

87.3.13

申請日期	85.07.04
案 號	85107939
類 別	C12P19/04, A01N63/02, A61K 31/715, A23K1/06

424110

公告本

(以上各欄由本局填註)

說明書修正頁(87年3月)

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	一種製備免疫刺激性 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑之方法及其產物
	英 文	"METHOD FOR PRODUCTION OF AN IMMUNOSTIMULATORY β -GLUCAN-MANNAN PREPARATION, AND PRODUCTS THEREOF"
二、發明 創作人	姓 名	1.瑞吉尼·懷特洛夫 2.羅伯·懷特·吉伯特 3.克拉吉·葛頓·史密斯 4.約瑟夫·古蘭迪 5.肯茲·詹姆士·希姆 6.威勒·亨德利克·蘭格里斯
	國 籍	1.2.5.英國 3.紐西蘭 4.澳大利亞 6.荷蘭
三、申請人	住、居所	均澳大利亞維多利亞省卡頓市博弗里街1號 卡頓聯合釀造廠有限公司
	姓 名 (名稱)	澳大利亞商卡頓聯合釀造廠有限公司
三、申請人	國 籍	澳大利亞
	住、居所 (事務所)	澳大利亞維多利亞省墨爾本區卡頓市博弗里街1號
三、申請人	代 表 人 姓 名	安德里安 卡德諾

裝

訂

線

424110

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

澳大利亞^國(地區) 申請專利，申請日期：1995.7.5 案號：PN3982 ，☐有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請
讀
背
面
之
注
意
事
項
再
填
寫
本
頁
各
欄
)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

本發明係關於具有生物活性的 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑，及其分離方法。特定而言，本發明係關於包含 β (1-3)聚葡萄糖的 β -聚葡萄糖-甘露聚糖，其由包括但不限於酵母的微生物所產製，以及產製 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑之方法，該方法避免使用到濃縮的鹼或酸。

發明背景

多醣類廣泛地分布在自然界中，而且它們在維持細菌、真菌和植物細胞之結構完整上的角色是特別重要的聚葡萄糖是D-葡萄糖的聚合物，而D-葡萄糖可以以各種方式連結在一起。例如，以1-3、1-4、1-6和1-2連結的聚葡萄糖都是已知的。鏈結的變化可能意味著聚葡萄糖通常是高度分支的化合物。因為它們的化學特性，已經發現聚葡萄糖在化學、食品和藥學工業上的各種用途。例如，它們可以用來作為增黏劑、乳化劑、纖維、軟片、塗覆物質、親和層析法和凝膠電泳的支撐物，在細胞培養介質中作為濾墊，以及在水泥中。它們也被廣泛地使用在食品增稠劑，並作為膳食纖維的來源，並在藥學產物中作為載劑和塗覆劑。

已經對聚葡萄糖，特別是 β (1-3)-聚葡萄糖進行了非常廣泛的研究，除了前文所述的之外，已經顯示出它們具有各種藥學活性，包括但不限於抗膽固醇血的活性、低血糖之活性、加速重金屬的排泄，並刺激免疫系統。 β -聚葡萄糖的免疫刺激之活性，導出它們可用來當作抗-癌症劑或用來治療HIV之感染、作為刺激傷口癒合之製劑，或是作為與抗生素混合使用或單獨使用之抗-感染劑的聯想。

五、發明說明(2)

該 β -聚葡糖也可以在植物中誘發對疾病的抵抗反應，諸如植物抗毒素的產生和枯萎。這亦導出可在植物中利用它們作為抗-感染劑和生長促進劑的聯想。

因為密集的家禽、動物、魚類或甲殼類動物產品所引起的問題，亦已經提出使用 β -聚葡糖作為這些飼料的添加物，來降低感染的發生率，而因此促進生長並減少抗生素的需求。

β (1-3)-聚葡糖是酵母細胞重要的細胞壁成份。酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的細胞壁主要是由 β -連結的聚葡糖構成，其主要是 β (1-3)-連結之葡萄糖單位的主鏈，具有經 β (1-6) 連結之分子間和分子內分支的次要成份。因為酵母在食品和釀造業上，以及在工業等級-醇之產製上的廣泛用途，使用過的酵母細胞是主要的工業副產物。酵母-衍生的產物本身具有重要的商業價值，例如在諸如酵母萃取物之類的產物中、調味劑、香味增效劑，如鳥嘌呤核苷單磷酸鹽和肌苷單磷酸鹽，以及在酵素、精細化學藥品和生物化學與藥學工業所使用之產物的製造中，如海藻糖、胸腺核苷、核苷和核苷酸等等。由釀造業中剩下的酵母，是 β -聚葡糖的主要來源。

此外，其他種類的酵母也可以用來當作 β -聚葡糖的來源，包括但不限於酒酵母菌以外的其他酵母菌品系、脆壁克魯維酵母 (*Kluyveromyces fragilis*)，以及念珠菌屬 (*Candida*)，如產阮假絲酵母 (*Candida utilis*)。所有的這些酵母品系均可以利用培養，在食品等及的營養物中，藉著分批發酵

(請先閱讀背面之注意事項)
(訂填寫本頁)

裝

訂

眼

五、發明說明(3)

法或連續發酵法來產製之。在此項技藝中已經報告了作為 β -聚葡萄糖來源的許多其他種類之微生物，包括細菌、真菌和單細胞藻類。

已經廣泛地研究了從酵母和其他生物中純化 β -聚葡萄糖的方法，並已經知道各種方法。這些方法大部分依賴 β (1-3)-聚葡萄糖在鹼中或是在有機溶劑中的不溶性。主要的已知方法為：

(a) 利用濃縮氫氧化鈉的高溫萃取作用，隨後是利用酸的高溫萃取作用，並與乙醇一起沉澱(參見例如 Manners, D.J.等人，Biochem. J. 135, 19-30 (1973), Jamas, S.等人，美國專利第4810646號，美國專利第5028703號，美國專利第5250436號，以及由 Phillips Petroleum Company提出的澳大利亞專利第628752號)。這些草案大部份都需要酵母細胞的預先均質化作用，且許多需要多次重複每個萃取步驟。

(b) 以濃縮的氫氧化鈉萃取，隨後是高溫的酸萃取和酵素處理，以便修正或純化聚葡萄糖(參見例如由 Masler, L.等人提出之捷克專利第890038號，其報告了藉著鹼-酸萃取作用，隨後以具有澱粉酶活性的酵素處理，來純化 β -D-聚葡萄糖)。

(c) 利用濃縮的酚：水(1:1)，萃取酵母細胞壁之製品，導致酵母的自溶或酵素降解作用(參見例如由 Truscheit, E.等人提出之美國專利第4138479號)。

(d) 利用有機溶劑的萃取作用，單獨使用或在鹼的存在下進行，如異丙醇、乙醇、丙酮或甲醇等(參見例如日本

(請先閱讀背面之注意事項)

勿填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(4)

專利第 7051081 號、第 6340701 號、第 5295003 號和第 3002202 號；歐洲專利請案第 515216 號)。

已知酸處理減少了在聚葡萄糖物質中 β (1-6)-鍵結的數目，而其結果為增加了黏性。

酵母的細胞壁主要包括：

- (i) 絲狀的，不溶於鹼的 β (1-3)-連結之聚葡萄糖，帶有 β (1-6)-連結之聚葡萄糖的側支。
- (ii) 可溶於鹼的 β (1-3)-連結之聚葡萄糖，帶有 β (1-6)-連結之聚葡萄糖的側支。
- (iii) 無定形的、可溶於酸的 β (1-6)-聚葡萄糖，帶有間斷的 β (1-3)-鍵結。
- (iv) 無定形、可溶於鹼，連結到蛋白質上的甘露聚糖。

