

申請日期	87.3.19
案 號	87104066
類 別	C12P19/12

(以上各欄由本局填註)

A4
C4

公告本

521087

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 新 型	中 文	α-單葡糖基橙皮苷高含有物之製法
	英 文	A PROCESS FOR PRODUCING HIGH CONTENT OF α-MONOGOSYLHESPERIDIN PRODUCT CONTAINING
二、發明 人	姓 名	1. 三宅俊雄 2. 湯本隆
	國 籍	日本國
	住、居所	1. 日本國岡山縣岡山市伊島町1丁目3番23號 2. 日本國千葉縣市原市岩崎西1丁目6番41號 東洋精糖株式会社千葉工場內
三、申請人	姓 名 (名稱)	林原生物化學研究所股份有限公司
	國 籍	日本國
	住、居所 (事務所)	日本國岡山縣岡山市下石井1丁目2番3號
	代 表 人 姓 名	林原健

洪式代理
陳昭誠
大校正章

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利, 申請日期: 案號: , 有 無主張優先權
 日本 1997年3月24日 特願平9-69588(主張優先權)

有關微生物已寄存於: , 寄存日期: , 寄存號碼:

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

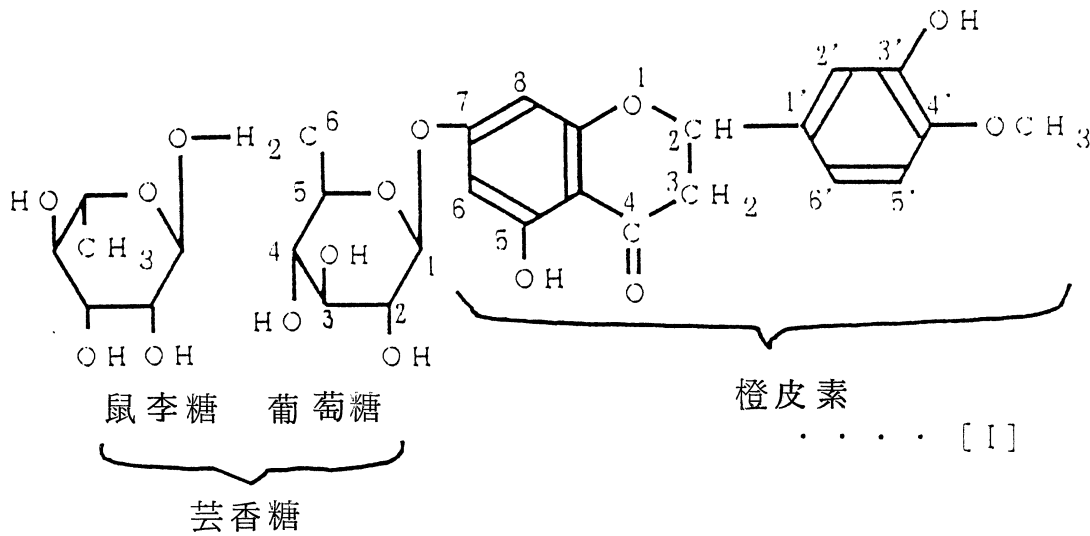
線

五、發明說明 (1)

本發明乃 α -單葡糖基橙皮苷高含有物之製法有關者。更詳言之，處理含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷之溶液而析出分離並採集 α -單葡糖基橙皮苷高含有物之製造方法有關者。

橙皮苷 (Hesperidin) 具有下列一般式 [I]：所示構造：

[橙皮苷]



係由橙皮素 (5,7,3'-三羥基-4'-甲氧基黃烷酮) 的 7-位置的羥基和芸香糖 (4-鼠李糖基-(α 1 \rightarrow 6)-葡萄糖) 以 β -結合而形成之化合物。這種橙皮苷一般存在於柑桔類之未熟果皮中，具有強化微細血管、預防出血、調整血壓等生理作用而做為維生素 P 提供醫藥品或化粧品上之用途。該橙皮苷可溶解於鹼性水溶液，但難溶於水或酸中，在室溫下 50 公升的水中僅能溶解 1 公克 (大約 0.002W/V%) 左右。因此，橙皮苷少量存在於缶裝溶液中，該溶液就呈顯白濁現象而影響其商品價值。

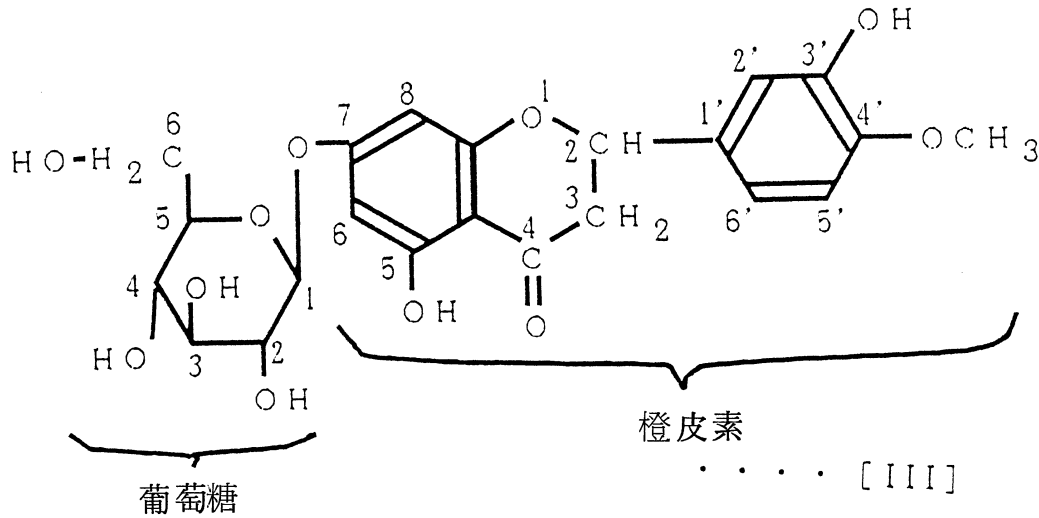
過去，為防止因為橙皮苷所引起的溶液白濁現象，有各種方法見諸文獻。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(4)



