

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 19/14

C12P 1/00 C08L 3/02



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96192439. X

[45] 授权公告日 2003 年 6 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1112446C

[22] 申请日 1996.3.7 [21] 申请号 96192439. X

[30] 优先权

[32] 1995. 3. 9 [33] US [31] 08/401,325

[32] 1995. 3. 27 [33] US [31] 08/411,038

[86] 国际申请 PCT/US96/02554 1996.3.7

[87] 国际公布 WO96/28567 英 1996.9.19

[85] 进入国家阶段日期 1997.9.9

[71] 专利权人 金克克国际有限公司

地址 美国纽约

[72] 发明人 R·L·安特里姆 C·密奇恩森

L·P·索尔海姆

[56] 参考文献

US4914029 1990.04.03 C12P19/04

"JOURNAL OF FOOD SCIENCE" VOL. 52, NO., 3 1987
-01 -01 "EFFECT OF P, HYTATE AND OTHER MYO
-INOSITOL PHOSPHATE ESTERS ON A - AMYLASE DI-
GESTION OF STARCH"

审查员 赵学武

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 郭建新

权利要求书 2 页 说明书 27 页

[54] 发明名称 液化淀粉的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种液化淀粉的方法, 包括如下步骤: 在液化淀粉之前或液化淀粉的同时处理淀粉以使存在于淀粉中的酶抑制组分失活和/或将其除去, 从而得到处理后的淀粉; 向处理后的淀粉中加入 α -淀粉酶; 使处理后的淀粉在一定的温度下反应一段时间, 该温度对处理后的淀粉的液化有利。处理淀粉的有效方法包括加入肌醇六磷酸酯降解酶和热处理, 随后可选择性地对颗粒状淀粉或淀粉溶液进行过滤或离心。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种液化淀粉的方法，它包括如下步骤：

(a) 处理颗粒淀粉或淀粉溶液以使存在于淀粉中的酶抑制组分失活和/或将其除去，从而得到处理后的淀粉；

(b) 向处理后的淀粉中加入 α -淀粉酶；

(c) 使处理后的淀粉在一定的温度下反应一段时间，该温度对处理后的淀粉的液化有利，

其特征在于步骤(a)在步骤(b)之前进行，并且特征还在于步骤(c)在pH为4.5至6.0的范围内进行。

2. 根据权利要求1的方法，其中步骤(a)包括将所述淀粉加热到大约80℃至150℃之间的温度。

3. 根据权利要求2的方法，进一步包括用离心方法将酶抑制组分除去。

4. 根据权利要求3的方法，其中在将淀粉温度升高之后或同时进行离心。

5. 根据权利要求1的方法，其中的步骤(c)在4.5至5.7的pH下进行。

6. 根据权利要求1的方法，其中的步骤(c)在4.5至5.2的pH下进行。

7. 根据权利要求1的方法，其中在步骤(a)之前，在60℃至90℃之间的温度下将 α -淀粉酶加入淀粉中，从而将酶抑制组分从淀粉中除去。

8. 根据权利要求7的方法，其中步骤(a)包括加入 α -淀粉酶之前通过在一定时间内以及在足以使酶抑制组分失活的温度下加热淀粉进行热处理，而使酶抑制组分从淀粉中除去。

9. 一种液化淀粉的方法，包括如下步骤：

(a) 处理颗粒淀粉或淀粉溶液以使存在于淀粉中的酶抑制组分失活和/或将其除去，从而得到处理后的淀粉；

(b) 向所述淀粉中加入 α -淀粉酶；和

(c) 使处理后的淀粉在一定温度下反应一段时间，该温度对处理后的液

粉的液化有利，

其特征在于步骤(a)在步骤(b)之前或同时进行，并且特征还在于步骤(a)包括加入一种含有肌醇六磷酸酯降解活力的酶，另外特征还在于步骤(c)在 pH 为 4.5 至 6.0 的范围内进行。

10. 根据权利要求 9 的方法，其中含有肌醇六磷酸酯降解活力的酶与 α -淀粉酶同时加入。

11. 根据权利要求 9 的方法，其中加入的含有肌醇六磷酸酯降解活力的酶的浓度为 0.1 至 100 肌醇六磷酸酶单位/克淀粉。

12. 根据权利要求 9 的方法，其中所述步骤(c)在 pH 为 4.5 至 5.7 的范围内进行。

13. 根据权利要求 9 的方法，其中所述步骤(c)在 pH 为 4.5 至 5.2 的范围内进行。

14. 根据权利要求 9 的方法，其中在步骤(a)之前， α -淀粉酶以 60 至 90℃ 的温度加入到所述淀粉中，以使所述酶抑制组合物从所述淀粉中除去。

15. 含有肌醇六磷酸酯降解活力的酶在液化含淀粉组合物之前或同时除去肌醇六磷酸酯的用途，所述液化步骤包括向组合物中加入 α -淀粉酶，并在液化淀粉有效的温度下使该组合物反应一段时间，其特征还在于所述淀粉是颗粒淀粉或淀粉溶液。

16. 根据权利要求 15 的用途，其中所述酶是肌醇六磷酸酶或磷酸酶。

液化淀粉的方法

本申请是1995年3月9日提出的美国专利申请序列号08/401,325的部分接续申请，该申请全部内容被并入本文作参考。

本发明涉及在将谷物淀粉转化为诸如葡萄糖、果糖和酒精等下游产品时对 α -淀粉酶的应用进行改进。特别地，本发明涉及在液化前或液化中从颗粒状淀粉中将一种酶抑制组分除去和/或使其失活的方法。

长久以来，诸如玉米的谷物就被用作淀粉的来源。将淀粉分离和纯化以用于工业生产的一种众所周知的方法是湿磨法。该方法已经发展成为一种高度专门化和完整的系统，其设计目的就是要使谷粒中的主要组分尽可能完全地分离（参见 Stanley A. Watson, Starch: Chemistry & Technology, Vol. II, Industrial Aspects, Academic Press, New York, 1967, pp. 30-51）。

在通常的湿磨法中，用于生产淀粉产品的干燥谷物首先要经过一个称作“浸泡”的步骤。在浸泡过程中，谷物处于逆向水流中，这样可以从谷物颗粒中分离出许多可溶物，包括肌醇六磷酸酯和肌醇六磷酸、糖类、盐类和蛋白质。从浸泡水中分离出被浸泡的谷物，然后使其经过一个机械破碎和研磨步骤。随后使用浮选和离心技术将胚芽从淀粉、纤维和蛋白质中分离出去。所得到的胚乳（淀粉）、纤维和蛋白质的稀浆随后被进一步研磨和过滤以分离出纤维。最后，根据密度的不同，通过逆流冲洗和离心将蛋白质及与胚乳有关的组分分离以从蛋白质/谷蛋白物流中分离出淀粉。然后对所分离的淀粉进行彻底的冲洗以除去任何非颗粒状的与淀粉有关的可溶物，诸如可溶的无机盐以及肌醇六磷酸酯和肌醇六磷酸的盐类。所得到的产物是一种高度纯化的不可溶颗粒状淀粉的稀浆，它被用作转化为果糖的起始物质。

通常，淀粉至果糖的生产过程包括四个步骤：颗粒状淀粉的液化，将液化后的淀粉糖化为葡萄糖，纯化，以及异构化为果糖。淀粉液化步骤的目的是将淀粉聚合物颗粒的高浓度悬浮液转化为一种低粘度的可溶性短链

长糊精的溶液。该步骤对于用标准设备简便地处理以及有效地转化为葡萄糖和其它糖类是很必要的。为了使颗粒状淀粉液化，有必要通过升高颗粒状淀粉的温度至大约 72 °C 以上以使颗粒糊化。加热步骤在瞬间使不可溶的淀粉颗粒破裂以产生水溶性的淀粉溶液。然后用 α -淀粉酶（EC 3.2.1.1）将被增溶化的淀粉溶液液化。

通常的酶促液化过程包括通过加入氢氧化钙、氢氧化钠或碳酸钠，将颗粒状淀粉稀浆的 pH 值调整在 6.0 至 6.5 之间，这是从地衣型芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）中提取的 α -淀粉酶的最适 pH 值。加入氢氧化钙的优点是它还能够提供钙离子，而该离子可以稳定 α -淀粉酶防止它失活。加入 α -淀粉酶后，将悬浮液泵送通过一个蒸汽喷管，使其温度在瞬间内升到 80 °C~115 °C。淀粉马上糊化，而且由于 α -淀粉酶的存在，它被 α -淀粉酶通过对（1-4）糖苷键的随机水解而解聚，成为一种容易用泵输送的流体物质。

