(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 30 455 T2** 2004.07.22

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 847 446 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 30 455.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/AU96/00401**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 920 633.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/002356**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.06.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **23.01.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.06.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **22.10.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12P 19/04**
A01N 63/02, A01N 63/04, A61K 31/715, A23K 1/06, A23L 1/09

(30) Unionspriorität:
PN398295 05.07.1995 AU

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Carlton and United Breweries Ltd., Carlton, Victoria, AU

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
WHEATCROFT, Ragini, Carlton, AU; LANGERIS, Willem Hendrik, Carlton, AU; KULANDAI, Joseph, Carlton, AU; GILBERT, Robert White, Carlton, AU; SIME, Keith James, Carlton, AU; SMITH, Craig Gordon, Carlton, AU

(54) Bezeichnung: **PRODUKTION VON BETA -GLUKAN-MANNAN PRÄPARATIONEN MITTELS AUTOLYSE VON ZELLEN UNTER BESTIMMTEN pH-, TEMPERATUR- UND ZEIT BEDINGUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft biologisch aktive β-Glucan-Mannan-Präparationen und Verfahren für ihre Herstellung. Insbesondere betrifft die Erfindung β-Glucan-Mannan-Präparationen, einschließlich β-(1-3)-Glucan, die von Mikroorganismen produziert werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Hefen, und Verfahren für die Produktion der β-Glucan-Mannan-Präparationen, die die Verwendung von konzentriertem Alkali oder von konzentrierter Säure vermeiden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Polysaccharide sind in der Natur weit verbreitet und sind insbesondere wichtig bei ihrer Rolle zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Bakterien-, Pilz- und Pflanzenzellen. Glucane sind Polymere aus D-Glucose, und die D-Glucoseeinheiten können auf eine Reihe von Arten miteinander verknüpft sein. Zum Beispiel sind Glucane mit 1-3-, 1-4-, 1-6- und 1-2-Bindungen bekannt. Die Vielzahl von möglichen Bindungen bedeutet, dass Glucane normalerweise stark verzweigte Verbindungen sind. Wegen ihrer chemischen Eigenschaften haben Glucane vielfältige Verwendung in der chemischen, Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie gefunden. Zum Beispiel sind von Nutzen als Viskosität verleihende Mittel, Emulgatoren, Fasern, Filme, Beschichtungsmittel, Träger bei der Affinitätschromatographie und Gelelektrophorese, in Zellkulturmedien, als Filterpropfen und in Zement. Sie werden auch verbreitet als Verdickungsmittel bei Lebensmitteln und als Quelle von Nahrungsfasern und als Träger und Beschichtungsmittel bei pharmazeutischen Produkten verwendet.

[0003] Glucane, insbesondere β-(1-3)-Glucane, wurden sehr ausführlich erforscht, und es wurde gezeigt, dass sie zusätzlich zu vorstehend Gesagtem eine Vielzahl von pharmakologischen Aktivitäten haben, einschließlich, aber nicht beschränkt auf anti-Cholesterinämie-Aktivität, Hypoglycämie-Aktivität, Beschleunigung der Exkretion von Schwermetallen und Stimulierung des Immunsystems. Die immunstimulierende Aktivität von β-Glucanen hat zu Vorschlägen geführt, dass sie als anti-Krebsmittel oder bei der Behandlung einer HIV-Infektion, als Mittel für die Stimulierung der Wundheilung oder als anti-Infektionsmittel für die alleinige Verwendung oder in Verbindung mit Antibiotika von Nutzen sind.

[0004] Die β-Glucane können auch die Resistenzantwort auf Krankheit in Pflanzen induzieren, wie die Phytoalexin-Produktion und Welken. Dies hat zu Vorschlägen geführt, dass sie als anti-Infektionsmittel und Wachstumsförderer in Pflanzen verwendet werden können.

[0005] Wegen der Probleme, die bei der intensiven Produktion von Geflügel, Tieren, Fischen oder Crustaceae auftreten, wurde die Verwendung der β-Glucane auch als Zusatz zu den Futtermitteln vorgeschlagen, um das Auftreten von Infektionen zu reduzieren und folglich das Wachstum zu fördern und den Bedarf an Antibiotika zu reduzieren.

[0006] β-(1-3)-Glucan ist ein wichtiger Zellwandbestandteil von Hefezellen. Die Zellwand von Saccharomyces cerevisiae besteht vorwiegend aus β-verknüpftem Glucan, das hauptsächlich ein Rückgrat von β-(1-3)-verknüpften Glucoseeinheiten ist, mit einem geringeren Bestandteil von inter- und intramolekularen Verzweigungen über β-(1-6)-Bindungen. Wegen der sehr breiten Anwendung von Hefen in der Nahrungsmittel- und Brauindustrie ebenso wie bei der Herstellung von Industriealkohol, sind verbrauchte Hefezellen ein wichtiges industrielles Nebenprodukt. Von Hefe abgeleitete Produkte selbst haben einen beträchtlichen kommerziellen Wert, zum Beispiel in solchen Produkten wie Hefeextrakten, Geschmacksmitteln, Geschmacksverstärkern wie Guanosinmonophosphat und Inosinmonophosphat, und bei der Herstellung von Enzymen, Feinchemikalien und Produkten zur Verwendung bei der biochemischen und pharmazeutischen Industrie, wie Trehalose, Thymidin, Nucleoside und Nucleotide, usw. Abfallhefe bei der Brauindustrie ist eine wichtige Quelle für β-Glucane.

[0007] Zusätzlich sind auch andere Arten von Hefe von Nutzen als Quelle für β-Glucane, einschließlich, aber nicht beschränkt auf andere Hefestämme von Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces fragilis und Candida-Stämme wie Candida utilis. Alle diese Hefestämme können unter Verwendung von Nährstoffen in Lebensmittelqualität entweder mittels diskontinuierlicher oder kontinuierlicher Fermentation produziert werden. Viele andere Arten von Mikroorganismen, einschließlich Bakterien, Pilze und einzellige Algen, sind im Stand der Technik als Quelle für β-Glucane beschrieben worden.

[0008] Die Reinigung der β-Glucane aus Hefe und anderen Organismen wurde intensiv untersucht, und eine Reihe von Verfahren ist bekannt. Die meisten beruhen auf der Unlöslichkeit von β-(1-3)-Glucan in Alkali oder in organischen Lösungsmitteln. Die wichtigen bekannten Verfahren sind:

(a) Extraktion bei hoher Temperatur mit konzentriertem Natriumhydroxid, gefolgt von Extraktion bei hoher Temperatur mit Säure und Ausfällung mit Ethanol (vgl. zum Beispiel Manners, D. J. et al., Biochem. J. 135 19–30 (1973), Jamas, S. et al., US-Patent Nr. 4810646, Nr. 5028703 und Nr. 5250436 und das Australische Patent Nr. 628752 von Phillips Petroleum Company). Viele dieser Protokolle verlangen die vorläufige Homogenisierung der Hefezellen, und viele verlangen die vielfache Wiederholung von jedem Extraktionsschritt.

(b) Extraktion mit konzentriertem Natriumhydroxid, gefolgt von Extraktion bei hoher Temperatur mit Säure

und Enzymbehandlung, um das Glucan zu modifizieren oder reinigen (vgl. zum Beispiel die Tschechische Patentanmeldung Nr. 890038 von Masler, L. et al., die über die Reinigung von β-D-Glucan durch Alkali-Säure-Extraktion berichten, gefolgt von Behandlung mit Enzymen, die Amylase-Aktivität haben).

(c) Extraktion von Hefezellwandpräparationen, die von Autolyse oder Enzymabbau von Hefe mit konzentriertem Phenol : Wasser (1 : 1) resultieren (vgl. zum Beispiel US-Patent Nr. 4138479 von Truscheit, E. et al.).

(d) Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wie Isopropanol, Ethanol, Aceton oder Methanol, entweder allein oder in der Gegenwart von Alkali (vgl. zum Beispiel die Japanischen Patentoffenlegungen Nr. 7051081, 6340701, 5295003 und 3002202; Europäische Patentanmeldung Nr. 515216).

[0009] Von der Behandlung mit Säure ist bekannt, dass sie die Zahl an β-(1-6)-Bindungen in dem Glucanmaterial reduziert, und dies resultiert in einer Erhöhung der Viskosität.

[0010] Die Zellwand von Hefe besteht vor allem aus:

(i) fibrillärem, in Alkali unlöslichem β-(1-3)-verknüpftem Glucan mit seitlichen Verzweigungen von β-(1-6)-verknüpftem Glucan.

(ii) in Alkali löslichem β-(1-3)-verknüpftem Glucan mit seitlichen Verzweigungen von β-(1-6)-verknüpftem Glucan.

(iii) amorphem, in Säure löslichem β-(1-6)-Glucan mit dazwischen liegenden β-(1-3)-Bindungen.

(iv) amorphem in Alkali löslichem Mannan, das mit Proteinen verknüpft ist.

