生具有期望的平均聚合度的菊粉。

作为调节菊粉的平均聚合度的第二种方法，在菊粉合酶接触蔗糖时控制温度，通过菊粉合酶与蔗糖接触而提供了一种制备菊粉的方法，其中通过控制接触时的温度来调节菊粉的平均聚合度。

菊粉合酶接触蔗糖时的反应温度范围是20-70℃，优选40-50℃。通过设置反应温度高于上述范围，得到的菊粉的平均聚合度变得更高。例如，当蔗糖浓度是50%时，15℃反应温度下菊粉的平均聚合度是10，而37℃反应温度下菊粉的平均聚合度是14。此外，当蔗糖浓度是30%时，15℃反应温度下菊粉的平均聚合度是15，而37℃反应温度下菊粉的平均聚合度是19。因此，适当设置反应温度能实现期望的菊粉的平均聚合度。

作为调节菊粉的平均聚合度的第三种方法，另外加入蔗糖，通过菊粉合酶与蔗糖接触而提供了一种制备菊粉的方法，其中通过在上述菊粉合酶消耗初始蔗糖并且反应达到平衡状态时的阶段另外加入蔗糖，这样继续产生菊粉的反应。

通过使菊粉合酶与最初加入的蔗糖接触开始制备菊粉之后另外加入蔗糖的时间是当观察到菊粉合酶的活性并且通过反应使蔗糖的消耗进行到某种程度的时候。这样的加入特别优选在合成反应达到平衡时的阶段进行。通过HPLC进行成分分析能证实反应进程。

另外加入的次数没有特别限制，只要保持菊粉合酶的活性和合成

反应持续，并且能根据期望的平均聚合度任意设置即可。为了获得具有高平均聚合度的菊粉，优选增加另外加入蔗糖的次数。

上述方法可以独立应用，或者可以联合应用两种或几种方法。

通过实施上述方法，能获得具有预定平均聚合度的菊粉。通过设置获得具有 8 至 25 之间的任何期望的平均聚合度的菊粉的最佳温度，接触的温度，和 / 或另外加入蔗糖，能获得具有预定平均聚合度的菊粉。通过例如设置蔗糖浓度为 50% 并且接触温度是 15°C，设置蔗糖浓度为 60% 并且接触温度是 45°C，或者设置蔗糖浓度为 60% 并且接触温度是 50°C，在反应中能获得具有 8 - 12 范围内的平均聚合度的菊粉。通过例如设置蔗糖浓度为 30% 并且接触温度是 15°C，设置蔗糖浓度为 40% 并且接触温度是 37°C，或者设置蔗糖浓度为 50% 并且接触温度是 45°C，能获得具有 13 - 18 范围内的平均聚合度的菊粉。此外，通过例如设置蔗糖浓度为 20% 并且接触温度是 37°C，设置蔗糖浓度为 30% 并且接触温度是 37°C，能获得具有 19 - 25 范围内的平均聚合度的菊粉。

这样获得的本发明的菊粉具有这样的质量使得它看起来果糖链长度聚合度分布中分散较小，并且是其中特定聚合度是高比例的尖峰分布。本说明书中聚合度分布指菊粉中果糖链长度聚合度最大值至最小值的分布范围。本发明的菊粉具有平均聚合度 ± 20 内的聚合度范围，并且优选在平均聚合度 ± 15 内。就聚合度分布中最大值至最小值范围来说，本发明的菊粉的聚合度为 35 或更小，优选 30 或更小。

实施例

用实施例具体描述本发明，但是这些实施例不是为了限制本发明的范围。

[实施例 1] 从杆菌属 217C-11 菌株制备酶溶液

30°C 下，在 pH7-8 含有 0.5% 至 2% (w/v) 蔗糖，1% 蛋白胨，0.5% 酵母提取物，0.2% 磷酸二钾和 0.05% 硫酸镁的液体培养基中摇合培养杆菌属 217C-11 菌株 (FERM BP-7450) 18 小时。

接着，向培养上清液加入固体硫酸铵，然后利用离心收集用 70% 饱和度沉淀的级分。然后将沉淀溶解于 pH7.0 的 20mM 磷酸缓冲液，然后加入透析管用相同的缓冲液充分透析，从而获得粗酶溶液。接着，对该粗酶溶液进行离子交换色谱法和凝胶过滤色谱法，使用 TOSOH 生产的 TSKgel DEAE TOYOPEARL 650 和 TOYOPEARL HW55 和 Pharmacia