在第二种液化过程中，将 α -淀粉酶加入淀粉悬浮液，将该悬浮液在 80 - 100 °C 下保温以部分水解淀粉颗粒，在高于大约 105 °C 的温度下将部分水解的淀粉悬浮液泵送通过一个喷管以使任何剩余的颗粒状结构完糊化。在糊化的淀粉冷却后，第二次 α -淀粉酶的加入可以使淀粉进一步水解。

液化过程的第三种方法被称作干磨法。在干磨法中，将谷物整体研磨并与水结合。使用浮选分离或等效的技术将胚芽选择性地除去。所得到的混合物，其中含有淀粉、纤维、蛋白质和谷物的其它组分，被用 α -淀粉酶液化。当使用干磨法时，本领域的一般操作是在较低的温度下进行酶促液化。通常，在将淀粉转化为可溶性糊精方面，低温液化的效果被认为要比高温液化差。

一般情况下，完成糊化后，在 α -淀粉酶存在的情况下将淀粉溶液在高温下保存，直至达到 10 - 20 的 DE 值，通常需要 1 - 3 小时的时间。葡萄糖值（DE）是计量全部还原糖浓度的工业标准，它以 D-葡萄糖的干重为计算基准。没有水解的颗粒状淀粉的 DE 值基本为零，而 D-葡萄糖的 DE 值被定义为 100。

含有 α -淀粉酶的淀粉溶液所能承受的最高温度取决于所得到的酶的微生物来源以及 α -淀粉酶分子的分子结构。由枯草杆菌（*B. subtilis*）或解淀粉芽孢杆菌（*B. amyloliquefaciens*）的野生菌株所生产的 α -淀粉酶的使用温度通常不高于大约 90 °C，因为高于那个温度会极快地导致它热失活，而由地衣型芽孢杆菌的野生菌株所生产的 α -淀粉酶可在高达大约 110 °C 的温度下使用。

已知淀粉和钙离子的存在能稳定 α -淀粉酶以防止其失活。尽管如此，还是在 pH 高于 6 的条件下使用 α -淀粉酶以防止其快速失活。在低温下，即使 pH 值低至 5，来自地衣型芽孢杆菌的 α -淀粉酶也表现出了对淀粉底物的极好的水解活性。然而，当用于淀粉水解的酶处于一般的喷射温度下，例如在 102 °C 至 109 °C 之间，pH 值就必须至少维持在 5.7 以上以防止其极其快速的失活。可惜的是，对 pH 值的要求使得操作范围十分地狭小，因为 pH 值高于 6.0 会产生不希望的副产物，例如麦芽寡糖类。因此，在实际上液化 pH 值必须维持在 5.9 和 6.0 之间以得到令人满意的水解淀粉的产量。

涉及液化 pH 值的另一个问题是，需要将淀粉悬浮液的 pH 值从大约为 4，即来自于湿磨阶段的玉米淀粉悬浮液的 pH 值，升高到 5.9 - 6.0。这种 pH 调节需要高费用地加入能中和酸的化学物质，而且还需要对最终的淀粉转化产物进行额外的离子交换精制以除去该化学物质。而且液化后的下一步骤通常是将液化淀粉糖化为葡萄糖，需要 4 - 4.5 的 pH 值；因此 pH 必须从 5.9-6.0 调低至 4-4.5；这就需要额外的化学物质的加入和精制步骤。

就象普遍存在于许多植物种子中一样，肌醇六磷酸，肌醇的六磷酸酯也以肌醇六磷酸盐的形式存在于谷粒中，例如钾盐、钙盐和镁盐。正如上面所提到的，通常认为在进行进一步处理前，大部分存在于玉米颗粒中的肌醇六磷酸都在浸泡过程中从颗粒中浸出，并将从液化的物流中除去。令人惊奇的是，如下所述，申请人发现在经过了浸泡和彻底的清洗后，一种形式的肌醇六磷酸酯好象还存在于颗粒状淀粉中。尽管不想被理论所束缚，申请人还是相信剩余的肌醇六磷酸酯实际上被束缚在淀粉颗粒中，因而在彻底清洗过程中也不能从淀粉中分离。

在美国专利 5,322,778 中，pH 值在 4.0 至 6.0 之间的液化是通过向液

化稀浆中加入抗氧化剂，如亚硫酸氢盐及其盐、抗坏血酸及其盐、异抗坏血酸，或加入酚类抗氧化剂，如丁基化邻甲氧基苯酚、丁基化羟基甲苯或 α -生育酚来实现的。

在美国专利 5,180,669 中，pH 值在 5.0 至 6.0 之间的液化是通过向研磨后的淀粉稀浆中加入碳酸根离子实现的，其用量超过了使溶液得到缓冲所需的量。由于碳酸根离子的加入导致了 pH 值的升高，通常通过加入氢离子使稀浆得到中和，例如加入诸如盐酸或硫酸的无机酸。

在 PCT 公开 No. WO 94/02597 中，描述了一种氧化稳定性得到改善的变异的 α -淀粉酶，其中的一个或多个蛋氨酸被除半胱氨酸或蛋氨酸之外的任何氨基酸所取代。

在 PCT 公开 No. 94/18314 中，描述一种氧化稳定性得到改善的变异的 α -淀粉酶，其中的一个或多个蛋氨酸、色氨酸、半胱氨酸、组氨酸或酪氨酸残基被一种不可氧化的氨基酸所取代。

在 PCT 公开 No. WO 91/00353 中，对与液化有关的问题的解决是通过通过对 α -淀粉酶进行遗传工程改造完成的，其特性包括改进了的热、酸和碱的稳定性。

在美国专利 4,914,029 中，向玉米浸泡液中加入肌醇六磷酸酶以减少玉米浸泡液中肌醇六磷酸的量，从而在动物饲料中更有效地利用了玉米浸泡液。

尽管现有技术中取得了一些进展，但还需要开发一种在低 pH 值水平使用商用 α -淀粉酶进行淀粉液化的有效方法。类似地，在本领域中也需要开发一种能够在高温下进行干磨谷物的液化的方法。然而，上述任何方法都不能提供这些优点，即能够将一种组分除去和/或使其失活，而该组分导致了参与低 pH 值淀粉液化的酶无效或不存在。另外，上述任何方法都不能提供一种适应性强的液化方法，该方法不需要加入抗氧化剂或中和用的酸，也不需要制备经遗传工程改造的酶或发现一种具有异常低的 pH 稳定性的新的 α -淀粉酶。

本发明的一个目的是使用易得的 α -淀粉酶的突变型或野生型进行有效的低 pH 值淀粉液化。

本发明的另一个目的是将存在于颗粒状淀粉中的酶抑制组分除去和/或使其失活，该组分主要会导致低 pH 值下 α - 淀粉酶液化的无效。

本发明的另一个目的是提供一种液化淀粉的方法，该方法不用加入昂贵的抗氧化剂。

本发明的另一个目的是提供一种液化淀粉的简单和有效的方式，它允许在方法中进行变通，而且不需要使用经遗传工程改造的 α - 淀粉酶。

本发明提供了一种液化淀粉的方法，它包括如下步骤：在液化淀粉之前或在液化淀粉的同时处理淀粉以使存在于淀粉中的酶抑制组分失活和/或将其除去，从而得到处理后的淀粉；向处理后的淀粉中加入 α - 淀粉酶；使处理后的淀粉在一定的温度下反应一段时间，该温度对处理后的淀粉的液化有利。根据本发明的另一个实施方案，提供了一种组合物，它包括 α - 淀粉酶和液态淀粉的混合物，其 pH 值小于 5.7，该组合物或者含有失活了的酶抑制组分，或者基本上不含酶抑制失活组分。

