

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12P 19/04
A01N 63/02 A01N 63/04
A61K 31/715 A23K 1/06
A23L 1/09

[21] 申请号 96196030.2

[43]公开日 1998 年 9 月 2 日

[11] 公开号 CN 1192247A

[22]申请日 96.6.28

[30]优先权

[32]95.7.5 [33]AU[31]PN3982

[86]国际申请 PCT/AU96/00401 96.6.28

[87]国际公布 WO97/02356 英 97.1.23

[85]进入国家阶段日期 98.1.27

[71]申请人 卡尔顿和联合酿酒有限公司

地址 澳大利亚维多利亚州

[72]发明人 R·维特克罗夫特 W·H·兰吉里斯

J·库兰戴 R·W·吉尔伯特

K·J·赛姆 C·G·史密斯

[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 李 瑛

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 通过在一一定的pH,温度和时间条件下使
细胞自体溶解生产 β -葡聚糖-甘露聚糖
制剂

[57]摘要

提供了生产免疫刺激性 β -葡聚糖—甘露聚糖制剂的方法,该方法包括下列步骤:在 pH5—6 和温度 35—60℃ 使微生物细胞自体溶解 6—48 小时,和从自体溶解的产物分离固体物质。将 β -葡聚糖—甘露聚糖作为食品成分掺入或用作作为药物以治疗例如免疫抑制,血胆固醇过高,血糖过低和重金属分泌的状态。

权 利 要 求 书

1. 生产免疫刺激性的 β 葡聚糖-甘露聚糖制剂的方法, 该方法包括下列步骤: 在 pH 5 - 6 和温度 35 - 60 °C 使微生物细胞自体溶解 6 - 48 小时, 和从自体溶解的产物分离固体物质。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中自体溶解的步骤是在 50 - 60 °C 的温度下进行的。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中自体溶解进行 18 - 24 小时。

4. 根据权利要求 1 - 3 任一项所述的方法, 其中在一种或多种选自下列组: 蛋白酶, 甘露聚糖酶, 淀粉酶和 β -葡聚糖酶的试剂存在下, 在 pH 4 - 6, 35 - 60 °C 温度使所述的自体溶解产物进一步自体溶解 6 - 48 小时, 并且从自体溶解的产物分离固体物质。

5. 根据权利要求 1 - 3 任一项所述的方法, 其中自体溶解是在选自下列组: 氯化钠, 乙醇, 蛋白酶, 甘露聚糖酶, 淀粉酶和 β -葡聚糖酶的试剂存在下进行的。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的方法, 其中蛋白酶是 Optimase APL - 440 或 Protomax。

7. 根据权利要求 4 或 5 所述的方法, 其中 β -葡聚糖酶是 Tunicase FN 或 Mutanase SP299。

8. 根据权利要求 4 或 5 所述的方法, 其中淀粉酶是 Optidex 或 Ban。

9. 根据权利要求 1 - 8 任一项所述的方法, 其中 β 葡聚糖-甘露聚糖制剂的免疫刺激潜力可通过酸化到 pH 2 - 4 进一步得到提高。

10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中酸化到 pH 2 - 4 之后, 进行加热处理。

11. 根据权利要求 1 - 10 任一项所述的方法, 其中 β 葡聚糖-甘露聚糖制剂的免疫刺激潜力和粘性可通过将制剂的颗粒大小降低到小于 2 微米, 通过使用机械破碎方法进一步得到提高。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中破碎方法选自于下列组：研磨，超声处理和加压匀浆化。

13. 根据权利要求 1 - 12 任一项所述的方法，其中通过改变用于该生产方法中的酶的特性可改变 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂的免疫刺激潜力和粘性。

14. 根据权利要求 1 - 13 任一项所述的方法，其中微生物选自于下列组：酵母，细菌，真菌。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中酵母选自于用于生产粘性授予剂，乳化剂，纤维，膜包被物质，亲和层析和凝胶电泳的支撑物，用于细胞培养基中，作为纤维垫和用于粘结剂的酵母。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中酵母是选自于下列组：啤酒酵母，脆壁克鲁维氏酵母和假丝酵母。

17. 根据权利要求 14 所述的方法，其中细菌选自于下列组：产碱杆菌，农杆菌，纤维单胞菌和 *Pestalotia*。

18. 根据权利要求 14 所述的方法，其中真菌选自于下列组的属：*Aureobasidium*，*Pleurotus*，*Macrophomopsis*，灵芝，粘双孢黑粉菌，*Fachyme*，和草革菌。

19. 由权利要求 1 - 18 任一项所述的方法生产的 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂。

20. 一种 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂，通过在 pH 5 - 6 和温度 35 - 60 °C 使微生物细胞自体溶解 6 - 48 小时生产，并且具有颗粒直径低于 2 微米。

21. 根据权利要求 19 - 21 任一项所述的 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂，其中 β - 葡聚糖是 β 1 - 3 葡聚糖。

22. 一种动物，家禽，鱼或甲壳类食料组合物，含有权利要求 19 - 21 任一项所述的 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂和一种或多种兽用可接受的食料成份。

23. 根据权利要求 22 所述的动物，家禽，鱼或甲壳类食料组合物，其中兽用可接受的食料成份包括饮用水。

24. 药物组合物, 含有权利要求 19 - 21 任一项所述的 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂和药理学可接受的载体。

25. 药物组合物, 含有药理学活性药剂和权利要求 19 或 21 任一项所述的 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂。

26. 根据权利要求 19 - 21 任一项所述的药物组合物, 其中 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂作为载体或包裹物存在。

27. 一种植物保护组合物, 包括权利要求 19 或 21 任一项所述的 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂和农业上可接受的载体, 和非强制性含有农业上可接受的营养或杀虫剂。

28. 处理选自于下列组: 免疫抑制, 血胆固醇过高, 血糖过低和重金属分泌的状态的方法, 包括给需要所述治疗的动物施用有效量的权利要求 19 - 21 任一项所述的 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂。

29. 权利要求 24 或 25 所述的药物组合物的应用, 其中所述组合物可用于治疗选自于下列组: 免疫抑制, 血胆固醇过高, 血糖过低和排泄重金属的状态。

30. 食品, 包括权利要求 19 或 21 任一项所述的 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂。

