

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

A21D 8/04
A23K 1/165 A23L 1/105
C12N 9/24

[21] 申请号 95192296.3

[43]公开日 1997 年 3 月 5 日

[11] 公开号 CN 1144457A

[22]申请日 95.2.24

[30]优先权

[32]94.3.2 [33]DK[31]0247/94

[86]国际申请 PCT/DK95/00082 95.2.24

[87]国际公布 WO95/23514 英 95.9.8

[85]进入国家阶段日期 96.9.26

[71]申请人 诺沃挪第克公司

地址 丹麦巴格司瓦德

[72]发明人 T·S·加克森 H·P·海德-哈森

L·V·考夫德 C·巴格尔

A·穆勒兹

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所

代理人 黄革生

权利要求书 4 页 说明书 23 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 用木聚糖酶处理植物材料

[57]摘要

本发明涉及减低植物材料粘度的方法，该方法包括用木聚糖酶处理植物材料，所述木聚糖酶具有 I. 所加入的每毫克蛋白质 WSPS 大于 0.06，和 / 或 II. 所加入的每毫克蛋白质 WSPU 大于 15 和 / 或 III. 比活性大于 0.053FVRU / mg 蛋白质。而且，本发明还涉及木聚糖酶制剂用于将植物材料（如小麦）分成有用的成分以及所述粘度降低或分离的方法。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1.降低植物材料粘度的方法,该方法包括用木聚糖酶处理所述植物材料,所述木聚糖酶具有

I.所加入的每毫克蛋白质的 WSPS 大于 0.06,和/或

II.所加入的每毫克蛋白质的 WSPU 大于 15,和/或

III.比活性大于 0.053FVRU/mg 蛋白质。

2.根据权利要求 1 的方法,其中所述的木聚糖酶处理是在 pH3—8 和/或温度 15—50℃ 的条件下进行。

3.将植物材料分成单个成分的方法,该方法包括用木聚糖酶处理所述植物材料,所述木聚糖酶具有

I.所加入的每毫克蛋白质的 WSPS 大于 0.06,和/或

II.所加入的每毫克蛋白质的 WSPU 大于 15,和/或

III.比活性大于 0.053FVRU/mg 蛋白质。

4.根据权利要求 1—3 中任何一个的方法,其中的植物是谷类植物,如小麦、大麦、黑麦、燕麦、大米和高粱。

5.根据权利要求 4 的方法,其中的谷类植物是小麦。

6.根据权利要求 3—5 中的任意一种方法,其中的谷类植物被分成含淀粉的和含蛋白质的成分。

7.根据权利要求 6 的方法,其中的谷类植物是被分成“A”型淀粉、“B”型淀粉和/或谷蛋白的小麦。

8.根据任何一个在前权利要求的方法,其中的木聚糖酶来源于微生物。

9.根据权利要求 7 的方法,其中的木聚糖酶来源于丝状真菌或酵母。

10.根据权利要求 9 的方法,其中的木聚糖酶来源于曲霉属、木霉属、青霉属、镰孢菌属或腐质霉属的菌株。

11.根据权利要求 10 的方法,其中的木聚糖酶来源于曲霉属菌株,特别是棘孢曲霉、泡盛曲霉、黑曲霉或米曲霉。

12. 根据权利要求 11 的方法, 其中的木聚糖酶由从棘孢曲霉 CBS101.43 的 DNA 文库中分离的 DNA 序列编码。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其中的木聚糖酶

I. 由 WO 94/21785 的 SEQ ID NO.2 所示 DNA 序列或其编码木聚糖酶 II 之同系物的类似物编码, 和/或

II. 含有 WO 94/21785 的 SEQ ID NO.5 所示氨基酸序列或其同源序列, 和/或

III. 与抗来自棘孢曲霉 CBS 101.43 之纯化木聚酶的抗体有免疫反应性。

14. 根据任何一个在前权利要求的方法, 其中将比活性至少为 10.000 EGU/FVRU 的含纤维素酶制剂与木聚糖酶结合使用。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中含纤维素酶制剂来源于微生物。

16. 根据权利要求 15 的方法, 其中含纤维素酶的制剂来源于丝状真菌或酵母菌。

17. 根据权利要求 16 的方法, 其中含纤维素酶的制剂来源于木霉属、曲霉属或腐质霉属。

18. 含木聚糖酶的制剂, 所述木聚糖酶具有:

I. 所加入的每毫克蛋白质的 WSPS 大于 0.06, 和/或

II. 所加入的每毫克蛋白质的 WSPU 大于 15, 和/或

III. 比活性大于 0.053FVRU/mg 蛋白质。

19. 根据权利要求 18 的制剂, 其中的木聚糖酶来源于微生物。

20. 根据权利要求 19 的制剂, 其中的木聚糖酶来源于丝状真菌或酵母菌。

21. 根据权利要求 20 的制剂, 其中的木聚糖酶来自曲霉属、土霉属、青霉属、镰孢菌属或腐质霉属的菌株。

22. 根据权利要求 21 的制剂, 其中的木聚糖酶来源于曲霉属菌属, 特别是棘孢曲霉、黑曲霉或米曲霉。

23. 根据权利要求 22 的制剂, 其中的木聚糖酶由自棘孢曲霉 CBS101.43 之 DNA 文库分离的 DNA 序列编码。

24. 根据权利要求 23 的 制剂, 其中的木聚糖酶

I. 由 SEQ ID NO.2 所示序列或其编码木聚糖酶 II 之同系物的类似物编码,

II. 含有 SEQ ID NO.5 所示氨基酸序列或其同源序列, 和/或

III. 与抗来自棘孢曲霉 CBS 101.43 之纯化木聚糖酶抗体有免疫反应性。

25. 根据权利要求 18—24 中任意的一种制剂, 其中的木聚糖酶由分离的单一成分酶制得。

26. 根据权利要求 18—25 中任意的一种制剂, 其中的木聚糖酶为 WO 94/21785 中的木聚糖酶 II。

27. 根据权利要求 18—25 中任意的一种制剂, 其中的木聚糖酶为 WO 94/21785 中的木聚糖酶 I。

28. 根据权利要求 27 的制剂, 其中的木聚糖酶是木聚糖酶 I 粉。

29. 根据权利要求 18—28 中任意的一种制剂, 含有比活性至少 10.000EGU/FVRU 的纤维素酶制剂。

30. 权利要求 18—29 中任意一种制剂用于降低植物材料的粘度。

31. 权利要求 18—29 中任意一种制剂用于分离谷类植物成分。

32. 根据权利要求 31 的用途, 其中的谷类植物包括小麦、大麦、黑麦、燕麦、大米和高粱。

33. 根据权利要求 32 的用途, 其中的谷类植物是小麦。

34. 根据权利要求 31 或 33 的用途, 其中的谷类植物被分成含淀粉的和含蛋白质的成分。

35. 根据权利要求 34 的用途, 其中的谷类植物是被分成“A”淀粉、“B”淀粉和谷蛋白的小麦。

36. 根据权利要求 18—29 中的任意一种制剂用于制备 β -葡聚糖。

37. 权利要求 18—29 中的任意一种制剂用于酿酒。

38. 权利要求 18—29 中的任意一种制剂用于制备动物饲料。

39. 根据权利要求 38 的用途, 是用于降低动物饲料的粘度。

40. 根据权利要求 38 和 39 的用途, 用于改善动物饲料的消化率。

41. 根据权利要求 38 或 39 的用途, 用于改善动物饲料的代谢能。

42. 根据权利要求 38—41 的任一用途, 其中的动物饲料是鸡饲料。

43. 根据权利要求 38—41 的任一用途, 其中的动物饲料是猪饲料。

说明书

用木聚糖酶处理植物材料

发明领域

本发明涉及木聚糖酶制剂用于减低植物材料的粘度和用于将植物材料(例如小麦)分成单个有用的成分,以及进行所述粘度降低或分离的方法。

发明背景

小麦含有谷蛋白和淀粉这些可在用湿磨法加工过程中回收的有价值成分。重要的谷蛋白是主要产物,而高质 A—淀粉和低质 B—淀粉是有价值的副产品。残余的纤维和可溶性固体物质是更进一步的副产品。

