[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12P 7/58 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480037839.7

[43] 公开日 2007 年 1 月 10 日

[11] 公开号 CN 1894414A

[22] 申请日 2004.12.17
[21] 申请号 200480037839.7
[30] 优先权
[32] 2003.12.18 [33] EP [31] 03258025.0
[86] 国际申请 PCT/EP2004/014406 2004.12.17
[87] 国际公布 WO2005/059152 英 2005.6.30
[85] 进入国家阶段日期 2006.6.19
[71] 申请人 塞里斯塔控股有限公司
地址 荷兰沙斯范亨特
[72] 发明人 R·L·M·韦考特伦
A·A·J·海伦
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 程 淼 刘 玥
权利要求书 3 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

用过氧化物酶和硝基氧基来氧化碳水化合物的方法

[57] 摘要

本发明涉及氧化具有伯醇基团的碳水化合物和/或碳水化合物衍生物的方法，所述方法包括：将含有所述碳水化合物和/或碳水化合物衍生物的反应介质与硝基氧基介体和过氧化物酶接触，其特征在于，初始的反应介质含有按重量计至少 10％的碳水化合物和/或碳水化合物衍生，所述过氧化物酶是油料种子的过氧化物酶，并且，将氢过氧化物和碱性化合物逐步加入到反应介质中，使得 pH 保持在 3.5 至 10.0 之间(pH－Stat)；本发明还涉及所述方法在制备葡萄糖酸、葡糖二酸和/或 D－葡萄糖醛酸内酯的过程中的用途。

1. 对具有至少一个伯醇基团的碳水化合物和/或碳水化合物衍生物进行氧化的方法，所述方法包括：将含有所述碳水化合物和/或碳水化合物衍生物的反应介质与硝基氧基介体和过氧化物酶反应，其特征在于，初始的反应介质含有按重量计至少 10%的碳水化合物和/或碳水化合物衍生物，所述过氧化物酶是油料种子的过氧化物酶，并且，将氢过氧化物和碱性化合物逐步加入到反应介质中，使得 pH 保持在 3.5 至 10.0 之间。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述碳水化合物和/或碳水化合物衍生物选自由淀粉、葡萄糖、海藻糖、麦芽寡糖、异麦芽寡糖、葡萄糖浆、麦芽糊精、甘油、山梨糖醇及其混合物所构成的组。

3. 如权利要求 1 所述用于氧化碳水化合物的方法，其中，所述 pH 被保持于 3.5 至 8.0 之间，优选地，4.0 至 7.5 之间。

4. 如权利要求 1 所述用于氧化碳水化合物衍生物的方法，其中，所述 pH 被保持于 5.0 至 10.0 之间。

5. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，所述初始的反应介质含有按重量计至少 40%的碳水化合物和/或碳水化合物衍生物。

6. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，所述伯醇基团中的至少 10%被氧化。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其中，被氧化的伯醇基团中至少 50%被氧化为羧基。

8. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，所述硝基氧基介体是二叔硝酰基化合物，优选地，选自 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基及其衍生物或混合物。

9. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，所述初始的反应介质包含与伯醇基团摩尔比为 1：4 至 1：150 的硝基氧基介体，优选地，1：40 至 1：70。

10. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，所述过氧化物酶选自由油菜籽过氧化物酶、棕榈油过氧化物酶、落花生过氧化物酶、大豆过氧化物酶和其混合物所组成的组。

11. 如权利要求 1 至 8 中任意一项所述的方法，其中，所述过氧化物酶是大豆或棕榈油过氧化物酶。

12. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，所述初始的反应介质中包含：相对于每摩尔伯醇而言，2000 至 540 000 个单位的过氧化物酶，优选地，大约 5000 个单位的过氧化物酶。

13. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中所述过氧化物酶被固定于支持物上。

14. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，对每摩尔伯醇而言，向反应介质中加入 0.5 至 4 mmol/分钟的氢过氧化物。

15. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，所述氢过氧化物是过氧化氢或其来源。

16. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，对每一伯醇基团而言，向反应介质中加入 0.1 至 1.1 mmol/分钟的碱性化合物。

17. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，所述碱性化合物是氢氧化钠。

18. 如前述权利要求中任意一项所述的方法， 其中所述反应介质被保持于 20 至 50°C 之间的温度，优选地，大约 25°C。

19. 如前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，所述反应时间为 20 至 55 小时，优选地，45 至 52 小时。

20. 一种制造葡萄糖酸和/或葡糖二酸的方法，所述方法包括：按照权利要求 1-3 或 5-19 中任意一项所述的方法来氧化葡萄糖。

21. 一种制造被氧化的海藻糖的方法，所述方法包括：按照权利要求 1-3 或 5-19 中任意一项所述的方法来氧化海藻糖。

22. 一种用于制造 D-葡萄糖醛酸内酯的方法，所述方法包括：

（a）按照权利要求 1-3 或 5-19 中任意一项所述的方法来氧化海藻糖；

（b）可选地，回收所述硝基氧基介体；

（c）水解步骤（a）的反应的被氧化产物；

（d）对步骤（c）的所述水解反应的产物进行内酯化，以及

（e）结晶步骤（d）的产物。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中，所述海藻糖中的至少 15% 被转化为 D-葡萄糖醛酸内酯。