31. 根据权利要求 30 所述的食品, 选自于下列组: 饮料, 调味汁, 汤, 涂抹食品, 酱汁, 面层, 酸奶和日用品。

说明书

通过在一一定的 pH， 温度和时间条件下使细胞
自体溶解生产 β -葡聚糖 - 甘露聚糖制剂

本发明涉及生物学活性的 β - 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂和涉及用于其分离的方法。特别是， 本发明涉及从微生物包括但不限于酵母制备的 β - 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂包括 $\beta(1 - 3)$ 葡聚糖， 以及涉及用于生产 β - 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂的方法， 该方法避免使用浓缩的碱或酸。

发明背景

多糖广泛地分布于自然界中， 特别是在细菌， 真菌和植物细胞保结构完整性方面具有重要的作用。葡聚糖是 D - 葡萄糖的聚合体， D - 葡萄糖单体以各种各样的方式结合在一起。例如， 具有 1 - 3， 1 - 4， 1 - 6 和 1 - 2 连接键的葡聚糖都是已知的。各种各样的连接键可能是指通常葡聚糖是高度分支的化合物。由于其化学特性， 葡聚糖已经在化学品， 食品和药物工业上有广泛的用途。例如， 它们可用作作为粘性授予剂， 乳化剂， 纤维， 膜， 包被物质， 亲和层析和凝胶电泳的支撑物， 用于细胞培养基中， 作为纤维垫和用于粘结剂。还广泛地用作为食品增稠剂， 用作为膳食纤维的来源， 和在药物产物中用作作为载体和包被剂。

葡聚糖， 特别是 $\beta(1 - 3)$ 葡聚糖， 已经被广泛地进行研究， 除上面所述之外， 已经证明具有各种各样的药理学活性， 包括但不限于抗胆固醇活性， 血糖过低活性， 加速排泄重金属， 和刺激免疫系统。由 β - 葡聚糖的免疫刺激活性产生这样的建议： 它们可用作作为抗癌剂或用于治疗 HIV 感染， 用作为刺激伤口愈合的药剂或单独或与抗菌素结合用作作为抗感染剂。

β - 葡聚糖还能诱导植物对疾病的抗性应答， 例如植物抗毒素的产生和衰弱。这产生这样的建议， 可将它们在植物中用作作为抗感染剂和生长助催化剂。

由于在大量的家禽，动物，鱼或甲壳类的生产中存在的问题，也建议将 β -葡聚糖用作它们饲料的添加剂，以减少感染的发生，从而促进生长，并且减少对抗生素的需要。

$\beta(1-3)$ 葡聚糖是酵母细胞的重要的细胞壁成份。啤酒酵母的细胞壁主要由 β -连接的葡聚糖组成，它主要是 $\beta(1-3)$ 连接的葡聚糖单位的主链，该主链具有借助于 $\beta(1-6)$ 连接键连接的分子内和间支链的次要成份。由于酵母在食品和酿造工业中，以及在工业级乙醇的生产中的广泛应用，耗尽酵母细胞是主要的工业副产品。酵母衍生的产物本身具有较大的商业价值，例如类似于酵母提取物，香味剂，香味增强剂例如鸟嘌呤一磷酸和肌苷一磷酸这样的产品，和用于制造酶，精细化学品和用于生化和药物工业中的产品例如海藻糖，胸腺嘧啶，核苷和核苷酸等等。酿造工业的废酵母是 β 葡聚糖的主要来源。

另外，其它的酵母种类也可用作 β -葡聚糖的来源包括但不限于啤酒酵母，脆壁克鲁维氏酵母的其它酵母种类，和假丝酵母例如产朊假丝酵母。利用或者通过分批发酵或连续发酵在食品级的营养中培养可以产生所有这些酵母菌株。在现有技术中已经报道了许多其它微生物种类包括细菌，真菌和单细胞藻类作为 β -葡聚糖的来源。

已经对从酵母和其它微生物中纯化 β -葡聚糖进行了广泛的调查，已知有各种各样的方法。大多数的方法依赖于 $\beta(1-3)$ 葡聚糖在碱性或在有机溶剂中的不溶解性。主要已知的方法是：

(a)用浓缩的氢氧化钠高温萃取，随后用酸高温萃取和用乙醇沉淀(参见，例如 Manner, D.J.等人, 生物化学杂志 135, 19-30(1973), Jamas, S.等人, 美国专利 No.4810646, No.5028703, 和 No.5250436 和菲力普石油公司的澳大利亚专利 No.628752)。许多这些方案需要将酵母细胞进行初步的匀浆化，许多要求将各个提取步骤多次重复。

(b)用浓的氢氧化钠提取，随后高温酸提取，酶处理以修饰或纯化葡聚糖(参见，例如 Masler 等人的捷克专利申请 No.890038, 报道了用碱-酸提取，随后用具有淀粉酶活性的酶处理纯化 β -D-葡聚糖)。

:.
:.
:.

(c)用浓的苯酚：水(1：1)提取自体溶解或酶降解酵母得到的酵母细胞壁制剂(参见，例如 Truscheit，E 等人的美国专利 No.4138479)。

(d)用有机溶剂例如异丙醇，乙醇，丙酮或甲醇各单独或在碱存在下提取(参见例如日本专利申请 No.7051081，6340701，5295003，和 3002202；欧洲专利申请 No.515216)。

已知酸处理减少葡聚糖物质中 $\beta(1-6)$ 键的数目，这导致粘性增加。

酵母的细胞壁主要由下列组成：

(i)具有 $\beta(1-6)$ 键合的葡聚糖侧链的原纤维的，碱不溶性 $\beta(1-3)$ 键合的葡聚糖。

(ii)具有 $\beta(1-6)$ 键合的葡聚糖侧链的碱溶性 $\beta(1-3)$ 键合的葡聚糖。

(iii)具有间歇性的 $\beta(1-3)$ 键的不定型的酸溶性的 $\beta(1-6)$ 葡聚糖。

(iv) 连接到蛋白质的不定型的碱溶性的甘露聚糖。

将原纤维的葡聚糖成份定位于酵母血浆膜的附近，并且外部由不定型的主要由甘露聚糖蛋白质组成的层覆盖(Kopecka M，等人，细胞生物学杂志，62 68 - 76(1974))。已知从啤酒酵母的细胞壁分离的颗粒物质(酵母多糖)具有用作为非特异性免疫刺激剂的能力。酵母细胞壁的颗粒的生物学活性主要是由于 $\beta(1-3)$ 键合的葡聚糖的存在，但是葡聚糖和甘露聚糖的其它两种形式也具有刺激免疫系统的能力。据报道甘露聚糖介导免疫系统的细胞对颗粒物质例如不溶性 $\beta(1-3)$ 葡聚糖的吸收和吞噬作用(Giaimis，J，等人，白细胞生物学杂志，54，564 - 571(1993)；Sun-Sang，J 等人，细胞生物学杂志 96 160 - 166(1983))。