通过商售途径可得的 *Trichoderma reesei* 纤维素酶制剂 Spezyme[®]CP (Genencor, USA) 已被证明可以降低粘度和改善小麦和谷物淀粉的加工。

Weegels 等人(1992)描述了酶类(纤维素酶、半纤维素酶、脂酶和蛋白酶/淀粉酶)在小麦的分离处理中的应用。该文还得出结论:纤维素酶和半纤维素酶能改善小麦的加工特性和提高谷蛋白和淀粉的产率。所用的半纤维素酶是一种木聚糖酶制剂,该制剂含有包括淀粉酶和蛋白酶活性的显著附带活性。

已知木聚糖酶能够将小麦粉和来源于其它植物的材料降解成大量不同的降解产物。已有大量参考文献描述了从真菌泡盛曲霉中纯化的木聚糖酶,例如,可以参考公开了三株泡盛曲霉菌之内木聚糖酶理化和动力学特征的 Kormelink 等人的文章(1993)。通过将这类泡盛曲霉木聚糖酶应用于酶降解各种植物材料包括谷麸、燕麦裂壳、小麦粉、落叶松木和桦木所得的降解产物已在特别是下列文献中描述: Kormelink et al., (1991)、kormelink et al., (1992)、J. M. Kormelink and A. G. J. Voragen(1993)、Gruppen et al., (1992)和 Grmpfen et al., Rymposium 1993, 10。

Voragen 等人(1992)和 Gmippen 等人(1993a 和 1993b)公开了用泡盛曲霉内木聚糖酶降解从小麦粉分离的水可提取和水不可提取的阿拉伯糖基木聚糖部分。后一参考文献描述了两种泡盛曲霉木聚糖酶在小麦面包焙烤中的应用。

Shei 等人(1985)和 Fournier 等人(1985)描述了从黑曲霉中分离的内木聚糖酶之纯化和鉴定特征。

上述的参考文献无一介绍过木聚糖酶可用于小麦的分离,也没有说明如何选择专门用于所述目的的木聚糖酶。

Dusterhoft 等人(1993.10, 研讨会)描述了内木聚糖酶在降解动物饲料中非淀粉多糖中的应用; Vietor 等人(1993)描述了内木聚糖酶在啤酒酿造过程中用于降低麦芽汁的粘度。

本发明的目的在于提供改变植物材料粘度和将植物材料分成所需成分的改良方法。

附图的简要说明

图 1 表示木聚糖酶 II 和其它酶一起的比粘度。

图 2 表示湿磨小麦分离法的原理。

图 3 表示小麦在 Broiler 中的 AMEn。

BF + = Bio—Feed^RPlus

Xyl II = 木聚糖酶 II

本发明的简明公开

本发明人意外地发现, 木聚糖酶分别对水溶性和水不溶性戊聚糖的活性似乎对木聚糖酶降低植物材料粘度和/或分离植物材料成分很重要。本发明正是基于这一发现。

据此, 本发明的第一方面涉及木聚糖酶制剂用于改变植物材料的粘度, 其中, 木聚糖酶制剂表现为

- a. 所加入的每毫克蛋白质 WSPS 至少为 0.06 和/或
- b. 所加入的每毫克蛋白质 WSPU 至少为 15 和/或
- c. 比活性至少 0.053FVRU/mg 蛋白质。

本发明的第二重要方面涉及表现出上述特征 a) — c) 的木聚糖酶制剂。更进一步, 本发明涉及这类酶制剂的多种用途。

在本说明书中, WSPU(水溶性戊聚糖单位)定义为木聚糖酶制剂每毫克蛋白质对水溶性戊聚糖的活性, 而 WIPU(水不溶性单位)定义为木聚糖酶制剂每毫克蛋白对水不溶性戊聚糖的活性, 其中所述活性以还原糖检测。有关水溶性和水不溶性戊聚糖各自的产生之描述见于下文的材料与方法部分。在实施例 4 中描述了确定 WSPU 和 WIPU 的测定方法。WSPS 是每毫克所加入蛋白质 WSPU 和 WIPU 间的比, 其中的蛋白质是根据 Kjeldahl 的描述(参见本文的材料与方法部分)确定。

在本发明说明书中, 术语“所加入的蛋白质”意指含有木聚糖裂解活性的一定量蛋白质, 该蛋白质是从已产生了所述酶的发酵肉汤中回收的, 并且随后用于本发明目的。因此, 在评定如本文所定义的指定酶的 WSPS、WSPU 和 FVRU 值时, 术语“毫克蛋白质”是指在从发酵肉汤中回收时与所述酶相关的毫克蛋白质, 而并不是任何无活性的或非木聚糖裂解性的所加入蛋白质。

可以理解到, 用于本发明目的的木聚糖酶制剂与现有技术的木聚糖酶和纤维素酶相比而言, 每毫克蛋白质含有极高的木聚糖裂解活性。这就意味着利用出人预料低剂量(毫克量蛋白质)的本发明木聚糖酶制剂, 即可分别获得极大的粘度降低(表示为比粘度)和小麦的分离能力。欲用于本发明的酶最好基本上为单一成分的酶, 典型情况下, 可以借助重组 DNA 技术以高纯度形式高效地产生(即, 含有相对小量的、与木聚糖裂解活性相比所不需要的附带活性)。

FVRU 被定义为酶的比粘度, 它是相对于如 WO 92/03540 所述由短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)DSM 6124 所产生的木聚糖酶标准酶制剂的比粘度。所述酶在下文的描述中被称为短小芽孢杆菌木聚糖酶。该短小芽孢杆菌制剂之比粘度的检测与所加入的毫克短小芽孢杆菌木聚糖酶蛋白相关。实施例 1 描述了比粘度的测定方法。

上文所定义的一类木聚糖酶被认为在小麦的分离中具有特别的用途。因此, 本发明人已观察到, 在小麦分离中具有良好作用的木聚糖酶能够迅速地降解水溶性小麦戊聚糖, 而只以非常低的速度降解水溶性小麦戊聚糖。无需局限于任何理论, 现在就可以相信, 这种在

小麦分离中表现出来的良好作用是由于粘性水溶性戊聚糖的降解所致。对于不溶性戊聚糖的低降解作用对于用本文所定义的木聚糖酶获得的粘度降低也是很重要的,因为增溶的不溶性戊聚糖可以增加粘度。

本发明更进一步涉及将植物材料分成所需成分的方法和改变植物材料粘度的方法,其中应用了上文所定义的木聚糖酶制剂。

本发明的详细描述

木聚糖酶制剂

正如通过上文的描述可以理解的,用于本发明目的的木聚糖酶制剂的活性(用术语 WSPS 或 WSPU 定义)被认为是最关键的。最好是用于本发明目的的木聚糖酶制剂所具有的每毫克所加蛋白质的 WSPS 大于 0.06。优选的是,所增加的 WSPS 为 0.06—10.0/毫克蛋白质,更优选地为 0.7—8.0/毫克蛋白质,再优选的是 0.9—6.0/毫克蛋白质,特别是至少 1.5—4.0/毫克蛋白质,和/或每毫克所加蛋白质的 WSPU 大于 15,如 25 或大于 25。优选的是每毫克所加蛋白质的 WSPU 为至少 100 至至多 150.000,更优选的是 130—120.000,如至少 160—100.000,更优选的是 300—90.000,再优选的是 20.000—85.000,和/或比活性至少为 0.053FVRU/mg 蛋白质。优选的比活性范围是 0.053—3.0FVRU/mg 蛋白质,如 0.4、0.5 或 0.6 至 3.0FVRU/mg 蛋白质,更优选的是 0.1—2.0FVRU/mg 蛋白质,再优选的是 0.4—1.0FVRU/mg 蛋白质。