正如下面的更为详细的介绍中所指出的，本发明的实施使得商业淀粉液化方法具有了重要的优点。尽管不希望被理论所束缚，申请人还是相信他们所发现的存在于颗粒状淀粉中的一种特定的组分是导致与使用 α - 淀粉酶在低 pH 值下液化淀粉有关的问题的原因，而以前并没有将该特定组分鉴定为其中的一种组分。通过对所分离的组分进行元素分析，该组分似乎含有某种形式的肌醇六磷酸酯。对这种导致低 pH 值液化问题的组分的令人惊奇的鉴定，使得将这种化合物失活和/或将其除去成为可能，从而能够使用已知的和鉴定过的 α - 淀粉酶在低至 4.5 的 pH 值下对颗粒状淀粉进行有效的液化。如下所示，申请人的发明第一次提供了一种在低 pH 值下液化淀粉的方法，它可以应用包括 α - 淀粉酶的商业上适用的系统。另外，本发明不需要使用经过特别设计的具有异常低的 pH 稳定性的突变型或野生型的酶或诸如加入抗氧化剂或酸中和剂这样的昂贵的方法。

参照下面的详细描述以及所附的图表就能够对本发明本身及其更进一步的目的和附带的优点有很好的了解。

“液化”表示一种过程，通过它淀粉转化成了短链和较低粘度的糊精。通常，该过程包括淀粉的糊化，在糊化的同时或之后加入 α - 淀粉酶。

“浸泡液”表示一种液体，它来自浸泡过程中被浸泡的谷物颗粒。浸泡液中含有谷物中的大部分可溶性组分。

“颗粒状淀粉”或“淀粉颗粒”表示一种食用谷物的水不溶性组分，在通过浸泡、机械粉碎、分离、筛分、逆流冲洗和离心这些典型的谷物湿磨法步骤除去了外壳、纤维、蛋白质、胚芽和可溶物后，它仍保持原状。颗粒状淀粉由完整的淀粉颗粒组成，该颗粒几乎完全由质密的淀粉分子（即支链淀粉和直链淀粉）组成。在玉米中，颗粒状淀粉组分占淀粉的大约 99 %；剩下的 1 % 由与颗粒紧密相联的蛋白质、灰份、纤维和痕量组分组成。颗粒状淀粉的质密结构严重阻碍了 α -淀粉酶水解淀粉的能力。淀粉的糊化被用来破坏颗粒以形成一种可溶性的淀粉溶液并促进酶促水解。

“淀粉溶液”表示可溶于水的糊化的淀粉，它来自对颗粒状淀粉的加热。在将颗粒加热到大约 72 °C 以上后，颗粒状淀粉分解成为一种疏松淀粉分子的液体混合物。举例来说，在黄色白齿型玉米中该混合物含有大约 75 % 的支链淀粉和 25 % 的直链淀粉，在水中形成了一种粘稠的溶液。在形成葡萄糖或果糖的商业生产中，是将淀粉溶液液化以形成一种可溶的糊精溶液。

“酶抑制组分”或“EIC”表示颗粒状淀粉中的一种组分，其作用是在低 pH 值液化时抑制 α -淀粉酶对淀粉溶液的水解。对从糊化的淀粉颗粒中提取的、在低 pH 值下抑制 α -淀粉酶的组分进行的化学分析显示，EIC 含有某种形式的肌醇六磷酸酯。含有酶抑制组分的肌醇六磷酸酯的形式被认为是肌醇六磷酸的镁、铁、钾、锰、锌和/或钙盐。

“处理”被定义为表示对颗粒状淀粉或淀粉溶液的处理，其目的是在低 pH 值，例如 pH 值低于 5.7 时，减弱或消除在酶促水解淀粉过程中由酶抑制组分引起的影响。举例来说，处理包括：向颗粒状淀粉或淀粉溶液中加入一种或一组化合物，其作用是防止酶抑制组分使 α -淀粉酶的淀粉水解活性失稳、失活，或换句话说使活性减小；让颗粒状淀粉或淀粉溶液经受某些条件或分离技术，以在低 pH 值液化前除去或明显地减弱酶抑制组分的抑制特性；或者加入一种或一组化合物，它通过将 EIC 化学修饰为非 EIC 化合物而将酶抑制组分从溶液中除去。

“ α -淀粉酶”表示一种酶活力，它切开或水解诸如淀粉、支链淀粉或直链淀粉聚合物中的 α (1 - 4) 糖苷键。合适的 α -淀粉酶既包括自然产生的 α -淀粉酶，也包括重组或变异的淀粉酶，它们都被用于淀粉液化。在本发明中优选的淀粉酶是从芽孢杆菌属中，尤其是从地衣型芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌或嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 中提取的 α -淀粉酶。

与本领域以前的液化方法相比，本发明对淀粉的处理使得液化反应，即淀粉、支链淀粉或直链淀粉的酶促水解，能够有效地在低于 6.0，甚至低于 5.0 的 pH 值下进行。液化反应优选在大约 4.5 至大约 5.7 的 pH 值下进行，更优选是在大约 4.5 至大约 5.5 之间，最优选是在大约 4.5 至大约 5.2 之间。

在本发明的一个优选的实施方案中，在加入 α -淀粉酶之前，通过热处理对颗粒状淀粉或淀粉溶液进行处理以使存在于其中的酶抑制组分失活。在该实施方案中， α -淀粉酶优选是在加热后加入颗粒状淀粉或淀粉溶液中，以确保酶抑制组分失活，从而不在一开始就影响 α -淀粉酶。然而，在处理步骤的同时加入 α -淀粉酶也被认为在本发明的范围之内。然后按照本领域所熟知的方法将稀浆在合适的时间内以及在合适的 pH 值和合适的温度下保温以使淀粉液化。根据本发明，在液化前，即加入 α -淀粉酶前，通过加热淀粉溶液能够明显地减弱酶抑制组分抑制 α -淀粉酶活力的能力。

另一方面，在液化完成之前，首先将含有淀粉酶的淀粉溶液在低温下，例如 60 °C 至 90 °C 下保温以便从淀粉或糊化的淀粉中将酶抑制组分释放，上述步骤也被认为在本发明的范围内。随后，通过将温度升高到合适的度数并维持足以使其基本液化的时间来液化淀粉。优选地，将温度升高到大约 80 °C 至大约 115 °C 之间。酶失活组分的失活可能发生在低温保温时，或发生在液化过程中升高和保持温度时。在该实施方案中，在对 α -淀粉酶进行低温保温过程中或在随后进行的液化过程中或之后，可以另外加入 α -淀粉酶。象本发明的其它实施方案一样，该实施方案能够在 pH 值低于 5.7 时进行有效的液化。

在另一个优选的实施方案中，将颗粒状淀粉或淀粉溶液用一种组分处理，该组分对酶抑制组分进行化学修饰或降解从而消除它的酶抑制特性，由此将酶抑制组分从淀粉中除去。优选地，在进行液化之前，将肌醇六磷酸酯降解酶加入淀粉颗粒或淀粉溶液中。优选的肌醇六磷酸酯降解酶包括肌醇六磷酸酶或酸性磷酸酶。产生自微生物、将肌醇六磷酸酯催化转化为肌醇和无机磷酸的许多酶中，已知其中大部分是肌醇六磷酸酶。产肌醇六磷酸酶的微生物包括细菌和丝状真菌和酵母，其中包括枯草杆菌、假单胞菌（*Pseudomonas*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*），黑曲霉（*Aspergillus niger*）、黑曲霉的变种泡盛曲霉（*Aspergillus niger* var. *awamori*）、土曲霉（*Aspergillus terreus*）、无花果曲霉（*Aspergillus ficuum*）。肌醇六磷酸酶优选是从无花果曲霉中提取。从微生物来源中对这种肌醇六磷酸酶进行提纯由本领域的已知技术完成。例如，在 Ullah, et al., *Preparative Biochemistry*, 18(4), pp. 443-458 (1988) 中，描述了从无花果曲霉中提纯肌醇六磷酸酶，其描述被并入本文作参考。

加入颗粒状淀粉或淀粉溶液中的肌醇六磷酸酯降解酶的浓度应该足以使溶液中的酶抑制组分明显地降解。当然，对合适的肌醇六磷酸酯降解酶的浓度的确定取决于 pH、温度、反应时间、酶的比活力，另外还取决于所得到的颗粒状淀粉或淀粉溶液来源于何种谷物。然而，肌醇六磷酸酯降解酶活力的最适条件对于本领域的技术人员来说是很容易确定的。肌醇六磷酸酯降解酶浓度优选为每克淀粉大约 0.1 至大约 100 单位肌醇六磷酸（肌醇六磷酸单位）。更优选地，肌醇六磷酸酯降解酶的浓度为每克淀粉从大约 1 至大约 25 肌醇六磷酸单位。一个肌醇六磷酸酶单位（肌醇六磷酸酯降解活力）被定义为在 37 °C 下，每分钟从 0.042 M 的 Mg-K 肌醇六磷酸酯中释放 1 μ mol 无机磷酸（P）所需的酶量（Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.）。考虑了将肌醇六磷酸酯降解酶或加入到颗粒状淀粉中或加入到淀粉溶液中。不管淀粉是处于颗粒状态还是溶解于溶液中，肌醇六磷酸酯降解酶都被确信对于本发明的目的是有效的。实际上，申请人发现，向颗粒状淀粉中加入肌醇六磷酸酯降解酶，即在糊化之前加入，对于本发明中对溶液的处理是有效的。另一种选择是肌醇六磷酸酶可在糊化过程中或过程后