絲狀的聚葡萄糖成份，係位在鄰近酵母原生質膜之處，並被一層無定形、主要由甘露糖蛋白質構成的物質從外側覆蓋 (Kopecka M. 等人，J. Cell. Biol., 62 68-76 (1974))。已知從酒酵母菌之細胞壁中分離出的微粒物質，具有作為非特异性免疫刺激劑的能力。酵母細胞壁微粒的生物活性大部份歸因於 β (1-3)-連結之聚葡萄糖的存在，但是其他兩種形式的聚葡萄糖及甘露聚糖也具有一些刺激免疫系統的能力。報告指出甘露聚糖藉著免疫系統的細胞，來調節微粒物質，如不可溶之 β (1-3)-聚葡萄糖的吸附及吞噬作用 (Giannis, J. 等人，Journal Of Leukocyte Biology 54 564-571 (1993); Sun-Sang, J. 等人，Journal Of Cell Biology 96 160-166 (1983))。

五、發明說明(5)

分離 β -聚葡糖的現存方法，通常是利用多重步驟的鹼-酸萃取法(Manners, D.J.等人，J. Gen. Micro. 80 411-417 (1974))。鹼萃取步驟移除大部份的無定形甘露糖蛋白質和聚葡糖物質，而後續的酸萃取步驟則從絲狀的主要 β (1-3)-連結之聚葡糖中，移除肝糖和大部份的 β (1-6)-側分支。最後的溶劑萃取步驟有時用來移除脂質。

雖然有些申請案已經提供了聚葡糖的零售價格，利用現存已經公告或申請專利的方法來產製聚葡糖的成本，在經濟上並不是可實行。這些方法有下列問題：-

(i) 他們企圖僅產製絲狀的、不溶於鹼之形式的聚葡糖。將細胞壁中存在的其他形式之聚葡糖和甘露聚糖當作該過程之副產物而將其移除。這些表示額外含量的聚葡糖，其可能明顯地增加聚葡糖產量，且它們可能在功能上具有重要性。

(ii) 現存的方法需要大資本的投資。

(iii) 現存的方法是危險的，因為需要在高溫下以高濃度腐蝕劑和酸來處理。

(iv) 該方法得到含有不溶於鹼之聚葡糖的溶液，以傳統方法為基礎來分離它是困難的，因為其結果為不良的回收。

(v) 當與許多申請書中之產物的價值相比較時，產製的成本高。

酵母細胞壁的電子顯微鏡研究(Kopecka M.等人，J. Cell Biol., 62 68-76 1974)顯示，當藉著酵素處理而移除外側無

(請先閱讀背面之注意事項)
填寫本頁

裝

訂

線

五、發明說明(6)

定形的甘露糖蛋白質層時，便露出細胞壁的絲狀成份。

在此項技藝中，明顯需要一種迅速且價廉的 β -聚葡萄糖萃取方法，它不必使用高濃度的鹼或酸，也不必使用高溫，它更避免了可溶於鹼之聚葡萄糖和甘露聚糖的喪失，並改善了聚葡萄糖和甘露糖的回收，而得到具有生物活性的製品。

現在已經意外地發現，在接近-中性的pH值和稍微昇高的溫度下，可利用簡單的自溶過程來分離 β -聚葡萄糖-甘露聚糖的製品，而獲得極佳產量的產物，它具有高度的免疫刺激活性，可包括刺激吞噬細胞之活性、過氧化物產製、對病原和感染增加抵抗力。可在溫和的條件下，以酵素或其他藥劑處理，來增補自溶作用，若需要可藉著酸處理、均質化的程度，或藉著改變所使用之酵素的種類，來修改聚葡萄糖-甘露聚糖產物的性質。

發明概述

根據第一個觀點，本發明提供一種產製免疫刺激性之 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的方法，包括在從自溶之產物中分離固體物質之前，先在5到6的pH值和35到60°C的溫度下，進行微生物細胞的自溶步驟6到48小時。

在第二個觀點中，本發明提供一種從微生物細胞中產製免疫刺激性之聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的改良方法，包括使該微生物經歷引起自溶作用之條件的步驟；其特徵在於該條件包括在從自溶產物中分離固體物質之前，先在5到6的pH值和35到60°C的溫度下培養該微生物6到48小時。

在第三個觀點中，本發明提供一種從微生物細胞中產製

(請先閱讀背面之注意事項)
(填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(7)

免疫刺激性之聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的在環境上穩定的方法，該改良包括使該微生物經歷引起自溶作用之溫和條件的步驟；其中該條件包括在從自溶產物中分離固體物質之前，先在5到6的pH值和35到60°C的溫度下培養該微生物6到48小時。

在第四觀點中，本發明提供一種產製免疫刺激性之聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的經濟方法，係利用如同上述之引起微生物細胞自溶作用的條件。

根據上述提供的培養條件，而能夠廉價、有效地，並以不危險之方式來製備含有聚葡萄糖和甘露聚糖的具有免疫刺激效力之製品。

在特佳的具體實施例中，上述的方法導致產製出含有 β (1-3)-聚葡萄糖的免疫刺激性之製品，更佳的是 β (1-3)-聚葡萄糖-甘露聚糖之製劑。

在該方法中所使用的微生物細胞，亦最好是經歷更進一步的自溶作用，係在一或多種選自包括氯化鈉、乙醇、蛋白水解酵素、甘露聚糖酶、澱粉酶和 β -聚葡萄糖酶的製劑的存在下，在4到6的pH值和35到60°C的溫度下進行6到48小時，再從經過自溶的產物中分離出固體物質。

若需要也可以在最初的細胞自溶作用之後使用酵素。也就是在從自溶產物中分離固體物質之前，先在一或多種選自包括蛋白水解酵素、甘露聚糖酶、澱粉酶和 β -聚葡萄糖酶之製劑的存在下，將自溶作用當成進一步的步驟來經營。

(請先閱讀背面之注意事項)
六填寫本頁

裝

訂

線

五、發明說明(8)

較佳的是在50到60°C的溫度下經營自溶作用18到24小時。

在特佳的具體實施例中，如此製備出之 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的免疫刺激效力，藉著酸化至pH 2到4進一步地改良；藉著酸化pH 2到4，隨後再以熱處理，而達到更大的改良。該製品較佳地藉著增強吞噬活性或非-特異性的免疫反應來刺激免疫系統。

更佳的是，經由使用機械破裂法，如研磨、超音波處理或壓力均質化作用，藉著降低經過萃取之物質的顆粒大小至2微米以下而使如此產製之 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的免疫刺激效力和黏性更為增加，更佳的是小於1微米。

在其他的具體實施例中，利用經過研磨的酵母而獲得 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑。在研磨時期內或之後，利用如同上述之條件使酵母細胞接受自溶作用和酵素消化作用。

在另一個特佳的具體實施例中，藉著改變在萃取過程中所使用之酵母的性質，來改變 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的免疫刺激效力和黏性。

在本發明的方法中，得自發酵工業之無用酵母是特別有用的，將會清楚地知道，本發明適用於任何來源，諸如其中有高比例之 β -聚葡萄糖存在的微生物或植物物質。已經報告可作為有用的 β -聚葡萄糖來源之微生物包括但不限於細菌，如產鹼桿菌屬(Alkaligenes)，特別是菲卡利產鹼桿菌(Alkaligenes faecalis)的各種混種(ATCC-21680)；土壤桿菌(Agrobacterium)；單胞菌屬(Cellulomonas)，如 ATCC

(請先閱讀背面之注意事項)

裝

訂

泉

五、發明說明(9)

21399和產黃纖維單胞菌(*Cellulomonas flavigena*)(ATCC 53703);以及盤多毛孢屬(*Pestalotia*);真菌,例如短梗微菌(*Aureobasidium*),如出芽短梗微菌(*Aureobasidium pullulans*)品系 IF0446和短梗微菌 K-1種(FERM P1289);糙皮側耳(*Pleurotus ostreatus*);大莖點菌(*Macrophomopsis*),如品系 KOB55;靈芝(*Ganoderma*);裂褶菌(*Schizophylla*);非凱馬菌(*Fachyma hoelen*);盤多毛孢屬;以及革蓋菌(*Coriolus*)。除了釀造業酵母之外,其他食品和發酵業中所使用的酵母也適用於本發明之目的。這包括但不限於:在產製增黏劑、乳化劑、纖維、軟片、塗覆物質、親和層析法和凝膠電泳的支撐物,在細胞培養基、濾墊,以及在水泥中時所使用的酵母。它們也被廣泛地當作食品增稠劑來使用,並作為膳食纖維的來源,亦在藥學產物中作為載劑和塗覆劑。