用于本发明目的的木聚糖酶制剂可以是有包括哺乳动物、植物或动物在内的任何来源,而目前优选的还是木聚糖酶来源于微生物。特别是所述木聚糖酶制剂可以来源于丝状真菌或酵母。

木聚糖酶已在许多种真菌中发现,所述真菌种特别是指曲霉,如黑曲霉、泡盛曲霉、*A. aculeatus* 曲霉和米曲霉;木霉,如 *T. reesei* 或 *T. harzianum* 毒霉,如沙门柏干酪青霉;镰孢菌,如尖镰孢霉以及 *Humicola* 如 *H. lanuginosa* 和 *H. insolens*。也曾在细菌中发现过木聚糖酶,例如,在芽胞杆菌属,如短小芽胞杆菌中有木聚糖酶。

用于本发明目的的木聚糖酶制剂可以通过包括下列步骤的方法

提供:

a. 利用现有技术中已知方法从任何产木聚糖酶的微生物中分离木聚糖酶制剂,

b. 如本文所述测试该木聚糖酶制剂的 WSPS、WSPU 和/或 FRVU 活性, 以评价该酶是否适合用于本发明目的。

步骤 A 中所指的产木聚糖酶微生物可以是天然产木聚糖酶的微生物, 或者是已被编码所述木聚糖酶 DNA 转化的微生物。

已经发现真菌 *A. aculeatus* 曲霉, 特别是菌株 CBS101.43 可以产生特别适用于本发明目的的木聚糖酶。所述木聚糖酶在本发明的描述中被称为木聚糖酶 II (或 Xyl II)。并且在 WO 94/21785 中被进一步描述, 该文献也包括在本申请中。

在实施例 4 中, 分别列出了大量现有技术中已知的木聚糖酶和本发明木聚糖酶 II 的 WSPS 及 WSPU 值。而且, 还显示了这些酶用于小麦分离的效果(表示为 FVRU)。很显然, 所述现有技术木聚酶中设有一种表现出能与本文所公开的木聚糖酶 II 相比的小麦分离效果。

编码木聚糖酶 II 的 DNA 序列在 WO 94/21785 的 SEQ ID NO. 2 中示出, 而且其相应的氨基酸序列为 SEQ ID NO.5。可以这样认为, 与木聚糖酶 II 显示出同源性的木聚糖酶可以与木聚糖酶 II 一样有类似的活性, 因此而可用于本发明目的。据此, 在特别优选的实施方案中, 用于本发明的木聚糖酶可以是:

i. 由 WO 94/21785 的 SEQ ID NO.2 所示 DNA 序列或其编码木聚糖酶 II 同系物的类似物编码;

ii. 含有 WO 94/21785 的 SEQ ID NO.5 所示氨基酸序列或其同源序列; 和/或

iii. 与抗纯化的木聚糖酶之抗体有免疫反应性, 所述纯化的木聚糖酶来源于 *A. aiuleatm* 曲霉 CBS101.43。

本说明书中, 术语“同系物”意指显示木聚糖酶活性(根据本文所定义的 WSPS、WSPU 和/或 FVRU)的多肽, 由能与根据编码木聚糖酶 II 的 DNA 序列制备的寡核苷酸探针在某特定条件下杂交的 DNA

序列编码,所述杂交条件例如,在 5xssc 中预浸泡,并于含 5xssc、5xDenhardt 溶液、50mM 磷酸钠 pH6.8 和 5Dug 变性的超声处理的小牛胸腺 DNA 的溶液中于-40℃ 预杂交 1 小时,随后在补充了 50 μ ci³²P—dCTP 标记探针的相同溶液中于-40℃ 杂交 18 小时,然后在 2xSSC、0.2% SDS 中于 40℃ 漂洗 3 次,共 30 分钟。更确切地说,术语“同系物”是指与 WO94/21785 的 SEQ ID NO.2 所示 DNA 序列或其实质部分至少有 70% 同源性的 DNA 序列,例如,与 WO94/21785 的 SEQ ID NO.2 的 DNA 序列或其编码具有木聚糖酶活性多肽之实质部分有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或者甚至至少 95% 的同源性。该术语欲包括对 WO 94/21785 的 SEQ ID NO.2 之 DNA 序列所进行的各种修饰,例如核苷酸替换,它并不形成木聚糖酶的另一氨基酸序列,但对应于被导入 DNA 构建体的宿主微生物中的密码子用法,或者所述核苷酸替换确实产生不同的氨基酸序列,因而可能产生可以形成与天然酶具不同特性之木聚糖酶实变体的不同蛋白质结构。其它可能的修饰作用实例为在序列中插入一个或多个密码子,在序列的任一端增加一个或多个密码子,或者在序列的任一端或在序列的内部缺失一个或多个密码子。可以理解,本文所定义的木聚糖酶 II 同系物包括许多不同的氨基酸残基,只要木聚糖酶的活性如本文所定义。

有关木聚糖酶 II 的生产及其进一步的特征鉴定可从已经包括在本申请中的 WO 94/21785 的公开中很容易得知。

用于本发明的木聚糖酶制剂可以借助任何适当的技术从所涉及的微生物中获得。例如,木聚糖酶制剂可以借助现有技术已知的方法发酵微生物,继而分离所述酶来获取,但更优选的是利用现有技术已知的重组 DNA 技术。这类方法通常包括在允许所述酶表达的条件下,在培养基中培养用重组 DNA 载体转化的宿主细胞,该重组载体能够表达并携带编码所述木聚糖酶的 DNA 序列,然后从培养物中回收所述酶。

包括在本发明范围内的可以是微生物来源的单一成分酶(即基本不含任何其它活性)制备的、具有上述木聚糖酶特征 a) — c) 的

任何酶制剂。本发明的木聚糖酶可以在分离所述成分酶后测定其 WSPS、WSPU 和 FVRU 值来鉴定。

所用编码木聚糖酶的 DNA 序列可以具有任何来源,例如可以是 cDNA 序列、基因组序列、合成序列或其任何组合,适用于本发明目的的木聚糖酶的制备方法已在 WO 94/21785 中有详细的描述。

当所述木聚糖酶用于本发明分离小麦的方法(或将产生淀粉的其它方法)时,最好是所述木聚糖酶制剂基本不含淀粉酶,因为任何淀粉酶活性的存在会降解将产生的淀粉。相应地,当木聚糖酶将用于蛋白质的产生时,例如用于产生谷蛋白的本发明小麦分离方法中时,最好所述木聚糖酶基本不含蛋白酶,因为蛋白酶对所产生的谷蛋白不利。可以用现有技术中已知的方法除去淀粉酶和蛋白酶活性。有关的一个例子是热灭活法,该方法相对于米曲霉所产生的木聚糖酶 II 具有特别的优点,因为木聚糖酶 II 通常比由所述宿主细胞产生的淀粉酶和蛋白酶具有更好的热稳定性。

已经发现,当所述木聚糖酶与纤维素酶一起使用时,木聚糖酶在本发明的植物材料分离方法中产生的作用可以得到极大地改善。

据此,用于本发明的木聚糖酶制剂可以含有纤维素酶。该纤维素酶最好具有微生物来源,例如可以来源于丝状真菌(如曲霉、木霉、腐质霉、镰孢菌)。适用于本发明目的之纤维素酶的具体例子包括可来自 *H. insolens* 并可由 WO 91/17244 之图 14 中的氨基酸序列进一步定义的内葡聚糖酶(内葡聚糖酶 I)和由 WO 91/17243 描述的 43KDH. *indolens* 内葡聚糖酶。

可与本文所描述的木聚糖酶结合使用的经商售可得纤维素酶制剂包括 Celluclast^R(可得自 Novo Norelisk A/S), Spezyme^RCP(可得自 Genencor, USA)和 Rohament^R 7069W(可得自 Rohm, 德国)。

