



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 90104813.5

[51] Int.Cl⁵

C08B 37/02

[43] 公开日 1991 年 2 月 6 日

[22] 申请日 90.7.17

[30] 优先权

[32] 89.7.17 [33] JP [31] 184311/89

[71] 申请人 武田药品工业株式会社

地址 日本大阪市

[72] 发明人 土师晃 桥本浩一

三柳一树 钟江幸洋

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 黄家伟

说明书页数: 7

附图页数:

[54] 发明名称 制备可热胶凝的 β -1,3-葡聚糖的方法

[57] 摘要

通过一定的方法将非热胶凝性的 β -1,3-葡聚糖转变为可热胶凝的 β -1,3-葡聚糖,所述方法包括用碱溶解非热胶凝性的 β -1,3-葡聚糖,调节此溶的 pH 使其不超过 10,从而沉淀出可热胶凝的 β -1,3-葡聚糖。

<21>

权 利 要 求 书

1. 一种制备可热凝胶 β -1,3-葡聚糖的方法, 包括用碱溶解非热胶凝性的 β -1,3-葡聚糖, 调节该溶液的pH使其不超过10, 从而沉淀出可热胶凝的 β -1,3-葡聚糖。

2. 按权利要求1的方法, 其中用碱处理含非热胶凝性 β -1,3-葡聚糖的细胞的湿法破裂产物, 溶解该葡聚糖, 除去不溶物, 从而得到所述溶液。

3. 按权利要求1的方法, 其中所述碱是碱金属氢氧化物或氢氧化铵。

4. 按权利要求2的方法, 其中所述细胞是原生动物的细胞。

5. 按权利要求2的方法, 其中不溶物是通过发泡除去的。

6. 按权利要求3的方法, 其中所述碱金属氢氧化物是氢氧化钠, 氢氧化钾或氢氧化锂。

7. 按权利要求4的方法, 其中眼虫属原生动物是*Euglena gracilis* klebs NIES-480。

制备可热胶凝的 β -1,3-葡聚糖的方法

本发明涉及一种制备可热胶凝的 β -1,3-葡聚糖的方法,该葡聚糖可在食品及化学工业领域应用。

在自然界中,存在许多含有非热胶凝性 β -1,3-葡聚糖颗粒的细胞。例如,已经存在从眼虫属(一种原生动物属)回收这种葡聚糖颗粒的已知方法(日本专利公开号37279/1989)。这些葡聚糖颗粒结晶度很高,其特征是在热水中不溶胀(Carbohydrate Research, 75(1979) 231-242)。另一方面,作为一种由(例如)产碱杆菌属或土壤杆菌属的微生物胞外排泄的 β -1,3-葡聚,已知有Curdian,于热水中加热时,它会凝胶(New Food Industry, 20, 49, 1978)。

如上所述,存在两种 β -1,3-葡聚糖,即非热胶凝性的 β -1,3-葡聚糖和可热胶凝性的 β -1,3-葡聚糖。

非热胶凝性的 β -1,3-葡聚糖在诸如凝胶性、保水性、粘合性等方面无法起到Curdian的作用。目前还没有通过从细胞获得的非热胶凝性 β -1,3-葡聚糖制备可热胶凝的 β -1,3-葡聚糖的工业化方法。

本发明涉及一种制备可热胶凝的 β -1,3-葡聚糖的方法,该方法包括将非热胶凝性 β -1,3-葡聚糖溶于碱中,调节该溶液的pH,使其不超过10,从而沉淀出可热胶凝的 β -1,3-葡聚糖。

本发明所用的非热胶凝性 β -1,3-葡聚糖颗粒是通过常规方法从含有这种葡聚糖颗粒的动物、植物、微生物等的细胞中得到的。所述的细胞最好通过培养原生动物(如眼虫属)获取,眼虫属原生动物的实例包

括 *Euglena gracilis* 和 *Euglena gracilis* Var *bacillaris*。

具体讲，可以提到下列菌株，如 *Euglena gracilis* Klebs NIES-47, *Euglena gracilis* Klebs NIES-48、*Euglena gracilis* Var *bacillaris* Pringsheim NIES-49 等。这些菌株是已知的原生动物，已保藏在 Global Environmental Forum at the National Institute of Pollution Research。