另外，米谷、寺田等人以藉「環糊精合成酶形成橙皮苷配糖體和天然色素之穩定化」(參考日本食品科學工學會誌，第42卷第5期，第376~382,頁1995年)報告使糖受體之橙皮苷和糖供體之 β -CD以及糖轉移酶之CGT酶反應，獲得橙皮苷配糖體(Hsp-Gn)之後，再於該橙皮苷配糖體之精製過程，以 α -鼠李糖苷酶作用在該橙皮苷配糖體，祇有未反應之橙皮苷被水解，然後利用交聯葡聚糖LH-20分離管層析法可以很有效地分離橙皮苷配糖體(精製物)和未反應之橙皮苷，所得上述橙皮苷配糖體(精製物)添加在天然色素溶液中，可抑制紫外光所引起之天然色素之褪色。

然而下列一般式[IV]所示 α -單葡糖基橙皮苷，依據上述米谷、寺田等人之文獻所記載，要預先利用離子交換樹脂之Amberlite XAD-16分離所含有橙皮素，再從所得 β -單葡糖基橙皮素和 α -單葡糖基橙皮苷和 α -雙葡糖基橙皮苷之混合物中，利用更昂貴的層析分離法分離 α -單葡糖基橙皮苷和 α -雙葡糖基橙皮苷，所以很難有效地採集得 α -單葡糖基橙皮苷高含物。如果有更簡單經濟的採

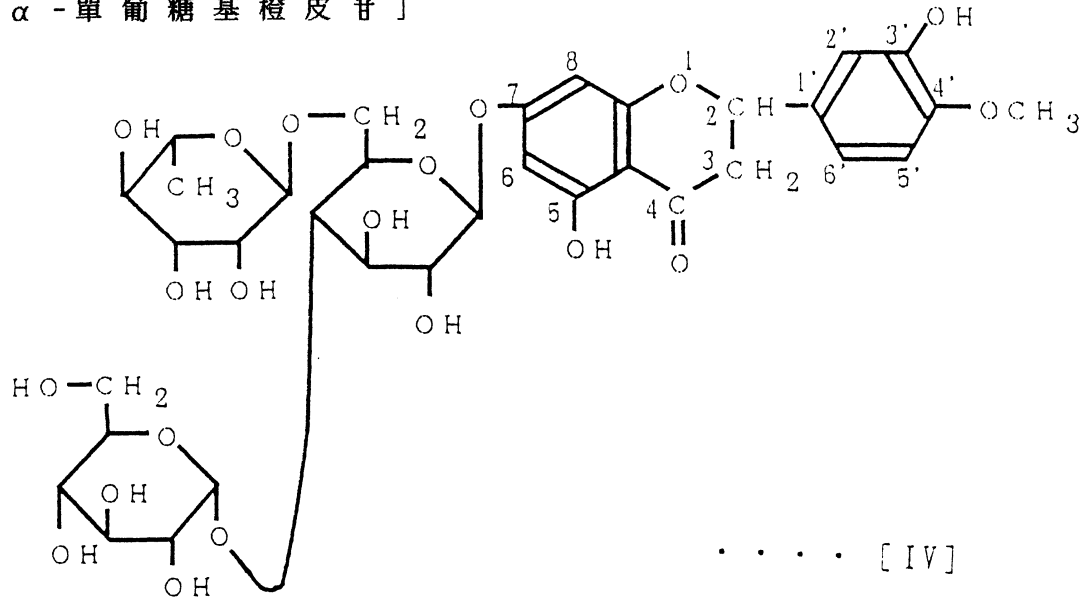
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(5)

集方法出現，可在醫藥品，化粧品，食品添加物等廣泛領域裡期得更多用途。

[α -單葡糖基橙皮苷]



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

另外，前記日本專利之特開平3-7593號公報中記載利用葡糖澱粉酶(E.C.3.2.1.3)處理 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷之混合液，將 α -葡糖基橙皮苷改變成 α -單葡糖基橙皮苷，再通過Diaion HP-20分離管，水洗後，依照梯次提升乙醇水溶液中的乙醇濃度，然後分離採集 α -單葡糖基橙皮苷含有部分。據該公報所公開方法仍然無法廉價提供 α -單葡糖基橙皮苷高含有物。

本發明研究者有鑑及此，更銳意研究結果，發現含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷之溶液中，利用葡糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶(E.C.3.2.1.40)作用後，使 α -單葡糖基橙皮苷析出分離而採集之方法，或利用葡糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶， β -D-配糖酶(E.C.3.2.1.21)作用後，

五、發明說明(6)

使 α -單葡萄糖基橙皮苷析出分離而採集之方法之任意一種方法，都能從所得混合物中有效率地分離採集 α -單葡萄糖基橙皮苷而完成本發明。

本發明中，從原來之混合物中藉固態和液態之分離方法，就能極高效率地分離所析出 α -單葡萄糖基橙皮苷而製得其高含物。

另外，橙皮苷以具有 α -L-鼠李糖苷活性的酵素作用，使橙皮苷變成 β -單葡萄糖基橙皮素，提升其水溶性之方法，現為柑桔缶糖漿之白濁現象之工業上常用方法。

然而本發明所發現方法乃過去文獻中所未記載方法。也就是在含有 α -葡萄糖基橙皮苷和未反應橙皮苷的溶液中，利用葡萄糖澱粉酶， α -L-鼠李糖苷酶作用，或用具葡萄糖澱粉酶， α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-配糖酶各活性之酵素劑作用，使 α -葡萄糖基橙皮苷之鼠李糖原封不動，僅將4-位置上結合多數的葡萄糖(G)_n僅留下一個葡萄糖而加以水解，變成 α -單葡萄糖基橙皮苷，另一方面，將橙皮苷之鼠李糖水解而變成 β -單葡萄糖基橙皮素(7-O- β -單葡萄糖基橙皮素)，或更進而將 β -單葡萄糖基橙皮素的 β -葡萄糖加水分解而變成橙皮素，藉此有效率地析出分離 α -葡萄糖基橙皮苷加以採取之方法，過去均未有人暗示過。

又，特開平8-80177號公報中記載含有橙皮苷的水溶液中添加可溶性橙皮苷以防止橙皮苷結晶析出之方法，該可溶性橙皮苷乃係橙皮苷中的葡萄糖基的4-位置上以 α -1,4-結合依序結合有1~10多個葡萄糖之化合物，這種

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

可溶性橙皮苷係在環糊精存在下利用糖轉移酶和橙皮苷作用而生產，而上述糖轉移酶之例舉如GT酶，即1,4- α -聚葡糖；1,4- α -D-(1,4-聚葡糖基)-轉移酶(E.C.2.4.1.19)，更具體言之，可用桿菌屬之A2-5a菌株培養物中所採集的糖轉移酶供其生產用途。