植物材料的分离方法

在含木聚糖的任何植物材料(如软材和硬材)可用本发明进行处理的同时,最好是植物材料来源于 Poaceae 科,并且特别是由谷类植物如小麦、黑麦、大麦或燕麦制备的植物材料。该植物材料另外还可以来源于蔬菜或水果,例如从玉米、大米、高粱豆或水果壳制得的植

物材料。所述植物材料可以由上述植物之任何组合制得,并且可以另外含有非植物材料。

欲按照本发明进行处理的植物材料可以为任何适宜的形式。如下文将进一步解释的那样,所述植物材料可以方便地成为使得可以进行连续加工的可抽吸分散液或溶液形式。该分散液通常可以通过将干磨材料,尤其是颗粒平均大小为 50—100 μm 的小麦和水混合制得。

根据本发明进行加工的优选植物材料是小麦。借助本发明的方法,小麦将被分成谷蛋白、淀粉和纤维部分。如此产生的谷蛋白例如可以被加到面粉中,以改善其焙烤特性,或者可用于改善诸如肉类、早餐谷类和宠物食品等产品的营养值。所述淀粉例如可用于造纸工业中的制浆(如纸张涂层)和纺织工业中的制浆。所述纤维部分例如可用于动物饲料。

下面将参照小麦的分离来描述本方法分离植物材料的方法。然而,可以理解,借助相似类型的方法可以分离上述任何其它类型的植物材料,并且,本领域的技术人员知道应该选择哪类方法用于分离所给定的植物材料,例如可以参考题为“淀粉生产技术”(J. A. Radley 著)的书籍,其中的图 2 显示了说明小麦分离过程的流程图。

本发明的方法可以通过现有技术已知的任何工业小麦分离方法来完成,然而,本发明优先使用所谓的粉碎法(或湿磨法),其中的起始材料是待分离小麦的稀释的可抽吸分散液。通常,该分散液由小麦粉和水构成。分散液的干物质含量范围一般为 35—50%。已知两种主要类型的粉碎方法为水力旋流器法和湍析器法。这些方法的优点在于水耗较低。

在水力旋流器法中,面粉首先与水混合制成生面,然后进一步稀释,并通过一个其中已附聚了谷蛋白的搅拌附聚罐,含小谷蛋白附聚物和淀粉的分散液被抽吸至一套水为旋流器中,在此进行离心分离,作为最轻部分的谷蛋白和“B”—淀粉一起留在水力旋流器的顶部,再经过滤将谷蛋白从“B”—淀粉中分开。来自水力旋流器的底流主要含有“A”—淀粉,而戊聚糖(或纤维)见于上下两部分。所述部分

将经一系列的清洗/浓缩步骤得以进一步的净化。

浞析器法与水力旋流器法之区别至少在于一个主要问题,即当谷蛋白被附聚时。在浞析器方法中,为了避免在两级或三级浞析器中进行分离前谷蛋白形成更大的团块,保持很低粉碎物浓度是非常重要的。在分离之前,将被混合的面粉/水分散液抽吸通过一个均质器,这是一个具有高剪切力的特殊针状碾机(pin miu),可以启动谷蛋白的附聚,就在分离开始之前,再次对分散液进行稀释。在两级浞析器的情况下,底流含有相当清洁的“A”淀粉,而溢流含谷蛋白、“B”淀粉和戊聚糖。对于三级浞析器而言,有两级除了“A”淀粉外含谷蛋白和一些“B”淀粉,而还有一级含谷蛋白、“B”淀粉和戊聚糖。当如本文所定义的木聚糖被用于小麦的分离时,有可能获得改善的揉面和均化能力、改善的分离能力、戊聚糖部分降低的粘度(当蒸发和干燥时降低能耗)和浞析器上降低的电流消耗。而且,可获得高纯度的终产物,由于降低粘度而增加了可流动性,所以加工时间也可缩短。

植物材料的分离法通常在 pH3—8 的范围内进行,如 PH4—7,特别是 PH5.5—6.5。典型情况下,温度范围是 15—50℃,如 35—45℃。在小麦分离法中,根据本发明所进行的分离一般于 40℃ 进行 1—5 分钟完成。

对于有些目的而言,与木聚糖酶一起使用其它的酶是有利的。例如,已发现将本文所定义的木聚糖酶与纤维素酶结合使用具有协同作用。适宜类型的纤维素酶已在上文“木聚糖酶制剂”部分介绍过。所用纤维素酶的量相当于 0—30,000 EGU/kg 面粉,优选 200—5000 EGU/kg 面粉。

粘度降低

如上所述,本文所定义的木聚糖酶制剂可用于降低植物材料的粘度。粘度的降低对于例如本文所述的连续小麦分离法之重要在于可以得到增加的小麦粉流动性。而且,所述粘度降低的重要性还体现在食品或饲料的制备和酿造方面,参考 Visser et al., Xylans and Xylanases, 1991。

酿造

本文所述木聚糖酶被认为特别适用于在酿造过程中降低麦芽汁的粘度。所述木聚糖酶可以由大麦和高粱制得的麦芽汁一起使用,并可以如戊聚糖酶用于酿造的相同方式使用,参考例如 Vietor et al., 1993 和 EP227159。

饲料

要制备的饲料通常是基于上文所确定的植物材料,如谷类植物,尤其是小麦和/或大麦。所述木聚糖酶通过降解植物材料所含的阿拉伯基木聚糖来发挥其作用,藉此获得动物饲料含能量成分及其它营养成分全面利用的改善。而且,特别是对于适合烤焙的小鸡,可以降低食糜的粘度。可以认为,降低的粘度对于饲料的可消化性是很重要的,这可能是由于内源性酶可以更好地与底物接触,或是由于消化产物弥散性增加的缘故。这些原因导致了吸引量的增加。另外,降解作用通过使营养物更容易被获取,从而有助于稳定小肠微生物菌群。所制备的饲料例如可用于饲喂适于烤焙的小鸡、蛋鸡和小猪。木聚糖酶可以任何适当的剂量,如 5—2000FXU/kg 饲料的量掺入饲料中,优选量的 20—1000FXU/kg 饲料。

制备 β -葡聚糖和其它谷类植物成分

本文所公开的木聚糖酶制剂被认为特别适用于通过降解存在于例如非淀粉多糖废品中的阿拉伯糖基木聚糖来制备 β -葡聚糖。所述 β -葡聚糖可以用作树胶或填充剂(以降解形式)。而且,由上文公开的内容可以证明,所述木聚糖酶制剂可用于制备淀粉,尤其是小麦淀粉和谷蛋白。

材料与方法

由小麦粉生产可溶性戊聚糖(WSP)

将 100kg 普通小麦粉悬浮于 300kg 冷水中。搅拌 1 小时后,用离心机除去泥状物。然后用酶处理所得的上清液以除去淀粉和蛋白质。在将 pH 调至 6.5 和温度调至 90℃ 后,首先加入 2% (干物质, d. m.) Termamyl^R120L, 同时搅拌 90 分钟;随后用 3% (干物质) AMG^R300L 于 pH4.6 和 60℃ 条件下进行类似的处理共 120 分钟,

以水解淀粉部分。最后,在连续搅拌、pH 8.0 和 55℃ 条件下用 1% (干物质)Alcalase^R2.4L 处理上清液 120 分钟,水解淀粉和蛋白质之后,用蔡氏滤器 K250 在压滤机上过滤所得产物,以除去残余的不溶性物质。用 10,000mw 截留膜对上清液进行超滤处理,以将产物从淀粉和蛋白质水解物中分出。将截留物进一步透滤直至达到 0°BRIX。所述产物通过在 Luwa 蒸发器上蒸发而浓缩,并且最终被冻干。

由小麦粉生产不溶性戊聚糖(WIP)