这些眼虫属原生物在受到 x 射线、紫外线或其它辐射时，或用诱变剂处理时，很容易发生突变。这些突变体只要具备在其细胞内积累非热胶凝性 β -1,3- 葡聚糖的能力，也可以用于本发明方法。

关于眼虫属原生动物培养基，可以提到的有 Koren-Hutner 培养基 (Koren, L. E. C., Hutner, S. H., Journal of Protozoology 14, Supplement 17, 1967)、Kuragano 培养基(日本专利公报号 58064/1985)和 Kitaoka 培养基(日本专利公报号 37297/1989)。通过令眼虫属原生动物在这种培养基中，或在该培养基的适当变体中生长，并收获该眼虫属原生动物细胞，可以得到含非热胶凝性的 β -1,3- 葡聚糖。

将含有一种 β -1,3- 葡聚糖的细胞湿法破裂，释放出非热胶凝性的 β -1,3- 葡聚糖颗粒。可采用压力为 300-600 千克/平方厘米的压力细胞分裂仪，或借助超声分裂仪实施上述破裂过程。然后用碱处理破裂的细胞，溶解非热胶凝性的 β -1,3- 葡聚糖颗粒。在进行这项处理时，可以事先将非热胶凝 β -1,3- 葡聚糖颗粒与破裂的细胞碎片相分离，也可以照原样使用既含所述葡聚糖颗粒又含破裂细胞的体系。在后一情况下，破裂细胞(它们是不溶性的)可以通过发泡工艺(下文将与碱溶解工艺一同介绍)去除，这种工艺具有适于工业生产的效率。实际上对所用的碱并没有任何限制，但一般采用氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化铵。溶解非热胶凝性 β -1,3- 葡聚糖颗粒所需的碱浓度一般不需要比 1N 高许多，但当体系中既含非热胶凝性 β -1,3- 葡聚糖又含细胞碎片

时,3-5N 的浓度是恰当的。因为这有助于产生泡沫。溶解工艺中非热胶凝性 β -1,3-葡聚糖的优选浓度约为0.1-1%(重量)。

将该非热胶凝性 β -1,3-葡聚糖颗粒溶解之后,去除碱不溶性部分。此不溶部分主要是眼虫属或其它细胞的碎片。通过向上述碱化体系鼓入空气,可产生泡沫,这些泡沫可将细胞碎片带走,从而高效率经济地除去不溶性物质。下文将更加详细地介绍这一工艺。

利用涡轮混合机或类似的机械,或借助于连续发泡机械,将空气压缩或鼓入含有破裂细胞的碱化淤浆中,从而产生泡沫。泡沫的体积一般不少于淤浆体积的30%,最好为50-70%。尽管在上述碱浓度下很容易产生泡沫,但为了稳该泡沫以便更加分散地将其除去,可以向体系中添加卵清蛋白(占淤浆体积的0.1-0.5%)或表面活性剂(如糖酯)。

最好于环境温度(20-30℃)对泡沫进行分离,形成离散界面所需的时间,即泡沫层形成时间,不大于3-4小时。可采用容器规模的间歇分离装置对泡沫进行分离,或者对于泡沫层或多或少有些不稳定的体系,采用包括细长容器的连续分离装置。

通过上述处理得到不含不溶物的非热胶凝性 β -1,3-葡聚糖溶液。然后将此溶液pH调至10或低于10,使 β -1,3-葡聚糖析出。在考虑对 β -1,3-葡聚糖进行沉淀时,该沉淀过程宜在中性pH范围进行,最好在pH为6-6.5范围进行。尽管可以选择性地采用适当的pH调节剂,但一般使用无机酸较好,例如,盐酸、硫酸、硝酸和磷酸。上述沉淀出的 β -1,3