熟諳此藝者將能夠迅速地定出最適當的條件,在該條件之下使得本發明方法能夠適用於酵母以外的微生物。

熟諳此藝者將會察覺,關於 β -聚葡糖和甘露聚糖的一些應用,係有利地以脫水形式來提供使用本發明方法來產製的製品。藉著任何適當的方法將該品適切地脫水,包括但不限於冷凍-乾燥、滾筒乾燥、烘箱-乾燥、噴霧-乾燥、環狀-乾燥或利用成膜設備將其脫水,可直接使用而不進一步加工,或可以利用任何適當的技術將其研磨或較佳的低於20微米的顆粒大小。關於其他應用。諸如有黏性的糊漿之類的潮濕產物也是適合的,可直接使用該製品而不需

五、發明說明(10)

進一步加工，或是接著利用機械破裂作用來增加它的黏性並降低顆粒大小。

根據第五個觀點，本發明提供以本發明方法產製之 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑，根據本發明之聚葡萄糖-甘露聚糖製劑，製佳的是主要含有聚葡萄糖(例如高達80%)，和一些甘露聚糖(例如高達50%)。該製品可含有 β 1-2、 β 1-3、 β 1-4和 β 1-6聚葡萄糖。

該製品可以單獨使用。然而最常見的是，將其與其他成份結合再提供使用。因此，在本發明的此一觀點中，較佳的具體實施例包括但不限於家禽、魚類、甲殼類動物或貝類飼料組合物，其含有本發明之 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑，與一或多種在獸醫學上可接受之食品成份在一起；一種免疫刺激之抗膽固醇血、低血糖或重金屬排泄的刺激性組合物，其含有本發明之 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑，和藥學上可接受之載劑在一起；一種醫藥組合物，其包括具有藥學活性之製劑，以及作為載劑或佐劑，或為了諸如錠劑或膠囊之類固體劑量形式，作為塗料的本發明之 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑；以及一種植物保護組合物，其含有本發明之 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑，與在農業上可接受之載劑在一起，並可視需要含有在農業上可接受之營養物或殺蟲劑。也可將該 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑以飲水之形式供給家禽或動物，或以周圍水的形式提供魚類、甲殼類動物或貝類。

將會清楚地瞭解到，本發明之製品通常適合用在某些產

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明(11)

物中，對該產物而言，已知 β -聚葡糖是有用的。在一些案例中。如果可使用這類已知之純化步驟本身、可能想要或需要進一步的純化作用。

發明詳述

現在僅藉著參考下列未加以限制之實例，來詳細地說明本發明。

實例1 自溶萃取作用

使酵母試樣接受自溶萃取作用處理。在35至60°C下培養1公升使用過的啤酒酵母(15%乾重)6到48小時，並加以攪拌。在需要時利用2M的NaOH或2M的HCl，將pH調整到5與6之間。這些條件促進酵母的自溶作用，以及細胞壁降解酵素的釋放。離心該物質(3000克，4到20°C 15分鐘)，並在噴霧-或冷凍-乾燥之前，先以等體積的水沖洗該沉降物。

實例2 酵素萃取作用

藉著添加已知能引酵母自溶作用的物質，來修改藉著實例1之自溶萃取過程的聚葡糖-甘露聚糖的產製作用。

藉著實例1之酵素程序來處理1公升使用過的啤酒酵母(15%乾重)。藉著加入蛋白水解酵素(木瓜蛋白酶，Optimase APL440 (Solvay)、Protomex (Novo))，及/或甘露聚糖酶(Gist Brocades)，及/或 α 澱粉酶(Optidex L300 (Solvay)、Ban 240L (Novo))，及/或葡聚糖酶(SP 299 (Novo)、Tunicase (Solvay))誘發更進一步的自溶作用。在需要時藉著使用2M NaOH或2M HCl，將pH值調整到酵素活性最

(請先閱讀背面之注意事項)
(填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明(12)

合適的pH值。在35到60°C下培養該酵母6到48小時，並加以攪拌。離心該物質(3000克，4到20°C 15分鐘)，並以等體積的水沖洗該沉降物。如同較早的描述將該沉降物脫水。

實例3 藉著先前技藝(鹼-酸)方法產製之聚葡糖，與藉著本發明(自溶和酵素的)方法產製之聚葡糖-甘露聚糖相比較

爲了比較之目的，利用以Manners, D.J.等人，Biochemical Journal 135 19-30 (1973)爲基礎的鹼-酸萃取法，來製備經過純化之 β (1-3)聚葡糖的試樣。

在100°C下利用等體積的氫氧化鈉(4%重量/體積)萃取1公升使用過的啤酒酵母(20%乾重)3小時，並加以攪拌，以移除甘露糖蛋白。離心該物質(3000克，在4°C下15分鐘)，拋棄上清液，再以氫氧化鈉(4%重量/體積)萃取小球4次。以水(2公升)沖洗得自最終腐蝕性萃取階段的沉降物，在100°C下以醋酸(0.15M)萃取3小時，並加以攪拌，以移除肝糖。離心該物質(3000克，在4°C下15分鐘)，並重覆該酸性萃取步驟三次。以水(2公升)沖洗得自最終酸性步驟的沉降物兩次，然後再以150毫升乙醇(96%體積/體積)沖洗之。在使該物質噴霧-乾燥或冷凍乾燥之前，先將其離心(3000克，在4°C下15分鐘)。

將利用先前技藝方法(上述方法)製備之試樣，或藉著鹼-酸萃取作用製備之可購得的聚葡糖試樣，與根據本發明製備的聚葡糖相比較。

根據 Official Methods Of Analysis of the Association of

(請先閱讀背面之注意事項)
填寫本頁

裝

訂

線

五、發明說明(13)

Official Analytical Chemists, 方法 27.8.04、27.6.08、32.1.14 (mod)、27.8.05, 第 16 版, 1995 來進行近似分析。在表 I 中顯示這些分析的結果。

表 I

藉著鹼-酸、自溶和酵素程序來產製之聚葡萄糖的比較

分析(%以乾重為基礎)	鹼-酸 聚葡萄糖	自溶的聚葡萄糖	酵素的聚葡萄糖
灰粉	3	2	3
脂肪	4	4	6
蛋白質	1	27	20
碳水化合物	90	66	71

顯示藉著先前技藝方法(鹼-酸)產製之聚葡萄糖, 與藉著本發明方法產製之試樣相比較方法具有較少的蛋白質和較多的碳水化合物, 如表 I 所示。

利用 Perkins-Elmer 分光光度計記錄聚葡萄糖製劑的傅里葉(Fourier)-變換紅外光(FTIR)光譜。將試樣冷凍-乾燥以移除任何殘餘的濕氣、在四氯乙烯中形成淤漿, 並在水平的衰減全反射(ATR)電池上進行分析。整個光譜顯示於圖 1 中。

由先前技藝(鹼-酸)製備之試樣的 FTIR 光譜與由本發明方法(自溶或酵素法, 如圖 1 所示)製備之試樣不同。由先前技藝方法製備之試樣在 2955 到 2855 公分⁻¹ (代表飽和脂肪酸)、1744 公分⁻¹ (代表糖苷)、1650 公分⁻¹ (代表蛋白質)之處缺乏強吸光率。由先前技藝(鹼-酸)方法製備之聚葡萄糖試樣的光譜, 類似經過純化之 β -聚葡萄糖製劑之光譜, 在 950 公分⁻¹ 處具有強吸光率。

五、發明說明(14)

在藉由先前技藝(鹼-酸)和本發明方法(自溶和酵素法)製備之試樣中的聚葡萄糖和甘露聚糖的含量，係藉著選擇性萃取作用和比色分析(以 Stewart, P.R., Methods In Cell Biology XII 111-145 (1975)為基礎)來決定之。如表II所示，與藉著本發明方法製備之試樣相比，藉著先前方法製備之聚葡萄糖試樣只含有一點點的甘露聚糖。