将 150kg 普通小麦粉悬浮于 450kg 冷水中。该悬液被加热至 60℃,再加入 600g Termamyl^R 120L。当加热至 95℃ 导致淀粉部分胶凝之后,将悬液冷却至 60℃ 继续水解 180 分钟。用 NaOH 调 pH 至 8.0 后加入 300g Alcalase^R2.4L。在连续搅拌下水解蛋白质的过程中,用 NaOH 滴定,使 PH 维持在 7.5—8.0。水解反应进行 120 分钟,离心后回收沉淀物,用水洗涤一次,然后用冷水在 35μm 筛上进一步冲洗,以除去全部残留的可溶性物质。向所得的不溶性物质中加入达 20L 的水,并加热至 60℃。在用 NaOH 调 pH 至 8.0 后,加入 100g Alcalase^R2.4L。继续进行水解反应和 NaOH 滴定,直至 pH 不再下降。然后将所述材料再次置于 35μm 筛洗涤,直至除去全部可溶性物质,最好冻干。

用于本发明之木聚糖酶的活性检测是借助还原糖从可溶性戊聚糖(保温后稀释 25 倍)和不溶性戊聚糖(保温后稀释 5 倍)中的释放。

将如上所述生产的 0.5% 水溶性或水不溶性戊聚糖溶解或悬浮于 0.1M 柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液(pH6.0)中。每个样品的 0.9ml 底物与 0.1ml 酶溶液混合。在酶与底物混合之前和混合过程中,底物被置于冰上。当所述酶于 100℃ 变性处理 5 分钟后,于 40℃ 保温 15 分钟。当所述样品被冷却时,可溶性戊聚糖溶液被稀释 25 倍,而不溶性戊聚糖溶液被稀释 5 倍。然后,通过在微量滴定板上与 PH-BAH 试剂反应测定还原糖,所述 PHBAH 试剂含有 0.15g 对羟基苯甲酸酐肼(Sigma H—9882),0.50g 酒石酸钾一钠(Merch 8087)和 2% NaOH 溶液,达 10.0ml。空白的结果被减去。木糖用作标准物。

还原糖可用于测定 WSPU 和 WSPS。

蛋白质测定法—Kjeldahl

利用 Tecator 浸煮器和 1003 型蒸馏装置进行所述测定。

破坏作用(Tecator 浸煮器)

待分析样品被转置于 Kjeldahl 管中,对于液体样品大约 1.5g;冻干样品为约 0.1g。向样品中加入:

- a)3.0ml 硫酸(浓 H_2SO_4)
- b)1.5ml 过氧化氢(32% H_2O_2)
- c)1 Kjeltab($\text{Se} + \text{K}_2\text{SO}_4$)

如果样品在加入化学物质后起泡,则其将在第二天才被破坏。在正常情况下,样品在 10 分钟后被置于破坏部件中。该部件的温度设置为 370°C 。当样品呈清亮或微黄时,将其取出。根据样品的组成不同,破坏作用通常需要进行 0.5—1 小时。将样品冷却至室温约 20 分钟。然后准备进行蒸馏。

蒸馏(1003 型蒸馏装置)

样品在含 Kjeldahl 指示剂(A:0.12g 亚甲基兰溶于 100ml96% 乙醇,B:0.125g 亚甲基红溶于 100ml96% 乙醇,将 A 和 B 以 1A:2B 的比例混合)的 25ml2% 硼酸中蒸馏。被破坏的样品与 32.5% NaOH 混合。氮被蒸馏到 2% 硼酸中,然后用 0.1NHCl 滴定,直到 pH 达 4.85。

测定内葡聚糖酶活性(EGU)

分析方法

利用振动粘度测定法于 CMC(pH6.0)分析发酵肉汤。更确切地说,制备含有溶于 0.1M 磷酸盐(pH6.0)的 34.0g/L CMC (Blanose Aqualon)的底物溶液。待分析的酶样品也溶于相同的缓冲液中。将 14ml 底物溶液与 0.5ml 酶溶液混合,并转置于振动粘度检测计(例如 MIVI 3000,可得自 Sofraser,法国)于 40°C 恒温。内葡聚糖单位(EGU)测定为样品粘度与标准酶溶液粘度之比。

测定木聚糖酶活性(FXU)

用一种测定法检测内木聚糖酶活性,在所述测定方法中,木聚糖

酶样品与 remazol—木聚糖底物 pH6.0(用 Remazol 亮兰 R 染色的 4—O—甲基—D—葡糖醛酸基(glucurono)—D—木聚糖, Fluka)一起保温。保温过程于 50℃ 进行 30 分钟。未被降解的染色底物之背景用乙醇沉淀。用分光光度计于 585nm 检测上清液中所保留的兰色, 其与内木聚糖酶活性成比例。

相对于酶标准测定样品的内木聚糖酶活性。

该测定法在出版物 AF 293.6/1—GB 中有进一步的描述。该出版一经有需求即可从 Novo Nordisk A/S, Denmark 得到。

测定内葡聚糖酶单位(ECU)

相对于一酶标准物测定 ECU(内纤维素单位)。

内纤维素酶分解羟甲基纤维素(CMC)。用 CMC—振动粘度测定计(例如 MIVI 3000, 可得自 Sofraser, 法国)检测所得到的降低的粘度。

所制备的底物溶液含有溶于 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH 7.5)的 35g/L CMC(Blanose Aqualon)。待分析的酶样品溶解于相同缓冲液中。

将 0.15ml 标准酶液或未知酶样品置于 10ml 试管中。加入预热至 40℃ 的 5ml CMC—底物液。充分混合该溶液, 保温 30 分钟, 置于粘度计中。

该方法在 AF302/1—GB 中有进一步的描述, 在提出请求时即可从 Novo Nordisk 获取 AF302/1—GB。

面粉

在下面实施例中的所用面粉含有下列成分：

表 1 所用面粉的组分

成分(于 pct)	Fakta 面粉
蛋白质	10.4
灰	0.2
干物质	10.5
糖类组合物(于 PCT)	
葡萄糖	97.7
阿拉伯糖	1.1
木糖	0.9
半乳糖	0.3

Fakt 粉：非指定型商售面粉(“Lnksus Hvedemel”, prepared by Daglig-varegruppen, Dk—7100 Vejle)。

实施例

实施例 1

降低小麦粉粘度

测试不同的木聚糖酶在如上所定义的 Fakta 粉中降低粘度的能力。

所测试的木聚糖酶为：

—Spezyme^RCP, 可得自 Genencor, USA

—H. insolens 木聚糖酶(其生产如 WO 92/175 73 之实施例 2 所述)

—木聚糖酶 I 粉末(用 WO 94/21785 所述木聚糖酶 I 作为起始材料, 根据标准方法通过固相分离、浓缩和冻干等步骤生产)

—木聚糖酶 II (如 WO 94/21785 所述生产)

—木聚糖酶, 如 WO 92/03540 所述用 B. pumilus 菌株 DSM

6124 生产(在下文称为 *B. pumilus* 木聚糖酶)。

利用下述方法检测粘度的降低:

精确称量 100g 面粉。向置于 35℃ 的 120ml 去离子水中加入上述酶。酶的剂量如下:

Spezyme^RCP 8.5FXU(相当于 3.4mg 蛋白质)

木聚糖酶 I 粉末:28.3FXU(相当于 0.19mg 酶蛋白和 0.24mg 蛋白质)。

木聚糖酶 II :7.5FXU(相当于 0.19mg 酶蛋白和 0.25mg 蛋白质)。

H. insolens 木聚糖酶:82.2FXU(相当于 2.2mg 酶蛋白和 22.3mg 蛋白质)。

短小芽孢杆菌木聚糖酶:21FXU(相当于 0.2mg 蛋白质)