生产的 Sephadryl S-300，根据标准方法操作，这样纯化本发明的菊粉合酶。该酶被用作反应的酶制剂。

[实施例 2] 通过控制蔗糖浓度和反应温度调节产生的菊粉的平均聚合度

制备反应溶液，其含有实施例 1 中制备的菊粉合酶 (2u/ml)，10mM 磷酸缓冲液 (pH7.0)，和用水调节使具有 20% (w/w)，30% (w/w)，40% (w/w)，50% (w/w)，或 60% (w/w) 最终浓度的蔗糖。将反应溶液置于恒温水浴中，分别设置 15°C，37°C，45°C，或 50°C，进行 48 小时反应。图 1 给出了产生的菊粉的平均聚合度结果。

作为结果，不考虑温度，随着反应溶液中蔗糖浓度的降低，产生的菊粉的平均聚合度变高。另外，相同蔗糖浓度情况下，证实产生的菊粉的平均聚合度随着反应温度的升高而增大。

[实施例 3] 通过另外加入蔗糖调节菊粉的平均聚合度

通过向 40 克蔗糖中加入水来制备 100 克反应溶液，并且将 2.4 - 4 克 30 u/ml 实施例 1 制备的菊粉合酶加到 500 毫升锥形瓶中，使得以 150rpm 搅拌溶液下进行反应（下文称作第一轮反应）。蔗糖消耗几乎停止时，向第一轮反应溶液加入 40% (w/w) 蔗糖，同时改变蔗糖的量，从 20 克至 100 克，并且继续反应，直到蔗糖消耗停止（下文称作第二轮反应）。另外，因为通过另外加入蔗糖稀释菊粉合酶，为了使加入的酶的所有最终浓度不变，在第一轮反应阶段加入的酶的量加以变化用于调节。

表 1 说明加入的菊粉合酶的量，反应时间，反应溶液的成分分析获得的值，和第一轮反应产生的菊粉的平均聚合度。表 2 说明另外加入的蔗糖的量，反应时间，反应溶液的成分分析获得的值，和第二轮反应产生的菊粉的平均聚合度。图 2 说明由于另外加入的蔗糖的量的不同产生的菊粉的平均聚合度的差异。作为结果，证实第一轮反应之后另外加入的蔗糖的量越高，产生的菊粉的平均聚合度越高。

表 1
第一轮反应的结果

酶的量 (g)	时间 (hr)	第一轮反应				
		菊粉	蔗糖	葡萄糖	果糖	DP(*)
2.4	22	44.8	7.7	44.1	2.3	16
2.8	20	44.8	7.6	44.2	2.3	16
3.2	18	44.8	7.5	44.3	2.3	16
3.6	16	44.7	7.5	44.3	2.3	16
4.0	14	44.7	7.5	44.3	2.3	16

DP=平均聚合度

表 2
第二轮反应的结果

另外加入 蔗糖 (g)	时间 (hr)	第2轮反应				
		菊粉	蔗糖	葡萄糖	果糖	DP(*)
20	16	44.4	8.5	44.0	2.4	17
40	18	44.0	9.1	43.9	2.3	18
60	20	43.6	9.5	43.9	2.3	19
80	22	43.2	10.3	43.5	2.3	20
100	24	43.5	9.6	43.9	2.4	20

DP=平均聚合度

[实施例 4] 通过控制另外加入蔗糖的次数调节产生的菊粉的平均聚合度

使用通过向 5 克蔗糖加入 0.25 毫升的 0.4M 磷酸缓冲液 (pH7) 和 4 克的 30u/ml 菊粉合酶并且用水将溶液重量调节至 10 克而制得的溶液在 60℃下进行第一轮反应。在第一轮反应中蔗糖消耗达到平衡态的阶段，另外每次各自加入 5 克 50% (w/w) 蔗糖溶液 (pH7)，这样继续第二轮反应。该程序重复四次，然后检测每次产生的菊粉的平均聚合度。图 3 给出了结果。从图 3 清楚地看到，随着另外加入蔗糖的次数的增加，菊粉的平均聚合度加大。通过四次另外加入获得的菊粉的平均聚合度达到 23。