亦將試樣水解，並藉著氣相層析來分析之，以確認糖的組成。在100°C下、在氫氣之下利用4M三氟乙酸水解該試樣4小時。在氫蒸氣之下藉著蒸發來移除酸，隨後按照 Harris, P.J.等人，Carbohydrate Research 127 59-73 (1984)中的描述將該試樣還原和乙醯化。藉著氣相層析在BPX70管柱上，利用火鎗電離檢測器來分析水解產物。注射器和檢測器溫度分別為280和300°C。將烘箱保持在185°C 1分鐘，然後以每分鐘3°C的速率升至260°C，並保持在最終溫度下5分鐘。

藉著先前技藝方法製備之聚葡萄糖試樣顯示出僅相當於葡萄糖的峰值。代表碳水化合物的組成主要是聚葡萄糖，如表II所示。藉著本發明方法製備之試樣，含有葡萄糖和相當量的甘露糖，表示碳水化合物的組成為甘露聚糖和聚葡萄糖的混合物。與甘露聚糖相比，不可溶之 β (1-3)-聚葡萄糖對於酸性水解作用較具有抵抗力：因此與比色法相比較，氣相層析法低估了葡萄糖(因此是聚葡萄糖)的濃度。

五、發明說明 (15)

表 II

藉著鹼-酸、自溶和酵素程序產製之聚葡萄糖的比較：碳水化合物分析

分析(%重量/ 重量)	鹼-酸 聚葡萄糖	自溶的聚葡萄糖	酵素的聚葡萄糖
聚葡萄糖比色分析	88	48	54
甘露聚糖比色分析	1	9	8
葡萄糖GC分析	65	50	45
甘露糖GC分析	未檢測	25	15

在利用鹼-酸萃取作用和本發明方法(自溶和酵素法)製備之聚葡萄糖試樣中葡萄糖殘基之間的鍵結種類，係藉著利用以 Harris, P.J.等人，Carbohydrate Research 127 59-73 (1984) 為基礎之程序的甲基化作用分析來決定。

在表III中的結果顯示，與根據本發明之方法製備之試樣相比較，藉著鹼-酸法製備之試樣主要由(1-3)-連結的葡萄糖組成。

表 III

藉著鹼-酸、自溶和酵素程序產製之聚葡萄糖的比較：鍵結分析

葡萄糖單體的鍵結 分析(相對百分比)	鹼-酸 聚葡萄糖	自溶的聚葡萄糖	酵素的聚葡萄糖
末端	4	26	24
1-2 連結	0	14	14
1-3 連結	94	29	40
1-4 連結	2	25	14
1-6 連結	0	6	8

五、發明說明 (16)

利用老鼠模式測試聚葡萄糖試樣的生物活性。藉這三種程序中每一種產製出的物質，主要具有100-300微米的顆粒大小。在小珠研磨機中將經過脫水的物質研磨成<20微米顆粒直徑，並利用該物質對老鼠進行腹腔內注射(2毫克/老鼠)。在72小時之後，從腹腔中採收誘導細胞進入的腹腔滲出液，與熱殺的酵母細胞一起培養，並計算吞噬細胞的百分比。

根據本發明(自溶或酵素法)製備之物質，比起藉鹼/酸萃取程序製備之物質，更有效地誘導出非-特異性的免疫反應，如同藉著在腹腔中細胞數目的增加所示，係歸因於經過注射之物質吸引炎症細胞的化學吸引作用，以及吞噬性嗜中性白血球和巨噬細胞數目的增加。這些結果顯示於表IV中。

表 IV

藉著鹼-酸、自溶和酵素程序產製之聚葡萄糖的比較；誘導吞噬細胞的能力

分析	鹼-酸 聚葡萄糖	自溶的聚葡萄糖	酵素的聚葡萄糖
在 腺 腔 內 的 細 胞 ($\times 10^6$)	11.9	11.9	15
%吞噬性巨噬細胞	45	50	70
%吞噬性嗜中性白血球	16	33	30

爲了獲得有利的效果，不希望受到任何經過計劃之機制的束縛，我們相信甘露聚糖和非- β (1-3)-連結的聚葡萄糖可以協同的方式與絲狀的 β (1-3)-連結的聚葡萄糖一起作用，而產生更好的免疫反應。

五、發明說明(17)

實例4 藉著酸化作用改善聚葡萄糖-甘露糖製品的效力

藉著實例1之酵素法來處理1公升使用過的啤酒酵母(15%乾重)。將一等份的沉降物冷凍-乾燥。利用氫氯酸或醋酸將剩下沉降物的pH值調整成2到4，然後將該沉降物冷凍-乾燥，或在80°C下以烘箱-乾燥。如同實例3中的描述，藉著GC-MS分析糖的鍵結。

將聚葡萄糖-甘露糖研磨成<20微米；並如同實例3中的描述，測試其誘導吞噬細胞的能力。在表V中的結果顯示酸化作用接著以烘箱-乾燥，改善了聚葡萄糖-甘露聚糖刺激免疫反應的效力，且酸化作用接著加熱處理，使一些 β (1-6)-連結的聚葡萄糖損壞，可能在微絲狀聚葡萄糖中顯露出較多的活性位置。

表 V

熱-乾燥經過酸化之物質的影響

分析	冷凍乾燥沒有酸化作用	冷凍乾燥隨後是酸化作用	烘箱乾燥隨後是酸化作用
在腹腔內的細胞 ($\times 10^6$)	4.15	3.9	7.1
%吞噬性巨噬細胞	55	52	68
%吞噬性嗜中性白血球	43	41	50
在聚葡萄糖中 β (1-3)對 β (1-6)鍵結的比例	4.9:1	5.28:1	7.3:1

實例5 藉著改變顆粒大小來改善聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的效力

已知可藉著改變顆粒大小而明顯地改變一些物質的效力

(請先閱讀背面之注意事項，再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (18)

。藉著實例1之酵素法來處理1公升使用過的啤酒酵母(10%乾重)。將終沉降物懸浮於水中(20%乾重)。在此一階段，聚葡萄糖-甘露聚糖物質在顯微鏡下呈現出大約4到6微米直徑的個別球體。在布老恩(Braun)細胞勻漿器中，利用在小珠大小上，直徑從0.25變化到1毫米的琉璃小珠，處理一等份經過懸浮的沉降物6分鐘。這使得聚葡萄糖球體分裂成大小低於2微米的顆粒，產生具有起泡乳霜之濃稠度的高黏性產物。然後藉著實例3中描述的方法來測試該產物，顯示出刺激非-特異性免疫反應的良好能力。

在該方法的變化中，將剛收穫的酵母細胞珠狀研磨，以便使細胞破裂。在研磨期間或之後，利用類似實例1或2中描述的那些條件，使該酵母細胞接受自溶或酵素消化作用。藉著離心獲得不溶的物質，並利用老鼠模式測試其生物活性。將結果摘述於表VI中。

表 VI

改變聚葡萄糖顆粒大小的影響

分析*	完整的聚 葡 糖顆粒 (4-6微米)	破裂的聚葡 糖顆粒 (<1微米)	破裂後再以酵素 消化的酵素顆粒 (<1微米)
%增加 在細胞/腹腔中	150	250	250
%增加 在吞噬性巨噬細胞中	50	118	125
%增加 在吞噬性嗜中性白血球中	10	24	30

五、發明說明(19)

*與經過乾燥之酵母或葡聚糖對照組比較

關於酵母或聚葡糖顆粒的分解，可以使用其他的濕式研磨法和設備。這些包括但不限於壓力均質化作用(Manton Gaulin)、小球研磨和球磨(Dyno-研磨機、Drais研磨機、Netzsch研磨機)。