分离 β -葡聚糖的现存的方法通常使用多个步骤的碱-酸提取方法(Manner，D.J.等人，微生物遗传杂志，80，411 - 417(1974))。碱性提取步骤去除大多数的不定型甘露聚糖蛋白质和葡聚糖物质，随后酸提取步骤从原纤维的主要的 $\beta(1-3)$ 键合的葡聚糖去除糖原和大

多数的 $\beta(1-6)$ 侧链分支。最后的溶剂提取步骤有时可用于去除脂类。

如果某些申请给定详细的价格的情况下，显然利用现存的公开的或已授权的专利的方法生产葡聚糖的成本在商业上不可靠的。这些方法具有下列问题：

(i)它们的目的在于仅生产纤维的，碱不溶性的葡聚糖形式。在细胞壁中存在的其它形式的葡聚糖和甘露聚糖以该方法的副产物形式被去除。这些代表额外量的葡聚糖，可能使葡聚糖的产量有显著的提高，其功能是重要的。

(ii)现存的方法需要显著的第一流的投资。

(iii)现存的方法是有毒的，因为需要在高温下用高浓度的腐蚀剂和酸处理。

(iv)该方法导致产生含有碱不溶性的葡聚糖的溶液，基于常规技术用于分离是困难的，导致回收率低。

(v)当与许多申请中的产物的价值比较，生产的成本是高的。

对酵母细胞壁的电子显微镜研究(Kopecka M, 等人, 细胞生物学杂志, 62 68 - 76(1974))显示当通过用酶处理去除外层的不定型甘露聚糖蛋白质层时出现细胞壁的原纤维成份。

本领域显然需求快速的和低廉的 β -葡聚糖提取方法，以避免使用高浓度的碱或酸和用高温，避免失去碱溶性的葡聚糖和甘露聚糖，提高葡聚糖和甘露聚糖的回收率，导致产生生物学活性制剂。

我们已经惊奇地发现利用简单的自体溶解方法，在接近中性 pH 和仅在微高温时，可以分离 β 葡聚糖-甘露聚糖制剂，并且发现可以获得高产率的具有高免疫刺激活性的产物，所述活性包括刺激吞噬作用活性，刺激超氧化物的生产，对病原体和感染抗性的增加。通过在温和条件下用酶或其它试剂处理补充自体溶解，并且如果需要，通过酸处理，匀浆化程度，或通过改变所使用的酶的类型修饰葡聚糖和甘露聚糖产物的特性。

发明概述

根据第一方面，本发明提供了生产免疫刺激性 β 葡聚糖-甘露聚

糖制剂的方法，包括在 pH5 - 6 和 35 - 60 °C 的条件下将微生物细胞自体溶解 6 - 48 小时，之后从自体溶解的产物分离固体物质的步骤。

在第二方面，本发明提供了用于从微生物细胞生产免疫刺激性 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂的改善的方法，包括下列步骤：将所述的微生物置于引起自体溶解的条件下；其特征在于所述条件包括在 pH5 - 6 和 35 - 60 °C 的条件下将微生物细胞保温 6 - 48 小时，之后从自体溶解的产物分离固体物质的步骤。

在第三方面，本发明提供了用于从微生物细胞生产免疫刺激 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂的符合环保要求的方法，改进之处包括下列步骤：将所述的微生物置于引起自体溶解的温和条件下；其中所述条件包括在 pH5 - 6 和 35 - 60 °C 的条件下将微生物细胞保温 6 - 48 小时，之后从自体溶解的产物分离固体物质的步骤。

在第四方面，本发明提供了用于生产免疫刺激性 β 葡聚糖 - 甘露聚糖制剂的经济的方法，该方法包括利用如上所述的条件引起微生物细胞的自体溶解。

根据上面所述的方法提供的保温条件能够低廉地，有效地并且以无毒的方式制备强效的包括葡聚糖和甘露聚糖的免疫刺激制剂。

在特别优选的实施例中，上面描述的方法导致产生包括 $\beta(1 - 3)$ 葡聚糖，更优选的是包括 $\beta(1 - 3)$ 葡聚糖 - 甘露聚糖的免疫刺激制剂。

优选的是还可以将用于该方法中的微生物细胞在一种或多种试剂存在下，在 pH4 - 6 和 35 - 60 °C 的条件下进一步自体溶解 6 - 48 小时，所述试剂选自于下列组：氢氧化钠，乙醇，蛋白酶，甘露聚糖酶，淀粉酶和 β - 葡聚糖酶，并且从自体溶解的产物分离固体物质。

如果需要，在细胞开始自体溶解之后，可以使用酶。就是说，在一种或多种选自于下列组：蛋白酶，甘露聚糖酶，淀粉酶和 β - 葡聚糖酶的试剂存在下，进行进一步的自体溶解的步骤，并且从自体溶解的产物分离固体物质。

优选的是，在 50 - 60 °C 的温度下进行自体溶解 18 - 24 小时。

在一个特定的优选的实施例中，通过酸化至 pH2 - 4 进一步改善

所产生的β葡聚糖-甘露聚糖制剂的免疫刺激能力；甚至通过酸化至pH 2-4，随后加热处理获得更大的提高。该制剂优选地通过提供吞噬细胞活性或非特异性免疫应答刺激免疫系统。

更优选的是，通过将提取的物质的颗粒大小降低到低于2微米，更优选的是低于1微米，通过利用机械破碎方法例如研磨，超声处理或加压匀浆化可以进一步提高由此产生的β葡聚糖-甘露聚糖制剂的免疫刺激潜力和粘性。

在另一个实施例中，利用研磨的酵母获得β葡聚糖-甘露聚糖制剂。在研磨期间或之后，利用如上所述的条件，将酵母细胞进行自体溶解和酶促消化。

在另一种可选的特定的优选的实施例中，通过改变用于提取方法中的酶的特性使β葡聚糖-甘露聚糖制剂的免疫刺激潜力和粘性改变。

如果来自发酵工业的耗尽的酵母特别适用于本发明的方法，易于理解本发明可用于各种来源，例如微生物或植物材料，其中β-葡聚糖以显著的比例存在。已经报道的适用于β-葡聚糖原料的微生物包括但不限于细菌，例如产碱杆菌，特别是粪产碱杆菌粘亚种(ATCC-21680)；农杆菌；纤维单胞菌例如 ATCC 21399 和产黄纤维单胞菌(ATCC 53703)；和 Pestalotia；真菌例如 Aureobasidium 例如 Aureobasidium pullulans 菌株 IFO446 和 Aureobasidium K-1 种类(FERM P1289)；Pleurotus ostreatus；Macrophomopsis 例如菌株 KOB55；灵芝；粘双孢黑粉菌；Fachyma hoelen；Pestalotia；和草革菌。除酿造酵母以外，用于食品和发酵工业中的其它酵母适用于本发明的目的。这些包括但不限于用于生产粘性授予剂，乳化剂，纤维，膜，包被物质，亲和层析和凝胶电泳的支撑物，用于细胞培养基中，作为纤维垫和用于粘结剂的酵母。它们还广泛地用作为食品增稠剂和用作为食用纤维的来源，和用作为药物产品的载体和包被剂。