空白样品作为对照(未加酶)。用于搅拌面粉和水 30 秒,然后在混合器(Warring, Commercial Laboratoig blender, Struers, Adjustments OFF 1—7 rotor in bottom (4 blades))以 7 档速度(最大速度)精确混合 30 秒。花 30 秒将该液体倒入粘度计的测定管(Programmable rheometer, model DV—111, Brookfield, Spindel 25, 测定管于 38℃ 恒温)。每个第 15 秒测 40rpm 时的粘度,共测 4 分钟。比粘度表示为样品粘度的均数与空白粘度均数的百分比,其用作粘度降低的检测。平均粘度为 60 秒后和直到检测结束时所达水平的均数。

最低的比粘度见于在使用木聚糖酶 II 的情况下。其它的木聚糖酶也被发现可以降低比粘度(木聚糖酶 I, Spezyme^RCP), 尽管其降低的程度较小。还发现所述量的 *H. insolens* 木聚糖酶可以升高粘度。作为实例,上述量对于木聚糖酶 II、木聚糖酶 I、Spezyme^RCP 和 *H. insolens* 木聚糖酶而言,产生的比粘度分别为 69%、78%、87% 和 128%(相当于 0.63FVRU/gm 蛋白质、0.044FVRU/mg 蛋白质、0.053FVRU/mg 蛋白质和 0.012FVRU/mg 蛋白质)。

实施例 2

小麦的分离

通过离心试验评估实施例 1 中所述酶的小麦分离能力。该试验用实施例 1 所述面粉进行。

根据实施例 1 所述方法将面粉与水混合。在此之后将糊状物以 4332g 离心 (Megafuge 1.0 Heraeus Sepatech) 5 分钟。在底层有淀粉, 继而是上部的谷蛋白、泥状物和流出物层。该分离作用表示为流出物百分比。百分比越高, 分离效果越好。

已经证实, 木聚糖酶 II 有最好的作用, 作为实例, 对于空白样品、Spezyme^RCP、木聚糖酶 I 和木聚糖酶 II 而言, 面粉流出物的百分比分别为 14%、21%、22% 和 23%。

实施例 3

木聚糖酶 II 与其它酶相结合降低粘度

测试不同的木聚糖酶在与木聚糖酶 II 相结合使用时降低粘度的能力。所用 Fakta 粉如上文所述。

测试的木聚糖酶有:

—Cellulast^RCCN3035, 可得自 Novo Nordisk A/S

—内葡聚糖酶 I, 一种含有如 WO 91/17244 图 14 所示氨基酸序列的 H.insolens 纤维素酶, 其生产方法如所述文献所述。

—43KD 内葡聚糖酶, 一种如 WO 91/17243 所述的 H.insolens 纤维素酶, 该文献还描述了其生产方法。

—H.insolens 木聚糖酶(如 92/17573 之实施例 2 所述生产)。

—木聚糖酶 I 粉末(如上所鉴定)。

—B.pumulis 木聚糖酶(如上所鉴定)。

每一种酶都与木聚糖酶 II 联用, 并与 Spezyme^RCP 相比较。如实施例 1 所述检测粘度的降低。

所用酶量如下:

Celluclast^R: 16EGU(相当于 0.024ml)

内葡聚糖酶 I: 26.5ECU(相当于 0.053ml)

43KD 内葡聚糖酶: 101ECU(相当于 0.017ml)

H.insolens 木聚糖酶: 82.2FXU(相当于 2.2mg 酶蛋白和 22.3mg 蛋白质)

木聚糖酶 I 粉末:28.3FXU(相当于 0.19mg 酶蛋白和 0.24mg 蛋白质)

短小芽孢杆菌木聚糖酶:21FXU(相当于 0.024ml 和 0.2mg 蛋白质)

木聚糖酶 II :7.5FXU(相当于 0.19mg 酶蛋白和 0.25mg 蛋白质)

Spezyme^RCP:8.5FXU(相当于 0.024ml 和 3.4mg 蛋白质)

由图 1 可证明,没有其它的酶可以将粘度降至和木聚糖酶 II 一样能达到的水平。而且,当木聚糖酶 II 尤其是与内葡聚糖酶 I 和 43KD 纤维素酶联用时可以显著降低粘度。木聚糖酶 II 还可以与显示出多成分酶的 Celluclast^R 联用。在图 1 中,暗柱图表示酶的单独作用。亮柱图表示所述酶与木聚糖酶 II 联用所观察到的效果:

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 = 木聚糖酶 II | 2 = 木聚糖酶 II |
| 3 = Spezyme ^R CP | 4 = 43KD 内葡聚糖酶 |
| 5 = H. insolens 木聚糖酶 | 6 = 内葡聚糖酶 I |
| 7 = 木聚糖酶 I 粉末 | 8 = Celluclast ^R |
| 9 = 短小芽孢杆菌 | |

实施例 4

测定 WSPS 和 WSPU

在测定 WSPS 和 WSPU 中,必须检测据 Kjeldahl 所述确定的所加酶的蛋白含量,以及所述酶对如前所述生产的水不溶性(WIP)和水溶性戊聚糖(WSP)的,以还原糖来检测的酶活性。

所确定的许多制剂之 WSPS 和 WSPU 值如下：

酶	优选的每公斤面粉中的蛋白质毫克数	以微摩尔/分钟/克产物为单位的对 WSP 的活性	WSPU	以微摩尔/分钟/克产物为单位的对 WIP 的活性	WSPS
木聚糖酶 II	2.5	121000	48237	14600	3.3
Spezyme [®] CP	34	446	13	231	0.06
H. insolens 木聚糖酶	223	3406	15	930	0.02
木聚糖酶 I (粉末)	2.4	188200	79000	038100	2.1

WSPU 为优选的每公斤面粉中的每毫克蛋白质对 WSP 的活性，且 WSPS 为优选的每公斤面粉中的每毫克蛋白质的 WSP/WIP 比值。

由此可见，木聚糖酶 II 表现出极高的 WSPU 和 WSPS，这反映出与蛋白质的加入相比，以高速度降解水溶性戊聚糖都以低速度降解水不溶性戊聚糖

实施例 5

木聚糖酶用于动物饲料

以含和不含酶的实验性饮食喂养适于烤焙的小鸡六周。该饮食在实验的头三周含 81% 小麦，在后三周含 84.5% 小麦。将其分成 3 种处理。对于头六周，每种处理包括以 8 小肉鸡重复 12 次，后三周每种处理以 5 只小鸡重复 6 次。

所述处理包括不含酶的对照和下列酶处理：400FXU/Kg 饲料 Bio—FecdTM Plus(BF⁺) (可得自 Noro Nordisk A/S) 和 400FXU/kg 饲料木聚糖酶 II。两种酶都根据 WO92/12645 所述方法配成 CT 颗粒。测定体重增加和饲料消耗量，并计算 0—3 周和 3—6 周的饲料转化率(FCR)。而且，利用 Brookfield LVTDV—II 粘度计确定肠内容物之上清液的 Jejunal 和 ileal 粘度。

所述结果从下表中可显而易见。

表 1 0—3 周生产的有关参数

	增重/鸡 (g)	饲料摄取/鸡 (g)	饲料转化率 (g/g)%
对照	364.55	647.04	1.78 100
BF + 400	391.88	643.68	1.64 92
XYI II 400	404.83	650.89	1.61 90

表 2 3—6 周生产的有关参数

	增重/鸡 (g)	饲料摄取/鸡 (g)	饲料转化率 (g/g)%
对照	835.51	1882.44	2.22 100
BF + 400	932.24	1906.70	2.06 93
XYI II 400	1050.08	2068.44	1.98 89