加入淀粉溶液中。

根据另一个优选的实施方案，在液化前使酶抑制组分失活和/或将其从颗粒状淀粉或淀粉溶液中除去。可以使用本领域已知的任何化学或机械分离方法将酶抑制组分除去，只要该法对于将包括肌醇六磷酸或肌醇六磷酸盐的化合物从溶液中分离是有效的。合适的分离方法包括色谱、离子交换、微滤和离心。一个特别优选的方法包括用与 pH 值有关的肌醇六磷酸沉淀法除去酶抑制组分，或在加热处理后过滤，或者进行离心。通过高温离心或高温过滤将酶抑制组分除去也是优选的。

在处理中，颗粒状淀粉或淀粉溶液的 pH 可为任意值，只要它能够将酶抑制组分除去或使其失活。尽管处理步骤可在任何 pH 水平下操作，pH 值在大约 4 至大约 6 之间处理过程则是高效的，因为不再需要对来自湿磨过程的颗粒状淀粉物流的 pH 水平进行不希望有的调整。优选地，pH 值在大约 4.5 至大约 5.7 之间；更优选地，pH 值在大约 4.5 至大约 5.5 之间；最优选的 pH 值在大约 4.5 至大约 5.2 之间。应该指出的是，通过将处理步骤的 pH 值维持在上述范围内，处理步骤的 pH 将与湿磨后谷物淀粉处理物流的 pH 很好地相关，从而避免了因调节湿磨后玉米的 pH 值而需要的额外花费。

处理步骤的温度对于将酶抑制组分除去或使其失活是一个合适的温度，它取决于所选择的特定的处理方式。当处理步骤中包括加入肌醇六磷酸酶时，就应该选择一个适用于特定酶的水解活力的温度。对于微生物肌醇六磷酸酶来说，合适的温度通常在大约 20 °C 至大约 60 °C 之间，优选是在大约 30 °C 至大约 40 °C 之间。然而，开发能够在例如 100 - 110 °C 的温度下水解肌醇六磷酸酯的耐高温的肌醇六磷酸酶被特别地加以考虑，它被认为在本发明的范围之内并且是优选的。如果处理步骤包括热处理，其选择性地随后进行过滤或离心，处理温度应高于淀粉的糊化温度；优选是在大约 80 °C 至大约 150 °C，更优选是在大约 90 °C 至大约 110 °C 之间，最优选是在大约 95 °C 至大约 110 °C 之间。

处理步骤的时间也可以随所选择的特定的处理方式而变化。如果处理步骤包括加入肌醇六磷酸酶，处理时间将取决于所加入的肌醇六磷酸酶的

比活力以及保温的温度。如果使用微生物肌醇六磷酸酶，处理时间优选是从大约1小时至大约24小时，更优选是从大约3小时至大约6小时，这随条件而定。如果处理步骤包括通过热处理将酶抑制组分从颗粒状淀粉或淀粉溶液中除去，其选择性地随后进行过滤或离心，处理时间优选是从大约10秒钟至大约60分钟，更优选是从大约3分钟至大约10分钟。在合适的条件下，例如合适的加热条件下，来自颗粒状淀粉的肌醇六磷酸酯的失活被认为几乎是在瞬间完成的，因而处理时间只受技术条件的限制。

在热处理后，可以用本领域已知的手段使用离心或过滤方法将失活的肌醇六磷酸酯从溶液中分离出来。如果在处理中使用离心方法将肌醇六磷酸酯从淀粉中分离，离心应该在至少 $2000 \times g$ 的 g 力下进行，优选是在大约 $5000 \times g$ 至大约 $10,000 \times g$ 的 g 力下进行。

处理条件也会受所使用的谷物或研磨类型的影响。例如，含有相对较高酶抑制组分浓度的谷物比酶抑制组分浓度较低的谷物需要更长的处理时间。在不同的植物物质中不同的肌醇六磷酸含量公开于 Lehrfield, J. Agric. Food Chem., Vol. 42, pp. 2726-2731 (1994) 中，将它并入本文作参考。当用干磨法处理谷物以用于液化时，似乎存在比湿磨法多得多的肌醇六磷酸酯，原因是纤维和蛋白质组分的存在。所以对于干磨的淀粉的处理需要使用比湿磨淀粉更为苛刻的条件。

在对颗粒状淀粉或淀粉溶液进行处理以使酶抑制组分失活和/或将其除去的同时或之后，将 α -淀粉酶加入淀粉中以将淀粉液化为分子量更低的糊精。因此，在使用 α -淀粉酶液化的同时或之前无论对颗粒状淀粉还是淀粉溶液进行处理都被认为在本发明的范围之内。可以根据任何众所周知的使用 α -淀粉酶的液化技术进行液化。根据本发明，在液化步骤中的 pH 优选是低于大约 5.7，更优选是低于 5.3，最优选是在大约 4.5 至大约 5 之间。

下述实施例反映了采用本发明而具有的优点，而不是限制性的。然而，根据上述公开的内容，本领域的普通技术人员将能够变换条件、谷物、温度、酶等等。

实施例 1

α -淀粉酶活力的测定

α - 淀粉酶活力是通过一种检测方法测定的, 该法的依据是淀粉能与碘形成一种蓝色的络合物, 而当淀粉水解为更短的糊精分子时这种颜色会消失。对 α - 淀粉酶活力的定义以产生颜色变化所需的消化时间为单位, 该颜色变化代表淀粉糊精化的一种确定的状态。

所使用的试剂如下: 磷酸缓冲液 - 将磷酸二氢钾 (340g) 和氢氧化钠 (25.3g) 溶于水中并稀释至~2 升。将缓冲液冷却至室温并将 pH 调节至 6.2 ± 0.1 。该缓冲液在一个容量瓶中被稀释至 2 升。淀粉底物 - 将 10 克 (干物质) 可溶性林特纳淀粉悬浮于 50ml 水中并将其冲入~300ml 的沸水中。再次使该悬浮物沸腾并在不断的搅拌下使其沸腾 5 分钟。使该淀粉溶液在不断的搅拌下冷却至室温, 然后加入 125ml 的磷酸缓冲溶液。将该溶液用水稀释至 500ml。每天都要制备新鲜的淀粉底物。备用碘溶液 - 将碘结晶 (5.5g) 和碘化钾 (11.0g) 溶于水中并稀释定容至 250ml。将该溶液避光保存。稀释的碘溶液 - 将碘化钾 (20g) 和 2ml 备用碘溶液溶解于水中并稀释定容至 500ml。该溶液每天都要制备新鲜的。酶稀释溶液 - 将氯化钙 (11.1g) 溶于 4 升水中。用于所有试剂的水都是蒸馏水或去离子水。

将待测的 α - 淀粉酶样品用酶稀释溶液稀释至 10 - 15LU/ml 之间 (参见下面的定义)。对于许多商品 α - 淀粉酶试剂来说, 发现合适的稀释倍数为 2000 倍。将稀释碘溶液的 5ml 等分试样送入 13×100 mm 的试管中, 将 10ml 的淀粉底物置于一个 23×200 mm 的试管中。将所有试管都置于 30°C 的水浴中。使用一台装备有特殊的 α - 淀粉酶色板的 Hellige 比色计 (产品编号 620 - s5) 进行读数。将五毫升被稀释的酶 (也是 30°C) 与淀粉底物混合并开始计时。在合适的时间间隔内, 例如在反应的早期间隔为 1 分钟, 在反应的后期间隔为 15 秒, 将酶 - 底物混合物的 1ml 等分试样移入装有保温的稀释碘溶液的试管中。将淀粉碘溶液混合并移入一个精确的 13mm 方形试管中, 将其颜色在 Hellige 比色计中与标准 α - 淀粉酶色板进行比较。当时间接近终点时, 取样品的时间间隔为 0.25 分钟。