本领域内技术人员易于测定大多数合适的条件，在所述条件下本发明的方法可用于除酵母以外的微生物。

本领域内技术人员将知道对于 β -葡聚糖和甘露聚糖的某些应用，利用本发明方法生产的制剂优选的是以干燥形式提供。所述制剂合适的是通过合适的方法进行干燥包括但不限于冷冻干燥，旋转鼓轮干燥，烘箱干燥，喷雾干燥，环状干燥或利用成膜设备干燥，并且在不进一步加工的情况下使用，或利用合适的技术进行研磨制备优选的是小于20微米的颗粒大小。对于其它应用，湿产物例如粘性糊状物是合适的，在没有进一步加工或随后机械破碎的情况下使用这样的制剂以提高其粘性和减少颗粒大小。

根据本发明的第五个方面，本发明进一步提供了由本发明方法生产的 β 葡聚糖-甘露聚糖制剂。本发明的葡聚糖-甘露聚糖制剂优选的是包括大量的葡聚糖(例如高达80%)和一些甘露聚糖(例如高达50%)。该制剂可以包括 β 1-2， β 1-3， β 1-4和 β 1-6葡聚糖。

该制剂可以单独使用。但是最通常的是将它与其它成份一起提供。因此，在本发明的这一方面，优选的实施例包括但不限于含有本发明的 β -葡聚糖-甘露聚糖制剂和一种或多种兽用可接受的食用成份的家禽，鱼，甲壳类或贝类饲料组合物；一种免疫刺激的，抗血胆固醇的，血糖过低或刺激重金属排泄的组合物，它包括本发明的 β -葡聚糖-甘露聚糖制剂和一种药理学上可接受的载体；含有药理学活性药剂和作为一种载体或一种赋形剂或作为固态剂型形式例如片剂或胶囊的包被材料的本发明的 β -葡聚糖-甘露聚糖制剂的药物组合物；和含有本发明的 β -葡聚糖-甘露聚糖制剂和农业上能接受的载体和选择性地含有农业上可接受的营养和杀虫剂的植物保护组合物。该 β -葡聚糖-甘露聚糖制剂还可用于家禽或动物的饮用水或鱼，甲壳类或贝类的生活水。

易于了解本发明的制剂通常适用于已知 β -葡聚糖是有效的产品中。在某些情况下，进一步纯化是令人满意的或必要的，并且可以使用本领域已知的纯化步骤。

发明详述

仅参照下面的非限制性实施例详细地描述本发明。

实施例 1

自体溶解提取

将酵母样品实施自体溶解提取方法。1 升的耗尽酿造酵母(15 %干重)在 35 - 60 °C 搅拌培养 6 - 48 小时。如果必要利用 2M 氢氧化钠或 2M 盐酸将 pH 值调节到 5 - 6 之间。这些条件促使酵母自体溶解并且释放细胞壁降解酶。将该材料离心(3000g, 4 - 20 °C, 15 分钟)并且将沉淀用等体积的水洗涤, 然后喷雾或冷冻干燥。

实施例 2

酶解提取

通过加入已知能诱导酵母自体溶解的物质修饰通过实施例 1 的自体溶解提取步骤生产的葡聚糖-甘露聚糖。

1 升的耗尽酿造酵母(15 %干重)采用实施例 1 的酶促方法处理。通过加入蛋白酶(Papain, Optimase APL440(Solvay), Protomex(Novo)和/或甘露聚糖酶(Gist Brocades)和/或 α 淀粉酶(Optidex L130(Solvay), Ban 240 升(Novo)和/或葡聚糖酶)(SP299(Novo)), Tunicase(Solvay))进一步诱导自体溶解。如果必要利用 2M 氢氧化钠或 2M 盐酸将 pH 调节到酶促活性的最适 pH。酵母在 35 - 60 °C 搅拌培养 6 - 48 小时。将该材料离心(3000g, 4 - 20 °C, 15 分钟)并且将沉淀用等体积的水洗涤, 然后按照前面所述将沉淀干燥。

实施例 3

将通过现有技术方法(碱-酸)生产的葡聚糖与本发明的方法(自体溶解和酶促)生产的葡聚糖-甘露聚糖进行比较

为了比较的目的, 利用基于 Manner, D.J.等人, 生物化学杂志 135, 19 - 30(1973)的碱酸提取方法制备纯化的 $\beta(1 - 3)$ 葡聚糖的样品。

将 1 升的耗尽酿造酵母(20 %干重)用等体积的氢氧化钠(4 % W/V)在 100 °C 搅拌提取 3 小时, 以去除甘露聚糖蛋白质。将该材料离心(3000g, 4 °C, 15 分钟), 滗去上清液, 用氢氧化钠(4 % W/V)再对沉



淀提取 4 小时。用水(2 升)洗涤来自最后的腐蚀性提取步骤的沉淀并且用乙酸(0.15M), 在 100 °C 搅拌提取 3 小时以去除糖原。将该材料离心(3000g, 4 °C, 15 分钟), 再将酸提取步骤重复 3 次。来自最后的酸步骤的沉淀用水(2 升), 然后用 150 毫升的乙醇(96 % W/V)洗涤两次。将该材料离心(3000g, 4 °C, 15 分钟), 然后喷雾或冷冻干燥该物质。

将利用现有技术已知的方法(上面所述)制备的样品或由碱酸提取制备的商业途径购买的葡聚糖样品与根据本发明制备的葡聚糖比较。

根据官方分析用化学品协会的分析的官方方法, 方法 27.8.04, 27.6.08, 32.1.14(mod), 27.8.05,16 版,1995 进行近似值分析。这些分

析的结果显示表 1。 表 1

由碱-酸方法, 自体溶解方法和酶促方法生产的葡聚糖的比较结果:

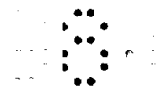
近似分析

分析 (基于干总的%)	碱-酸 生产的葡聚糖	自体溶解 生产的葡聚糖	酶促 生产的葡聚糖
灰份	3	2	3
脂肪	4	4	6
蛋白质	1	27	20
碳水化合物	90	66	71

与由显示于表 1 的本发明的方法生产的样品相比, 由现有技术的方法(碱-酸)生产的葡聚糖显示具有较少的蛋白质和较多的碳水化合物。

利用 Perkins - Elmer 分光光度计记录葡聚糖制剂的 Fourier - Transform Infrared(FTIR)光谱。将样品冷冻干燥以去除残留的水分, 混合于四氯乙烯并且基于水平的减弱的总发射系数(ATR)上分析。完整的光谱显示于附图 1。

由现有技术方法(碱-酸)制备的样品的 FTIR 光谱不同于本发明方



法(附图 1 显示的自体溶解或酶促方法)制备的样品的光谱。由现有技术方法制备的样品在 $2955 - 2855\text{cm}^{-1}$ (指示饱和的脂肪酸), 1744cm^{-1} (指示糖苷), 1650cm^{-1} (指示蛋白质)失去强吸收。由现有技术的方法(碱-酸)制备的葡聚糖样品的光谱类似于纯化的 β -葡聚糖制剂的光谱, 在 950cm^{-1} 谱带具有强吸收。

通过选择性提取和比色分析(基于 Stewart, P.R., 细胞生物学方法 XIII 111 - 145(1975))测定现有技术方法(碱-酸)和本发明方法(自体溶解和酶促方法)制备的样品的葡聚糖和甘露糖的量。由现有技术的方法制备的葡聚糖样品与由本发明方法制备的样品相比, 含有较少的甘露聚糖, 如表 II 所示。

还采用气相色谱方法将样品水解并且分析以识别糖成份。利用 4M 三氟乙酸将样品在 100°C , 在氩气中水解 4 小时。通过在氩气流中蒸发去除酸, 随后如 Harris, P.J.等人, 碳水化合物研究 127, 59 - 73(1984)描述的方法减少样品并且酰化。通过在 BPX70 柱气相层析, 利用火焰离子化检测分析水解产物。注射器和检测器温度分别是 280°C 和 300°C 。将烘箱在 185°C 保持 1 分钟, 然后以每分钟 3°C 的速度增加到 260°C , 在最后的温度下保持 5 分钟。

由现有技术方法制备的葡聚糖样品显示仅对应于葡萄糖的峰值, 表明碳水化合物成份主要是葡聚糖如表 II 所示。由本发明方法制备的样品含有葡萄糖以及基本量的甘露聚糖, 表明碳水化合物成份是甘露聚糖和葡聚糖的混合物。不溶性的 $\beta(1 - 3)$ 葡聚糖与甘露聚糖相比对酸水解相对具有抗性: 因此气相层析方法与比色方法相比, 低估葡萄糖的浓度(因此低估葡聚糖的浓度)。

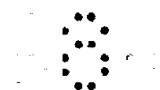


表 II

由碱-酸和自体溶解方法, 酶促方法生产的葡聚糖的比较: 碳水化合物分析

分析 (% W/V)	碱-酸 生产的葡聚糖	自体溶解 生产的葡聚糖	酶促 生产的葡聚糖
葡聚糖比色分析	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	未检测	25	15

采用甲基化分析方法, 利用基于 Harris, P.J.等人, 碳水化合物研究 127, 59 - 73(1984)描述的方法测定利用碱-酸提取方法和本发明方法(自体溶解和酶促方法)制备的葡聚糖样品中葡萄糖残基之间的键的类型。

在表 III 的结果显示由碱-酸方法制备的样品与本发明方法制备的样品相比主要由(1 - 3)-连接的葡萄糖组成。

表 III

由碱-酸方法, 自体溶解方法和酶促方法生产的葡聚糖的比较: 连接键的分析

葡萄糖单体的连接键分析 (相对百分数)	碱-酸 生产的葡聚糖	自体溶解方法 生产的葡聚糖	酶促 生产的葡聚糖
末端	4	26	24
1 - 2 连接	0	14	14
1 - 3 连接	94	29	40
1 - 4 连接	2	25	14
1 - 6 连接	0	6	8

利用小鼠模型检测葡聚糖样品的生物学活性。由三种方法之一生

产的物质具有占优势的 100 - 300 微米的颗粒大小。在有珠的研磨器中将干燥的物质研磨到颗粒直径为 <20 微米, 并且通过腹膜内注射到小鼠(2 毫克/小鼠)。72 小时之后, 从腹腔收集诱导到腹膜渗出液的细胞, 与加热杀死的酵母细胞一起培养, 估测吞噬作用细胞的百分数。

根据本发明方法(自体溶解或酶促方法)制备的物质在诱导非特异性免疫应答时比由碱/酸提取方法制备的物质更有效, 如由于吸引注射的物质的炎性细胞的趋药性, 腹腔中细胞数量增加所示, 和吞噬作用的中性白细胞和巨噬细胞的数量增加所示。这些结果显示于表 IV 中。

表 IV

由碱-酸和自体溶解方法和酶促方法生产的葡聚糖的比较: 诱导吞噬作用细胞的能力

分析	碱-酸葡聚糖	自体溶解葡聚糖	酶促葡聚糖
腹膜腔中细胞($\times 10^6$)	11.9	11.9	15
吞噬作用的巨噬细胞%	45	50	70
吞噬作用的中性白细胞%	16	33	30

对于观察到的有益效果不希望受任何建议的机理的束缚, 我们相信甘露聚糖和非 $\beta(1-3)$ 连接的葡聚糖与原纤维的 $\beta(1-3)$ 连接的葡聚糖具有增效作用以产生更好的免疫应答。

实施例 4

通过酸化提高葡聚糖-甘露聚糖制剂的效力

1 升的耗尽酿造酵母(15 %干重)采用实施例 1 的酶促方法处理。将沉淀的样品冷冻干燥。用盐酸或乙酸将残留的沉淀的 pH 调节到 2 - 4, 然后在 80 °C 将沉淀冷冻干燥或烘箱干燥。如实施例 3 所述, 通过 GC - MS 分析糖的连接键。

将葡聚糖-甘露聚糖物质研磨到 <20 微米; 检测其诱导吞噬细胞的能力, 如实施例 3 所述。表 V 的结果显示由酸化随后烘箱干燥可以改善葡聚糖-甘露聚糖刺激免疫应答的潜力, 酸化随后加热处理破坏某些 $\beta(1-6)$ 连接的葡聚糖, 可能表明在微纤维葡聚糖中有多个活性位