葡聚糖是可热胶凝的,从商业角度考虑,最好将其进一步脱盐、浓缩并干燥,以便将其制成粉末。举例讲,用离心法对含有沉淀葡聚糖的上述溶液进行浓缩,用水洗涤,得到脱盐的浓缩物(2-4%)。可对此浓缩物进行喷雾干燥,得到干燥粉末,或者经冻干,在亲水有机溶剂中解冻,脱水,真空加热干燥,得到干燥粉末。

按本发明制备的 β -1,3-葡聚糖是可热胶凝的,与副淀粉和其它已

知的非热胶凝性 β -1,3-葡聚糖不同。利用一特性,可将其更加有利地用于食品和化学工业。例如,它可以用于与Curdian 相同的应用领域。

下面的实例进一步说明本发明。

例 1

向一个5 升发酵缸中添加3 升Koren-Hutner培养基,然后于121 °C 灭菌20分钟。用150 毫升处于同样的培养基中的*Euglena gracilis* klebs NIES-48 培养种接种该发酵缸。于28 °C,400 转/ 分的转速,1升/ 分通气量的条件下,于暗处培养96小时。两个发酵缸得到6.15升培养肉汤。细胞的产率为2%(以干重为基准),这种干产物含20%的 β -1,3-葡聚糖。

(1) 利用台式离心机(型号PS-18GL,Tomy Precision Industries, Ltd,Japan),于6000 转/ 分转速下对5.0 升上述培养肉汤进行离心浓缩,得到一千克浓缩的眼虫属膏状物。

(2) 向此湿细胞膏状物添加足量的水,使总量达到2 升,利用高压匀浆器(商品名:Manton - Gaulin,APV Gaulin,美国产)于300 个大气压下对该混合物进行匀化,从而将该眼虫属细胞破碎,并释放出葡聚糖颗粒。

(3) 向所得的含破裂细胞的浆液中添加30% 氢氧化钠,使其浓度达到3N,将该混合物加热到60 °C,所述 β -1,3-葡聚糖于4 小时内溶解。

(4) 将此碱化的破裂细胞溶液(3.5升) 冷却至约30 °C。然后添0.2% (体积) 非热胶凝性卵清蛋白(Takeda,Chemical Industries,Ltd. Japan 出产)。在一个涡轮搅拌器(5升) 中搅拌该混合物,以形成泡沫。当泡沫的体积达到进料体积的约50% 时,停止搅拌,体系静置3-4 小时。这样,原生动物细胞碎片和其它不溶物被吸收到泡沫中,并作为浮渣被除去。从该搅拌器的底部取出不含破裂细胞碎片的 β -1,3-葡聚糖溶液(约3.0 升) 。

(5) 用4N盐酸将该 β -1,3-葡聚糖溶液的pH调为6-6.5,以便沉淀出 β -1,3-葡聚糖。

(6) 用上述Tomy离心机对此含有沉淀葡聚糖的溶液进行离心浓缩(8000 转/分,10 分钟),得到一种中性浓缩物(含固量2.5%)。添加足量的水(使总体积达到3 升)重新将此浓缩物淤浆化,得到脱盐的中性浓缩物(含固量3%)。再次用水稀释该浓缩物,经过与上述相同的操作,得到300 克中性浓缩物(含固量3%)。

(7) 于-20 °C将上述浓缩物(300克)分批冻干,添加两倍于其体积的醇于室温将该浓缩物融化,接着用玻璃过滤器真空脱水,得到24克脱水产物(含固量为25%)。将此脱水产物于60 °C真空干燥,得到干燥的絮片。然后用台式粉碎机对该干絮片进行粉碎,得到1 克 β -1,3-葡聚糖粉末。

这种 β -1,3-葡聚糖粉末(样品1)的品质参数与碱处理之前的 β -1,3-葡聚糖颗粒(样品2)的品质参数均列于表1。

表 1 粉末的品质参数

	样品2	样品1
平均粒度(μ)	3	70
湿度(%)	2	5
溶解性(光学密度, 660nm)	-	80
燃烧后的残余量(%)	0.05	1.2
凝胶强度(克/ 平方厘米):		
2%浓度	不凝胶	160
3%浓度	不凝胶	400
4%浓度	不凝胶	750