實例6 藉著改變所使用之酵素的性質來改善聚葡糖-甘露聚糖製劑的效力

以水沖洗新鮮酵母的淤漿(16.5%乾重)，然後在50°C下培養17小時，並加以攪拌。將經過自溶的酵母加熱到100°C 30分鐘，然後分成兩批。

一批以得自Solvay的酵素來處理。在47°C和pH值9之下，將該酵母與1%重量/重量的Optimase APL-440(蛋白水解酵素)一起培養2小時，並加以攪拌。然後將pH值降至7.5，並加入1%重量/重量的Tunicase FN(聚葡糖酶)酵素。在培養6小時之後，加入1% Optidex(葡糖澱粉酶)，然後在60°C和pH值4.5下，再培養該混合物6小時。得到有黏性的沉降物。將該沉澱物冷凍乾燥並以球磨研磨之。

以得自Novo的酵素培養第二批。在pH值5.5之下，將該酵母與1%重量/重量BAN(葡糖澱粉酶)和1%重量/重量Mutanase SP299(聚葡糖酶)酵素一起培養6小時，並加以攪拌。加入1% Protomex(蛋白水解酵素)，並在55°C和pH值5.5下再培養該混合物16小時。

在不同的實驗中，以1%重量/重量Tunicase(pH值7.5，在35°C下6小時)處理根據實例1製備之聚葡糖-甘露聚糖。利

(請先閱讀背面之注意事項)
裝
訂
線

裝

訂

線

五、發明說明(20)

用Tunicase處理過的聚葡糖-甘露聚糖增加了黏度。離心該製品，並將該沉降物冷凍乾燥並加以研磨。將得自經Tunicase處理之聚葡糖的上清液，對蒸餾水進行廣泛的透析，並冷凍乾燥之。

按照實例3中的描述，分析在聚葡糖試樣中葡萄糖殘餘物之間的鍵結種類。亦利用老鼠模式來測試生物活性。結果顯示於表VII中，顯示可利用酵素來改變聚葡糖製劑之性質。例如，以Tunicase(Solvay)處理，得到有黏性的產物，在聚葡糖製劑中具有降低的 $\beta(1-6)$ -鍵結。也可以利用酵素來產製具有生物活性的可溶形式之聚葡糖。

表 VII

酵素活性的影響

分析*	Solvay 酵素法	Novo 酵素法	Tunicase 沉降物	Tunicase 上清液
在聚葡糖中 $\beta(1-3)$ 對 $\beta(1-6)$ 鍵結的比例	25:1	4.6:1	5.4:1	未檢測
%增加 在細胞/腹腔中	330	268	110	65
%增加 在吞噬性巨噬細胞中	65	90	96	140

實例7 改變聚葡糖-甘露聚糖製劑之黏性

也可以藉著酸化作用(實例4)、藉著研磨(實例5)和藉著改變所用之酵素的種類(實例6)，來改變按照實例2中之描述來製備之聚葡糖-甘露糖的黏性。使用帶有60毫米之板子的CSL100流變儀，來測量黏性。以100/秒之剪切速率，

五、發明說明(21)

利用10%重量/體積的聚葡萄糖懸浮液，在20°C下取得測量值，並將結果摘述於表VIII中。

表 VIII

改變聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的黏性

處理	黏性(Pa.s)
按照利用pH值4.5之實例2來製備的聚葡萄糖	5.8×10^{-3}
按照利用pH值4.5，並煮沸10分鐘之實例2來製備的聚葡萄糖	7.82×10^{-3}
按照利用pH值4.5、煮沸10分鐘並研磨至小於1微米之實例2來製備的聚葡萄糖	1.10
按照利用pH值3、煮沸10分鐘並研磨至小於1微米之實例2來製備的聚葡萄糖	1.40
按照實例6，利用Tunicase來製備之聚葡萄糖	1.50

因此，可利用熱、酸、酵素，和藉著改變顆粒大小來改變聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的黏性，而產生有黏性的物質。這種物質可用來作為乳霜、凝膠或其類似物。

實例8 聚葡萄糖-甘露聚糖製劑在魚類身上作為免疫促進劑的效力

從維多利亞的商業農場獲得虹鱒魚(*Oncorhynchus mykiss*)。這群魚具有13克的平均體重，並使其分散在6 x 260公升的實驗槽中，在每個魚槽中有12隻魚。在開始實驗之前先使魚群適應環境7天。

使用標準鱒魚小球，並以每天大約5%體重的量，每天餵食魚群兩次。將聚葡萄糖-甘露聚糖製劑與飲食合併，得到在最終飼料中0.1重量%/重量的終濃度。將包括對照組

(請先閱讀背面之注意事項)
+ 填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明(22)

飲食的所有飲食再製成小球，並在50°C下脫水。在飼養3週之後，將魚群以苯佐卡因(benzococaine)(1:10,000)麻醉並犧牲之。

在每毫升含有1單位肝素的組織培養培養基中收獲前腎。通過不銹鋼80規格之網篩來處理該組織，以便分離單一細胞。以杜必可(Dulbecco's)經過修改之鷹氏培養基(DMEM)(Gibco Laboratories)來沖洗該細胞懸浮液。使該細胞接受氮藍四唑分析，以檢測過氧化物陰離子的產生(以Rook, J.等人，J. Immunol. Methods 82 161-167 (1985))，並接受吞噬作用分析，以檢測巨噬細胞吞噬酵母細胞的能力。

發現按照實例2中之描述所產製的聚葡萄糖-甘露聚糖，在分離自虹鱔魚之前腎的細胞中，增加了吞噬活性和過氧化物陰離子的產製，如表IX所示。數據顯示按照實例2中之描述所產製的聚葡萄糖-甘露聚糖能夠在虹鱔魚中刺激免疫系統。

表 IX

在魚類中作為免疫促進劑效力

飲食	吞噬作用%	過氧化物的產製
對照組	27.2	0.038
聚葡萄糖-甘露聚糖製劑 (酵素法)	37.1	0.068

實例9 聚葡萄糖-甘露聚糖製劑在魚類中降低死亡率的能
力

五、發明說明(23)

從塔斯馬尼亞的商業農場獲得一年以下的虹鱒魚(*Oncorhynchus*)。牠們具有65克的平均體重。將魚群分散在六個隔離的魚槽中，每個魚槽中有16隻魚。將魚群保持在15°C的氣溫和13-18°C的水溫下，並在開始實驗之前先使其適應環境7天。

每天使用吉普森(Gibson's)鱒魚小球，以每天大約2.5%體重的量來餵飽魚群。將聚葡萄糖(根據實例2製備之聚葡萄糖，或利用鹼/酸萃取法製備之聚葡萄糖)合併到5%重量/重量的明膠溶液中，並塗覆在小球上，以便在最終飼料中提供0.1%重量/重量的聚葡萄糖濃度。餵飼對照組魚群的小球則僅塗覆明膠。利用下列的餵飼計劃：14天以經過補充的飼料，接著42天以未經補充的飼料，然後另14天以經過補充的飼料。在第二個補充物週期之後一週，以鰻弧菌(*Vibrio anguillarum*)來挑戰魚群。

使用鰻弧菌血清型C的塔斯馬尼亞品系(相當於清型01)(Munday, B.等人, *Immunology and Cell Biology* 70 391-397 (1992))。使該生物生長在補充有2% NaCl的營養肉湯培養基中。

藉著腹腔內注射 3×10^7 c.f.u. (LD_{50} 劑量)，以鰻弧菌來挑戰魚群，並且每天至少觀察兩次，持續10天。所有死亡的魚均對鰻弧菌進行培養。

在接種後第三天發生死亡。在接種後第3和第4天，對照組大部份是不活潑的，並在魚鰭的基部和肚子上有充血，雖然在該組中未記錄到更多的死亡率。

(請先閱讀背面之注意事項)
7.填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(24)