点。

表 V
 加热干燥酸化的物质的效果

分析	冷冻干燥不 酸化	冷冻干燥随 后酸化	烘箱干燥随后酸化
腹腔中的细胞($\times 10^6$)	4.15	3.9	7.1
吞噬作用的巨噬细胞%	55	52	68
吞噬作用的中性白细胞%	43	41	50
在葡聚糖中 $\beta(1-3)$ 与 $\beta(1-6)$ 连接键的比例	4.9 : 1	5.28 : 1	7.3 : 1

实施例 5 通过改变颗粒大小改善葡聚糖-甘露聚糖制剂的潜力

已知通过改变颗粒大小可显著地改变某些物质的潜力。1 升的耗尽酿造酵母(15 %干重)采用实施例 1 的酶促方法处理。将最后的沉淀悬浮于水(20 %干重)。在该阶段在显微镜下葡聚糖-甘露聚糖物质显示为约 4-6 微米直径的不连续的球。将悬浮的沉淀在 Braun 细胞匀浆器中, 利用直径从 0.25-1 毫米变化的珠大小的玻璃珠处理悬浮的沉淀 6 分钟。该步骤将葡聚糖球破碎到大小低于 2 微米的颗粒, 导致产生高粘性的具有损奶油的一致性的产物。当用实施例 3 的方法进行检测时, 该产物显示刺激非特异性免疫应答的良好能力。

在该方法的修饰形式中, 刚收集的酵母细胞用玻璃珠研磨以破碎细胞。在研磨期间或研磨之后, 利用类似于实施例 1 或 2 所述的条件, 将酵母细胞自体溶解和酶促消化。通过离心收集不溶性的物质, 并且利用小鼠模型检测生物学活性。结果概括于表 VI。



表 VI

改变葡聚糖颗粒大小的效果

分析 [*]	完整的葡聚糖颗粒(4 - 6 微米)	破碎的葡聚糖颗粒(<1 微米)	破碎的和然后酶促消化的酵母颗粒(<1 微米)
细胞增加的百分数/腹腔	150	250	250
吞噬的巨噬细胞的增加%	50	118	125
吞噬的中性白细胞增加的%	10	24	30

*与注射的干燥的酵母或葡聚糖对照相比。

为了裂解酵母或葡聚糖颗粒，可使用其它许多湿研磨方法和设备。这些包括但不限于加压匀浆(Manton Gaulin)，玻璃珠研磨和球研磨(Dyno 研磨器， Drais 研磨器， Netzsch 研磨器)。

实施例 6

通过改变所使用的酶的特性改善葡聚糖 - 甘露聚糖制剂的潜力

将新鲜的酵母糊(16.5 %干重)用水洗涤并且然后在 50 °C 搅拌保温 17 小时。将自体溶解的酵母加热 30 分钟到 100 °C，然后划分为两批。

将一批样品用来自 Solvay 的酶处理。将酵母在 47 °C 和 pH 9 条件下与 1 % W/W Optimase APL - 440(蛋白酶)一起搅拌保温 2 小时，然后将 pH 降低到 7.5，并且加入 1 % W/W Tunicase FN(葡聚糖酶)。在 6 小时保温之后，加入 1 % Optidex(葡萄糖淀粉酶)，将混合物在 60 °C 和 pH 4.5 时进一步保温 6 小时。获得粘性沉淀。将沉淀冷冻干燥并且用球研磨。

用来自 Novo 的酶保温第二批样品。将酵母在 pH5.5 条件下与 1 % W/W Ban(葡萄糖淀粉酶) 和 1 % W/W Mutanase SP299(葡聚糖酶)一起搅拌保温 6 小时。加入 1 % Protomex(蛋白酶)，在 55 °C 和 pH 5.5 将混合物进一步培养 16 小时。

在不同的实验中，用 1 % W/W Tunicase 处理实施例 1 制备的葡



聚糖－甘露聚糖(在 35 ℃, pH 7.5, 6 小时)。用 Tunicase 处理葡聚糖－甘露聚糖提高粘性。将该制剂离心, 并且将沉淀冷冻干燥并且研磨。在蒸馏水中充分地透析来自 Tunicase 处理的葡聚糖的上清液并且冷冻干燥。

按照实施例 3 描述, 分析葡聚糖样品中葡萄糖残基的连接键类型。也利用小鼠模型检测生物学活性。结果显示于表 VII, 该表显示可用酶可以改变葡聚糖制剂的特性。例如用 Tunicase (Solvay) 处理结果导致葡聚糖制剂中 $\beta(1-6)$ 连接减少的粘性产物。酶也可以用于生产生物学活性可溶性形式的葡聚糖。

表 VII

酶促活性的效果

分析*	Solvay 酶 方法	Novo 酶 方法	Tunicase 沉淀	Tunicase 上清液
在葡聚糖中 $\beta(1-3)$ 与 $\beta(1-6)$ 连接键的比例	25 : 1	4.6 : 1	5.4 : 1	未检测
腹腔细胞增加 %	330	268	110	65
吞噬作用的巨噬细胞增 加 %	65	90	96	140

实施例 7

改变葡聚糖－甘露聚糖制剂的粘性

通过酸化(实施例 4), 通过研磨(实施例 5), 和通过改变所使用的酶的类型(实施例 6)也可以改变如实施例 2 描述的方法制备的葡聚糖－甘露聚糖的粘性。利用具有 60 毫米的平板的 CSL100 电流计检测粘度。检测是在 20 ℃, 以 100/s 的剪切速率, 利用 10 % W/V 葡聚糖悬浮液进行的, 结果概括于表 VIII。



表 VIII
改变葡聚糖－甘露聚糖制剂的粘性

处理	粘性(Pa.s)
如实施例 2，以 pH4.5 制备的葡聚糖	5.8×10^{-3}
如实施例 2，以 pH4.5，煮沸 10 分钟制备的葡聚糖	7.82×10^{-3}
如实施例 2，以 pH4.5，煮沸 10 分钟并且研磨到低于 1 微米制备的葡聚糖	1.10
如实施例 2，以 pH3，煮沸 10 分钟并且研磨到低于 1 微米制备的葡聚糖	1.40
利用 Tunicase，如实施例 6 制备的葡聚糖	1.50