[实施例 5] 检查聚合度分布

使用来自植物的菊粉 ORAFTI 的 RAFTILINE ST (平均聚合度 = 11) 和 RAFTILINE HP (平均聚合度 = 22) 作为标准物质产生的校正曲线测定产生的菊粉的聚合度，使用 TOSOH 生产的 TSK-GEL G3000PWXL (7.8x300mm) 作为柱子 (溶剂：水，流速：0.5 毫升 / 分钟，温度：50℃) 和示差折光率检测器作为检测器进行 HPLC 分析，证实本发明的菊粉的聚合度。比较本发明的菊粉和来自植物的菊粉的聚合度分布。图 4 说明本发明的菊粉的结果，图 5 和 6 分别说明 RAFTILINE ST (平均聚合度 = 11) 和 RAFTILINE HP (平均聚合度 = 22) 的结果。从这些结果清楚地看出，本发明的菊粉 (平均聚合度是 17) 表现出一个峰，这个峰比用作标准物质的来自植物的菊粉的峰更窄且更高。

对本发明的菊粉和来自植物的菊粉 RAFTILINE HP 测定了聚合度分布的具体范围。在本发明的平均聚合度是 17 的菊粉的情况下，聚合度分布范围是 4 - 30。另一方面，平均聚合度是 22 的 RAFTILINE HP 的情况下，聚合度分布范围是约 8 - 60，表明本发明的菊粉的链长的分布范围大约是 RAFTILINE HP 的一半。

因此，因为本发明的菊粉聚合度分布小，并且表现出具体聚合度高比例分布，所以说这种菊粉具有非常稳定的品质这一点是毋庸置疑的。

工业实用性

根据本发明，在通过使菊粉合酶接触蔗糖产生菊粉的菊粉的制备方法中，通过控制反应条件，包括蔗糖浓度和 / 或反应温度，或者一次或几次另外加入蔗糖，能任意制备具有特定平均聚合度的菊粉。作为结果，根据具体情况只收集具有期望的和最有效的平均聚合度的菊粉分级是可能的，这样获得的菊粉能根据其用途被进一步有效应用。