以鰻弧菌排戰之後，證實了根據本發明之聚葡糖的保護作用。使用鹼-酸萃取法製備之聚葡糖具有較低的效力，如同表X所示。

表 X

聚葡糖-甘露聚糖在魚類上降低死亡的能力

飲食	在挑戰之後10天的死亡率%
對照組	15.6
聚葡糖製劑(酵素法)	3.1
聚葡糖製劑(鹼/酸法)	9.4

結果顯示可利用按照實例2中之描述所產製的聚葡糖-甘露聚糖，來改善虹鱔魚對鰻弧菌引起之感染的抵抗力，並勝過先前技藝的聚葡糖製劑。

實例10 聚葡糖-甘露聚糖製劑在蝦子(Penaeus monodon)身上降低死亡率的能力

從昆士蘭(Queensland)的農場獲得5-10克的蝦子。在12x60公升的魚槽中將12雙蝦子稱重。使蝦子在魚槽中適應環境5天，然後餵食對照組或處理組的飲食。在23天之後，以LD₅₀劑量之哈氏弧菌(Vibrio harveyi)注射蝦子。持續7天監視死亡率。在這段期間內，以對照組或處理組之飲食來餵食蝦子。

所有的蝦子均餵食蒸氣小球化的標準飲食(CP 100)。藉著以明膠黏到小球的表面上，將根據本發明之聚葡糖-甘露聚糖加至處理組飲食中。製備大約5%重量/體積之明膠溶液的溶液，並以100毫升/每公斤小球之比例，混合到對

(請先閱讀背面之注意事項，再填寫本頁)

裝

訂

水

五、發明說明(25)

照組飲食中。處理組所使用之明膠溶液，含有足夠的根據實例2製備之聚葡萄糖-甘露聚糖，或利用鹼/酸萃取法產製之聚葡萄糖，以確保在終飲食中含有0.1%重量/重量的終濃度。餵食比例為蝦子體重的6.5到5%/天。

挑戰研究使用分離自垂死之(*P. esculentus*)蝦的哈氏弧菌品系656的病原品系。在26-28°C下，在含有維生素的海水液態肉湯中繼代培養細菌過夜。以0.73%重量/體積的生理食鹽水溶液沖洗細胞三次，並在40°C下以2,000 rpm離心30分鐘。每個步驟中均使用渦流混合。製備細菌懸浮液的連續稀釋，並將每種稀釋度注射到未經處理的蝦子中，以便計算LD₅₀值。從每個連續的稀釋度中取0.1毫升，與25毫升42°C、含有纖維素的海洋瓊脂(MAV)混合，然後倒入培氏皿中。在26-28°C下24小時之後，計算菌落並計算在每個接種懸浮液中細菌的數目。使用傾倒盤來計算在0.05毫升之注射體積中的細菌數目。

關於LD₅₀的挑戰，最後選擇在0.05毫升中含有1-2x10⁵的劑量來注射哈氏弧菌品系656。在第二個腹節處注射蝦子。在接下來七天中每天記錄死亡率，以下法來計算死亡率百分比：-

$$\text{死亡率}\% = \frac{\text{死亡蝦子的數目} - A}{\text{蝦子總數} - A} \times 100$$

A=在第1天之後的死亡率

在以哈氏弧菌挑戰之前的餵飼時期中，監視蝦子的行為和健康。同時在生長方面沒有明顯的影響，以按照實例2

(請先閱讀背面之注意事項)
填寫本頁

裝

訂

錄

五、發明說明(26)

描述來製備之聚葡萄糖-甘露聚糖的飲食來餵飼的蝦子具有較好的食慾，是較活潑的，並顯示出較低死亡率的發生。

在以哈氏弧菌挑戰之後，證實了本發明之聚葡萄糖的保護效力。根據鹼/酸法製備之聚葡萄糖的效力較差，如同表 XI 所示。

表 XI

在蝦子中死亡率的降低

飲食	在挑戰後7天 的死亡率%	挑戰所使用的 蝦子數目
對照組	50	99
聚葡萄糖製劑(酵素法)	11*	92
聚葡萄糖製劑(鹼/酸法)	18	55

*與對照組有顯著差異。

因此可利用按照實例2中之描述製備的聚葡萄糖-甘露聚糖，成功地改善了蝦子的疾病抵抗力。

實例11 聚葡萄糖-甘露聚糖製劑促進家禽之疾病抵抗力的能力

將240隻混合性別的幼雞分成四個不同的飲食處理組。將一日齡的幼雞飼養在兩組育雛箱中，並均勻地分成24個隔間，每個隔間有10隻雞。以標準未-攪藥物的商業飲食(對照組)，或是以1克/公斤飼料之比例將聚葡萄糖-甘露聚糖合併到飼料中的標準飲食來餵飼雞群。該聚葡萄糖-甘露聚糖係根據實例2或實例5(在酵素作用期間或之後加以研磨)中的方法來製備之。在一日齡到21日齡之間無限制提供雞群該飲食。並以每週為間隔來監視生長速率。

五、發明說明(27)

在餵食試驗結束時，從每種處理中取18隻鳥將其放血。以經過肝素處理的試管收集血液，並以PBS沖洗兩次。藉著從少量的血液試樣中分離白血球，並與有生存能力的金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)懸浮液一起培養，來評估循環血液中白血球的殺細菌活性。在一小時的培養期間之後，溶解血球細胞，並測量存活細菌的數目。

另外從每種處理中取出20隻鳥移至泡罩隔離器中，每個隔離器中一種處理組。從每隻鳥身上取得共泄腔擦拭物以確認鳥群是不含沙門桿菌的。以紫外線照射飼料以確保其不含沙門桿菌。利用鼠傷寒沙門氏桿菌(*Salmonella typhimurium*)的遺傳工程品系(具萘啶酮酸抵抗力)，經口接種予鳥群。以不同的時間間隔，犧牲每種處理組中的五隻鳥，並從胃腸道中取得沙門桿菌計數。結果摘述於表XII和XIII中。

表 XII

聚葡萄糖-甘露聚糖對家禽健康的影響：生長速率和單核球活性

處理	第21天體重(克)	存活的細菌 (cfu/毫升)
對照組	799	2.3×10^4
0.1%聚葡萄糖(酵素法)	813	1.2×10^4
0.1%聚葡萄糖 經過研磨然後以酵素消化	818	7.7×10^3

五、發明說明 (28)

表 XIII

挑戰試驗：沙門桿菌的殖民

分析	對照組	0.1%聚葡萄糖 (酵素法)	0.1%聚葡萄糖 經過研磨然後 再以酵素消化
在2天後 被殖民鳥隻的%	93	0	60
在4天後 被殖民鳥隻的%	100	60	20
在第2天時的 沙門桿菌數目 (CFU/克)	2364	0	760
在第4天時的 沙門桿菌數目 (CFU/克)	30000	15840	6000

表XII顯示聚葡萄糖-甘露聚糖在生長速率方面產生了2-3%的改善。該聚葡萄糖-甘露聚糖製劑在幼雞身上補強了免疫反應，並促進其抵抗感染的能力，另一方面，表XIII顯示將聚葡萄糖-甘露聚糖添加到飲食中，明顯地降低了沙門桿菌對幼雞殖民的發生率和嚴重程度。

實例12 機能飲料

可將根據本發明之聚葡萄糖-甘露聚糖製劑加至飲料或食物(例如優格)中，來改善易於受到感染之人類的健康，如免疫-妥協的個體、密集訓練的運動員，以及具有癆病生命型式或易罹患胃腸道問題的人。適合使用的調配物是不含酒精的飲料：

(請先閱讀背面之注意事項，再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(29)

25%的紅蘿蔔、蕃茄及/或柑橘的果汁含量

1% (重量/體積)聚葡糖製劑。

摘要：-

(i) 我們產製含有甘露聚糖、並具有免疫刺激之活性的顆粒狀聚葡糖製劑的方法，與先前已知的方法有相當大的差異，先前已知的方法係以鹼-酸、酚：水或溶劑萃取作用為基礎。

(ii) 藉著我們的方法產製之聚葡糖-甘露聚糖物質，比藉著鹼-酸萃取法產製的更不純，然而其在老鼠身上刺激非-特異性的免疫反應卻更為有效。

(iii) 藉著在加熱-乾燥之前先將該聚葡糖-甘露聚糖物質酸化，可以改善該物質之活性。

(iv) 可藉著改變顆粒大小、酸處理和酵素處理，而明顯地改變聚葡糖-甘露聚糖物質的黏性和生物活性。

本發明之聚葡糖-甘露聚糖物質，在許多領域中均是有用的，包括但不限於：-

i) 養殖漁業：為了增加硬骨魚類和甲殼類種類對各種水-生感染的抵抗力。可將該聚葡糖物質投予在已經製備好的魚飼料中。

ii) 畜牧業：可在飼料原料中、寵物食品中，以及以液態形式將該聚葡糖物質以投予動物和家禽。

iii) 獸醫和醫學上的用途：可將該聚葡糖-甘露聚糖物質當作局部傷口-癒合乳霜或薄膜來投予，或是可經口、鼻內或經由非經腸之注射來投予。

五、發明說明(30)