然而該公報中所公開者僅止於將可溶性橙皮苷添加在未反應橙皮苷而混合，藉以防止含有橙皮苷物質中的橙皮苷結晶析出之技術觀念而已。又該公報中所記載方法所獲得為 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷之混合物，生成物中仍然含有未反應之橙皮苷。因此，據該方法所製得缶頭，其液汁尚有容易逐漸發生白濁現象之問題存在。其善後方法在該公報中之實施例中採取 α -單葡糖基橙皮苷和 α -雙葡糖基橙皮苷部分以供使用。然而採取上述二種成份部分在經濟上有困難。

本發明乃為解決上述已往技術上之問題，提供一種簡單的處理方法從含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷的溶液中，採集 α -單葡糖基橙皮苷高含物之方法為其目的。

依據本發明之 α -單葡糖基橙皮苷高含物製造方法，其特徵在含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷之溶液(a)中，同時或分別使用葡糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶作用之後，從所得混合物(酵素反應液)(b-1)中使 α -單葡糖基橙皮苷析出分離(第I製法)，或上述溶液(a)中，將具有葡糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶， β -D-配醣酶之各活性之酵素類，同時或分別作用後，再從所得混合物(酵素反應液)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

(b-2)中使 α -單葡萄糖基橙皮苷析出分離之方法(第II製法)之任意一種方法,由上述溶液(a)中分離 α -單葡萄糖基橙皮苷,再行採集而達成。

本發明之較佳實施方法中,可在使 α -單葡萄糖基橙皮苷析出分離之前,利用多孔性吸附樹脂和上述酵素反應液接觸,使 α -單葡萄糖基橙皮苷, β -單葡萄糖基橙皮素,橙皮素等吸附在該樹脂上,繼之,水洗而洗去糊精之後,再使用有機溶劑(例如乙醇)將 α -單葡萄糖基橙皮苷, β -單葡萄糖基橙皮素,橙皮素溶洗出來為宜,然後再將溶出液中用以洗提之有機溶劑加以去除為佳。本發明之較佳實施方法中,可在低級醇類(例如甲醇)中,使溶出液中所含 α -單葡萄糖基橙皮苷析出分離為宜。

依據本發明方法,可從含有 α -葡萄糖基橙皮苷和橙皮苷之溶液中,很容易獲得水溶性極佳之 α -單葡萄糖基橙皮苷之高含物,而且其中幾乎不含橙皮苷, β -單葡萄糖基橙皮素,橙皮素等。

本發明有關 α -單葡萄糖基橙皮苷高含物之製造方法具體說明如下:

本發明之 α -單葡萄糖基橙皮苷高含物之分取(製造)方法,乃在含有 α -葡萄糖基橙皮苷和橙皮苷之溶液中,同時或分別以葡萄糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶以及 β -D-配糖酶作用(但是不能在葡萄糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶作用之前,使用 β -D-配糖酶),再從酵素處理液中析出分離 α -單葡萄糖基橙皮苷,再行採集。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(9)

首先就含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷之溶液的意義說明如下。

[含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷之溶液]

上述做為酵素處理之對象溶液，祇要含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷，無論其含量比率，濃度等皆無特別限制，但是，有待處理溶液中之 α -葡糖基橙皮苷濃度宜在 0.1~30 重量%，其中以 1~10 重量% 為更佳，橙皮苷濃度宜在 0.02~15 重量% 範圍，其中以 0.2~5 重量% 為更佳，而且 α -葡糖基橙皮苷 / 橙皮苷 (重量比率) 以 100 / 1~200 為宜，其中以 100 / 1~20 範圍為更佳。

含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷之溶液的例舉如下列①，②項所示。

① 如特開平 3-7593 號公報中所記載，橙皮苷在澱粉局部分解物 (α -葡糖基糖化物) 共存之下，由糖轉移酶 (具有 α -葡萄糖基轉移活性之酵素) 作用而成之含有 α -葡糖基橙皮苷和未反應之橙皮苷所構成溶液。

② 按照上述①項所得含有 α -葡糖基橙皮苷溶液中，使橙皮苷析出後，再藉過濾等方法分離去除橙皮苷，而降低溶液中對於 α -葡糖基橙皮苷的橙皮苷之比率所得溶液。

[具備葡糖澱粉酶， α -L-鼠李糖苷酶， β -D-配糖酶各種活性之酵素劑]

本發明中所指葡糖澱粉酶， α -L-鼠李糖苷酶， β -D-配糖酶及分別具備該酵素活性者均可採用之。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (10)

葡糖澱粉酶之具體例舉有「葡糖酶 NL4,2」(日本天野製藥公司製品),「纖維素酶 A<天野>3」(日本天野製藥公司製品),「葡糖酶」(日本長瀨產業公司製品),「單化酶 30」(日本養樂多公司製品),「柚皮苷酶」(日本田邊製藥公司製品)等市販酵素劑具有將 α -1,4-糖苷鍵以葡萄糖為單位切割之酵素。

α -L-鼠李糖苷酶之具體例舉有「橙皮苷酸」(日本田邊製藥公司製品),「柚皮苷酶」(日本田邊製藥公司製品),「纖維素酶 A<天野>3」(日本天野製藥公司製品)等市販之酵素劑,其中以「橙皮苷酶」為較佳。

β -D-配糖酶之具體例舉如「纖維素酶 A<天野>3」(日本天野製藥公司製品)等市販之酵素劑。

上述酵素劑 4, 具有葡糖澱粉酶活性的酵素劑, 其使用量以上含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷溶液中的 α -葡糖基橙皮者 100 重量份計, 宜使用 0.01~10 重量份, 其中尤以使用 0.1~1 重量份左右的理想。

具有 α -L-鼠李糖苷酶活性的酵素劑用量, 以含有上述 α -葡糖基橙皮者苷和橙皮苷的溶液中之橙皮苷 100 重量份計, 使用 0.05~50 重量份為宜, 其中尤以使用 1.5~15 重量份左右為理想。

又, 具有 β -D-配糖酶活性的酵素劑用量, 以含有上述 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷的溶液中之橙皮苷 100 重量份計, 使用 0.01~20 重量份為宜, 其中尤以使用 0.1~10 重量份左右為理想。又葡糖澱粉酶活性, α -L-鼠李糖苷酶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(11)