[0011] Die fibrilläre Glucankomponente liegt in der Nachbarschaft der Hefeplasmamembran und ist extern durch eine amorphe Schicht bedeckt, die vor allem aus Mannoproteinen besteht (Kopecka M. et al., J. Cell. Biol., 62 68–76 (1974)). Von partikulärem Material (Zymosan), das aus den Zellwänden von Saccharomyces cerevisiae isoliert wurde, ist bekannt, dass es die Fähigkeit hat, als ein unspezifisches immunstimulierendes Mittel zu wirken. Die biologische Aktivität von Teilchen der Hefezellwand wird zum großen Teil der Gegenwart von β-(1-3)-verknüpftem Glucan zugeordnet, aber auch die beiden anderen Formen von Glucan und Mannan haben eine gewisse Fähigkeit, das Immunsystem zu stimulieren. Von Mannan wird berichtet, dass es die Adsorption und Phagocytose von partikulärem Material wie unlöslichem β-(1-3)-Glucan an Zellen des Immunsystems vermittelt (Giaimis, J., et al., Journal Of Leukocyte Biology 54 564–571 (1993); Sun-Sang, J., et al., Journal Of Cell Biology 96 160-166 (1983)).

[0012] Existierende Verfahren für die Isolierung von β-Glucanen verwenden üblicherweise ein Alkali-Säure-Extraktionsverfahren in vielen Schritten (Manners, D. J., et al., J. Gen. Micro. 80 411–417 (1974)). Die Schritte der Alkaliextraktion entfernen das meiste an amorphem Mannoprotein- und Glucanmaterial, und die folgenden Schritte der Säureextraktion entfernen das Glycogen und die meisten seitlichen β-(1-6)-Verzweigungen von dem fibrillären, vorwiegend β-(1-3)-verknüpften Glucan. Eine letzte Lösungsmittelextraktion wird manchmal verwendet, um Lipide zu entfernen.

[0013] Unter Berücksichtigung des Verkaufspreises von Glucan für einige Anwendungen ist es klar, dass die Kosten der Produktion von Glucan unter Verwendung existierender veröffentlichter oder patentierter Verfahren nicht kommerziell sinnvoll sind. Diese Verfahren haben die folgenden Probleme:

(i) Sie zielen nur darauf, die fibrilläre, in Alkali unlösliche Form von Glucan zu produzieren. Andere Formen von Glucan und das in der Zellwand vorhandene Mannan werden als Nebenprodukte des Verfahrens entfernt. Diese stellen eine zusätzliche Menge an Glucan dar, welche die Glucanausbeute signifikant hätten erhöhen können, und die funktionell wichtig sein kann.

(ii) Die existierenden Verfahren erfordern signifikante Kapitalinvestitionen.

(iii) Die existierenden Verfahren sind wegen der Erfordernis der Behandlungen mit Basen und Säuren mit hohen Konzentrationen und bei hohen Temperaturen gefährlich.

(iv) Die Verfahrenen resultieren in einer Lösung, die in Alkali unlösliches Glucan enthält, welches auf der Grundlage herkömmlicher Verfahren schwer abzutrennen ist, und das resultiert in schlechten Ausbeuten.

(v) Die Herstellungskosten sind im Vergleich zum Wert der Produkte bei vielen Anwendungen hoch.

[0014] Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Hefezellwänden (Kopecka M., et al., J. Cell. Biol. 62 68–76 1974) zeigten, dass die fibrilläre Komponente der Zellwand freigelegt wurde, wenn die äußere amorphe Schicht von Mannoproteinen durch Behandlung mit Enzymen entfernt wurde.

[0015] Im Stand der Technik besteht ein klarer Bedarf an einem schnellen und billigen Verfahren für die Extraktion von β-Glucan, welches die Verwendung von hohen Konzentrationen an Alkali oder Säure und die Verwendung von hohen Temperaturen vermeidet, einen Verlust von in Alkali löslichen Glucanen und Mannanen vermeidet, eine verbesserte Ausbeute an Glucanen und Mannanen hat und in einer biologisch aktiven Präparation resultiert.

[0016] Gemäß dem US-Patent 4,313.934 wird ein physiologisch aktives Polysaccharid durch Behandlung von bei der Autolyse unlöslichem Material von Hefen von Saccharomyces mit einem für die Hefezellwand lytischen

Enzym und Gewinnung einer wasserlöslichen, physiologisch aktiven Substanz in der resultierenden Lösungsfraktion hergestellt. Das neue Polysaccharid besitzt spezifische physikalische und chemische Eigenschaften und stellt ein chemotherapeutisches Mittel wie ein karzinostatisches Mittel, das bei der Behandlung von eingepflanzten Tumoren in Mäusen und Ratten verwendet werden kann, und ein Interferon induzierendes Mittel bereit.

[0017] In JP 53/044614-A wird ein anti-Krebsmittel wie folgt definiert:

(1) es ist eine in Wasser unlösliche Fraktion von Bierhefe-Autolysat; (2) es besteht aus Polysaccharid und Protein; (3) der Hauptbestandteil, das Polysaccharid, umfaßt mindestens Glucan, Mannan und Glycogen; und (4) sein Säure-Hydrolysat zeigt positive reduzierende Zuckerreaktionen.

– Die Substanz verlängert bei oraler oder parenteraler Verabreichung das Überleben von Mäusen, die einen Ehrlich-Ascites-Tumor oder einen Brusttumor tragen. Ihre akute Toxizität LD50 bei Mäusen ist 1335 mg/kg (i.p.).

– Die Antitumor-Substanz kann erhalten werden durch (a) Waschen einer Bierhefe wie Saccharomyces carlsbergensis mit einem geeigneten Detergens oder nur Wasser, um Hopfen oder andere Verunreinigungen zu entfernen, und (b) Suspension der erhaltenen Hefezellen in einem angesäuerten Wasser und 18–24 Std. Inkubation bei 45–55 Grad C für die Autolyse. Die Autolyse kann lange Zeit in Anspruch nehmen, z. B. 2–3 Tage. Das Autolysat wird dann zentrifugiert, um die wasserlösliche Form zu erhalten. Die überstehende Flüssigkeit wird zur Trockenheit verdampft, um die Antitumor-Substanz bereitzustellen.

[0018] Mit der vorliegenden Erfindung haben wir gefunden, dass β-Glucan-Mannan-Präparationen unter Verwendung eines Autolyse-Verfahrens bei fast neutralem pH-Wert und bei nur leicht erhöhter Temperatur isoliert werden können und dass die ausgezeichnete Ausbeute eines Produkts mit hoher immunstimulierender Aktivität erhalten wird, welche die Stimulierung der phagocytischen Aktivität, der Superoxidproduktion und eine erhöhte Resistenz gegen Pathogene und Infektionen umfassen kann. Die Autolyse kann durch eine Behandlung mit Enzymen oder anderen Mitteln unter schonenden Bedingungen ergänzt werden, und, falls erwünscht, können die Eigenschaften des Glucan-Mannan-Produkts durch Säurebehandlung, Grad der Homogenisierung oder durch Variation der verwendeten Art von Enzym modifiziert werden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0019] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren für die Produktion einer immunstimulatorischen Präparation bereitgestellt, die β-Glucane und Mannane enthält, wobei die β-Glucane 1,3-**β**-Glucane und 1,6-β-Glucane umfassen, welches die Schritte umfaßt:

a) Zellen eines Mikroorganismus einem ersten Autolyseschritt bei einem pH-Wert von etwa 5 bis etwa 6 und einer Temperatur von etwa 35°C bis etwa 60°C für etwa 6 bis etwa 48 Stunden unterziehen, um ein Material mit einer Partikelgröße von etwa 100 bis 300 Mikrometer zu erzeugen;

b) Abtrennen des festen Materials von den autolysierten Produkten;

c) das feste Material von Schritt b) einem zweiten Autolyseschritt in Gegenwart eines oder mehrere Mittel unterziehen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem proteolytischen Enzym, Mannanase, Amylase und β-Glucanase, bei einem pH-Wert von etwa 4 bis etwa 6 und einer Temperatur von etwa 35°C bis etwa 60°C für etwa 6 bis etwa 48 Stunden;

d) Abtrennen des festen Materials von dem autolysierten Produkt; und anschließend

e) Verringern des festen Materials auf Partikel von weniger als 2 Mikrometer.

[0020] Die Inkubationsbedingungen, die gemäß dem vorstehend beschriebenen Verfahren bereitgestellt werden, ermöglichen eine wirksame immunstimulierende Präparation, die Glucane und Mannane enthält und die billig, effizient und auf eine nicht gefährliche Weise herzustellen ist. Die Präparation stimuliert das Immunsystem vorzugsweise durch Erhöhung der Phagocytose-Aktivität oder der nicht spezifischen Immunantwort.

[0021] Die immunstimulierende Wirksamkeit und Viskosität der so produzierten β-Glucan-Mannan-Präparation wird durch eine Verringerung der Partikelgröße des extrahierten Materials auf unter 2 Mikrometer, mehr bevorzugt unter 1 Mikrometer, unter Verwendung eines mechanischen Aufbrechverfahrens wie Mahlen, einer Ultraschallbehandlung oder einer Homogenisierung unter Druck weiter erhöht.

[0022] In einer anderen Ausführungsform wird gemahlene Hefe verwendet, um die β-Glucan-Mannan-Präparation zu erhalten. Hefezellen werden der Autolyse und dem enzymatischen Verdau entweder während oder nach der Mahlphase unter Verwendung von Bedingungen, wie vorstehend beschrieben, unterworfen.

[0023] In einer alternativen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird die immunstimulierende Wirksamkeit und Viskosität der β-Glucan-Mannan-Präparation durch Veränderung der Natur des beim Extraktionverfahren verwendeten Enzyms verändert.