使样品的颜色与色板的颜色一致所需的时间被记录下来, 根据下面的公式计算活力 (每克或每毫升的淀粉酶活性单位) :

$$\text{LU/ml 或 LU/g} = \frac{570}{V \times t} \times D$$

其中 LU = 淀粉酶活性单位

V = 酶的容积 (5ml)

t = 糊化时间 (分钟)

D = 稀释系数: 稀释容积 ÷ 所稀释的酶的毫升数或克数

实施例 2

淀粉液化条件 -

液化后的淀粉的 DE (葡萄糖值) 的测定

淀粉液化在一个反应器中进行,其结构如下:将 50 英尺长、直径为 0.24 英寸 (内径为 0.21 英寸) 的不锈钢管弯成直径大约为 10 英寸、高为~5.5 英寸的盘管。该盘管装备有一个 11.5 英寸的作业线内静态混合器 (Cole-Parmer # G-04669-60), 它安装在距前端~4 英尺处。盘管的末端装备有一个 Swagelok 作业线内可调减压阀 (# SS 4CA - 3), 其开阀压力设定为大约 20psi。用一台活塞计量泵以~70ml/分钟的流率将淀粉稀浆送入盘管中。对盘管的加热是通过将其浸入加热到 105.5 ℃ 的甘油 - 水浴中完成的。使用循环加热器/温度控制器 (Fisher Scientific model 7305) 维持该浴的温度。

颗粒状淀粉得自玉米湿磨机并在两天之内使用。作为另一种淀粉来源, LO - DEXTM10 (一种可溶于水的经过提纯的糊精, 由对玉米淀粉的有限的水解制得) 购自 American Maize-Products Company, Hammond, Indiana。此处所使用的 LO - DEXTM10 的初始 DE 为~9.5。

用无离子水将淀粉或麦芽糖糊精稀释至大约 30 - 35 % 干固体这一理想的固体含量, 根据需要用 2.5 % 的 NaOH 或 6 % 的 HCl 调节 pH。钙被以 CaCl₂ · 2H₂O 的形式加入。典型的液化条件为:

淀粉或 LO - DEXTM10

30 % - 35 % 的固体

钙	40 - 60ppm (加入的为 30ppm)
pH	5.0 - 6.0
α - 淀粉酶	12-14 LU/g 碳水化合物 (干基)

将含有酶和 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式的钙的淀粉或 LO - DEXTM 10 以大约 70ml/min 的流率加入到反应器中。通过将反应器浸没在甘油 - 水浴中将其温度维持在 105.5 °C。将淀粉样品从反应器中转移到一个 95 °C 的第二阶段液化浴中并维持 90 分钟。在第二阶段的液化之后, 根据 Standard Analytical Methods of the Member Companies of the Corn Refiners Association, Inc., sixth ed., Analytical Procedure Committee (1980) 中描述的方法, 通过测定样品的葡萄糖值 (DE) 马上测定淀粉液化的程度。

实施例 3

肌醇六磷酸酯的 HPLC 分析

如下所述, 对肌醇六磷酸酯的分析是通过 HPLC (高效液相色谱) 完成的。使用一个 HPLC 系统, 它包括一个 Millipore/Waters, model 510 Waters Automated Gradient Controller、用 Poros 20 PI/M 树脂 (PerSeptive Biosystems) 填充的长为 250mm、内径为 4.6mm 的柱子、装备有一个 Dionex 阴离子抑制器和一个 Dionex SRS 控制器 Dionex 的电导检测器。将商品肌醇六磷酸酯的样品、从玉米谷蛋白物流中、粉碎的整个玉米、浸泡液、粉碎的全麦面粉、粉碎的大米提取的 EIC 以及来自颗粒状淀粉的 EIC 用无离子水稀释至肌醇六磷酸酯的浓度为 10 - 200mg/L, 同时过滤以除去任何不溶的物质。将 20 至 500ml 的样品 (取决于肌醇六磷酸酯的浓度) 注入柱子中, 然后以 1.3ml/min 的流率用水冲洗柱子 2 分钟。2 分钟后, 开始用 0 至 40mM 的 NaOH 进行线性梯度洗脱, 以 1.3ml/min 的流率在下面的 20 分钟中连续操作。

在~15 分钟后肌醇六磷酸酯被从柱中洗脱。用呈线性的一系列的肌醇六磷酸钠 (Sigma Chemical Company, #P 8810) 稀释液来标定电导检测器的响应。我们发现每一种来源的 EIC 都有与商品肌醇六磷酸酯相同的洗脱峰。

实施例 4

从玉米谷蛋白物流中分离 EIC

从一种富含蛋白质的淀粉物流（称作玉米谷蛋白物流）中分离出一种能使 α -淀粉酶失活或受到抑制的组分，所述物流是在玉米湿磨厂进行玉米胚乳分级时产生的，如下所述。通过离心（ $\sim 6000 \times g$ ，操作 15 分钟）将不可溶的蛋白质和淀粉颗粒从玉米谷蛋白级分（ $\sim 18.6\%$ 的固体）中除去。通过 Whatman #3 滤纸进行真空过滤以使上层清液进一步澄清。使用一个截流分子量为 5,000 的聚砜中空纤维滤芯（A/G Technology Corp., model UFP-5-D-4）进行超滤以使过滤液分级。通过加入 1N 的 NaOH 将来自超滤步骤的大约 1200ml 的滤液调节至 pH 为 9。通过离心（ $\sim 6000 \times g$ ，操作 10 分钟）将形成的沉淀回收并悬浮在水中加以清洗。

通过离心（ $\sim 6000 \times g$ ，操作 10 分钟）将沉淀从清洗的水中回收后，将沉淀再次悬浮于 ~ 500 ml 的水中，通过逐滴加入 3M 的 HCl 将 pH 慢慢地调至 5 从而使沉淀溶解。通过 Whatman #3 滤纸将溶液过滤以除去任何不溶物，然后将滤液冷却至 $\sim 4^\circ\text{C}$ 。将两倍体积的酒精（ 4°C ）加入到滤液中，通过一个多孔玻璃过滤器的过滤将所得到的沉淀回收。将沉淀用冷酒精清洗，回收后置于真空中在室温下干燥。

1200ml 的超滤液产生 3.04g 的 EIC。

实施例 5

低 pH 的液化过程中 EIC 对 α -淀粉酶的抑制

按照实施例 4 中的方法分离的 EIC（从 0 至 200 mg/升）被加入到含有 50 ppm 钙的 35 % 的 LO - DEXTM 10(pH5.2)中。将 α -淀粉酶（SPEZYME® AA20，由地衣型芽孢杆菌生产，购自 Genencor International, Inc., South San Francisco, CA）以 12 LU/g 碳水化合物的比率加入并需要通过加入 2.5% 的 NaOH 或 6 % 的 HCl 将溶液的 pH 值调节并维持在 pH5.2。使用描述于实施例 2 中的反应器系统使溶液水解。在第二阶段的保温后马上用葡萄糖值（DE）对 LO - DEXTM 10 的水解程

度进行计量。

表 1 显示 EIC 浓度的升高降低了液化的 LO - DEXTM10 (初始 DE 为 9.5) 的最终 DE, 这表明对 α -淀粉酶抑制的增加。

表 1

在 pH5.2 下 EIC 对 α -淀粉酶催化水解 LO - DEXTM10 的影响

<u>EIC (mg/升)</u>	<u>DE</u>
0	18.7
50	17.5
100	15.8
150	13.9
200	12.9

从该实施例中可以看出, EIC 的存在明显地降低了 α -淀粉酶在 pH5.2 下的效用。

实施例 6

EIC 抑制 α -淀粉酶与 pH 值的关系

按照实施例 4 中的方法分离的 EIC (200mg/升)被加入到含有 50ppm 钙的 35 % 的 LO - DEXTM10 中, 其 pH 被调节为大约 6.0 或 5.2。将 α -淀粉酶 (SPEZYME® AA20, 由地衣型芽孢杆菌生产, 购自 Genencor International, Inc.)以 12 LU/g 碳水化合物的比率加入, 按照需要通过加入 2.5 % 的 NaOH 或 6 % 的 HCl 将溶液的 pH 调节并维持在 pH5.2 或 6.0。使用描述于实施例 2 中的反应器系统和步骤使溶液水解。在 pH5.2 和 6.0 下, 将除了不含 EIC 外其它均相同的对照组与测试样品同时进行测试。在第二阶段的保温后马上用葡萄糖值 (DE) 对 LO - DEXTM10 的水解程度进行计量。