活性和 β -D-配醣酶活性中，具有其中兩個以上之活性的市販酵素劑(例如纖維酶素 A<天野>3(日本天野製藥公司製品))，當使用之際，可以酌量加減其使用量。

又，上述酵素劑用以處理上述含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷的溶液中之 α -葡糖基橙皮苷或橙皮苷時，通常在 pH3~7 範圍，最好在 pH3~4 下，通常在 40~70℃ 範圍，最好在 50~60℃ 溫度下，一般反應 0.5~72 小時，最好保持 6~48 小時左右之反應時間。

按照上述條件處理含有上述 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷的溶液時， α -葡糖基橙皮苷在實質上不受上述 α -L-鼠李糖苷酶(例如橙皮苷酶)處理之影響。

然而上述 α -葡糖基橙皮苷會受葡糖澱粉酶之水解作用，其 α -葡糖基橙皮苷之橙皮素架構上之 7-位置的葡萄糖上以 α -1,4-鍵結合依序按 n 次結合(n=1~10 多個)存在的葡萄糖僅留下 1 個而其他經水解，而成為一般式 [II] 所示中 n=1 的 α -單葡糖基橙皮苷。

又，葡糖基橙皮苷(包括 α -單葡糖基橙皮苷)以 β -D-配醣酶作用時，實質上也不被水解。

另一方面，橙皮苷會受到上述 α -L-鼠李糖苷酶之作用，而鼠李糖基被水解，而成為 β -單葡糖基橙皮素(7-O- β -單葡糖基橙皮素)。

又 β -單葡糖基橙皮素，再用 β -D-配醣酶作用時，該 β -單葡糖基橙皮素的橙皮素架構上 7-位置上結合存在的 β -葡糖基被水解，而 β -單葡糖基橙皮素變成水難溶性的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(12)

橙皮素。

所以本發明中，上述含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷的溶液中，添加上述各種酵素劑之順序如下。

含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷的溶液中，以葡糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶作用，所得混合物(酵素反應液)中析出分離 α -單葡糖基橙皮苷的第I製法，可以同時或任意優先進行 α -葡糖基橙皮苷之 α -單葡糖基橙皮苷化，和橙皮苷之 β -單葡糖基橙皮素化，所以可以同時或任意將葡糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶中之一優先進行。所得酵素反應液中之各組成含量對 α -單葡糖基橙皮苷1重量份而言， β -單葡糖基橙皮素為0.5重量份以下，橙皮苷和橙皮素分別為0.1重量份以下。又，醣類等其他組成分含量，通常以該酵素反應液中之 α -單葡糖基橙皮苷1重量份計，在1重量份以上含量。

含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷的溶液中，同時或任意一種為優先順序使用葡糖澱粉酶， α -L-鼠李糖苷酶， β -D-配醣酶作用，從所得混合物(酵素反應液)中析出分離 α -單葡糖基橙皮苷的第II製法，添加酵素劑之方法如下。

① 同時添加葡糖澱粉酶， α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-配醣酶之方法。

② 先用葡糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶添加作用之後，再添加 β -D-配醣酶作用之方法。

③ 以任意順序添加葡糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(13)

作用之後，再添加 β -D-配醣酶作用之方法。

④ 為使橙皮苷先變成橙皮素，在 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-配醣酶作用之後，再用葡糖澱粉酶作用之方法。任何情況下，上述各種酵素劑皆可一次添加或少量分批添加。

所得酵素反應液中之各成分含量，對於 α -單葡糖基橙皮苷1重量份計，橙皮素為0.4重量份以下， β -單葡糖基橙皮素和橙皮苷分別各為0.1重量份以下。醣類等其他成分含量，以該酵素反應液中的 α -單葡糖基橙皮苷1重量份計，大約含有1重量份以上量。

本發明中，採用第I製法時，先用 α -L-鼠李糖苷酶作用後，再以葡糖澱粉酶作用為理想。

又採用第II製法，先用 α -L-鼠李糖苷酶作用後，再用葡糖澱粉酶和 β -D-配醣酶作用，就反應效率觀點而言較為理想。

[α -單葡糖基橙皮苷之分離採集]

本發明中，按照上述以酵素處理含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷溶液，由所得酵素處理液(又稱為酵素處理含 α -單葡糖基橙皮苷溶液)分離採集 α -單葡糖基橙皮苷。

這種從酵素處理液中分離採集 α -單葡糖基橙皮苷之方法，在第I製法中，將低類醇類混合在下述酵素處理液，即「對於 α -單葡糖基橙皮苷1重量份而計，含有 β -單葡糖基橙皮苷0.5重量份以下，橙皮苷和橙皮素分別各含0.1重量份以下。又，醣類等其他成分通常含1重量份以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (14)

上之酵素處理液」中，

在第 II 製法中，以低級醇類混合在下述酵素處理液，即「對於 α -葡糖基橙皮苷 1 重量份計，含有橙皮素 0.4 重量份以下， β -單葡糖基橙皮素和橙皮苷分別各為 0.1 重量份以下，又醣類等其他成分通常含 1 重量份以上量之酵素處理液」中，

但上述混合操作之前，將酵素處理液中之游離糖成分加以去除為理想。該游離糖成分之去除方法，祇要是能從酵素處理液中高效率地去除游離糖成分之任意方法都可採用，通常採用多孔性吸附樹脂處理方法較為方便。

該多孔性吸附樹脂之種類，具體而言，例如 HP-20，HP-50，XAD-2 等非極性樹脂，XAD-7 等中間極性樹脂較為適用。其方法乃將多孔性吸附樹脂充充分離管中，再用高濃度的乙醇水溶液活化處理後，在 10~60℃ 溫度下，將上述酵素處理之含有 α -單葡糖基橙皮苷溶液注入，使該樹脂和上述含有 α -單葡糖基橙皮苷溶液接觸，吸附 α -單葡糖基橙皮苷， β -單葡糖基橙皮素，橙皮素等。

繼之，以所填充樹脂容量之 1~4 倍量左右的水洗淨而去除游離糖為主成分之夾離物後，再用乙醇，乙醇-水 (50~100/25~1) 等洗提液在 10~60℃ 溫度下注入，溶洗出該樹脂上所吸附之 α -單葡糖基橙皮苷， β -單葡糖基橙皮素，橙皮素等。

第 I 製法中，據本操作方法可得對於 α -單葡糖基橙皮苷 1 重量份計， β -單葡糖基橙皮素為 0.5 重量份以下，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(15)