[0024] Während verbrauchte Hefe von der Fermentationsindustrie beim Verfahren der Erfindung besonders von Nutzen ist, sollte klar verstanden werden, dass die Erfindung auf jede Quelle anwendbar ist, wie mikrobi-

elles oder Pflanzenmaterial, in dem β-Glucane in einem signifikanten Anteil vorhanden sind. Mikroorganismen, von denen berichtet wurde, dass sie nützliche Quellen von β-Glucane sind, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Bakterien wie Alkaligenes, insbesondere Alkaligenes faecalis Var. mixogenes (ATCC-21680); Agrobacterium; Cellulomonas wie ATCC 21399 und Cellulomas flavigens (ATCC 53703); und Pestalotia; Pilze, zum Beispiel Aureobasidum wie Aureobasidum pullulans Stamm IFO446 und Aureobasidum Art K-1 (FERM P1289); Pleurotus ostreatus; Macrophomopsis wie der Stamm KOB55; Ganoderma; Schizophylla; Fachyma hoelen; Pestalotia; und Coriolus. Zusätzlich zu Brauhefen sind andere Hefen, die in der Lebensmittel- und Fermentationsindustrie verwendet werden, für die Zwecke der Erfindung geeignet. Diese umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Hefen, die bei der Produktion von Viskosität verleihenden Mitteln, Emulgatoren, Fasern, Filmen, Beschichtungssubstanzen, Trägern für die Affinitätschromatographie und Gelelektrophorese, bei Zellkulturmedien, als Filterpfropfen und in Zement verwendet werden. Sie werden auch verbreitet als Verdickungsmittel für Lebensmittel und als Quelle für Nahrungsfasern und als Träger und Beschichtungsmittel in pharmazeutischen Produkten verwendet.

[0025] Der Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet wird leicht die geeigneten Bedingungen ermitteln können, unter denen das endungsgemäße Verfahren bei Organismen, die keine Hefen sind, angewendet werden kann.

[0026] Dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet wird offensichtlich sein, dass für einige Anwendungen von β-Glucan und Mannan die unter Verwendung des Verfahrens der Endung hergestellte Präparation vorteilhafterweise in einer trockenen Form bereitgestellt wird. Die Präparation wird in geeigneter Weise mittels jedes geeigneten Verfahrens getrocknet, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Gefriertrocknung, Trocknung in einer Rolltrommel, Trocknung in einem Ofen, Sprühtrocknung, Ringtrocknung oder Trocknung unter Verwendung von filmbildender Ausrüstung, und kann entweder ohne weitere Verarbeitung verwendet werden oder kann unter Verwendung jeder geeigneten Technik zu einer Partikelgröße von vorzugsweise weniger als 20 Mikrometer gemahlen werden. Für andere Anwendungen ist ein feuchtes Produkt wie eine viskose Paste geeignet, und die Präparation kann entweder ohne weitere Verarbeitung verwendet werden oder nach mechanischem Aufbrechen, um ihre Viskosität zu erhöhen und die Partikelgröße zu vermindern.

[0027] Gemäß einem verwandten Aspekt stellt die Erfindung eine β-Glucan-Mannan-Präparation bereit, die mit dem Verfahren der Erfindung produziert wurde. Die Glucan-Mannan-Präparation gemäß der Erfindung umfaßt vorzugsweise hauptsächlich Glucan (zum Beispiel bis zu 80%) und etwas Mannan (zum Beispiel bis zu 50%). Die Präparation kann aus β-1-2-, β-1-3-, β-1-4- und β-1-6-Glucanen bestehen.

[0028] Die Präparation kann allein verwendet werden. Üblicherweise wird sie jedoch in Verbindung mit anderen Komponenten bereitgestellt. Damit umfassen bei diesem Aspekt der Erfindung bevorzugte Ausführungsformen, sind aber nicht beschränkt darauf, eine Futtermittelzusammensetzung für Geflügel, Fisch, Crustaceae oder Schalentiere, die die β-Glucan-Mannan-Präparation der Endung zusammen mit einer oder mehreren veterinärmedizinisch zulässigen Futtermittelkomponenten umfaßt; eine immunstimulierende Zusammensetzung, eine Zusammensetzung gegen Cholesterinämie, gegen Hypoglycämie, eine Zusammensetzung zur Stimulierung der Exkretion von Schwermetallen, umfassend die β-Glucan-Mannan-Präparation der Erfindung zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger; eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein pharmazeutisch aktives Mittel umfaßt und die β-Glucan-Mannan-Präparation der Erfindung entweder als Träger oder als Adjuvans oder als Beschichtungsmittel für eine Dosierung in fester Form wie eine Tablette oder Kapsel; und eine Zusammensetzung zum Pflanzenschutz, umfassend die β-Glucan-Mannan-Präparation der Erfindung zusammen mit einem landwirtschaftlich zulässigen Träger und gegebenenfalls einem landwirtschaftlich zulässigen Nährstoff oder Pestizid. Die β-Glucan-Mannan-Präparation kann auch im Trinkwasser für Geflügel oder Tiere oder im Umgebungswasser für Fisch, Crustaceae oder Schalentiere bereitgestellt werden.

[0029] Es sollte eindeutig verstanden werden, dass die Präparation der Erfindung im allgemeinen für die Verwendung in Produkten geeignet ist, bei denen bekannt ist, dass β-Glucane von Nutzen sind. In einigen Fällen kann eine weitere Reinigung wünschenswert oder notwendig sein, und wenn dem so ist, können Reinigungsschritte verwendet werden, die per se bekannt sind.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0030] Die Endung wird nun im Detail im Wege der Bezugnahme auf die folgenden nicht einschränkenden Beispiele beschrieben.

Beispiel 1 Autolytische Extraktion

[0031] Eine Hefeprobe wurde einem autolytischen Extraktionsverfahren unterworfen. 1 Liter verbrauchte Brauhefe (15% Trockengewicht) wurde 6 bis 48 Stunden bei 35 bis 60°C unter Rühren inkubiert. Der pH-Wert wurde unter Verwendung von 2 M NaOH oder 2 M HCl , wie erforderlich, zwischen 5 und 6 eingestellt. Diese Bedingungen fördern die Autolyse der Hefe und die Freisetzung von die Zellwand abbauenden Enzymen. Das

Material wurde zentrifugiert (3.000 g, 15 Minuten bei 4 bis 20°C), und das Sediment wurde vor der Sprüh- oder Gefriertrocknung mit einem gleichen Wasser Volumen gewaschen.

Beispiel 2 Enzymatische Extraktion

[0032] Die Produktion von Glucan-Mannan durch das Verfahren der autolytischen Extraktion von Beispiel 1 wurde durch die Zugabe von Substanzen modifiziert, von denen man weiß, dass sie die Autolyse der Hefe induzieren.

[0033] 1 Liter verbrauchte Brauhefe (15% Trockengewicht) wurde mit dem enzymatischen Verfahren von Beispiel 1 behandelt. Die weitere Autolyse wurde durch die Zugabe von proteolytischen Enzymen (Papain, Optimase APL440 (Solvay), Protomex (Novo) und/oder Mannanase (Gist Brocades) und/oder alpha-Amylase (Optidex L300 (Solvay), Ban 240L (Novo)) und/oder Glucanase (SP299 (Novo), Tunicase (Solvay) induziert. Der pH-Wert wurde unter Verwendung von 2 M NaOH oder 2 M HCl , wie erforderlich, auf den optimalen pH-Wert für die enzymatische Aktivität eingestellt. Die Hefe wurde 6 bis 48 Stunden bei 35 bis 60°C unter Rühren inkuziert. Das Material wurde zentrifugiert (3.000 g, 15 Minuten bei 4 bis 20°C), und das Sediment wurde mit einem gleichen Wasser Volumen gewaschen. Das Sediment wurde, wie vorstehend beschrieben, getrocknet.

Beispiel 3 Ein Vergleich des Glucans, das nach dem Verfahren des Stands der Technik produziert wurde (Alkali-Säure), mit dem Glucan-Mannan, das mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung-produziert wurde (autolytisch und enzymatisch).

[0034] Zum Zwecke des Vergleichs wurde unter Verwendung eines Verfahrens der Extraktion mit Alkali-Säure, basierend auf dem von Manners, D. J., et al., Biochemical Journal 135 19–30 (1973), eine Probe von gereinigtem β-(1-3)-Glucan hergestellt.

[0035] 1 Liter verbrauchte Brauhefe (20% Trockengewicht) wurde mit einem gleichen Volumen Natriumhydroxid (4% Gew./Vol.) bei 100°C 3 Stunden unter Rühren extrahiert, um die Mannoproteine zu entfernen. Das Material wurde zentrifugiert (3.000 g, 15 Minuten bei 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet 4 weitere Male mit Natriumhydroxid (4% Gew./Vol.) extrahiert. Das Sediment des letzten basischen Extraktionsschritts wurde zweimal mit Wasser (2l) gewaschen und mit Essigsäure (0,15 M) 3 Stunden unter Rühren bei 100°C extrahiert, um Glycogen zu entfernen. Das Material wurde zentrifugiert (3.000 g, 15 Minuten bei 4°C), und der Säure-Extraktionsschritt wurde 3 weitere Male wiederholt. Das Sediment vom letzten Säureschritt wurde zweimal mit Wasser (2l) und dann mit 150 ml Ethanol (96% Vol./Vol.) gewaschen. Das Material wurde vor der Sprüh- oder Gefriertrocknung zentrifugiert (3.000 g, 15 Minuten bei 4°C).

[0036] Das unter Verwendung des Verfahrens des Stands der Technik hergestellte Material (vorstehend beschrieben) oder kommerziell verfügbare Proben von Glucan, die mittels der Alkali-Säure-Extraktion hergestellt worden waren, wurden mit dem Glucan verglichen, das gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt worden war.