年	月	日	修正
89	11	27	補充

iv) 作為食品補充物：酵母細胞壁物質產製成的副產物，幾乎是公認的食品添加物，用來當作增稠劑或是在沙拉調味料、湯、塗麵包之物(如奶油、果醬)、醬料等等中，提供飲食的纖維，並可使用於"機能"食品和飲料中，以促進對疾病的抵抗力。

v) 化妝品：在例如減少日曬的乳霜或乳液中，以及在敏感皮膚使用的調配物中。

vi) 藥學上：作為傷口-癒合製劑、抗-癌症製劑，或是在免疫抑制的患者或易受到感染之患者身上作為抗-感染製劑。本發明之產物可以乳霜、乳液、錠劑、漱口藥水之形式來使用，或是使該物質在經乾燥後形成薄膜，而用來作為燒傷的包紮。也可用它來當作疫苗、抗生素或其他藥學製品的佐劑。

將能夠清楚地瞭解到，本發明之聚葡萄糖-甘露聚糖產品可應用在已經描述於前項技藝中之 β -聚葡萄糖的用途上。

對熟諳此藝者而言，顯然為了清楚和明瞭的目的，在一些細目中已經說明了本發明，可以對本文中描述之具體實施例和方法進行各種修改和變化，而不違背在此專利說明書中揭示之發明概念的範圍。

圖式簡要說明

圖1係顯示獲自實例1至3聚葡萄糖樣本之FTIR光譜。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：一種製備免疫刺激性 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑之方法及其產物)

本發明提供一種產造免疫刺激性 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的方法，其包含在pH值5到6之下，以及在35到60°C的溫度下，進行具有高比例 β -聚葡萄糖存在的酵母、細菌或真菌細胞的自溶步驟6到48小時，並從自溶產物中分離出固體物質。

β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑，可併入作為食品成份，或是用以作為治療諸如免疫-抑制、高膽固醇血症、低血糖和重金屬排泄等症狀之醫藥品。

英文發明摘要(發明之名稱："METHOD FOR PRODUCTION OF AN IMMUNOSTIMULATORY β -GLUCAN-MANNAN PREPARATION, AND PRODUCTS THEREOF")

There is provided a method of production of an immunostimulatory β -glucan-mannan preparation, comprising the step of autolysis of cells of a yeast, bacterium or fungus containing a significant proportion of β -glucan at a pH of 5 to 6 and a temperature of 35 to 60°C for 6 to 48 hours, and separating solid material from the autolysed product.

The β -glucan-mannan preparation may be incorporated as a food component or be used as a pharmaceutical for treatment of conditions such as immuno-suppression, hypercholesterolaemia, hypoglycaemia and heavy metal excretion.

六、申請專利範圍

89.11.17

修正
補充

公告本

1. 一種製造免疫刺激性含有 β -聚葡萄糖及甘露聚糖製劑的方法，其中該 β -聚葡萄糖包含1,3- β -聚葡萄糖及1,6- β -聚葡萄糖，該方法包含下列步驟：
 - a) 在5到6之pH值和35至60℃之溫度下，將具有高比例 β -聚葡萄糖存在的酵母、細菌或真菌細胞進行第一次自溶步驟6到48小時，以產生顆粒大小100至300微米之物質；
 - b) 從自溶產物中分離出固體物質；
 - c) 在4到6之pH值和35至60℃之溫度下，將步驟b)之產物於一或多種選自包含蛋白水解酵素、甘露聚糖酶、澱粉酶和 β -聚葡萄糖酶所組成之群之製劑的存在下，進行第二次自溶步驟6到48小時；
 - d) 從自溶產物中分離出固體物質；並再
 - e) 降低其自溶產物之顆粒至小於2微米。
2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該酵母為選自包含酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、脆壁克魯維酵母(*Kluyveromyces fragilis*)和念珠菌屬(*Candida*)所組成之群的菌種。
3. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該細菌為選自包含產鹼桿菌屬(*Alkaligenes*)、土壤桿菌(*Agrobacterium*)、單胞菌屬(*Cellulomonas*)和盤多毛孢屬(*Pestalotia*)所組成之群的菌屬。
4. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該真菌為選自包含短梗微菌(*Aureobasidium*)、側耳屬

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

(*Pleurotus*)、大莖點菌(*Marcophomopsis*)、靈芝(*Ganoderma*)、裂褶菌(*Schizophylla*)、非凱馬菌(*Fachyme*)和革蓋菌(*Coriolus*)所組成之群。

5. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該蛋白水解酵素係選自包含經發酵地衣芽孢桿菌(*Bacillus licheniformis*)製得之鹼性細菌蛋白酶及分離自芽孢桿菌屬菌種(*Bacillus species*)之蛋白酶所組成之群。
6. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該 β -聚葡萄糖酶係選自經發酵節桿菌屬菌種(*Arthrobacter species*)製得之酵母細胞壁分解酶及經發酵毒性木霉(*Trichoderma harzianum*)製得之酵素複合物所組成之群。
7. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該澱粉酶係選自經發麴霉菌(*Aspergillus*)菌株製得之葡萄糖澱粉酶所組成之群。
8. 一種免疫刺激性製劑，其包含 β -聚葡萄糖及甘露聚糖，其中該 β -聚葡萄糖包含1,3- β -聚葡萄糖及1,6- β -聚葡萄糖，其係由下列步驟製得：
 - a) 在5到6之pH值和35至60℃之溫度下，將具有高比例 β -聚葡萄糖存在的酵母、細菌或真菌細胞進行自溶步驟6到48小時；並再
 - b) 在4到6之pH值和35至60℃之溫度下，將步驟a)之產物於一或多種選自包含蛋白水解酵素、甘露聚糖

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

以

六、申請專利範圍

酶、澱粉酶和 β -聚葡萄糖酶所組成之群之製劑的存在下，進行自溶步驟6到48小時；

且其顆粒大小小於2微米。

9. 根據申請專利範圍第8項免疫刺激性製劑，其係由包含下列步驟之方法製得：

a) 在5到6之pH值和35至60°C之溫度下，將具有高比例 β -聚葡萄糖存在的酵母、細菌或真菌細胞進行自溶步驟6到48小時；

b) 從自溶產物中分離出固體物質；

c) 在4到6之pH值和35至60°C之溫度下，將步驟b)之產物於一或多種選自包含蛋白水解酵素、甘露聚糖酶、澱粉酶和 β -聚葡萄糖酶所組成之群之製劑的存在下，進行自溶步驟6到48小時；

d) 從自溶產物中分離出固體物質；並再

e) 降低其自溶產物之顆粒至小於2微米。

10. 根據申請專利範圍第9項之免疫刺激性製劑，其中該顆粒之大小係小於1微米。

11. 根據申請專利範圍第1項之製造免疫刺激性製劑的方法，其中第一次自溶步驟之pH值係界於5至6間，溫度係維持於35至60°C間進行6至48小時，且該顆粒之直徑係小於2微米。

12. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該產物包含1,3-聯結及1,6-聯結葡萄糖單體，且其中1,3-聯結比1,6-聯結葡萄糖單體之比例為4.9%至7.3%。

六、申請專利範圍

13. 根據申請專利範圍第9項之免疫刺激性製劑，其中pH值係界於5至6間，溫度係維持於35至60°C間進行6至48小時，且該顆粒大小係小於2微米。
14. 根據申請專利範圍第9項之免疫刺激性製劑，其中該顆粒之平均直徑係小於2微米。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