橙皮苷和橙皮素分別各為0.1重量份以下，又糖類等其他成分含量在0.1重量份以下之洗提液。

又，第II製法中，據本操作方法可得對於 α -單葡萄糖基橙皮苷1重量份計，橙皮素為0.4重量份以下， β -單葡萄糖基橙皮素和橙皮苷分別各為0.1重量份以下，又糖類等其他成分含量在0.1重量份以下之洗提液。

上述混合用之醇類，可採用甲醇，乙醇，丙醇，丁醇等碳數為1~5之低級醇類。

繼之，將上述洗提液中之 α -單葡萄糖基橙皮苷在低級醇類中析出，藉固液分離而採集，可得 α -單葡萄糖基橙皮苷高含有物。

本操作乃利用 α -單葡萄糖基橙皮苷在加溫下之低級醇類中容易溶解，另一方面在室溫，(例如15~25℃)以下溫度很容易析出之現象，以及 β -單葡萄糖基橙皮素易溶解於低級醇類，在室溫以下溫度也不容易析出之現象的發現而完成本發明。

析出分離操作分別按第I製法和第II製法詳述如下。無論是上述任意製法，經酵素處理的上述洗提液在溶解於上述低級醇類之前，宜以乾物保存為理想。

<析出分離操作>

第I製法：

將含有對於 α -單葡萄糖基橙皮苷1重量份計， β -單葡萄糖基橙皮素0.5重量份以下，橙皮苷和橙皮素分別各為0.1重量份以下，又糖類等其他成分為0.1重量份以下之乾物，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (16)

溶解在低級醇類，最好是溶解在甲醇中。甲醇用量對於乾物 1g 計，使用 0.2~20ml，其中以使用 1~10ml 為較宜，加熱至 20~120℃ 範圍，最好在 60~90℃ 溫度下溶解。

然後，冷卻上述溶液，例如室溫至上述醇類的熔點以上溫度下冷卻，或放置室溫下，祇有 α -單葡糖基橙皮苷會析出。上述溶液在冷卻時，將預先調製為微粉末狀的 α -單葡糖基橙皮苷做為晶種少量添加到該溶液，更能使 α -單葡糖基橙皮苷迅速析出。

然後，利用離心機等進行固液分離，就能獲得 α -單葡糖基橙皮苷高含有物。

固液分離時，所析出 α -單葡糖基橙皮苷結晶用低級醇類洗淨時，可得 α -單葡糖基橙皮苷含率更高的 α -單葡糖基橙皮苷高含有物。

第 II 製法：

上述第 I 製法中，除改用含有對於 α -單葡糖基橙皮苷 1 重量份計，橙皮素為 0.4 重量份以下， β -單葡糖基橙皮素和橙皮苷分別各為 0.1 重量份以下，又糖類等其他成分在 0.1 重量份以下之乾物以外，其他按照第 I 製法操作處理，可從該乾物獲得 α -單葡糖基橙皮苷高含有物。

按照上述方法所製成 α -單葡糖基橙皮苷高含有物 ((a), (b)) 中含有 α -單葡糖基橙皮苷在 85 重量% 以上，最高時含量以高達 95 重量% 以上為理想，又和 α -單葡糖基橙皮苷共存的橙皮苷， β -單葡糖基橙皮素 (γ - β -單葡糖基橙皮素)，橙皮素最好都不存在，含有時，和該 α -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(17)

單葡糖基橙皮苷共存的橙皮苷含量，以該 α -單葡糖基橙皮苷1重量份計，宜去0.10重量份以下，較好是0.05重量份以下，最好是0~0.01重量份範圍，又， β -單葡糖基橙皮素(7-0- β -單葡糖基橙皮素)含量在0.10重量份以下，較好在0.05重量份以下，最好是0~0.02重量份為理想。並且橙皮素含量在0.10重量份以下，較宜為0.05重量份以下，特別是以0~0.01重量份以下為理想。

上述這種 α -單葡糖基橙皮苷高含有物((d)，(f))的水溶性極優，例如固形物濃度為30重量%之 α -單葡糖基橙皮苷高含有物溶液在室溫(例如25℃)下保持4星期，以肉眼幾乎看不見橙皮苷，橙皮素等之析出，也幾乎看不到凝聚塊(floc)之產生。

按照上述方法所得 α -單葡糖基橙皮苷高含有物中之 α -單葡糖基橙皮苷，當攝取別人體內受到酵素之作用會恢復為原來之橙皮苷，能發揮維生素P之各種機能。該時，將 α -單葡糖橙皮苷(或其高含有物)和維生素C併用時，在增強微血管之低抗性等維生素P作用為上能發揮相乘效果。

又，這種 α -單葡糖基橙皮苷高含有物在防止天然色素褪色等用途方面也適用。

以 α -單葡糖基橙皮苷高含有物做為防止天然色素之褪色用途使用時，其使用量按以天然色素染色之試料重量計，使用0.001~0.2重量%範圍，其中以使用0.005~0.1重量%為較宜，最好採用0.01~0.05重量%為理想。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(18)

更詳細而言，橙皮苷具有固有紫外光吸收光譜，但在可視光範圍沒有明顯的吸收光譜，因此，幾乎無色。已往容易為紫外光引起褪色的色素，特別是天然色素之防止褪色方面試用過，但是由於橙皮苷幾乎不溶於水，所以迄今無法發揮其功能。即使提升水溶性之經酵素處理過的橙皮苷，已有市販品仍有未反應的橙皮苷析出以致沈澱之慮，擔心影響及商品之良好印象，所以使用上還是有問題存在。

相對而言，本發明的 α -單葡萄糖基橙皮苷高含有物為幾乎不會發生沈澱之水溶性化合物，所以可提供防止天然色素褪色方面之廣泛用途。特別是對辣椒紅素、 β -胡蘿蔔素、蝦黃質等之類胡蘿蔔素類色素有顯著效果，除此之外，對於葡萄果皮，紅花等之類黃酮類色素，甜菜紅素、鬱金色素，梔子藍色色素，紅麴色素等之防止褪色方面也能有效使用。

本發明之 α -單葡萄糖基橙皮苷提供防止天然色素褪色用途使用之際，如能和酵素處理過的芸香苷，L-抗壞血酸(或L-抗壞血酸鈉)之任意一種或二者併用時，更能獲得防止天然色素褪色上之增效作用。