[0037] Unmittelbare Analyse wurde gemäß der offiziellen Analyseverfahren der Association of Official Analytical Chemists, Verfahren 27.8.04, 27.6.08, 32.1.14 (mod), 27.8.05, Sechzehnte Aushabe, 1995, durchgeführt. Die Resultate dieser Analysen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

[0038] Ein Vergleich von Glucanen, die gemäß dem Alkali-Säure-, dem autolytischen und dem enzymatischen Verfahren produziert wurden:

Unmittelbare Analyse

Analyse (% auf Basis Trockengewicht)	Alkali-Säure-Glucan	Autolytisches Glucan	Enzymatisches Glucan
Asche	3	2	3
Fett	4	4	6
Protein	1	27	20
Kohlenhydrate	90	66	71

[0039] Von dem Glucan, das gemäß dem Verfahren des Stands der Technik produziert worden war (Alkali-Säure), wurde gezeigt, dass es weniger Protein und mehr Kohlenhydrate im Vergleich zu Proben hatte, die gemäß dem vorliegenden Verfahren produziert worden waren, wie in Tabelle I gezeigt.

[0040] Fourier-transformierte Infrarot (FTIR)-Spektren der Glucanpräparate wurden unter Verwendung eines Perkin-Elmer-Spectrophotometers gemessen. Die Proben wurden gefriergetrocknet, um jegliche verbliebene Feuchtigkeit zu entfernen, in Tetrachlorethylen aufgeschlämmt und unter Verwendung einer Zelle mit horizontaler gedämpfter Gesamtreflektion (ATR) analysiert. Das vollständige Spektrum ist in **Fig.** 1 gezeigt.

[0041] Die FTIR-Spektren von Proben, die gemäß dem Stand der Technik hergestellt worden waren (Alkali-Säure), unterschieden sich von den Spektren von Proben, die gemäß dem vorliegenden Verfahren hergestellt worden waren (autolytisch oder enzymatisch, wie in **Fig.** 1 gezeigt). Den Proben, die gemäß dem Stand der Technik hergestellt worden waren, fehlte eine starke Absorption bei 2955 bis 2855 cm^1 (Zeichen für gesättigte Fettsäuren), 1744 cm^1 (Zeichen für Glycoside), 1650 cm^1 (Zeichen für Protein). Die Spektren der Glucanprobe, die gemäß dem Stand der Technik hergestellt worden waren (Alkali-Säure), waren ähnlich den Spektren eines gereinigten β-Glucan-Präparats mit einer starken Absorption in der Bande bei 950 cm^1.

[0042] Die Menge an Glucan und Mannan in den Proben, die gemäß dem Verfahren des Standes der Technik (Alkali-Säure) und gemäß dem vorliegenden Verfahren (autolytisch und enzymatisch) hergestellt worden waren, wurden durch selektive Extraktion und kolorimetrische Analyse (basierend auf Stewart, P. R., Methods In Cell Biology XII 111–145 (1975)) bestimmt. Die Glucanproben, die gemäß dem herkömmlichen Verfahren hergestellt worden waren, enthielten wenig Mannan im Vergleich mit den Proben, die gemäß dem vorliegenden Verfahren hergestellt worden waren, wie in Tabelle II gezeigt.

[0043] Die Proben wurden auch hydrolysiert und mittels Gaschromatographie analysiert, um die Zuckerkomponenten zu identifizieren. Die Proben wurden unter Verwendung von 4 M Trifluoressigsäure 4 Stunden bei 100°C unter Argon hydrolysiert. Die Säure wurde durch Verdampfen unter einem Stickstoffstrom entfernt, wonach die Proben, wie in Harris P. J. et al., Carbohydrate Research 127 59–73 (1984) beschrieben, reduziert und acetyliert wurden. Die Hydrolysate wurden mittels Gaschromatographie auf einer BPX70-Säule unter Verwendung des Flammen-Ionisations-Nachweises analysiert. Die Injektor- und Detektor-Temperatur waren 280°C bzw. 300°C. Der Ofen wurde 1 Minute auf 185°C gehalten, und dann wurde die Temperatur mit 3°C pro Minute auf 260°C angehoben und 5 Minuten auf der Endtemperatur gehalten.

[0044] Die Glucanproben, die gemäß dem Stand der Technik hergestellt worden waren, zeigten Peaks, die nur Glucose entsprachen, was anzeigt, dass die Kohlenhydratkomponente hauptsächlich Glucane waren, wie in Tabelle II gezeigt. Proben, die gemäß dem vorliegenden Verfahren hergestellt worden waren, enthielten Glucose ebenso wie erhebliche Mengen an Mannose-Zuckern, was anzeigt, dass die Kohlenhydratkomponente ein Gemisch aus Mannanen und Glucanen war. Unlösliche β-(1-3)-Glucane sind auch relativ resistent gegen Säurehydolyse im Vergleich mit Mannan: daher unterbewertet das Verfahren der Gaschromatographie die Konzentration an Glucose (und damit Glucan) im Vergleich mit dem kolorimetrischen Verfahren.

Tabelle II

[0045] Ein Vergleich von Glucanen, die gemäß dem Alkali-Säure- und dem autolytischen und dem enzymatischen Verfahren produziert wurden:

Kohlenhydrat-Analyse

Analyse (% Gew./Gew.)	Alkali-Säure-Glucan	Autolytisches Glucan	Enzymatisches Glucan
Glucan, kolorimetrischer Test	88	48	54
Mannan, kolorimetrischer Test	1	9	8
Glucose, GC-Test	65	50	45
Mannose, GC-Test	nicht nachgewiesen	25	15

[0046] Die Arten von Bindungen zwischen den Glucoseresten in den Glucanproben, die unter Verwendung des Verfahrens der Alkali-Säure-Extraktion und des vorliegenden Verfahrens (autolytisch und enzymatisch) hergestellt worden waren, wurden unter Verwendung eines Verfahrens, basierend auf dem von Harris P. J. et al., Carbohydrate Research 127 59–73 (1984), mittels der Methylierungsanalyse bestimmt.

[0047] Die Resultate in Tabelle III zeigen, dass die Probe, die mittels des Alkali-Säure-Verfahrens hergestellt worden war, vor allem aus (1-3)-verknüpfter Glucose bestand im Vergleich zu den Proben, die mittels des Ver-

fahrens gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt worden waren.

Tabelle III

[0048] Ein Vergleich von Glucanen, die gemäß dem Alkali-Säure-, dem autolytischen und dem enzymatischen Verfahren produziert wurden:

Verknüpfungs-Analyse

Verknüpfungs-Analyse von Glucose-Monomeren (relative Prozentsätze)	Alkali-Säure-Glucan	Autolytisches Glucan	Enzymatisches Glucan
Endständig	4	26	24
1-2-verknüpft	0	14	14
1-3-verknüpft	94	29	40
1-4-verknüpft	2	25	14
1-6-verknüpft	0	6	8

[0049] Die Glucanproben wurden unter Verwendung eines Mausmodells auf ihre biologische Aktivität getestet. Das Material, das durch jedes der drei Verfahren produziert wurde, hatte ein Partikelgröße von vorwiegend 100–300 Mikrometer. Das getrocknete Material wurde in einer Perlmühle zu einem Partikeldurchmesser von < 20 Mikrometer gemahlen und wurde verwendet, um es Mäuse intraperitoneal zu injizieren (2mg/Maus). Nach 72 Stunden wurden die Zellen, die in das peritoneale Exsudat induziert worden waren, von der Bauchhöhle geerntet, mit Hitze-getöteten Hefezellen inkubiert und der Anteil an phagocytischen Zellen berechnet.

[0050] Das Material, das gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt worden war (autolytisch oder enzymatisch), ist bei der Induktion einer unspezifischen Immunanwort wirksamer als das Material, das gemäß dem Verfahren der Alkali-Säure-Extraktion hergestellt worden war, wie gezeigt durch einen Anstieg bei der Zahl der Zellen in der Bauchhöhle aufgrund einer chemotaktischen Wirkung des injizierten Materials, das Entzündungszellen anzieht, und einen Anstieg bei der Zahl der phagocytischen neutrophilen Zellen und Macrophagen. Diese Ergebnisse sind in Tabelle IV gezeigt.

Tabelle IV

[0051] Ein Vergleich von Glucanen, die gemäß dem Alkali-Säure- und dem autolytischen und dem enzymatischen Verfahren produziert wurden:

Fähigkeit der Induktion von phagocytischen Zellen

Analyse	Alkali-Säure-Glucan	Autolytisches Glucan	Enzymatisches Glucan
Zellen in der Bauchhöhle ($X10^6$)	11,9	11,9	15
% phagocytische Macrophagen	45	50	70
% phagocytische neutrophile Zellen	16	33	30

[0052] Ohne an irgendeinen vorgeschlagenen Mechanismus für den beobachteten nützlichen Effekt gebunden sein zu wollen, glauben wir, dass Mannan und nicht-β-(1-3)-verknüpftes Glucan synergistisch mit dem fibrillären β-(1-3)-verknüpften Glucan zusammenwirken können, um eine bessere Immunantwort zu produzieren.

Beispiel 4 Die Verbesserung der Potenz der Glucan-Mannan-Herstellung durch Ansäuern.