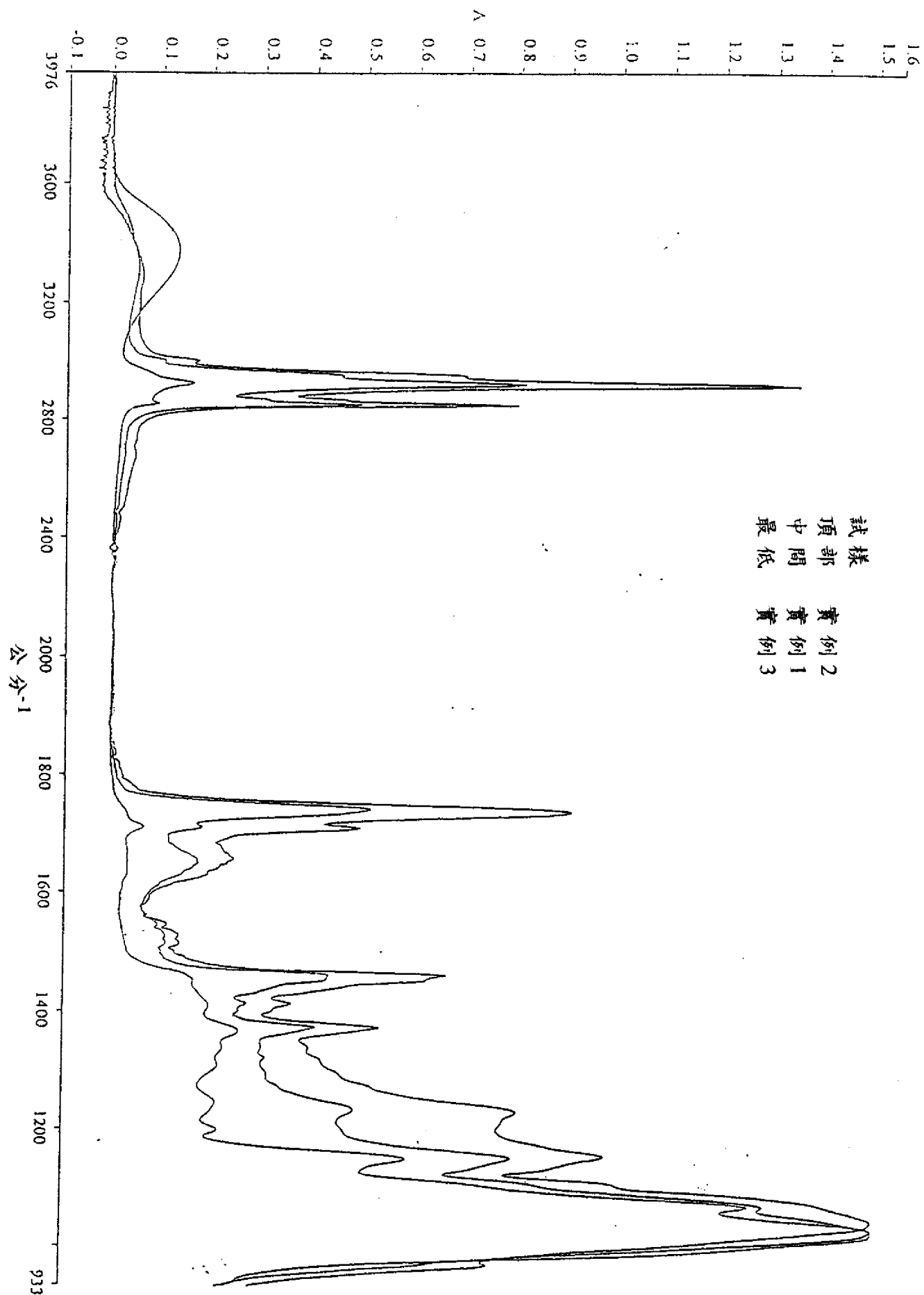
裝

訂

冰

89.11.27 修正
年 月 日 補充

第85107939號專利申請案
中文圖式修正本(89年11月)



87.3.13

申請日期	85.07.04
案 號	85107939
類 別	C12P19/04, A01N63/02, A61K 31/715, A23K1/06

424110

公告本

(以上各欄由本局填註)

說明書修正頁(87年3月)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	一種製備免疫刺激性 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑之方法及其產物
	英 文	"METHOD FOR PRODUCTION OF AN IMMUNOSTIMULATORY β -GLUCAN-MANNAN PREPARATION, AND PRODUCTS THEREOF"
二、發明人	姓 名	1.瑞吉尼·懷特洛夫 2.羅伯·懷特·吉伯特 3.克拉吉·葛頓·史密斯 4.約瑟夫·古蘭迪 5.肯茲·詹姆士·希姆 6.威勒·亨德利克·蘭格里斯
	國 籍	1.2.5.英國 3.紐西蘭 4.澳大利亞 6.荷蘭
	住、居所	均澳大利亞維多利亞省卡頓市博弗里街1號 卡頓聯合釀造廠有限公司
三、申請人	姓 名 (名稱)	澳大利亞商卡頓聯合釀造廠有限公司
	國 籍	澳大利亞
	住、居所 (事務所)	澳大利亞維多利亞省墨爾本區卡頓市博弗里街1號
	代 表 人 姓 名	安德里安 卡德諾

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：一種製備免疫刺激性 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑之方法及其產物)

本發明提供一種產造免疫刺激性 β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑的方法，其包含在pH值5到6之下，以及在35到60°C的溫度下，進行具有高比例 β -聚葡萄糖存在的酵母、細菌或真菌細胞的自溶步驟6到48小時，並從自溶產物中分離出固體物質。

β -聚葡萄糖-甘露聚糖製劑，可併入作為食品成份，或是用以作為治療諸如免疫-抑制、高膽固醇血症、低血糖和重金屬排泄等症狀之醫藥品。

英文發明摘要(發明之名稱："METHOD FOR PRODUCTION OF AN IMMUNOSTIMULATORY β -GLUCAN-MANNAN PREPARATION, AND PRODUCTS THEREOF")

There is provided a method of production of an immunostimulatory β -glucan-mannan preparation, comprising the step of autolysis of cells of a yeast, bacterium or fungus containing a significant proportion of β -glucan at a pH of 5 to 6 and a temperature of 35 to 60°C for 6 to 48 hours, and separating solid material from the autolysed product.

The β -glucan-mannan preparation may be incorporated as a food component or be used as a pharmaceutical for treatment of conditions such as immuno-suppression, hypercholesterolaemia, hypoglycaemia and heavy metal excretion.

六、申請專利範圍

89.11.17

修正
補充

公告本

1. 一種製造免疫刺激性含有 β -聚葡萄糖及甘露聚糖製劑的方法，其中該 β -聚葡萄糖包含1,3- β -聚葡萄糖及1,6- β -聚葡萄糖，該方法包含下列步驟：
 - a) 在5到6之pH值和35至60℃之溫度下，將具有高比例 β -聚葡萄糖存在的酵母、細菌或真菌細胞進行第一次自溶步驟6到48小時，以產生顆粒大小100至300微米之物質；
 - b) 從自溶產物中分離出固體物質；
 - c) 在4到6之pH值和35至60℃之溫度下，將步驟b)之產物於一或多種選自包含蛋白水解酵素、甘露聚糖酶、澱粉酶和 β -聚葡萄糖酶所組成之群之製劑的存在下，進行第二次自溶步驟6到48小時；
 - d) 從自溶產物中分離出固體物質；並再
 - e) 降低其自溶產物之顆粒至小於2微米。
2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該酵母為選自包含酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、脆壁克魯維酵母(*Kluyveromyces fragilis*)和念珠菌屬(*Candida*)所組成之群的菌種。
3. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該細菌為選自包含產鹼桿菌屬(*Alkaligenes*)、土壤桿菌(*Agrobacterium*)、單胞菌屬(*Cellulomonas*)和盤多毛孢屬(*Pestalotia*)所組成之群的菌屬。
4. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該真菌為選自包含短梗微菌(*Aureobasidium*)、側耳屬

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

89.11.27 修正
年 月 日 補充

第85107939號專利申請案
中文圖式修正本(89年11月)