因此，用加热，酸，酶，和通过改变颗粒大小可改变葡聚糖－甘露聚糖的粘性以生产粘性物质。这可用作为奶油，凝胶等等。

实施例 8

葡聚糖－甘露聚糖制剂作为鱼的免疫增强剂的效果

从 Victoria 的商业农场获得虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)。该鱼具有 13 克的平均体重并且分配到 6×260 升的实验池，每个鱼池具有 12 条鱼。在开始实验之前使鱼适应水 7 天。

用标准的鱼丸，以约 5 % 体重/每天的量给鱼每天两次喂养。将葡聚糖－甘露聚糖制剂掺入到食料中以获得最终饲料中终浓度为 0.1 % W/W。将包括对照饲料的所有饲料再成丸，在 50 °C 干燥。在供给饲料 3 星期之后，用苯佐卡因(1 : 10000)麻醉并且牺牲。

将前肾收集到含有 1 单位的肝素/毫升的组织培养基中。通过不锈钢 80 标准规格的网筛将组织表面梳起毛线以分离单细胞。用改良的 Dulbecco 的尹格尔氏培养基(DMEM)(Gibco 实验室)洗涤细胞悬浮液。将细胞进行四唑翁硝基兰检测试验以检测过氧化物阴离子的产生(基于 Rook, J. 等人, 免疫方法杂志 82, 161 - 167(1985))并且进行吞噬作用检测试验以测定巨噬细胞吞噬酵母细胞的能力。

发现在实施例 2 中描述的方法产生的葡聚糖－甘露聚糖提高吞噬

作用的活性并且在从虹鳟的前肾分离的细胞中产生过氧化物阴离子，如表 IX 所示。数据显示如实施例 2 描述的方法生产的葡聚糖-甘露聚糖能够刺激虹鳟的免疫系统。

表 IX
作为鱼免疫系统的增强子的效果

食料	吞噬作用 %	过氧化物的产生
对照	27.2	0.038
葡聚糖-甘露聚糖制剂 (酶促方法)	37.1	0.068

实施例 9

葡聚糖-甘露聚糖制剂降低鱼致死率的能力

从 Tasmania 的商业农场获得不到一岁的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)。它们的平均体重为 65 克。将鱼分配到 6 个隔离的鱼池，每个鱼池有 16 条鱼。将鱼保持于 15 °C 的室温下，水温保持于 13 - 18 °C，在开始实验之前使鱼适应水 7 天。

用 Gibson 的鱼丸，以 2.5 % 体重/每天的量给鱼每天一次喂养。将葡聚糖 制剂(实施例 2 方法制备的葡聚糖或碱-酸提取方法制备的葡聚糖)掺入到 5 % W/W 明胶溶液，包裹到鱼丸以提供最终的食料中浓度为 0.1%W/W 葡聚糖。给对照喂养的鱼丸仅用明胶包裹。随后使用下面的喂养方式：增补食料喂养 14 天，随后用未增补食料喂养 42 天，然后用增补食料喂养 14 天。在第二阶段的增补食料喂养一星期之后，用鳟弧菌攻击鱼。

使用鳟弧菌的 Tasmanian 菌株血清型 C(相同于血清型 01)(Munday, B.等人, 免疫学和细胞生物学 70, 391 - 397(1992))。将生物体在增补了 2 % 氯化钠的营养培养液中生长。

通过腹腔注射 3×10^7 的 c.f.u.(LD₅₀ 剂量)的生物体，用鳟弧菌攻击鱼，每天至少观察两次，观察 10 天。所有死鱼培养鳟弧菌。

接种之后三天出现死亡，在接种之后第三和第四天，许多对照组

昏睡，在翅的基部和腹部有充血，尽管在该组没有出现进一步的死亡。

在用鳃弧菌攻击之后，证实了本发明的葡聚糖的保护作用。如表 X 所示，利用碱-酸提取方法制备的葡聚糖效果较低。

表 X

葡聚糖-甘露聚糖降低鱼致死率的能力

食料	在攻击 10 天之后死亡率%
对照	15.6
葡聚糖制剂(酶促方法)	3.1
葡聚糖制剂(碱-酸方法)	9.4

结果表明如实施例 2 描述的方法生产的葡聚糖-甘露聚糖可用于改善虹鳟对鳃弧菌感染的抗性，其效果比现有技术的葡聚糖制剂有优势。

实施例 10

葡聚糖-甘露聚糖制剂降低虾 *Penaeus monodon* 死亡率的能力

从昆士兰的农场获得 5 - 10 克的 *Penaeus monodon* 虾。对 12 只虾称重分配到 12 × 60 升鱼池中。在鱼池中使虾适应 5 天，然后喂养对照或处理食料。在 23 天之后，用哈氏弧菌的 LD₅₀ 剂量注射虾。监测 7 天的死亡率。在该期间，用对照或处理食料喂养虾。

所有的虾用蒸发丸化的标准食料(CP 100)喂养。加入本发明的葡聚糖-甘露聚糖，通过明胶吸附到丸的表面以处理食料。制备约 5 % W/V 明胶溶液的溶液，并且以 100 毫升/千克的丸的速率混合到对照食料。用于处理食料的明胶溶液含有足够的实施例 2 制备的葡聚糖-甘露聚糖或用碱-酸提取方法制备的葡聚糖以确保最终的速率中浓度为 0.1%W/W。喂养速率为 6.5 - 5 % 的虾体重/天。

利用来自于临终的 *P. esculentus* 虾的哈氏弧菌，菌株 656 的病原菌株进行攻击研究。将细菌在 26 - 28 °C，含有维生素的海水液体培养基中传代培养过夜。用 0.73 % W/V 盐水溶液，在 40 °C，以 2000rpm 离心 30 分钟洗涤细胞三次。在每个步骤使用旋转混合。制备细菌悬浮



液的连续稀释液，将各个稀释液注射到未处理的爪中，以便计算 LD_{50} 剂量。对于每个连续稀释液，将 0.1 毫升与 25 毫升的 $42^{\circ}C$ 的含有维生素的海水琼脂(MAV)混合并且倾倒入培养皿中。在 $26 - 28^{\circ}C$ 保温 24 小时之后，计算菌落数目，计算各个接种悬浮液中细菌的数量。将培养皿倒置用于计算 0.05 毫升注射体积中细菌的数量。

最后选择以每 0.05 毫升中 $1 - 2 \times 10^5$ 的剂量注射哈氏弧菌 656 菌株进行 LD_{50} 攻击。注射到虾的第二异常部位。在随后的 7 天每天记录死亡率，按照如下所述计算死亡率百分数：

$$\text{致死率}\% = \frac{\text{死亡的虾数量} - A}{\text{虾的总数} - A} \times 100$$

A = 1 天后的死亡率。

在用哈氏弧菌攻击之前在喂养阶段监测虾的行为和健康状况。如果对生长没有显著的作用，虾对实施例 2 描述的方法制备的葡聚糖-甘露聚糖食料有更好的胃口，更具有活性，并且显示死亡率较低。