[0053] 1 Liter verbrauchte Brauhefe (15% Trockengewicht) wurde mit dem enzymatischen Verfahren von Beispiel 1 behandelt. Eine Teilmenge des Sediments wurde gefriergetrocknet. Der pH-Wert des verbleibenden Sediments wurde entweder mit Salzsäure oder mit Essigsäure auf 2 bis 4 eingestellt, und dann wurde das Sediment entweder gefriergetrocknet oder bei 80°C im Ofen getrocknet. Die Zuckerbindungen wurden mittels GC-MS analysiert, wie in Beispiel 3 beschrieben.
[0054] Das Glucan-Mannan-Material wurde auf < 20 Mikrometer gemahlen; und auf seine Fähigkeit getestet, phagocytische Zellen zu induzieren, wie in Beispiel 3 beschrieben. Die Resultate in Tabelle V zeigen, dass Ansäuern, gefolgt von Trocknen im Ofen, die Wirksamkeit des Glucan-Mannans bei der Stimulierung der Immunantwort erhöhte und dass Ansäuern, gefolgt von Hitzebehandlung, einige der β-(1-6)-Bindungen im Glucan aufbricht und damit vielleicht mehr aktive Stellen im mikrofibrillären Glucan freilegt.

Tabelle V
Wirkung der Hitzetrocknung von angesäuertem Material

Analyse	Gefriergetrocknet ohne Ansäuern	Gefriergetrocknet nach Ansäuern	Im Ofen getrocknet nach Ansäuern
Zellen in der Bauchhöhle ($X10^6$)	4,15	3,9	7,1
% phagocytische Makrophagen	55	52	68
% phagocytische neutrophile Zellen	43	41	50
Verhältnis von β-(1-3)- zu β-(1-6)-Bindungen in Glucan	4,9:1	5,28:1	7,3:1

Beispiel 5 Die Verbesserung der Wirksamkeit der Glucan-Mannan-Herstellun durch Veränderung der Partikelgrgöße.

[0055] Es ist bekannt, dass die Potenz einiger Materialien durch Veränderung der Partikelgröße signifikant verändert werden kann. 1 Liter verbrauchte Brauhefe (10% Trockengewicht) wurde mit dem enzymatischen Verfahren von Beispiel 1 behandelt. Das endgültige Sediment wurde in Wasser suspendiert (20% Trockengewicht). In diesem Stadium erschien das Glucan-Mannan-Material mikroskopisch als diskrete Kügelchen von etwa 4 bis 6 Mikrometer Durchmesser. Eine Teilmenge des suspendierten Sediments wurde 6 Minuten in einem Braun-Zellhomogenisator unter Verwendung von Glaskügelchen behandelt, die im Durchmesser der Kügelchengröße von 0,25 bis 1 nun variierten. Dies zerbrach die Glucanteilchen in Partikel von einer Größe von unter 2 Mikrometer und resultierte in einem hoch viskosen Produkt mit der Konsistenz von Schlagsahne. Wenn das Produkt mit dem in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren getestet wurde, zeigte es eine gute Fähigkeit zur Stimulierung der unspezifischen Immunantwort.
[0056] In einer Abänderung des Verfahrens wurden frisch geerntete Hefezellen in einer Perlmühle gemahlen, um die Zellen aufzubrechen. Während oder nach der Mahlphase wurden die Hefezellen unter Verwendung ähnlicher Bedingungen wie den in Beispiel 1 oder 2 beschriebenen der Autolyse und dem enzymatischen Verdau unterworfen. Das unlösliche Material wurde mittels Zentrifugation geerntet und unter Verwendung des Mausmodells auf biologische Aktivität getestet. Die Resultate sind in Tabelle VI zusammengestellt.

Tabelle VI
Wirkung der Veränderung der Glucanpartikelgröße

Analyse*	Ganze Glucanpartikel (4-6 Mikrometer)	Aufgebrochene Glucanpartikel (<1 Mikrometer)	Aufgebrochene und dann enzymatisch verdaute Hefepartikel (<1 Mikrometer)
% Zuwachs an Zellen/Bauchhöhle	150	250	250
% Zuwachs an phagocytischen Macrophagen	50	118	125
% Zuwachs an phagocytischen neutrophilen Zellen	10	24	30

*Verglichen mit mit getrockneter Hefe oder mit Dextran injizierten Kontrollen

[0057] Für das Aufbrechen der Hefe- oder Glucanpartikel kann eine Reihe von anderen Naßmahlverfahren und anderer Ausrüstung verwendet werden. Diese umfassen Druckhomogenisierung (Manton Gaulin), Perlmahlen und Kugelmahlen (Dyno-Mühle, Drais-Mühle, Netzsch-Mühle), sind aber nicht beschränkt darauf.

Beispiel 6 Die Verbesserung der Wirksamkeit der Glucan-Mannan-Herstellun durch Veränderung der Natur der verwendeten Enzyme.

[0058] Eine frische Hefeaufschlämmung (16,5% Trockengewicht) wurde mit Wasser gewaschen und dann 17 Stunden bei 50°C unter Rühren inkubiert. Die autolysierte Hefe wurde 30 Minuten auf 100°C erhitzt und dann in zwei Teilmengen aufgeteilt.
[0059] Eine Teilmenge wurde mit Enzymen von Solvay behandelt. Die Hefe wurde 2 Stunden bei 47°C und pH-Wert 9 mit 1% Gew./Gew. Optimase APL-440 (ein proteolytisches Enzym) unter Rühren behandelt. Der pH-Wert wurde dann auf 7,5 abgesenkt und 1% Gew./Gew.
[0060] Tunicase FN (Glucanase)-Enzym zugegeben. Nach 6 Stunden Inkubation wurde 1% Optidex (Glucoamylase) zugegeben, und das Gemisch wurde weiterhin 6 Stunden bei 60°C und pH-Wert 4,5 inkubiert. Es wurde ein viskoses Sediment erhalten. Das Sediment wurde gefriergetrocknet und mit einer Kugelmühle gemahlen.
[0061] Die zweite Teilmenge wurde mit Enzymen von Novo inkubiert. Die Hefe wurde 6 Stunden mit 1% Gew./Gew. BAN (Glucoamylase)- und 1% Gew./Gew. Mutanase SP299 (Glucanase)-Enzym bei einem pH-Wert von 5,5 unter Rühren inkubiert. 1% Protomex (ein proteolytisches Enzym) wurde zugegeben, und das Gemisch wurde weitere 16 Stunden bei 55°C und pH-Wert 5,5 inkubiert.
[0062] In einem anderen Experiment wurde das gemäß Beispiel 1 hergestellte Glucan-Mannan mit 1% Gew./Gew. Tunicase behandelt (6 Stunden bei pH-Wert 7,5 und 35°C). Das mit Tunicase behandelte Glucan-Mannan erhöhte die Viskosität. Der Herstellung wurde zentrifugiert und das Sediment gefriergetrocknet und gemahlen. Der Überstand des mit Tunicase behandelten Glucans wurde ausführlich gegen destilliertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.
[0063] Die Arten von Verknüpfungen zwischen den Glucoseresten in den Glucanproben wurde, wie in Beispiel 3 beschrieben, analysiert. Die biologische Aktivität wurde unter Verwendung des Mausmodells auch . getestet. Die Resultate sind in Tabelle VII gezeigt, welche zeigt, dass Enzyme verwendet werden können, um die Natur des Glucanpräparats zu verändern. So resultiert die Behandlung mit Tunicase (Solvay) zum Beispiel in einem viskosen Produkt mit reduzierten β-(1-6)-Bindungen in dem Glucanpräparat. Enzyme können auch verwendet werden, um eine biologisch aktive lösliche Form von Glucan zu produzieren.

Tabelle VII
Wirkung der Enzymaktivität

Analyse*	Verfahren mit Solvay-Enzymen	Verfahren mit Novo-Enzymen	Tunicase-Sediment	Tunicase-Überstand
Verhältnis von β-(1-3)- zu β-(1-6)-Bindungen in Glucan	25:1	4,6:1	5,4:1	nicht bestimmt
% Zuwachs an Zellen/Bauchhöhle	330	268	110	65
% Zuwachs an phagocytischen Macrophagen	65	90	96	140

Beispiel 7 Die Veränderung der Viskosität der Glucan-Mannan-Herstellung

[0064] Die Viskosität des Glucan-Mannans, hergestellt wie in Beispiel 2 beschrieben, kann auch durch Ansäuern (Beispiel 4), durch Mahlen (Beispiel 5) und durch Veränderung der Art des verwendeten Enzyms (Beispiel 6) verändert werden. Die Viskosität wurde unter Verwendung eines CSL100-Rheometers mit Platten von 60 mm gemessen. Die Messungen wurden bei 20°C bei einer Scherrate von 100/s und unter Verwendung einer 10%-igen Gew./Vol. Glucansuspension vorgenommen, und die Resultate sind in Tabelle VIII zusammengestellt.

Tabelle VIII
Die Veränderung der Viskosität der Glucan-Mannan-Herstellung.

Behandlung	Viskosität (Pa.s)
Glucan, hergestellt wie in Beispiel 2, mit einem pH-Wert von 4,5	$5{,}8 \times 10^{-3}$
Glucan, hergestellt wie in Beispiel 2, mit einem pH-Wert von 4,5 und 10 min gekocht	$7{,}82 \times 10^{-3}$
Glucan, hergestellt wie in Beispiel 2, mit einem pH-Wert von 4,5, 10 min gekocht und auf unter 1 Mikrometer gemahlen	1,10
Glucan, hergestellt wie in Beispiel 2, mit einem pH-Wert von 3, 10 min gekocht und auf unter 1 Mikrometer gemahlen	1,40
Glucan, hergestellt wie in Beispiel 6 unter Verwendung von Tunicase	1,50

[0065] Daher kann die Viskosität der Glucan-Mannan-Herstellung mittels Hitze, Säure, Enzymen und durch Veränderung der Partikelgröße verändert werden, um ein viskoses Material zu produzieren. Dieses kann als Creme, Gel oder dergleichen verwendet werden.