表 3 第 3 周和第 6 周的 Jejunal 粘度

	3 周	6 周
对照	16.51	6.31
BF + 400	11.24	12.96

Xyl II 400	6.35	3.50
------------	------	------

表 4 第 3 周和第 6 周的 Ileal 粘度

	3 周	6 周
对照	40.07	20.41
BF + 400	18.46	16.92
Xyl II 400	15.65	6.27

从表 1 和 2 所见,在 3 周和 6 周后,接受酶的处理组之 FCR 均较低。在两种情况下,木聚糖酶 II 好于 BF+。这主要是因为该组动物生长得更好。

关于 Jejunal 粘度,木聚糖酶与 BF+ 和对照相比产生了较低的粘度。这也是 ileal 粘度的情况。对照和木聚糖酶两者在 6 周之后比 3 周之后所产生的粘度要低,而对于 BF+ 而言却非如此。因此,似乎应该是木聚糖酶 II 在后三周期间比 BF+ 有更好的作用,这也由木聚糖酶 II 在第 6 周时相比于 BF+ 有相对较低的 FCR 来证明。

因此,该实验表明,在同样的基础上,木聚糖酶比 BF+ 能产生更好的饲料转化率,即用木聚糖酶 II 可以得到更多的营养物,这部分原因是木聚糖酶 II 组中的 ileal 粘度较低。

实施 6

木聚糖酶 II 在动物饲料中的可代谢能量

利用欧洲的参考方法(Bourdillon et al., 1990)测定木聚糖酶 II (100 FXU/kg 和 200FXU/kg)对 AME(表观可代谢能)的影响,并与

商售产品 Bio—FeedTM Plus(400FXU/kg)(BF + , 得自 Novo Nordisk A/S)相比较。AMEn 值表示饲料中考虑到 N- 残留进行校正了的代谢能。

使用了来自商业孵化场的一天龄雄性 Ross 适于烤焙的小鸡。

从 1—16 天, 给小鸡喂商售的起始(Starter)饮食。第 16 天分别给小鸡称重。去掉高或低体重的鸡, 其余的分配至孵蛋箱中。从 16—23 天小鸡适应孵箱。根据 Bourdillon 等人(1990 *supra*)的方法在 24—28 天于体内进行平衡试验。该实验包括以每次重复均含 4 只小鸡的总数为 5 次重复的 9 种处理。

基础饮食含 56% 高粱、32.5% 大豆粉、6% 动物脂肪、1% 豆油和 5% 矿物质、维生素、微量元素和氨基酸。在实验饮食中, 一半的基础饮食被小麦替换。山鸡饲喂的糊状饲料占其随意摄取量的 90%。

测定 AMEn

每天定量收集小鸡的排泄物。分析饮食和冻干排泄物样品中的脂肪、总能量(GE)和氮。

由各自的排泄物/饲料比以及相应的总能量(GE)计算饮食的 AME 量。考虑到 N 残留的校正至零是用 34.36KJ/g 残留 N 的能量等式进行的。

通过饮食和冻干排泄物的脂肪提取物确定脂肪消化率。

所测定的 AMEn 如图 3 所示。

由图 3 可见, 补充了木聚糖酶 II 的基础饮食与 Bio—FeedTM(BF +)相比导致可代谢能的明显改善。

参考文献:

Weegels et al., Starch/Stärke, 44 No. 2, pp. 44-48, 1992.

H. Gruppen et al., Journal of Cereal Science, Vol. 18, pp. 111-128, 1993a.

Kormelink, F.J.M. and Voragen, A.G.J., Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, pp. 688-695, 1993.

Kormelink, F.J.M. et al. Journal of Biotechnology., 27, pp. 249-265, 1993.

Kormelink et al., Xylans and Xylanases, Elsevier Science Publishers, 1993, pp. 141-147.

H. Gruppen et al., Carbohydr. Res. 233 (1992), 45-64.

H. Gruppen et al., Journal of Cereal Science, Vol. 18, pp. 129-143, 1993b.

Düsterhöft et al., Symposium: Enzymes in Animal Nutrition, 13-15 October, 1993, Kantaue Ittingen.

H. Gruppen et al., Symposium: Enzymes in Animal Nutrition, 13-15 October, 1993, Kantaue Ittingen.

A.G.J. Voragen et al., in "Xylans and Xylanases", Elsevier Science Publishers B.V., 1992, 51-68.

F.J.M. Kormelink and A.G.J. Voragen, in "Xylans and Xylanases", Elsevier Science Publishers, 1993, p. 415-418.

Viëtor et al., 1993, J. Inst. Brew., May-June, 99, pp. 243-248.

Shei, J.C., et al., Biotech. and Bioeng. Vol. XXVII, pp. 533-538, 1985.

Fournier, R. et al., Biotech. and Bioeng. Vol. XXVII, pp. 539-546, 1985.

Bourdillon et al. (1990), Br. Poultry Sci., 31, 557-565)