结果被列于表 2 中。可以看出, 在 LO - DEXTM10 的水解中 EIC 对 α -淀粉酶的抑制是与 pH 有关的。在 pH6.0 时, 200 mg/L EIC 的加入仅导致 DE 下降了~6%。在 pH5.2 时, DE 下降了~65%。

表 2

在 LO - DEX™ 10 的水解中 pH 对 EIC 抑制 α - 淀粉酶的影响

<u>pH</u>	<u>EIC(mg/L)</u>	<u>DE</u>
6.0	0	19.2
6.0	200	18.6
5.2	0	18.7
5.2	200	12.9

实施例 7

EIC 的元素分析

使用原子吸收光谱 (Galbraith Laboratories, Inc., Knoxville, TN) 对按照实施例 4 从玉米谷蛋白级分中分离出的 EIC 进行元素分析。结果列于表 3 中。

表 3

EIC 的元素分析

碳	7.41%	镁	10.32
氢	2.48	锰	0.07
氮	<0.05	锌	0.05
磷	22.38	铁	0.04
钙	0.78	灰分	69.50

这一分析与对肌醇六磷酸的镁、锰、锌或铁盐的混合物的分析相一致。接着,按照实施例 3 中的描述用 HPLC 分析测定 EIC 中的肌醇六磷酸酯含量。分析显示 EIC 中的阴离子组分基本上由肌醇六磷酸酯组成。

实施例 8

从粉碎的全玉米中分离 EIC

将 250g 粉碎的全玉米悬浮于 500g 的无离子水中,用 6 % 的 HCl 将所得到的稀浆的 pH 调节至 4。将该稀浆搅拌~8 小时,然后静置~10 小时。

通过在 Whatman #3 滤纸上的过滤将稀浆分离，用 1M 的 NaOH 把过滤液 (~310g) 的 pH 调节至 9。通过在一个 0.45m 膜过滤器中的过滤将所产生的沉淀回收并用水冲洗。沉淀被悬浮于水中以形成一种溶液，通过缓慢加入 6 % 的 HCl 将 pH 调节至 5。将该溶液过滤以除去任何不溶物并冷却至 ~4 °C。加入两倍体积的冷酒精，所形成的沉淀用离心方法回收。将沉淀用冷酒精洗涤一次，然后在室温下在真空中干燥过夜。

从 250g 粉碎的全玉米中回收了 0.772g 的 EIC。如实施例 3 中所示，由于其中特征性肌醇六磷酸酯的存在，可用 HPLC 分析确认 EIC。对 EIC 的确认是在 pH5.2 下向 LO - DEXTM 10 的液化混合物中加入所分离的 EIC，然后测定 α -淀粉酶是否受到了抑制。将来自粉碎的全玉米中的 EIC (200mg/升) 加入含有以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式存在的 50ppm 的钙离子的 35 % LO - DEXTM 10 中，pH 被调至大约 5.2。将 α -淀粉酶 (SPEZYME® AA20，由地衣型芽孢杆菌生产，购自 Genencor International, Inc.) 以 12 LU/g 碳水化合物的比率加入，按照需要通过加入 2.5 的 NaOH 或 6 % 的 HCl 将溶液的 pH 调节至 5.2。使用描述于实施例 2 中的反应器系统和步骤使溶液水解。将除了不含 EIC 外其它均相同的对照组与测试样品同时进行测试。在第二阶段的保温后马上用葡萄糖值 (DE) 对 LO - DEXTM 10 的水解程度进行计量。

试验的结果示于下面的表 4 中，它们与上面显示的使用从玉米谷蛋白物流中分离的 EIC 时所产生的结果相同。

表 4

pH5.2 下在 LO - DEXTM 10 的水解中，从粉碎的全玉米中分离的 EIC 对 α -淀粉酶稳定性的影响

样品	DE
200 mg/L EIC	9.5
对照	16.3

按照描述于实施例 3 中的方法对从粉碎的全玉米中分离的 EIC 进行 HPLC 分析。将一百微升的 15mg/L 的 EIC 溶液注入 HPLC 柱中，在材料

中只发现了一个阴离子峰,通过洗脱时间被证实为肌醇六磷酸酯。该 HPLC 的峰形与从玉米谷蛋白级分中分离的 EIC 的峰形基本相同。

实施例 9

从玉米浸泡液中分离 EIC

将来自玉米湿磨厂的比重为~1.19 Be 的重玉米浸泡液,即经过提浓的浸泡水浓缩液用离心方法澄清。通过加入 5M 的 NaOH 将一升澄清液的 pH 从 4.2 调节为 8.1。所得到的沉淀用离心方法收集,将沉淀悬浮于水中进行清洗后再次用离心方法收集。将该沉淀悬浮于~400 ml 的水中,通过缓慢地加入 6 % 的 HCl 将浆液的 pH 调节至~4。沉淀溶解后,通过 Whatman #3 滤纸对溶液过滤以除去任何不溶物,滤液被冷却至~4 °C。通过加入 2 倍体积的用冰冷却的酒精使 EIC 从溶液中沉淀出来,用离心方法收集。用冷酒精洗涤沉淀一次,用离心方法收集后在室温下真空干燥。

从 1 升重玉米浸泡液中回收了 23.3g 的 EIC。对 EIC 的识别是在 pH5.2 下水解 LO - DEX™ 10 时通过测定 α - 淀粉酶的失活以及对肌醇六磷酸酯的 HPLC 分析确定的。

为了确定来自玉米浸泡液的 EIC 对使用 α - 淀粉酶的液化的影响,将 200 mg/升的 EIC 加入到含有以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式存在的 50ppm 钙离子的 35 % 的 LO - DEX™ 10 中,将 pH 调节至大约 5.2。将 α - 淀粉酶 (SPEZYME® AA20, 由地衣型芽孢杆菌生产,购自 Genencor International, Inc.) 以 12 LU/g 碳水化合物的比率加入,按照需要通过加入 2.5% 的 NaOH 或 6 % 的 HCl 将溶液的 pH 调节至 5.2。使用描述于实施例 2 中的反应器系统和步骤使溶液水解。将除了不含 EIC 外其它均相同的对照组在 pH5.2 下测定以进行比较。在第二阶段的保温后马上用葡萄糖值 (DE) 对 LO - DEX™ 10 的水解程度进行计量。将除了未加 EIC 外其它均相同的对照组在 pH5.2 下测定。

结果显示于表 5 中。这些结果与上面显示的使用从玉米谷蛋白物流中分离的 EIC 时所产生的结果相同。

表 5

pH5.2 下在 LO - DEX™ 10 的水解中从玉米浸泡液中分离的 EIC 对 α -淀粉酶稳定性的影响

样品	DE
200 mg/L EIC	10.9
对照组	14.9

按照描述于实施例 3 中的方法对从玉米浸泡液中分离的 EIC 进行 HPLC 分析。将一百微升的 200 mg/L 的 EIC 溶液注入 HPLC 柱中，在材料中只发现了一个阴离子峰，通过洗脱时间被证实为肌醇六磷酸酯。该 HPLC 的峰形与从玉米谷蛋白级分中分离的 EIC 的峰形基本相同。

实施例 10

颗粒状玉米淀粉中 EIC 的鉴定

将来自玉米湿磨机的颗粒状玉米淀粉的稀浆在 Whatman #3 滤纸上过滤以将水与淀粉颗粒分离。将颗粒状淀粉再次悬浮于去离子水中并再次过滤以便从不可溶淀粉中除去任何可溶于水的组分。然后将颗粒状淀粉再次悬浮于水中并稀释至固含量为 35 %。加入来自地衣型芽孢杆菌的 α -淀粉酶（12 LU/g 碳水化合物）（SPEZYME® AA20，购自 Genencor International Inc.）和钙（50ppm），按照实施例 2 中的描述在 pH 5.2 下使颗粒状淀粉稀浆液化。

对玉米淀粉稀浆进行的第一次过滤中回收的水被用于溶解 LO - DEX™ 10 以产生固含量为 35 % 的溶液。加入 α -淀粉酶（12 LU/g 碳水化合物）和以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的形式加入的钙离子（50ppm），按照实施例 2 中的描述在 pH5.2 下使溶液液化。对照组中含有 LO - DEX™ 10，它溶解于去离子水中，而不是溶解于来自玉米淀粉稀浆的过滤水中，同时使其液化。