[0066] Beispiel 8 Wirksamkeit der Glucan-Mannan-Herstellung als Immunverstärker in Fischen

[0067] Regenbogenforellen (Oncorhynchus mykiss) wurden von einer kommerziellen Farm in Victoria erhalten. Die Fische hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 13 g und wurden auf 6 experimentelle Tanks von 260 1 mit 12 Fischen pro Aquarium verteilt. Die Fische wurden 7 Tage akklimatisiert, bevor das Experiment begann.

[0068] Es wurden Standardpellets für Forellen verwendet, und die Fische wurden zweimal täglich mit etwa 5% ihres Körpergewichts pro Tag gefüttert. Die Glucan-Mannan-Herstellung wurde in das Futter eingebracht und ergab eine Endkonzentration von 0,1% Gew./Gew. im endgültigen Futter. Das gesamte Futter einschließlich des Kontrollfutters wurde erneut in Pellets geformt und bei 50°C getrocknet. Nach drei Wochen Fütterung wurden die Fische mit Benzococain (1 : 10.000) betäubt und getötet.

[0069] Die Vornieren wurden in Gewebekulturmedium gegeben, das 1 Einheit Heparin pro ml enthielt. Das

Gewebe wurde durch ein Edelstahlsieb mit der Maschengröße 80 passiert, um einzelne Zellen zum isolieren. Die Zellsuspensionen wurden mit Dulbecco modifiziertem Eagles-Medium (DMEM) (Gibco Laboratories) gewaschen. Die Zellen wurden einem Nitroblau-Tetrazolium-Test, um die Produktion des Superoxid-Anions nachzuweisen (basierend auf Rook, J., et al., J. Immunol. Methods 82 161–167 (1985)), und einem Phagocytose-Test unterworfen, um die Fähigkeit der Macrophagen zu bestimmen, die Hefezellen zu phagocytieren.

[0070] Bei dem Glucan-Mannan, das wie in Beispiel 2 beschrieben produziert wurde, wurde gefunden, dass es die Phagocytose-Aktivität und die Produktion des Superoxid-Anions in Zellen erhöhte, die von der Vorniere von Regenbogenforellen isoliert worden waren, wie in Tabelle IX gezeigt. Die Daten zeigen, dass Glucan-Mannan, das wie in Beispiel 2 beschrieben produziert wurde, das Immunsystem in Regenbogenforellen stimulieren kann.

Tabelle IX
Wirksamkeit als Verstärker der Immunantwort in Fischen

Futter	% Phagozytose	Superoxid-Produktion
Kontrolle	27,2	0,038
Glucan-Mannan-Herstellung (enzymatisches Verfahren)	37,1	0,068

Beispiel 9 Fähigkeit der Glucan-Mannan-Herstellung zur Reduktion der Sterblichkeit bei Fischen

[0071] Regenbogenforellen von weniger als einem Jahr (Oncorhynchus mykiss) wurden von einer kommerziellen Farm in Tasmanien erhalten. Sie hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 65 g. Die Fische wurden auf 6 isolierte Aquarien mit 16 Fischen in jedem Aquarium verteilt. Die Fische wurden bei einer Lufttemperatur von 15°C und einer Wassertemperatur von 13–18°C gehalten und wurden 7 Tage akklimatisiert, bevor das Experiment begann.

[0072] Die Fische wurden täglich bis zur Sättigung mit Gibson-Forellenpellets mit etwa 2,5% des Körpergewichts pro Tag gefüttert. Die Glucan-Herstellungen (entweder gemäß Beispiel 2 hergestelltes Glucan oder unter Verwendung des Alkali/Säure-Extraktionsverfahrens produziertes Glucan) wurden in eine 5%-ige Gew./Gew. Gelatinelösung eingebracht und die Pellets damit beschichtet, um in dem endgültigen Futter eine Konzentration von 0,1% Gew./Gew. Glucan bereitzustellen. Die an die Kontrollfische verfütterten Pellets wurden nur mir Gelatine beschichtet. Das folgende Fütterungsschema wurde verwendet: 14 Tage mit ergänztem Futter, gefolgt von 42 Tagen mit nicht ergänztem Futter, und dann noch einmal 14 Tage mit ergänztem Futter. Eine Woche nach der zweiten Periode der Ergänzung wurden die Fische mit Vibrio anguillarum herausgefordert.

[0073] Es wurde ein Tasmanischer Stamm von V. anguillarum Serotyp C (äquivalent zu Serotyp 01) verwendet (Munday, B., et al., Immunology and Cell Biology 70 391–397 (1992)). Der Organismus wurde in einem Nährbrühenmedium gezüchtet, das mit 2% NaCl ergänzt wurde.

[0074] Die Fische wurden mit V anguillarum durch intraperitoneale Injektion des Organismus mit 3×10^7 UBE (LD_{50}-Dosis) herausgefordert und wurden 10 Tage mindestens zweimal täglich beobachtet. Von allen Fischen, die starben, wurde V. anguillarum gezüchtet.

[0075] Die Todesfälle traten während der drei Tage nach der Inokulation ein. Am 3. oder 4. Tag nach der Inokulation waren viele in den Kontrollgruppen lethargisch und hatten Hyperaemie an der Basis der Flossen und am Bauch, obgleich in dieser Gruppe keine weiteren Todesfälle beobachtet wurden.

[0076] Nach der Herausforderung mit V. anguillarum war die Schutzwirkung des Glucans gemäß der Erfindung offensichtlich. Ein Glucan, das unter Verwendung des Verfahrens der Alkali-Säure-Extraktion hergestellt worden war, war weniger wirksam, wie in Tabelle X gezeigt.

Tabelle X
Fähigkeit von Glucan-Mannan zur Reduktion der Sterblichkeit von Fischen

Futter	% Sterblichkeit 10 Tage nach der Herausforderung
Kontrolle	15,6
Glucanherstellung (enzymatisches Verfahren)	3,1
Glucanherstellung (Alkali-Säure-Verfahren)	9,4

[0077] Die Resultate zeigen, dass das Glucan-Mannan, das wie in Beispiel 2 beschrieben produziert wurde, verwendet werden kann, um die Resistenz von Regenbogenforellen gegen eine Infektion mit Vibrio anguillarum zu verbessern, und einer Herstellung von Glucan gemäß dem Stand der Technik überlegen ist.

Beispiel 10 Fähigkeit der Glucan-Mannan-Herstellung zur Reduktion der Sterblichkeit in der Garnele Penaeus monodon

[0078] 5–10 g P. monodon-Garnelen wurden von einer Farm in Queensland erhalten. 12 Garnelen wurden in 12 Aquarien von 60 l gewogen. Die Garnelen wurden 5 Tage in den Aquarien akklimatisiert und dann mit Kontrollfutter oder Futter zur Behandlung gefüttert. Nach 23 Tagen wurde den Garnelen eine LD_{50}-Dosis Vibrio harveyi injiziert. Die Todesfälle wurden 7 Tage aufgezeichnet. Während dieses Zeitraums wurden die Garnelen mit dem Kontrollfutter oder Futter zur Behandlung gefüttert.
[0079] Alle Garnelen wurden mit einem mit Dampf pelletierten Standardfutter (CP 100) gefüttert. Glucan-Mannan gemäß der vorliegenden Endung wurde zu dem Futter zur Behandlung durch Adhäsion mit Gelatine an der Oberfläche der Pellets zugegeben. Es wurde eine Lösung mit etwa 5% Gew./Vol. Gelatine hergestellt und dem Kontrollfutter mit der Rate von 100ml/kg Pellet beigemischt. Die für das Futter zur Behandlung verwendete Gelatinelösung enthielt genug Glucan-Mannan, das gemäß Beispiel 2 hergestellt worden war, oder ein Glucan, das unter Verwendung des Verfahrens der Alkali-Säure-Extraktion produziert worden war, um eine Endkonzentration von 0,1% Gew./Gew. in dem endgültigen Futter sicherzustellen. Die Fütterungsrate war 6,5 bis 5% des Körpergewichts der Garnelen/Tag.
[0080] Ein pathogener Stamm von V. harveyi, Stamm 656, isoliert aus einer sterbenden P. esculentus-Garnele, wurde für die Herausforderungsuntersuchungen verwendet. Die Bakterien wurden bei 26–28°C übernacht in Seawater Liquid Broth mit Vitaminen subkultiviert. Die Zellen wurden dreimal mit 0,73%-iger Gew./Vol. Salzlösung mit 30 Minuten Zentrifugation bei 2.000 UpM und 40°C gewaschen. Bei jedem Schritt wurde mit einem Vortexgerät gemischt. Es wurden serielle Verdünnungen der Bakteriensuspension hergestellt, und jede Verdünnung wurde in nicht behandelte Garnelen injiziert, um die LD_{50}-Dosis zu berechnen. Von jeder seriellen Verdünnung wurden 0,1 ml mit 25 ml Marine Agar mit Vitaminen (MAV) bei 42°C gemischt und in Petrischalen gegossen. Nach 24 Stunden bei 26–28°C wurden die Kolonien gezählt, und die Zahl an Bakterien in jeder der Inokulationssuspensionen wurde berechnet. Die gegossenen Platten wurden verwendet, um die Zahl an Bakterien in dem Injektionsvolumen von 0,05 ml zu berechnen.
[0081] Der V. harveyi-Stamm 656, injiziert mit einer Dosis von $1 - 2 \times 10^5$ in 0,05 ml, wurde letztlich für die LD_{50}-Herausforderung ausgewählt. Den Garnelen wurde in die zweite abdominale Sektion injiziert. Die Sterblichkeit wurde für die nächsten sieben Tage täglich festgehalten, der Sterblichkeitsprozentsatz wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Sterblichkeit} = \frac{\text{Zahl an toten Garnelen} - A}{\text{Gesamtzahl an Garnelen} - A.} \times 100$$