又，使用本發明之 α -單葡萄糖基橙皮苷高含有物於防止柑桔缶頭上白濁現象時，所使用該 α -單葡萄糖基橙皮苷高含有物量，以柑桔和柑桔缶頭內溶液中所存在橙皮苷(未反應橙皮苷)1重量份計，使用0.1~10重量份範圍，其中以使用0.1~2重量份為較宜，使用0.1~1重量份為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (19)

最佳。

又，該 α -單葡糖基橙皮苷高含有物具有固有之可視光範圍外之吸收光譜特性，同時其顏色極為淡薄，所以也能做為除紫外光劑等而應用在化粧品等用途。

本發明之功能，依據本發明可以從含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷的溶液中，簡單而高收率的製得具備優異水溶性，不會發生白濁現象（結晶析出作用），同時幾乎不含有橙皮苷， β -單葡糖基橙皮素，橙皮素等的 α -單葡糖基橙皮苷高含有物。

本發明之 α -單葡糖基橙皮苷高含有物之製造方法藉實施例更具體說明如下。但本發明不受實施例範圍之局限不得贅述。

另外，下文中所指「%」，如無特殊情形皆代表重量%。

參考例 1

溶解 50.0 克的橙皮苷於 0.9 升的 0.25N 氫氧化鈉水溶液中，再加入 150 克的 DE8 的糊精並與溶解之。

以 4N 硫酸調整為 pH9.0 後，加入來源於嗜熱脂肪芽孢桿菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 之環糊精葡聚糖轉移酶（日本林原生物化學研究公司製品），以 1 克糊精計加入該酵素 15 單位，加溫至 60℃，再滴加 4n 硫酸調整至 pH8.3，並反應 6 小時。

然後，再滴加 4N 硫酸調整為 pH3.0，加溫至 68℃，並反應 40 小時。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(20)

反應結束後，加熱使酵素失去活性，過濾而製得酵素處理橙皮苷溶液(稱為A液)。

以下述條件藉HPLC分析A液之結果，反應前溶液中之橙皮苷的72%變成 α -葡糖基橙皮苷，其餘28%為未反應狀態之橙皮苷。

<HPLC分析條件>

分離管柱：C18

洗提液：甲醇/水/乙酸 = 30/65/5

檢測波長：280nm

溫度：40℃

流速：0.5ml/分鐘

[橙皮苷， β -單葡糖基橙皮素， α -單葡糖基橙皮苷， α -葡糖基橙皮苷等之鑑定]

橙皮苷、 β -單葡糖基橙皮素， α -單葡糖基橙皮苷， α -葡糖基橙皮苷等依據下述方法分別鑑定之。

1. 橙皮苷：使用橙皮苷試劑(日本東京化成公司製品)為標準試料鑑定之。
2. β -單葡糖基橙皮素：

以 α -L-鼠李糖苷酶作用在上述橙皮苷試劑(東京化成公司製品)並以HPLC分析(分析條件如上述)。繼之，採取橙皮苷之保持時間(R.T = 10.90)以後之單一高峰(R.T. = 12.13)部分，經水解檢測得葡萄糖。更進一步由紫外光吸收光譜確認上述吸收高峰和橙皮苷者符合一致，認定該高峰為 β -單葡糖基橙皮素(橙皮素-7-葡糖苷)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(21)

3. α -單葡萄糖基橙皮苷， α -葡萄糖基橙皮苷：

將橙皮苷試劑(東京化成公司製品)之反應物以HPLC分析(分析條件如上述)之。確定各高峰之紫外光吸收光譜和橙皮苷者符合一致。另外，以葡萄糖澱粉酶作用，再行HPLC分析(分析條件如上述)。其結果皆為橙皮苷的保持時間前(R.T. = 10.90)之單一高峰(R.T. = 10.34)。

分離上述保持時間R.T. = 10.34之部分，以 α -葡萄糖苷酶(E.C.3.2.1.20)作用，使之水解而確認產生葡萄糖和橙皮苷。以保持時間R.T. = 10.31之高峰部分為 α -單葡萄糖基橙皮苷，該高峰部分和保持時間低於該高峰部分之各高峰部分做為 α -單葡萄糖基橙皮苷部分。

[橙皮苷、 β -單葡萄糖基橙皮素， α -單葡萄糖基橙皮苷， α -單葡萄糖基橙皮苷等之重量分析]

依據下列方法測定橙皮苷、 β -單葡萄糖基橙皮素， α -單葡萄糖基橙皮苷， α -單葡萄糖基橙皮苷等之重量。

1. 橙皮苷：

藉HPLC分析，據橙皮苷試劑(東京化成公司製品)為標品計算之。

2. β -單葡萄糖基橙皮素：

藉HPLC分析，據橙皮苷試劑(東京化成公司製品)為標品換算其分子量而求之。

3. α -單葡萄糖基橙皮苷：

藉HPLC分析，據橙皮苷試劑(東京化成公司製品)為標品換算其分子量而求之。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(22)

4. α -葡糖基橙皮苷部分：

將 1.0 克之本試料乾燥物溶解於 50 毫升水中。再預先用高濃度乙醇溶液活化處理，並用水充分洗淨之 XAD-7 樹脂 100 毫升中，按照 $SV = 1$ 將上述溶液導入，然後水洗，以 50% 乙醇水溶液 200 毫升洗提之。洗提液去除乙醇，經濃縮、乾燥後稱量之。藉 HPLC 分析，如果含有橙皮苷， β -單葡糖基橙皮素時，減去上述 1、2 項所求得值而求得 α -葡糖基橙皮苷部分之重量。

實施例 1

加入橙皮苷酶 2 克(橙皮苷酶 2 號，日本田邊製藥公司製品)於參考例 1 中所得之酵素處理橙皮苷溶液(A 液)中，用 4N 硫酸調整為 pH4，在 55℃ 下反應 24 小時後，加入 1.0 克的葡糖澱粉酶(Glucozyme，日本長瀨產業公司製品)，再於 55℃ 下繼續反應 24 小時。

反應結束後，所得反應溶液保持在 90℃ 下 20 分鐘，使酵素加熱失去活性後，過濾而製得酵素處理橙皮苷溶液(B 液)。按照參考例 1 所記載 HPLC 分析條件進行分析結果，B 液中的 α -葡糖基橙皮苷幾乎全部變成 α -單葡糖基橙皮苷，另外 B 液中的未反應橙皮者幾乎(99% 以上)變成 β -單葡糖基橙皮素(橙皮素-7-葡糖苷)。