在用哈氏弧菌攻击之后，证实本发明的葡聚糖的保护作用。根据碱-酸方法制备的葡聚糖效果较低，如表 XI 所示。

表 XI
虾死亡率的降低

食料	在攻击 7 天之后 死亡率%	用于受攻击的虾的数量
对照	50	99
葡聚糖制剂(酶促方法)	11*	92
葡聚糖制剂(碱/酸方法)	18	55

*显著不同于对照组

因此实施例 2 制备的葡聚糖-甘露聚糖可用于成功地改善虾 *Penaeus monodon* 的疾病抵抗力。

实施例 11

葡聚糖-甘露聚糖制剂增强家禽的疾病抵抗力的能力

将 240 只混合性别的小鸡分配给 4 种不同的食料处理。将 1 天大



的小鸡圈养于两个孵蛋箱中，均匀地分配到 24 个小室中，每个室 10 头小鸡。用标准的不含药的商业食料(对照)或具有以 1 克/千克食料的比例掺入的葡聚糖—甘露聚糖标准的食料喂养鸡。根据实施例 2 或 5 的方法(在研磨期间或之后酶促处理)制备葡聚糖—甘露聚糖。在 1 天大和 21 天之间给小鸡随意提供食料。以 1 星期的间隔监测生长速率。

食料实验的最后，从每个处理的 18 只小鸡取血。将血液收集到肝素处理过的试管中，用 PBS 洗涤两次。通过从小量血液样品中分离白细胞，并且用活的金黄色葡萄球菌的悬浮液一起培养，对循环血液白细胞的杀细菌活性进行评价。1 小时保温期之后，溶解血液细胞，监测存活的细菌的数量。

将每个处理的其余的 20 只小鸡转移到气泡分离器，每个处理组用一个分离器。从每个小鸡取泄殖腔标本证实小鸡是没有沙门氏杆菌的。对食料辐射处理以确保它没有沙门氏杆菌。小鸡口服接种鼠伤寒沙门氏杆菌工程菌株(萘定酸抗性)。在不同的时间间隔杀死来自每个处理的 5 只小鸡，从胃肠道取出沙门氏杆菌计数。结果概括于表 XII 和表 XIII。

表 XII

葡聚糖—甘露聚糖制剂对家禽健康的影响：生长速率和单细胞活性

处理	21 天的重量(克)	存活的细菌(cfu/ml)
对照	799	2.3×10^4
0.1%葡聚糖(酶促方法)	813	1.2×10^4
研磨的然后酶促消化的 0.1%葡聚糖	818	7.7×10^3



表 XIII

攻击试验：沙门氏杆菌菌落的形成

分析	对照	0.1%葡聚糖(酶促方法)	研磨的然后酶促消化的0.1%葡聚糖
2 天之后形成菌落的小鸡的%	93	0	60
4 天之后形成菌落的小鸡的%	100	60	20
2 天时沙门氏杆菌的数量(cfu/g)	2364	0	760
4 天时沙门氏杆菌的数量(cfu/g)	30000	15840	6000

表 XII 显示葡聚糖-甘露聚糖使生长速率提高 2 - 3 %。葡聚糖-甘露聚糖制剂增强小鸡的免疫应答，增强抗感染的能力，表 XIII 显示将葡聚糖-甘露聚糖加入到食料中显著降低沙门氏杆菌在小鸡中存在的证据和形成菌落的程度。

实施例 12

功能饮料

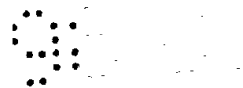
将本发明的葡聚糖-甘露聚糖制剂加入到饮料或食料(例如，酸奶)以改善人类的健康抵抗感染，例如免疫妥协的个体，高强度训练的运动员，发热的生活方式或患有胃肠道问题的患者。用作为无醇饮料的合适的制剂是：

25 %的胡萝卜，番茄和/或橘子汁

1 % (W/V) 葡聚糖制剂

总结：

(i) 我们的方法用于生产含有葡聚糖并且具有免疫刺激活性的颗粒葡聚糖制剂，该方法大大不同于以前已知的方法，该方法是基于碱-酸，苯酚：水，或溶剂提取。



(ii)由我们的方法生产的葡聚糖-甘露聚糖物质的纯度低于碱-酸提取方法生产的葡聚糖，在小鼠中能更有效地刺激非特异性免疫应答。

(iii)通过将该物质酸化，之后加热干燥可改善葡聚糖-甘露聚糖物质的活性。

(iv)通过改变颗粒大小，酸处理和酶促处理可显著地改变葡聚糖-甘露聚糖物质的粘性和生物学活性。

本发明的葡聚糖-甘露聚糖物质可用于许多区域包括但不限于：

(i)鱼池：以便增加多骨鱼和甲壳类对各种水衍生的感染的抗性。葡聚糖物质可以以制备的鱼食料形式给药。

(ii)畜牧业：以家畜食料，宠畜食料和液体形式给动物和家禽喂养葡聚糖物质。

(iii)兽药和医药应用：葡聚糖-甘露聚糖物质可以以局部伤口愈合乳液或膜的形式给药，或口服，鼻内给药，或借助于腹膜注射给药。

(iv)作为食品添加剂：作为副产品的酵母细胞壁物质已经是获准使用的食品添加剂，可用作为增稠剂或在色拉调味汁，汤，涂抹食品，调味汁等等中提供食用纤维，并且用作为“功能”食品和饮料以提高对疾病的抗性。

(v)化妆品：例如用于乳剂和洗剂中以降低太阳光的伤害以及用于敏感皮肤的制剂。

(vi)药物：作为免疫抑制患者或其它易于感染的患者的伤口愈合剂，抗癌剂，或抗感染剂。本发明的产品可用于乳液，洗液，片剂，漱口液或将该物质干燥为膜用作为伤口的包裹物。也可用作为疫苗，抗生素或其它药物制剂的佐剂。

易于理解适用于本发明葡聚糖-甘露聚糖产品的是使用已经在现有技术中描述的 β -葡聚糖。

对本领域内技术人员来说显而易见的是，为了清楚和便于理解的目的详细描述了本发明，对本文描述的实施例和方法进行各种修饰和改变不会脱离在本说明书中公开的本发明的范围。

说明书附图

附图 1: Fourier 变换红外光谱学