A = Sterblichkeit nach Tag 1.
[0082] Die Leistungsfähigkeit und die Gesundheit der Garnelen wurden im Fütterungszeitraum vor der Herausforderung mit V. harveyi aufgezeichnet. Während es keine signifikante Wirkung beim Wachstum gab, hatten die Garnelen, die mit dem Glucan-Mannan gefüttert wurden, das wie in Beispiel 2, beschrieben hergestellt wurde, einen besseren Appetit, waren lebendiger und zeigten eine niedrigere Sterblichkeitsrate.
[0083] Nach der Herausforderung mit V. harveyi wurde die Schutzwirkung des Glucans der Erfindung evident. Glucan, das gemäß dem Alkali-Säure-Verfahren hergestellt worden war, war weniger wirksam, wie in Tabelle XI gezeigt.

Tabelle XI
Reduktion der Sterblichkeit in Garnelen

Futter	% Sterblichkeit 7 Tage nach der Herausforderung	Zahl der für die Herausforderung verwendeten Garnelen
Kontrolle	50	99
Glucanherstellung (enzymatisches Verfahren)	11*	92
Glucanherstellung (Alkali-Säure-Verfahren)	18	55

*Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe

[0084] Das Glucan-Mannan, das wie in Beispiel 2 beschrieben hergestellt wurde, kann daher verwendet werden, um erfolgreich die Krankheitsresistenz der Garnele P. monodon zu verbessern.

Beispiel 11 Fähigkeit der Glucan-Mannan-Herstellung zur Verbesserung Krankheitsresistenz in Geflügel

[0085] 240 Hühner zum Braten gemischten Geschlechts wurden auf 4 verschiedene Futterbehandlungen verteilt. Die einen Tag alten Küken für Brathühnchen wurden in zwei Batteriebrütern untergebracht und gleichmäßig auf die 24 Abteile mit 10 Küken pro Abteil verteilt. Die Küken wurden entweder mit einem kommerziellen Standardfutter ohne medizinische Zusätze (Kontrolle) oder einem Standardfutter mit dem Futter zu lg/kg Futter zugesetztem Glucan-Mannan gefüttert. Das Glucan-Mannan wurde gemäß dem Verfahren von Beispiel 2 oder Beispiel 5 (Enzymwirkung während oder nach dem Mahlen) hergestellt. Den Küken wurde das Futter zwischen dem Alter von einem Tag und 21 Tagen ad libitum angeboten. Die Wachstumsraten wurden in wöchentlichen Abständen aufgezeichnet.
[0086] Beim Abschluß der Fütterungsversuche wurde 18 Vögeln von jeder Behandlung Blut entnommen. Das Blut wurde in mit Heparin versetzten Röhrchen gesammelt und zweimal mit PBS gewaschen. Die bakterizide Aktivität von zirkulierenden Blutleukocyten wurde durch Isolierung von Leukocyten aus einer kleinen Blutprobe und Inkubation mit einer lebenden Suspension von Staphylococcus aureus bewertet. Nach der Inkubationszeit von 1 Stunde wurden die Blutzellen lysiert, und die Zahl an lebenden Bakterien wurde gemessen.
[0087] 20 andere Vögel von jeder Behandlung wurden in Blasenisolatoren gegeben, mit einer Behandlungsgruppe pro Isolator. Kotabstriche, die bei jedem Vogel gemacht wurden, bestätigten, dass die Vögel frei von Salmonellen waren. Das Futter wurde bestrahlt, um sicherzustellen, dass es frei von Salmonellen war. Die Vögel wurden oral mit einem gentechnischen Stamm von Salmonella typhimurium (nalidixinsäureresistent) inokuliert. Fünf Vögel von jeder Behandlung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten getötet und aus dem Verdauungstrakt wurde die Zahl an Salmonellen festgestellt. Die Resultate sind in Tabelle XII und Tabelle XIII zusammengefaßt.

Tabelle XII
Wirkung der Glucan-Mannan-Herstellung auf die Gesundheit von Geflügel:
Wachstumsraten und Monocytenaktivität

Behandlung	Gewicht am Tag 21 (g)	Lebende Bakterien (UBE/ml)
Kontrolle	799	$2,3 \times 10^4$
0,1% Glucan (enzymatisches Verfahren)	813	$1,2 \times 10^4$
0,1% Glucan, gemahlen und dann enzymatisch verdaut	818	$7,7 \times 10^3$

Tabelle XIII
Herausforderungsversuche : Salmonellen-Kolonisation

Analyse	Kontrolle	0,1% Glucan (enzymatisches Verfahren)	0,1% Glucan, gemahlen und dann enzymatisch verdaut
% Vögel, nach 2 Tagen kolonisiert	93	0	60
% Vögel, nach 4 Tagen kolonisiert	100	60	20
Salmonellenzahlen (UBE/g) nach 2 Tagen	2364	0	760
Salmonellenzahlen (UBE/g) nach 4 Tagen	30000	15840	6000

[0088] Tabelle XII zeigt, dass Glucan-Mannan eine 2–3%-ige Verbesserung bei den Wachstumsraten erreichte. Die Glucan-Mannan-Herstellung erhöht die Immunantwort in Küken für Brathühnchen und erhöht die Fähigkeit, Infektionen zu widerstehen, während Tabelle XIII zeigt, dass die Zugabe von Glucan-Mannan zum Futter das Auftreten und das Ausmaß der Kolonisation durch Salmonellen in Küken für Brathühnchen signifikant reduziert.

Beispiel 12 Funktionelle Getränke

[0089] Die Glucan-Mannan-Herstellung gemäß der vorliegenden Erfindung kann zu Getränken oder Essen (z. B. Yoghurt) zugegeben werden, um die Gesundheit von Menschen zu verbessern, die zu Infektionen neigen, wie immunologisch beeinträchtigte Individuen, Athleten in intensivem Training und Personen mit einem hektischen Lebensstil oder die an Problemen mit dem Verdauungstrakt leiden. Eine geeignete Formulierung zur Verwendung als ein nicht alkoholisches Getränk ist:
25% Saftgehalt von Karotten, Tomaten und/oder Orangen
1% (Gew./Vol.) Glucan-Herstellung

Zusammenfassend

(i) Unser Verfahren zur Produktion einer partikulären Glucan-Herstellung, die Mannan enthält und mit einer immunstimulierenden Aktivität, unterscheidet sich erheblich von bisher bekannten Verfahren, die auf Extraktion mit Alkali-Säure, Phenol : Wasser oder Lösungsmittel beruhen.
(ii) Das Glucan-Mannan-Material, das mit unserem Verfahren produziert wird, ist weniger rein als dasjenige, das mit dem Verfahren der Extraktion mit Alkali-Säure produziert wird, es ist jedoch wirksamer bei der Stimulierung einer unspezifischen Immunantwort in Mäusen.
(iii) Die Aktivität des Glucan-Mannan-Materials kann durch Ansäuern des Materials vor der Hitzetrocknung verbessert werden.
(iv) Die Viskosität und die biologische Aktivität des Glucan-Mannan-Materials kann durch Veränderung der Partikelgröße, Säurebehandlung und Enzymbehandlung signifikant verändert werden.

[0090] Das Glucan-Mannan-Material der vorliegenden Erfindung ist in einer Reihe von Gebieten von Nutzen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf:
i) Aquakultur. Um die Resistenz von Knochenfischen und Crustaceae bei verschiedenen über das Wasser übertragenen Infektionen zu erhöhen. Das Glucan-Material kann in zubereitetem Fischfutter verabreicht werden.
ii) Tierische Landwirtschaft: Das Glucan-Material kann den Tieren und dem Geflügel in Viehfutter, Haustierfutter und in einer flüssigen Form verabreicht werden.
iii) Tiermedizinische und medizinische Anwendungen: Das Glucan-Mannan-Material kann als eine topische Creme oder ein topischer Film für die Wundheilung oder es kann oral, intranasal oder mittels parenteraler Injektion verabreicht werden.
iv) Als ein Lebensmittelzusatzstoff:: Hefezellwandmaterial, das als Nebenprodukt produziert wird, ist bereits ein zugelassener Lebensmittelzusatzstoff als ein Verdickungsmittel oder zur Bereitstellung von Nahrungs-

fasern in Salatsoßen, Suppen, Aufstrichen, Soßen usw., und ist von Nutzen in "funktionellen" Lebensmitteln und Getränken, um Resistenz gegen Krankheit zu vermitteln.

v) Kosmetika: in Cremes und Lotionen, um zum Beispiel Sonnenbrand zu reduzieren und in Formulierungen für die empfindliche Haut.

vi) Pharmazeutika: Als Wundheilungsmittel, als anti-Krebsmittel, als anti-Infektionsmittel bei immunsupprimierten Patienten oder Patienten, die sonst zu Infektionen neigen. Das Produkt der Erfindung kann in Cremes, Lotionen, Tabletten, Mundwasser verwendet werden oder das Material kann zu einem Film getrocknet werden zur Verwendung als Verband bei Verbrennungen. Es kann als Adjuvans mit Impfstoffen, Antibiotika oder anderen pharmazeutischen Präparaten verwendet werden.