在这里引述的所有的公开出版物，专利文献，专利申请在此全文引作参考。

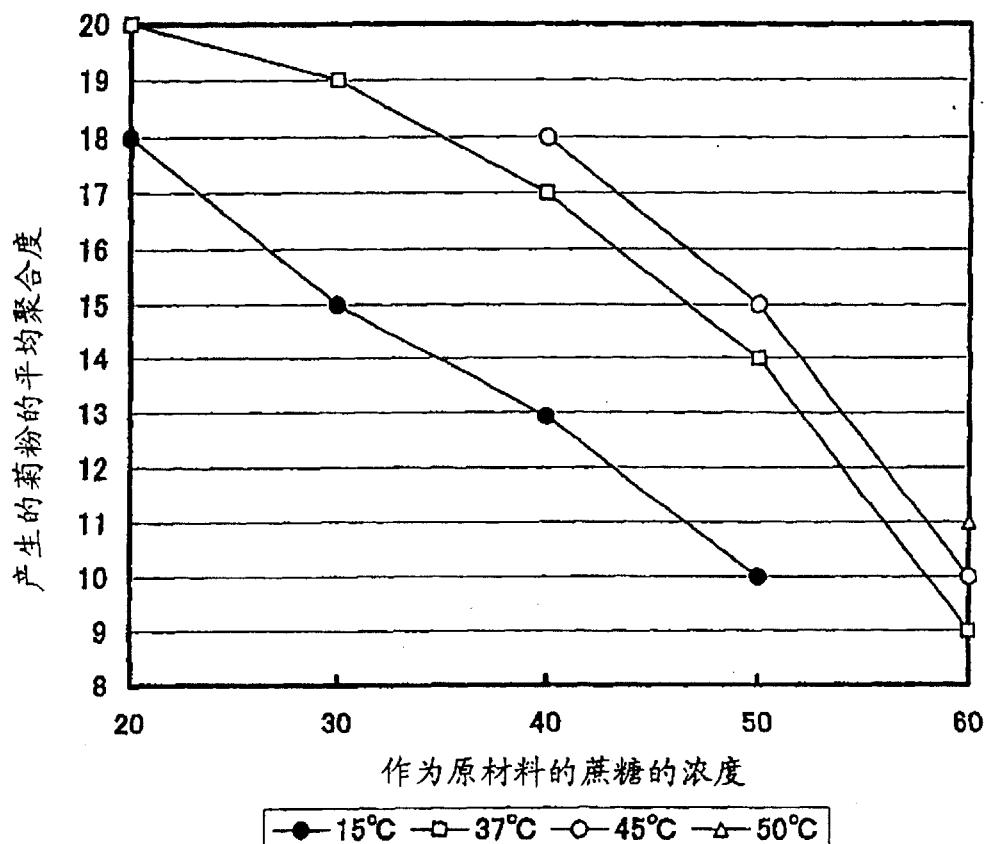


图 1

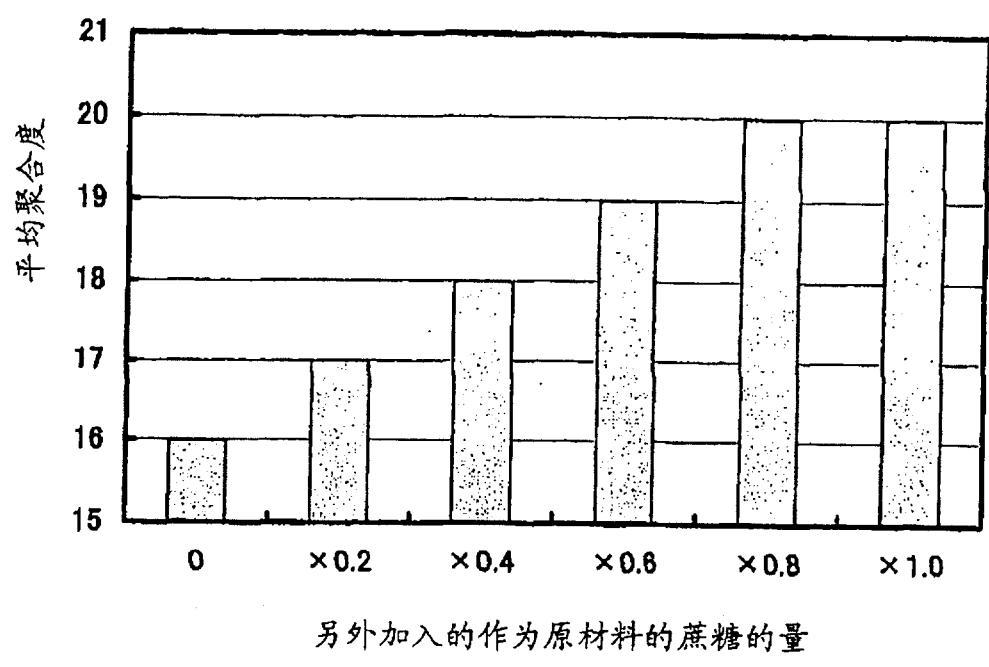