用 HPLC 对特征性的肌醇六磷酸酯是否存在进行分析时，在来自颗粒状淀粉稀浆的过滤液中没有检测到 EIC。然而，对 pH6 下液化的颗粒状玉米淀粉的 HPLC 分析检测到了一个洗脱峰，该峰显示存在一种与实施例 4

中从玉米谷蛋白中分离的 EIC 相同的物质。HPLC 分析表明, 30wt% 固形物的每升液化颗粒状淀粉中存在 30~40mg 肌醇六磷酸酯。将麦芽糖糊精中的 α -淀粉酶与颗粒状淀粉过滤液混合后的液化结果与 LO-DEX™ 10 中的 α -淀粉酶与去离子水混合后的液化结果进行比较, 证实了存在于颗粒状淀粉中的 EIC 并没有通过清洗被除去。由此, 列于下面表 6 中的这些实验结果显示, 在淀粉液化中导致 α -淀粉酶失活的 EIC 与淀粉颗粒相结合, 在溶液中不是游离的。

表 6

使用来自清洗后的玉米淀粉颗粒的过滤液所进行的液化

样品	90 分钟 DE
清洗后的淀粉颗粒	~0
去离子水中的 LO-DEX™ 10	17.9
来自淀粉稀浆的过滤液中的 LO-DEX™ 10	18.1

实施例 11

EIC 的肌醇六磷酸酶失活

将参照实施例 4 分离的 20 ml EIC 用 500 单位的肌醇六磷酸酶 (来自无花果曲霉, Sigma Chemical Company, P9792) 在 pH2.5、37 °C 下处理 30 分钟。将 10ml 处理后的 EIC 加入 LO-DEX™ 10 中以产生 1 升 35 % 的 LO-DEX™ 10 溶液, 其中含有以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式加入的 50ppm 的钙离子和 200 mg/L 的 EIC。将提取自地衣型芽孢杆菌的 α -淀粉酶 (SPEZYME® AA20, 购自 Genencor International Inc.) 以 12 LU/g 碳水化合物化合物的比率加入, 使用描述于上述实施例 2 中的反应器系统和步骤在 pH5.2 下使溶液液化。将含有未添加 EIC 的 LO-DEX™ 10 的对照组与含有 200 mg/ml 的未处理的 EIC 的 LO-DEX™ 10 同时液化。如表 7 中所示, 肌醇六磷酸酶处理使 EIC 失活, 由此阻止了它对 α -淀粉酶的抑制能力。

表 7

肌醇六磷酸酶处理对 α -淀粉酶的 EIC 失活的影响

样品	90 分钟 DE
不含 EIC 的对照组	15.4
200 mg/L 的 EIC	9.5
用 200 mg/L 肌醇六磷酸酶处理的 EIC	14.4

实施例 12

对颗粒状玉米淀粉的肌醇六磷酸酶处理

将肌醇六磷酸酶（来自无花果曲霉，5ml, 250 单位/ml，购自 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., 产品编号 P9792）加入到 1 升 34 % 的颗粒状玉米淀粉中，后者含有以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式加入的~50 ppm 的钙离子，将它们在 37 °C、pH4.0 下保温 5 个小时。保温后将颗粒状淀粉稀浆的 pH 调节至 pH5.2，将提取自地衣型芽孢杆菌的 12 LU/g 碳水化合物的 α -淀粉酶（SPEZYME® AA20，购自 Genencor International Inc.）加入到颗粒状淀粉稀浆中。使用描述于实施例 2 中的反应器系统将混合物液化。同时进行 pH5.2 下的对照液化试验，它使用没有经过肌醇六磷酸酶处理的 34 % 的颗粒状玉米淀粉稀浆。

在第二个试验中，将肌醇六磷酸酶（来自小麦，Sigma Chemical Company P1259, 160 单位）在 1 升 35 % 的颗粒状玉米淀粉稀浆中在 55 °C、pH5.15 下保温 6 小时，稀浆中含有以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式加入的~50 ppm 的钙离子。保温后，将颗粒状淀粉稀浆的 pH 值调节至 5.5，将提取自地衣型芽孢杆菌的 12 LU/g 碳水化合物的 α -淀粉酶（SPEZYME® AA20，购自 Genencor International Inc.）加入到稀浆中。使用描述于实施例 2 中的反应器系统和步骤将混合物液化。同时进行 pH5.5 下的对照液化试验，它使用没有经过肌醇六磷酸酶处理的 35 % 的颗粒状玉米淀粉的稀浆。

如表 8 中所示，在液化前对颗粒状玉米淀粉的肌醇六磷酸酶处理提高了 α -淀粉酶在低 pH 值下水解淀粉的能力。

表 8

在低 pH 值液化中肌醇六磷酸酶对 α - 淀粉酶稳定性的影响

液化 pH 值	90 分钟 DE	
	对照	肌醇六磷酸酶处理的淀粉
5.2	~0	1.4
5.5	6.4	8.6

实施例 13

对含有 EIC 的麦芽糖糊精的热过滤

将按照实施例 4 的方法分离的 EIC (200 mg/升) 加入 35 % w/w 的含有以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式加入的 50ppm 钙的 LO - DEXTM 10 中并将 pH 调节至大约为 5.2。将该溶液分成两部分。将一部分加热至 ~100 °C，然后乘热立即通过 Whatman #3 滤纸进行真空过滤。将第二部分在室温下 (例如 20 - 25 °C) 通过 Whatman #3 滤纸进行真空过滤。将 α - 淀粉酶 (SPEZYME® AA20, 由地衣型芽孢杆菌生产, 购自 Genencor International Inc.) 以 12 LU/g 碳水化合物的比率加入到每一部分溶液中, 按照需要通过加入 2.5 % 的 NaOH 或 6 % 的 HCl 将每部分溶液的 pH 值都调节至 5.2。使用描述于实施例 2 中的反应器系统和步骤将每部分溶液都水解。在第二阶段的保温后马上用葡萄糖值 (DE) 对 LO - DEXTM 10 的水解程度进行计量。按照描述于实施例 3 中的方法, 在进行水解前在每一部分溶液中取样用于肌醇六磷酸酯分析。

如表 9 中所示, 在 ~100 °C 下对含有 EIC 的 LO - DEXTM 10 的过滤从溶液中除去了大约 75 % 的 EIC。结果是在 pH 5.2 下的液化中使较少的 α - 淀粉酶失活, 而且使所得到的水解液的 DE 显著增高。

表 9

在低 pH 值液化中热过滤对 α - 淀粉酶 EIC 失活的影响

样品	EIC 浓度	DE
----	--------	----

冷过滤的麦芽糖糊精	184 mg/L	11.5
热过滤的麦芽糖糊精	45 mg/L	14.5
“没有水解的”麦芽糖糊精		9.5

实施例 14

从糙米中分离 EIC

使用一台小型咖啡磨将 Basmati 糙米（购自 Lundburg Mills）研磨成粉状。将二百克磨碎的大米加入到 500 ml 去离子水中，用 6 % 的 HCl 将 pH 值调节至~3。将该浆液静置 30 小时并不时搅拌，然后用 Whatman #3 滤纸进行真空过滤以将其分离。

通过加入 1M 的 NaOH 将滤液的 pH 值调节至 9，所形成的沉淀用离心方法回收。用水将沉淀洗涤一次，离心收集后再次悬浮于水中。通过逐滴加入 6 % 的 HCl 将悬浮液的 pH 缓慢地调节至~5，搅拌该悬浮液以使沉淀溶解。通过一个 5m 的膜过滤器的过滤将不溶物除去，滤液被冷却至~4℃。将两倍体积的冷酒精加入滤液中，用离心方法回收所形成的沉淀。将沉淀用冷酒精洗涤一次，然后在室温下真空干燥。

由二百克粉碎的大米得到了 0.3571g 的 EIC。对 EIC 的鉴定是在 pH 5.2 下水解 LO - DEXTM 10 时通过测定 α - 淀粉酶的失活以及对肌醇六磷酸酯的 HPLC 分析确定的。