[0091] Es ist klar zu verstehen, dass das Glucan-Mannan-Produkt der Endung bei den Anwendungen von β-Glucanen einsetzbar ist, die im Stand der Technik beschrieben wurden. Es wird dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet offensichtlich sein, dass, während die Erfindung zum Zwecke der Klarheit und des Verständnisses etwas detailliert beschrieben wurde, bei den Ausführungsformen und Verfahren, die hier beschrieben werden, verschiedene Modifikationen und Veränderungen vorgenommen werden können, ohne den Umfang des erfinderischen Konzepts zu verlassen, das in dieser Beschreibung offenbart wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines immunstimulatorischen Präparats, welches β-Glucane und Mannane enthält, worin die β-Glucane 1,3-β-Glucane und 1,6-β-Glucane aufweisen, welches Verfahren die Schritte umfasst:
a) Zellen eines Mikroorganismus einem ersten Autolyseschritt bei einem pH-Wert von 5 bis 6 und einer Temperatur von 35° bis 60°C für 6 bis 48 Stunden unterziehen, um ein Material mit einer Partikelgröße von 100 bis 300 Mikrometer zu erzeugen;
b) Abtrennen des festen Materials von den autolysierten Produkten;
c) das feste Material von Schritt von b) einem zweiten Autolyseschritt in Gegenwart eines oder mehrerer Mittel unterziehen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem proteolytischen Enzym, Mannanase, Amylase und β-Glucanase, bei einem pH-Wert von 4 bis 6 und einer Temperatur von 35° bis 60°C für 6 bis 48 Stunden;,
d) Abtrennen des festen Materials von dem autolysierten Produkt; und anschließend
e) Verringern des festen Materials auf Partikel von kleiner als 2 Mikrometer.

2. Präparat, im Wesentlichen bestehend aus β-Glucan und Mannan, worin die – Glucanase 1,3-β-Glucane und 1,6-β-Glucane aufweisen, erhalten durch:
a) Autolyse von Zellen eines Mikroorganismus bei einem pH-Wert von 5 bis 6 und einer Temperatur von 35° bis 60°C für 6 bis 48 Stunden; und anschließend
b) Autolysieren des Produktes von Schritt a) in Gegenwart von einem oder mehreren Mitteln, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem proteolytischen Enzym, Mannanase, Amylase und β-Glucanase, bei einem pH-Wert von 4 bis 6 und einer Temperatur von 35° bis 60°C für 6 bis 48 Stunden, wobei das Produkt eine Partikelgröße von kleiner als etwa 2 Mikrometer hat.

3. Tier-, Geflügel-, Fisch- oder Crustacea-Futterzusammensetzung, aufweisend ein Präparat nach Anspruch 2 oder ein immunstimulatorisches Präparat nach Anspruch, 12, zusammen mit einer oder mehreren veterinärmedizinisch zulässigen Nährmittelkpomponenten.

4. Tier-, Geflügel-, Fisch- oder Crustacea-Futterzusammensetzung nach Anspruch 3, worin die veterinärmedizinisch zulässige Nähmittelkpomponente Trinkwasser aufweist.

5. Pharmazeutische Zusammensetzung, aufweisend ein Präparat nach Anspruch 2 oder ein immunstimulatorisches Präparat nach Anspruch 12 zusammen mit einem pharmazeutisch zulässigen Träger.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung; aufweisend einen pharmazeutischen Wirkstoff und Präparat nach Anspruch 2 oder ein immunstimulatorisches Präparat nach Anspruch 12.

7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, worin das Präparat als ein Träger oder eine Beschichtung vorliegt.

8. Zusammensetzung zum Pflanzenschutz, aufweisend ein Präparat nach Anspruch 2 oder ein immunstimulatorisches Präparat nach Anspruch 12 zusammen mit einem landwirtschaftlich zulässigen Träger und wahlweise einem landwirtschaftlich zulässigen Nährmittel oder Pestizid.

9. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei die Zusammensetzung für die Behandlung von Erkrankungen verwendet wird, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Immunsupression, Hypercholesterinämie, Hypoglykämie und Schwermetallexkretion.

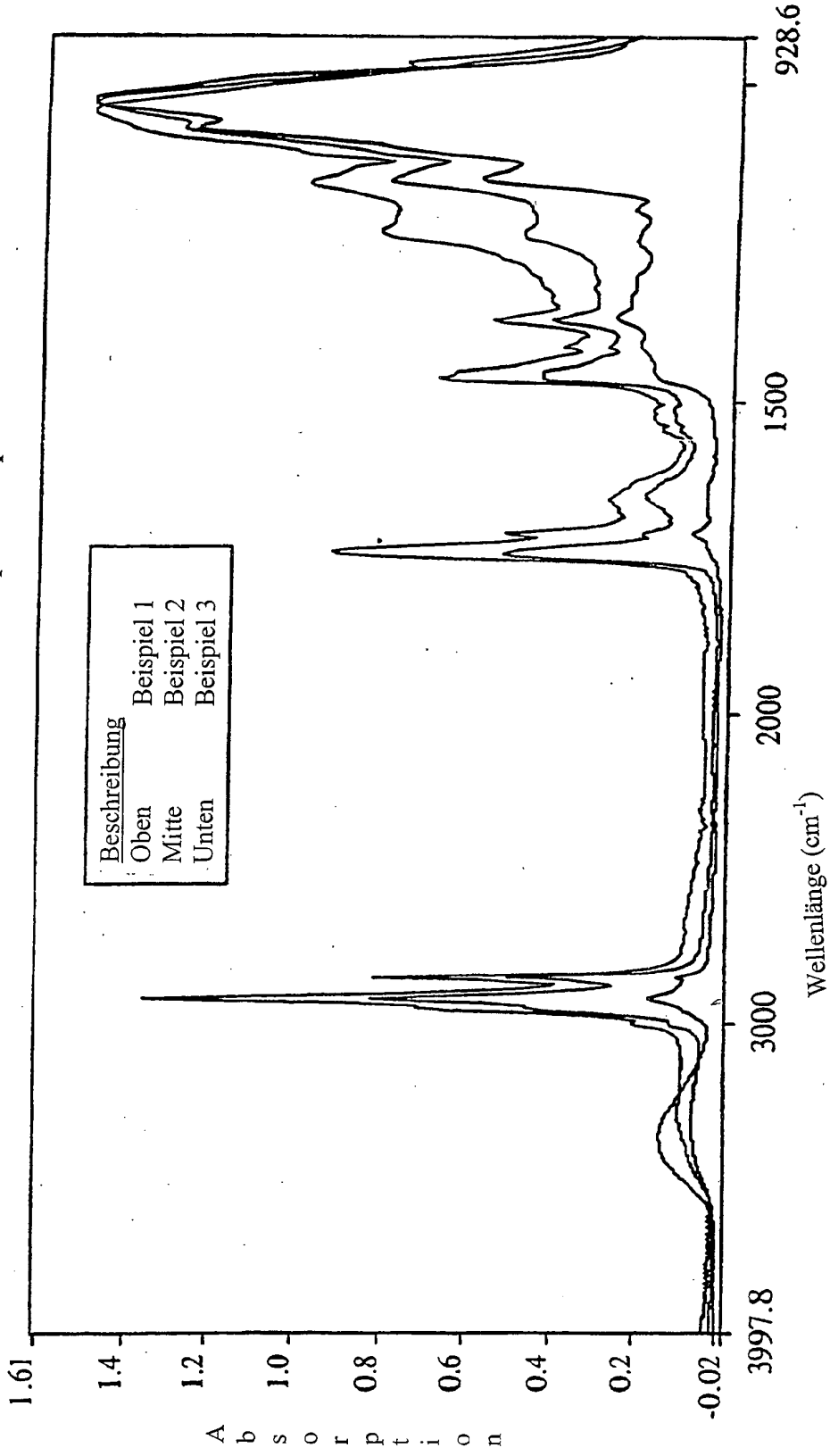
10. Nährmittelprodukt aufweisend ein Praparat nach Anspruch 2 oder ein immunstimulatorisches Präparat nach Anspruch 12.

11. Nährmittelprodukt nach Anspruch 10, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Getränken, Dressings, Suppen, Brot oder Soßen, Überzügen, Joghurt und Molkereiprodukten.

12. Immunstimulatorisches Präparat, im Wesentlichen bestehend aus β-Glucan und Mannan, hergestellt nach einem Verfahren, umfassend die Schritte:
a) Autolysieren von Zellen eines Mikroorganismus bei einem pH-Wert von 5 bis 6 und einer Temperatur von 35° bis 60°C für 6 bis 48 Stunden;
b) Abtrennen des festen Materials von dem autolysierten Produkt;
c) Autolysieren des Produktes von Schritt b) in Gegenwart von einem oder mehreren Mitteln, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem proteolytischen Enzym, Mannanase, Amylase und β-Glucanase bei einem pH-Wert von 4 bis 6 und einer Temperatur von 35° bis 60°C für 6 bis 48 Stunden;
d) Abtrennen des festen Materials von dem autolysierten Produkt; und anschließend
e) Verringern der Partikel des autolysierten Produkts auf weniger als 2 Mikrometer.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1 : Fourier transformierte Infrarot-Spektroskopie