图 2

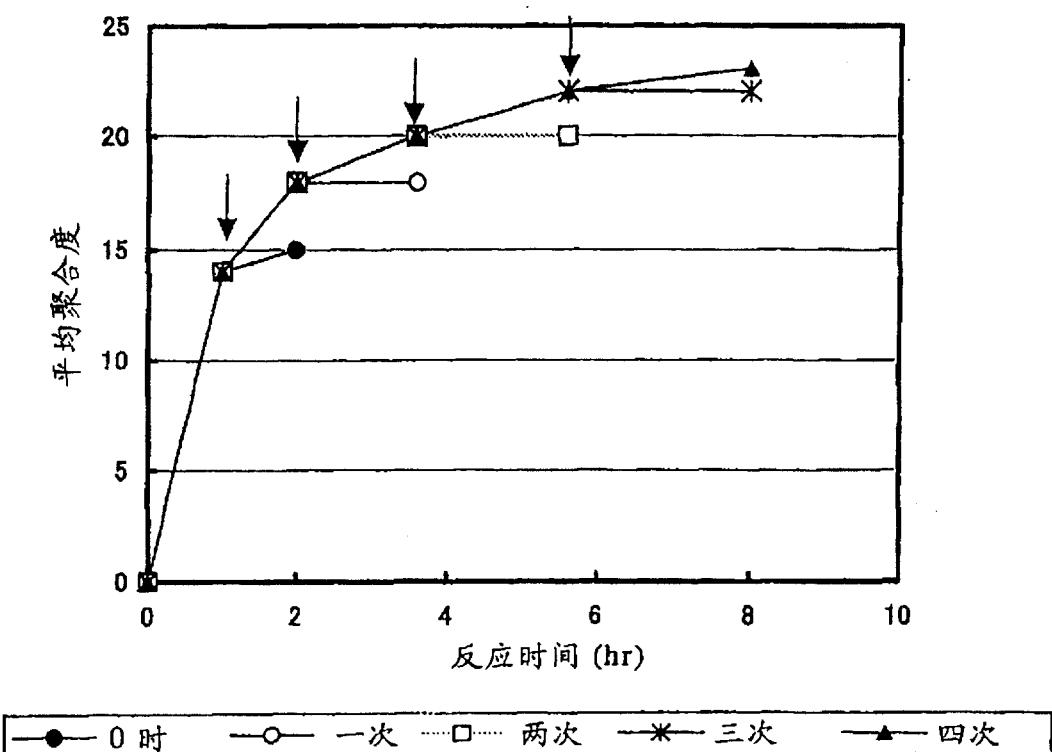


图 3

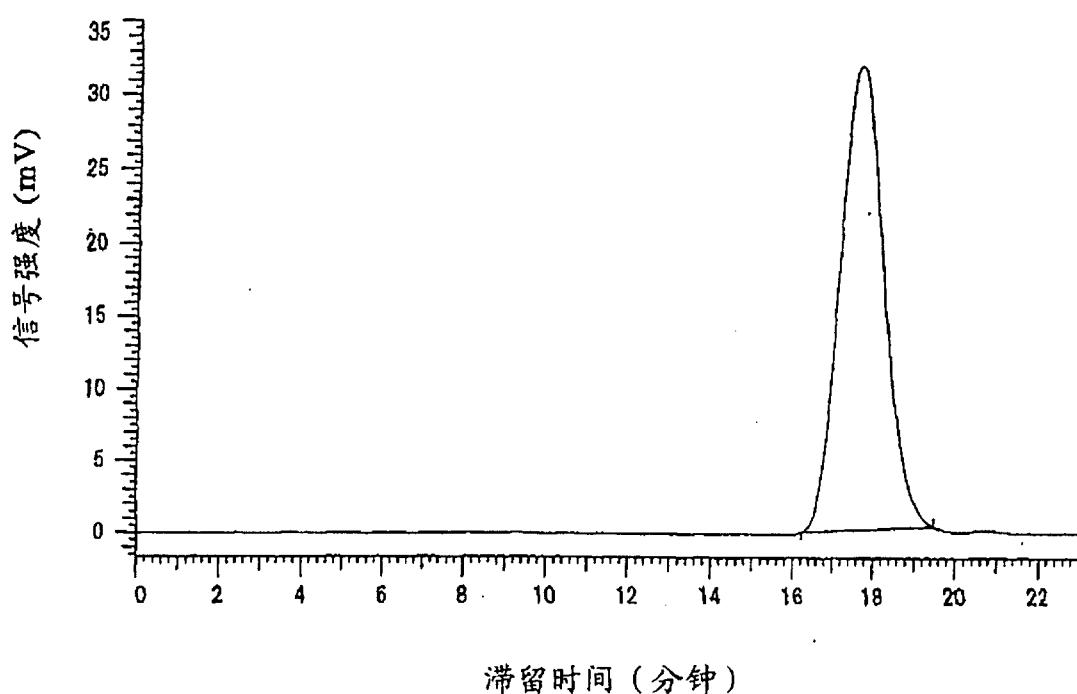