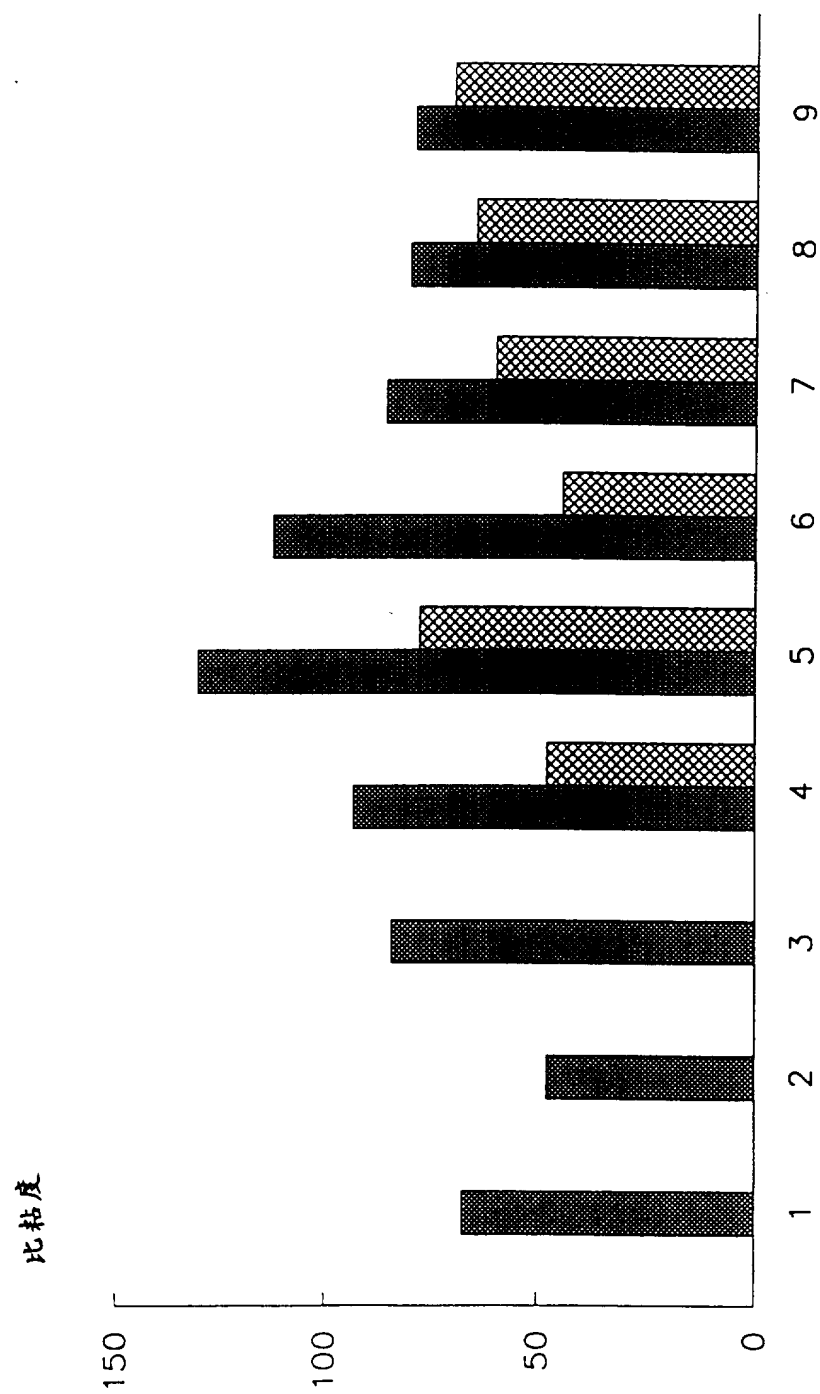


图 1

湿磨小麦分离法的原理

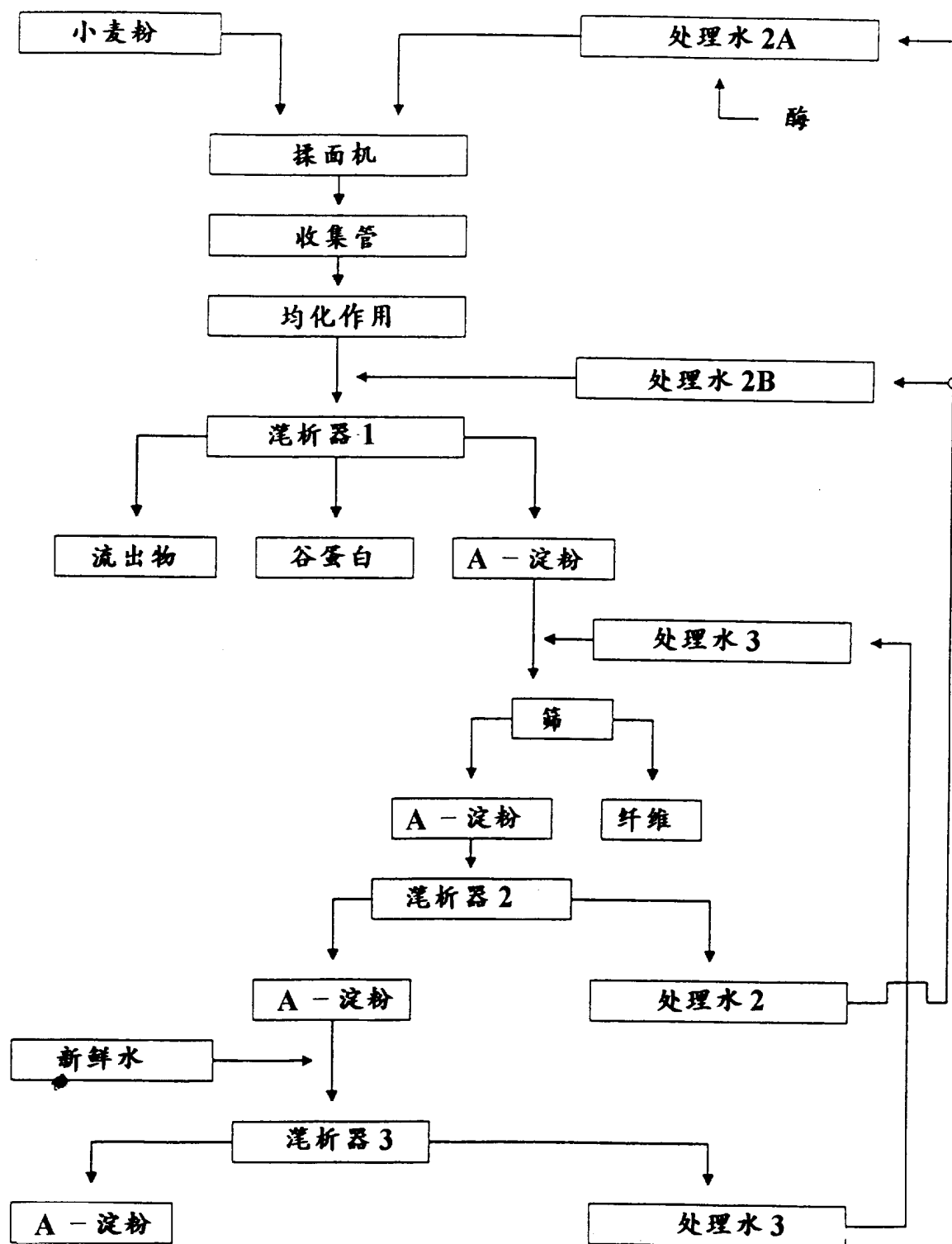


图 2

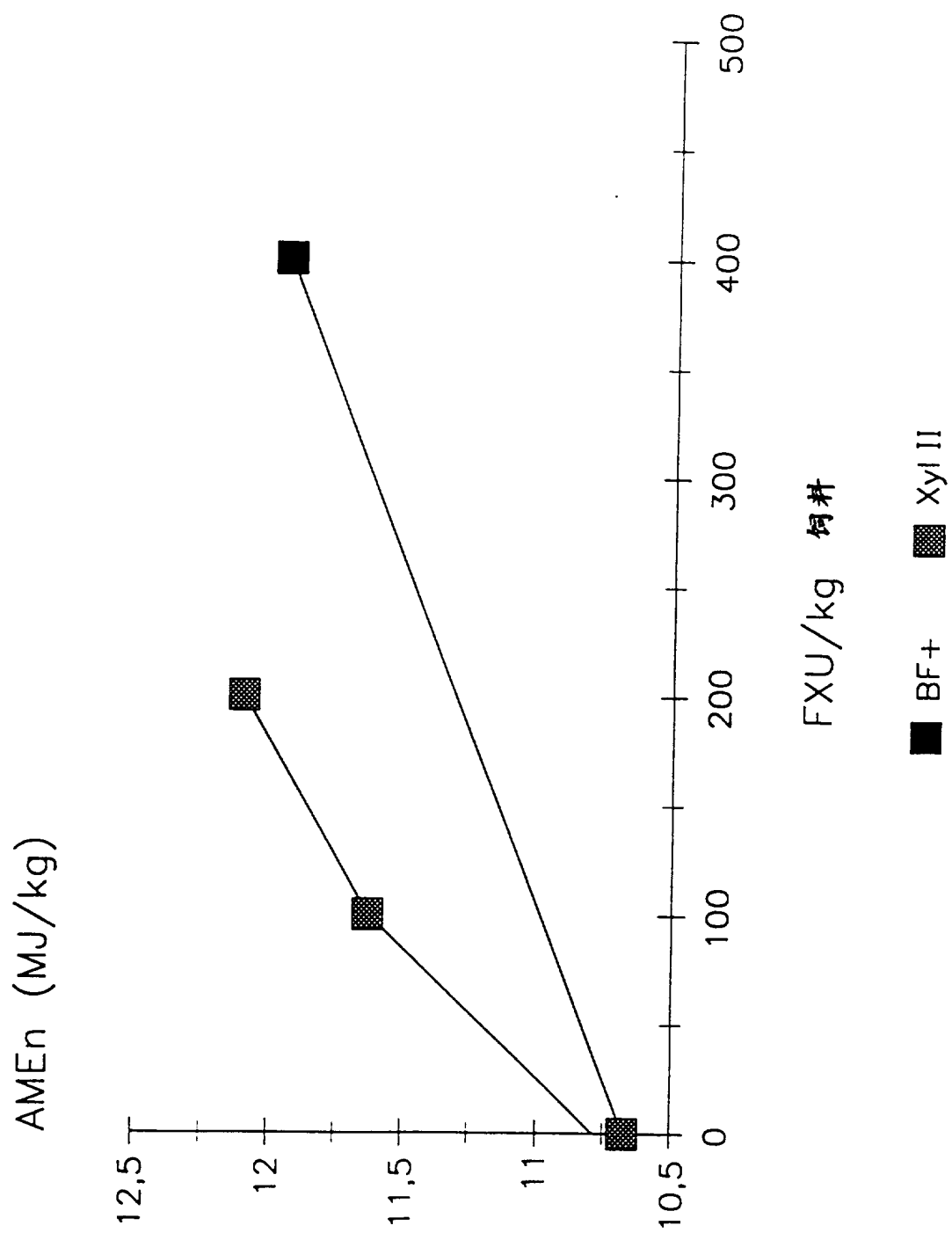


图 3