将来自磨碎的大米的 EIC（200 mg/升）加入 35 % 的含有以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式加入的 50ppm 的钙离子的 LO - DEXTM 10 中并将 pH 调至大约 5.2。将提取自地衣型芽孢杆菌的 α - 淀粉酶（SPEZYME® AA20，购自 Genencor International, Inc.）以 12 LU/g 碳水化合物的比率加入，按照需要通过加入 2.5 % 的 NaOH 或 6 % 的 HCl 将溶液的 pH 调节至 5.2。使用描述于实施例 2 中的反应器系统和步骤将溶液水解。在 pH 5.2 下将除了不含 EIC 外其它均相同的对照组与测试样品同时进行测试。在第二阶段的保温后马上用葡萄糖值（DE）对 LO - DEXTM 10 的水解程度进行计量。试验的结果列于表 10 中。

表 10

在 pH5.2 下水解 LO - DEXTM 10 时从磨碎的大米中分离的 EIC 对 α -淀粉酶稳定性的影响

样品	DE
对照	16.3
200 mg/L EIC	11.7

按照描述于实施例 3 中的方法对从磨碎的大米中分离的 EIC 进行 HPLC 分析。将一百微升 15 mg/L 的 EIC 溶液注入 HPLC 柱中，在样品中只发现了一个阴离子峰，通过洗脱时间被证实为肌醇六磷酸酯。该 HPLC 的峰形与从玉米谷蛋白级分中分离的 EIC 的峰形基本相同。

实施例 15

从全麦面粉中分离 EIC

将二百克的商品全麦面粉（购自 Arrowhead Mills）加入含有 12 mM 的 D, L - 二硫苏糖醇（Sigma Chemical Co.）的去离子水中。用 6 % 的 HCl 将浆液的 pH 调节至~3，在不时搅拌的情况下将该浆液在室温下静置~30 小时。离心法分离浆液。

通过加入 1M 的 NaOH 把滤液 pH 调至 9，离心法回收产生的沉淀。水洗沉淀物一次，离心法再次收集，再悬浮于水中。通过逐滴加入 6 % 的 HCl 将悬浮液的 pH 缓缓地调节至~5，搅拌悬浮液以使沉淀溶解。通过一个 5m 的膜过滤器的过滤将不溶物除去并将滤液冷却至~4 °C。将两倍体积的冷酒精加入滤液中，通过离心方法将所形成的沉淀除去。用冷酒精将沉淀洗涤一次，然后在室温下进行真空干燥。

由两百克的全麦面粉得到了 0.385g EIC。对 EIC 的鉴别是在 pH 5.2 下水解 LO - DEXTM 10 时通过测定 α -淀粉酶的失活以及对肌醇六磷酸酯的 HPLC 分析确定的。

将来自全麦面粉的 EIC（150 mg/升）加入含有 50ppm 钙离子的 35 % 的 LO - DEXTM 10 中并将 pH 值调节至大约 5.2。将提取自地衣型芽孢杆菌的 α -淀粉酶（SPEZME® AA20，购自 Genencor International

Inc.) 以 12 LU/g 碳水化合物的比率加入, 根据需要通过加入 2.5% 的 NaOH 或 6 % 的 HCl 将溶液的 pH 调节至 5.2。使用描述于实施例 2 中的反应器系统和步骤将溶液水解。

将不含 EIC 的对照组在相同条件下进行测试以用于比较。在第二阶段的保温后马上用葡萄糖值 (DE) 对 LO - DEXTM 10 的水解程度进行计量。试验的结果列于表 11 中。

表 11

在 pH5.2 下水解 LO - DEXTM 10 对从全麦面粉中分离的 EIC 对 α - 淀粉酶稳定性的影响

<u>样品</u>	<u>DE</u>
对照	16.3
150 mg/L EIC	14.2

按照描述于实施例 3 中的方法对从全麦面粉中分离的 EIC 进行 HPLC 分析。将一百微升 15 mg/L 的 EIC 溶液注入 HPLC 柱中, 在样品中只发现了一个阴离子峰, 通过洗脱时间被证实为肌醇六磷酸酯。该 HPLC 的峰形与从玉米谷蛋白组分中分离的 EIC 的峰形基本相同。

实施例 16

通过加热到 95 °C 使 EIC 沉淀

将按照实施例 4 中的方法分离的 EIC (200mg/L) 加入到含有 50ppm 钙离子 (以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式加入) 的 35 % w/w 的 LO - DEXTM 10 中, 用 2.5 % 的 NaOH 将 pH 值调节至 5.2。将 LO - DEXTM 10 溶液分成两份。将其中的一份通过描述于实施例 2 中的反应器加热到 95 °C 并维持~6 分钟。该溶液通过反应器后, 以 12 LU/g 碳水化合物的比率向其中加入 α - 淀粉酶 (SPEZYME® AA20, 由地衣型芽孢杆菌生产, 购自 Genencor International Inc.)。然后将该溶液在 95 °C 下保温 90 分钟。在 90 分钟的保温后马上用葡萄糖值 (DE) 对 LO - DEXTM 10 的水解程度进行计量。

向第二部分含有 EIC 的麦芽糖糊精溶液中加入 α - 淀粉酶 (12 LU/g

碳水化合物, SPEZYME® AA20, 由地衣型芽孢杆菌生产, 购自 Genencor International Inc.) 并使其通过描述于实施例 2 中的反应器系统, 所不同的是, 温度为 95 °C。然后将该溶液在 95 °C 下保温 90 分钟。在 90 分钟的保温后马上用葡萄糖值 (DE) 对 LO - DEX™ 10 的水解程度进行计量。在 pH 5.2 下将除了不含 EIC 外其它均相同的对照组同时进行测试以用于比较。

试验结果列于表 12 中, 它显示通过加热可以在液化过程中降低 EIC 对 α - 淀粉酶的失活作用。

表 12

加热对 α - 淀粉酶的 EIC 失活的影响

<u>样品</u>	<u>DE</u>
对照	17.6
EIC + α - 淀粉酶	14.0
EIC + 加热后加入的 α - 淀粉酶	17.5

实施例 17

通过加热到 105.5 °C 使 EIC 从麦芽糖糊精中沉淀

将按照实施例 4 中的方法分离的 EIC (200 mg/L) 加入到含有 50ppm 钙离子 (以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式加入) 的 35 % w/w 的 LO - DEX™ 10 中, 用 2.5% 的 NaOH 将 pH 调节至 5.2。将 LO - DEX™ 10 溶液分成两份。将其中的一份通过描述于实施例 2 中的反应器加热到 105.5 °C 并维持~6 分钟。该溶液通过反应器后, 以 12 LU/g 碳水化合物的比率向其中加入 α - 淀粉酶 (SPEZYME® AA20, 由地衣型芽孢杆菌生产, 购自 Genencor International, Inc.)。然后将该溶液在 95 °C 下保温 90 分钟。在 90 分钟的保温后马上用葡萄糖值 (DE) 对 LO - DEX™ 10 的水解程度进行计量。

向第二部分含有 EIC 的麦芽糖糊精溶液中加入 α - 淀粉酶 (12 LU/g 碳水化合物, SPEZYME® AA20, 由地衣型芽孢杆菌生产, 购自 Genencor International Inc.) 并使其通过描述于实施例 2 中的反应器系统, 温度是

105.5 ℃。然后将该溶液在 95 ℃下保温 90 分钟。在 90 分钟的保温后马上用葡萄糖值 (DE) 对 LO - DEXTM 10 的水解程度进行计量。在 pH5.2 下将除了不含 EIC 外其它均相同的对照组同时进行测试以用于比较。

试验结果列于表 13 中, 它显示在加入 α - 淀粉酶之前通过加热可以在液化过程中降低 EIC 对 α - 淀粉酶的失活作用。

表 13

在低 pH 值液化时加热对 α - 淀粉酶的 EIC 失活的影响

<u>样品</u>	<u>DE</u>
无 EIC 的对照组	15.0
EIC + α - 淀粉酶	10.2
加热后的 EIC + α - 淀粉酶	17.5

与不加入任何 EIC 以及不进行热处理的对照组相比, 我们观察到加入 EIC 和进行热处理后 DE 升高了, LO - DEXTM 10 中 EIC 的存在被认为是导致 DE 升高的原因。

当然, 应当了解的是可以对上述的优选实施方案在很宽的范围内进行改变和修正。因而上述详细的描述是为了促进对本发明的了解; 而下面的权利要求, 包括所有的等同内容, 其目的是为了定义本发明的范围。