图 4

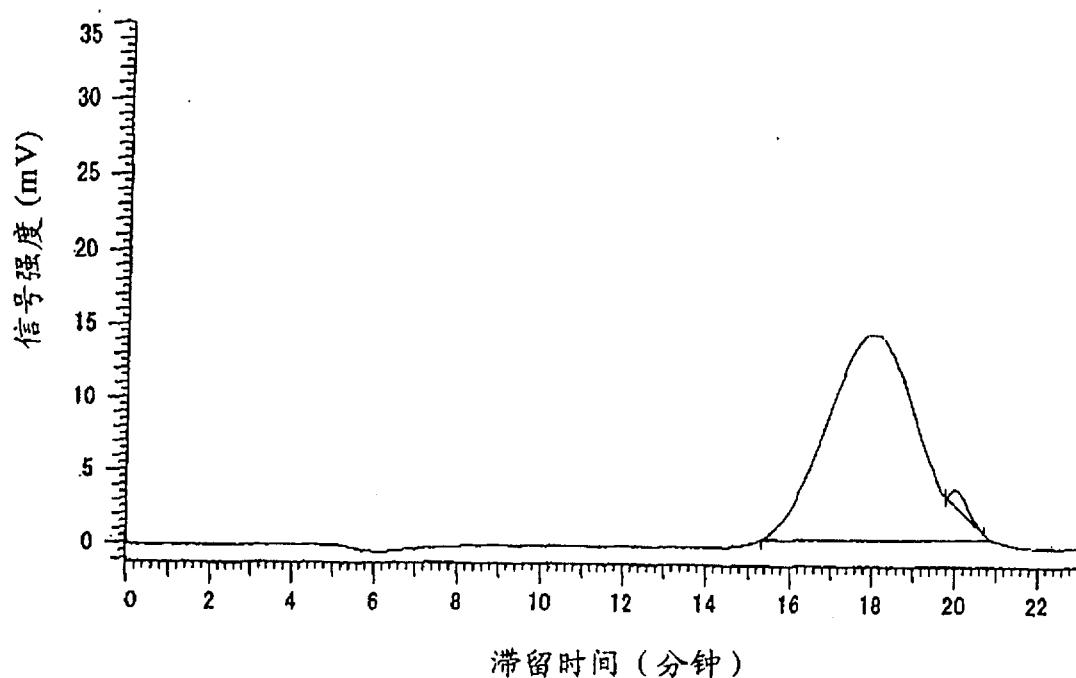


图 5

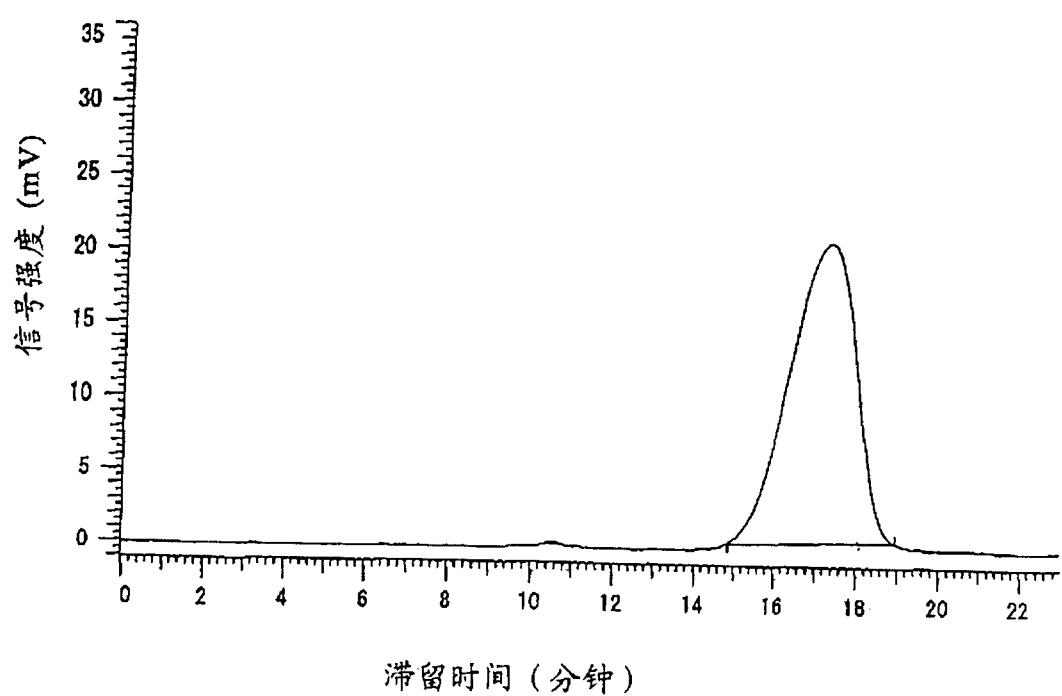


图 6