準備填充有 5 升的中間極性多孔性吸附樹脂(XAD-7)，以高濃度乙醇水溶液活化處理的分離管柱，導入上述酵素處理橙皮苷溶液(B 液)，繼之，使用分離管柱容量之二倍量的水洗淨，再用 80% (V/V) 的乙醇溶液 3 升洗提被樹脂

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (23)

所吸附的成分。洗提液去除乙醇後，凍結乾燥而得固形物 (B-r)。

該固形物 (B-r) 中，據分析含有 81 重量 % 的 α -單葡萄糖基橙皮苷，18 重量 % 的 β -單葡萄糖基橙皮素，1 重量 % 之其他成分，而不含橙皮苷和橙皮素。

該固形物 (B-r) 中，加入 100 毫升之 99% (V/V) 甲醇，在 80℃ 下加熱溶解後，放置室溫下使結晶析出。所析出結晶以 99% (V/V) 甲醇洗淨後乾燥而得固形物 (B-r-c)。12 克。該固形物 (B-r-c) 據分析結果，含有 98 重量 % 之 α -單葡萄糖基橙皮苷，1 重量 % 的 β -單葡萄糖基橙皮素，1 重量 % 之其他成分，而不含有橙皮苷和橙皮素。

其結果合併示於表 1~2 中。

實施例 2

參考例 1 所得酵素處理橙皮苷溶液 (A 液) 中，加入 1 克之葡萄糖澱粉酶 (Glucosyme, 長瀨產業公司製品)，2 克的橙皮苷酶 (橙皮苷酶 2 號, 田邊製藥公司製品)，10 克的纖維素酶 A <天野> 3 號 (日本天野製藥公司製品)，以 4N 硫酸調整為 pH 4.0 後，在 55℃ 下反應 48 小時。

反應結束後，加熱使酵素不活化後，過濾而得酵素處理橙皮苷溶液 (C 液)。

依據參考例 1 所示 HPLC 分析條件分析結果，A 液中所含 α -葡萄糖基橙皮苷在 C 液中幾乎全部變成 α -單葡萄糖基橙皮苷，又 A 液中所含之未反應橙皮苷，在 C 液中幾乎 (99% 以上) 變成橙皮素。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(25)

多孔性吸附樹脂(XAD-7)處理，凍結乾燥而得固形物(D-r)

。

該固形物(D-r)據分析含有76重量%之 α -單葡萄糖基橙皮苷，23重量%之橙皮苷，1重量%之其他成分，而不含有 β -單葡萄糖基橙皮素和橙皮素。

該固形物(D-r)按照實施例1, 2所示相同方法加入99%(V/V)甲醇100毫升，在80℃下加熱，固形物僅有局部溶解，很難使用析出分離方法獲得結晶。再追加100毫升的99%(V/V)甲醇後；在80℃下加熱，也是僅有一部分的固形物(D-r)溶解，很難使結晶析出而分離得 α -單葡萄糖基橙皮苷。

其結果合併示於表1~2中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(26)

表1 酵素處理橙皮苷溶液中所含各成分重量比率

(重量%)

成分	α -單葡萄糖基橙皮苷	橙皮苷	β -單葡萄糖基橙皮素	橙皮素	其他成分
酵素處理橙皮苷					
B-r	81	0	18	0	1
C-r	85	0	2	12	1
D-r	76	23	0	0	1

表2 結晶中之各組成分重量比率(重量%)

成分	α -單葡萄糖基橙皮苷	橙皮苷	β -單葡萄糖基橙皮素	橙皮素	其他組成分
結晶(固形物)					
實施例1 (B-r-c)	98	0	1	0	1
實施例2 (c-r-c)	96	0	2	1	1
比較例1 (不能析晶)	-	-	-	-	-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

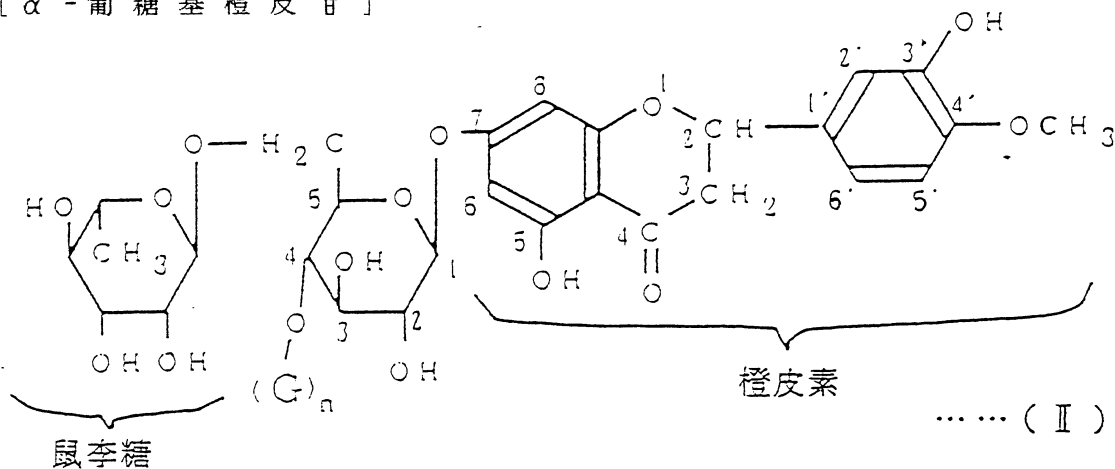
附
 件
 五

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明(2)

例如日本專利特開平3-7593號公報中報告橙皮苷和澱粉局部分解產物(α-葡糖基糖化物)共同存在下,以糖轉移酶(具有α-葡糖基轉移活性多醱素)作用,而產生下列一般式[II]所示α-葡糖基橙皮苷,提升其水溶性有關醱素處理橙皮苷之製造方法。

[α-葡糖基橙皮苷]



該α-葡糖基橙皮苷如上述一般式[II]所示,係在一般式[I]所示橙皮苷的葡萄糖的4-位置上,以α-1,4結合方式依序結合有n個(1~20個)葡萄糖(G)而形成之化合物,或上述不同葡萄糖數目之α-葡糖基橙皮苷之混合物所構成。

上述醱素反應中,原料溶液中所含有橙皮苷之40~80%會被醱素作用而變成α-葡糖基橙皮苷,但尚留存20~60%的未反應的橙皮苷。未反應的橙皮苷和α-葡糖基橙皮苷共同存在時,其在水溶液中的溶解性會提升,但是對於α-葡糖基橙皮苷而計,未反應的橙皮苷之比率過高,會在很短時間裡產生未反應的橙皮苷的不溶化而析出來。