凝胶强度: 向 β -1,3-葡聚糖添加10 毫升水,使之达到指定的浓度,用Potter's均混器对该混合物进行均化,并真脱气。将匀浆置于试

管(直径1.6 厘米)中,于沸水浴中加热10分钟。用自来水将试管冷却30分钟,将所得的凝胶切成10毫米高。用凝乳计(Iio Type, Iio Electric Co., Japan)测定此试样的凝胶强度。

从表1 的数据可以明显看到,得自眼虫属培养肉汤(属名:副淀粉)的 β -1,3-葡聚糖是非热胶凝性的,本发明方法制备的 β -1,3-葡聚糖是可热胶凝的,其凝胶强度可与通常的凝胶剂(琼脂,明胶,Curdlan 等)相比。

例2

采用5 升发酵缸,按与例1 相同的方式培养*Englena glacilis* Klebs NIES-48,得3.1 升培养肉汤。用自立式离心机(8000 转/分,10 分钟)对2 升上述肉汤进行离心浓缩,得到上述细胞的膏状物。用水稀释该细胞膏状物,使总体积达400 毫升,并用近距离声波定位器(T-A-4280,10kc,10分钟)进行处理,以便将细胞粉碎。

(1) 向200 毫升该淤浆中添加30% 氢氧化钠,使其浓度达到3N, β -1,3-葡聚糖颗粒于60℃在约5 小时内被溶解。用Tomy 离心机(8000 转/分,10 分钟)对该溶液进行离心分离,以除去不溶物。用35% HCl 将所得溶液中和至pH为6.0,将此中性溶液脱盐,并用Tomy 离心机(8000 转/分,10分钟)进行浓缩,得到约12克膏状物。用水稀释该膏状物,使总体积达200 毫升,经两次脱盐和浓缩,得12克脱盐的浓缩物。于-20℃冻干浓缩的膏状物,然后添加两倍于其体积的醇将其融化,经Nutsche 真空过滤脱水后,得1.4 克脱水产物。此脱水产物进一步于50℃真空干燥,得到一种多孔的淡绿色干燥产物。然后在研钵中对其进行粉碎,得0.5 克粉末。

(2) 在上述步骤(1) 中进行碱溶之前,用100%体积的99% 乙醇对该淤浆进行脱色,并用Tomy 离心机进行离心浓缩,得到脱色的破裂细胞膏状物。用水重新将该膏状物淤浆化,使总体积达200 毫升,用100%体积

的正己烷对其进行脱脂。水层经与步骤(1) 相同的处理, 得0.5 克多孔白色粉末。

分别将粉末(1) 和粉末(2) 分散在水中, 制成2%分散液, 然后进行均化, 于100 ℃加热, 冷却至环境温度。这些凝胶的凝胶强度分别为150 克/ 平方厘米和180 克/ 平方厘米。

按照上述方法, 可从由眼虫属得到的非热胶凝性 β -1,3- 葡聚糖制备可热胶凝的 β -1,3- 葡聚糖。

例3

在200 毫升1N氢氧化钠水溶液中溶解2 克副淀粉粉末, 同时进行搅拌, 用4N盐酸将该溶液的pH调至6.0, 从而沉淀出 β -1,3- 葡聚糖。用Tomy离心机(8000 转/ 分,10 分钟) 离心浓缩所得的中性淤浆, 用200 毫升水重新将浓缩物配成浆液。按与上述相同的方式离心浓缩此淤浆, 得50克膏状物。于-20 ℃冻干此膏状物, 添加200%体积的乙醇将其融化, 接着通过滤纸进行吸滤, 得8 克脱水产物。此产物进一步于60℃真空干燥, 得2 克多孔干燥产物。

按前述方法测定所得 β -1,3- 葡聚糖粉末的凝胶强度, 浓度为2%时其值为200 克/ 平方厘米。因此这种葡聚糖粉末是可热胶凝的, 原料副淀粉没有凝胶性。