為防止未反應的橙皮苷析出,可考慮添加羧甲基纖維

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

訂
 線

五、發明說明 (3)

素 (簡稱為 CMC) 等糊料在含有橙皮苷之溶液中，提升水溶液之粘性等方法，然而這種添加糊料會影響及商品的好印象而不甚適宜，特別是外銷產品上不能採用等問題存在，所以很難成為一般常用方法。

另外，也有報告使未反應的橙皮苷析出，利用過濾等方法分離去除，而降低對於 α -葡糖基橙皮苷之未反應的橙皮苷之比率，而延緩未反應的橙皮苷析出之方法。

然而採用上述方法，仍然有經過長時間之後，尚有未反應橙皮苷析出之問題存在，實際上沒有根本解決問題。

另外，利用層析分離等方法，從含有 α -葡糖基橙皮苷和未反應之橙皮苷的水溶液中，僅分離 α -葡糖基橙皮苷部分之方法，然而成本高昂，並非符合經濟原則之方法。

本發明研究者為解決上述問題，努力研究結果發現含有 α -葡糖基橙皮苷和未反應的橙皮苷的溶液中，以具有 α -鼠李糖苷酶活性之酵素加以作用時， α -葡糖基橙皮苷幾乎原封不動，但是未反應的橙皮苷就被水解而分離鼠李糖而變成下列一般式 [III] 所示 β -單葡糖基橙皮素，其水溶性優異，經過長時間後也不再產生酵素處理橙皮苷以致發生白濁現象。

[β -單葡糖基橙皮素]

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (24)

該 C 液按照實施例 1 所示用 1.5 升的中間極性多孔性吸附樹脂 (XAD-7) 處理，經凍結乾燥而得固形物 (C-r)。該固形物 (C-r) 中，據分析結果含有 85 重量 % 之 α -單葡萄糖基橙皮苷，2 重量 % 之 β -單葡萄糖基橙皮素，12 重量 % 之橙皮素，1 重量 % 之其他成分，而不含有橙皮苷。

該固形物 (C-r) 中加入 99% (V/V) 之甲醇 200 毫升，在 80℃ 下加熱溶解後，放置室溫使結晶析出。所析出結晶用 99% (V/V) 甲醇洗淨後乾燥而得固形物 (C-r-c) 8g。

該固形物 (C-r-c) 中據分析結果，含有 96 重量 % 之 α -單葡萄糖基橙皮苷，2 重量 % 之 β -單葡萄糖基橙皮素，1 重量 % 之橙皮素，1 重量 % 之其他成分，而不含有橙皮苷。

其結果合併示於表 1~2 中。

比較例 1

參考例 1 中所得酵素處理橙皮苷溶液 (A 液) 中加入 1.0g 的葡糖澱粉酶 (Glucosylase, 長瀨產業公司製品)，用 4N 硫酸調整為 pH4.0，在 55℃ 下反應 48 小時。

反應結束後，加熱使酵素不活化，過濾而得酵素處理橙皮苷溶液 (D 液)。

該 D 液依據參考例 1 所示 HPLC 分析條件分析結果。A 液中所含有 α -葡糖基橙皮苷，在 D 液中幾乎全部變成 α -單葡萄糖基橙皮苷。另外，A 液中所含有未反應橙皮苷，在 D 液中並未變化。

該 D 液按照實施例 1, 2 所進行，用 1.5 升之中間極性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

附件四

四、中文發明摘要 (發明之名稱: α -單葡糖基橙皮苷高含有物之製法)

本發明係 α -單葡糖基橙皮苷高含有物之製造方法有關者。該製法乃含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷之溶液中，同時或任意順序利用葡糖澱粉酶和 α -4-鼠李糖苷酶作用，再從所得混合物析出分離 α -單葡糖基橙皮苷為其特徵之方法。

依據本發明的製法，從含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷之溶液中，很容易獲得幾乎不含有橙皮苷、 β -單葡糖基橙皮素，橙皮素等，而水溶性優異的 α -單葡糖基橙皮苷高含有物質。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

英文發明摘要 (發明之名稱: A PROCESS FOR PRODUCING A PRODUCT CONTAINING HIGH CONTENT OF α -MONOGLUCOSYLHESPERIDIN)

The present process for producing a high α -monoglucosyl hesperidin content product is characterized in that it comprises the steps of contacting glucoamylase and α -L-rhamnosidase simultaneously or randomly with a solution containing α -glucosyl hesperidin and hesperidin to obtain a mixture; crystallizing and separating α -monoglucosyl hesperidin in and from the mixture; and collecting the resulting α -monoglucosyl hesperidin. From solutions containing α -glucosyl hesperidin and hesperidin, the present invention facilitates the production of a high α -monoglucosyl hesperidin content product which does not substantially contain hesperidin, β -monoglucosyl hesperetin, and hesperetin, and has an extremely-superior water-solubility.

專利代理人
陳昭誠

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

附件二

第 87104066 號 專利 申請 案

申請 專利 範圍 修正 本

(91年 2月 7日)

1. 一種 α -單葡糖基橙皮苷高含有物之製造方法，其特徵為於含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷溶液中，利用葡糖澱粉酶和 α -L-鼠李糖苷酶在 40 至 70 $^{\circ}$ C，pH 3 至 7 之範圍下同時作用或任意一方為優先依序作用 0.5 至 72 小時之後，由所得混合物中使 α -單葡糖基橙皮苷析出分離而獲得之方法。
2. 一種 α -單葡糖基橙皮苷高含有物之製造方法，其特徵為於含有 α -葡糖基橙皮苷和橙皮苷溶液中，利用葡糖澱粉酶， α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-配糖酶在 40 至 70 $^{\circ}$ C，pH 3 至 7 之範圍下同時作用或任意一種為優先依序作用 0.5 至 72 小時之後，由所得混合物中使 α -單葡糖基橙皮苷析出分離而獲得之方法。
3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之方法，其特徵為利用在低級醇類中析出而分離得 α -單葡糖基橙皮苷高含有物。
4. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之方法，其特徵為 α -單葡糖基橙皮苷高含有物係含有 85 重量% 以上之 α -單葡糖基橙皮苷。
5. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其特徵為 α -單葡糖基橙皮苷高含有物係含有 85 重量% 以上之 α -單葡糖基橙皮苷。