24. 如权利要求 22 或权利要求 23 所述的方法，其中，步骤（c）在存在硫酸、HCl 和/或阳离子交换树脂的情况下进行。

25. 如权利要求 **22** 或权利要求 **23** 所述的方法，其中，步骤（c）在存在 *O*-糖基化合物水解酶的情况下进行，优选地，在存在外-聚半乳糖醛酸酶的情况下进行。

26. 如权利要求 **25** 所述的方法，其中，所述 *O*-糖基化合物水解酶被固定于支持物上。

用过氧化物酶和硝基氧基来氧化碳水化合物的方法

技术领域

本发明涉及用过氧化物酶和硝基氧基介体来氧化碳水化合物和/或碳水化合物衍生物的方法。具体而言，本发明涉及将伯醇基团选择性氧化为羧基的方法。

发明背景

对碳水化合物（和碳水化合物衍生物）伯醇基团的氧化导致了醛（R'-CHO）和/或羧基（R'-COOH）的形成。

醛和羧基的形成增加了得到的化合物的反应活性、多功能性和溶解性，它们因此具有更为大量的工业应用（例如，在食品、纺织品和纸工业中）。作为结果，人们对发展出允许对伯醇基团选择性氧化的方法非常感兴趣。一种此类方法涉及到使用硝基氧基介体（nitroxy radical mediator）。

本领域中已描述了大量硝基氧基介导的氧化方法。此类方法的例子可在下述申请中找到：WO00/50621A1、WO01/00681A1、US20030029588A1和EP1077221A1。

不幸的是，现有的所有方法都具有大量的缺点。例如，US20030029588A1和EP1077221A1需要使用对环境有害的卤化物化合物。然而，现有的方法的主要缺陷还在于它们可怜的性能，这是就任何一次中能被实际氧化的碳水化合物底物的数量而言的。例如，在WO00/50621A1和WO01/00681A1中，可被加入到所述反应介质中的碳水化合物的量被限制为不超过1至2%干物质（事实上通常情况下干物质的水平不超过0.05%）。

因此，对将获得的任何有用数量的被氧化的碳水化合物而言，将需要非常大量的反应试剂，所产生的废水的量也非常之可观。例如，已经提出，为增加氧化水平，应当使用更大量的酶。这不仅是令人不满地增加了反应成本，而且还发现这样做并没有用。因此，现有的方法不经济，也不适合用于工业规模的应用。

因此，人们需要改进的硝基氧基介导的氧化方法。本发明就提供

了这样的方法。

发明内容

在本发明的第一个方面，提供了一种对具有至少一个伯醇基团的碳水化合物和/或碳水化合物衍生物进行氧化的方法，所述方法包括：将含有所述碳水化合物和/或碳水化合物衍生物的反应介质与硝基氧基介体和过氧化物酶接触，其特征在于，初始的反应介质含有按重量计至少 10%的碳水化合物和/或碳水化合物衍生物，所述过氧化物酶是油料种子的过氧化物酶，并且，将氢过氧化物和碱性化合物（例如 NaOH）逐步加入到反应介质中，使得 pH 保持在 3.5 至 10.0 之间。

在一种优选的实施方式中，伯醇基团中的至少 10%被氧化。进一步更优选地，被氧化的伯醇基团中的至少 50%被氧化为羧基。

在本发明的另一个方面，提供了生产葡萄糖酸和/或葡糖二酸的方法，所述方法包括将葡萄糖按照上述方法氧化。

在本发明的又一个方面，提供了制造 D-葡萄糖醛酸内酯的方法，所述方法包括：（a）按照上述方法氧化海藻糖；（b）可选地，回收硝基氧基介体；（c）水解步骤（a）的反应的被氧化产物；（d）对步骤（c）的水解反应的产物进行内酯化，以及（e）结晶步骤（d）的产物。优选地，所述海藻糖的至少 15%被转化为 D-葡萄糖醛酸内酯。

发明详述

本发明提供了一种对具有至少一个伯醇基团的碳水化合物和/或碳水化合物衍生物进行氧化的方法，所述方法包括：将含有所述碳水化合物和/或碳水化合物衍生物的反应介质与硝基氧基介体和过氧化物酶接触，其特征在于，初始的反应介质含有按重量计至少 10%的碳水化合物和/或碳水化合物衍生物，所述过氧化物酶是油料种子(oilseed)的过氧化物酶，并且，将氢过氧化物和碱性化合物逐步加入到反应介质中，使得 pH 保持在 3.5 至 10.0 之间。

碳水化合物和/或碳水化合物衍生物

术语“碳水化合物(carbohydrate)”指含有至少一个碳水化合物亚基的任何化合物。其还可以包含一种或多种非碳水化合物亚基（例如，

脂质残基、蛋白质残基等）。

所述至少一个碳水化合物亚基可以是单糖（例如葡萄糖或果糖）、二糖（例如蔗糖、麦芽糖、乳糖或海藻糖）或者寡糖或多糖（即聚合度分别为 3-10 和超过 10 的分子）。

寡糖和多糖可以是任何类型的，它们包括但不限于：半乳聚糖、（半乳）-甘露聚糖、呋喃果聚糖和木聚糖；α-葡聚糖，例如出芽短梗霉聚糖（pullulan）、淀粉、淀粉组分（即直链淀粉或支链淀粉）或淀粉衍生物（例如，糊精、麦芽糊精或环糊精）；β-葡聚糖，例如，纤维素或几丁质；果聚糖，例如菊粉；天然或人工胶质，例如黄原胶、瓜尔胶、阿拉伯胶、琼脂、角叉菜胶等。

本发明的方法还可用于氧化任何上述碳水化合物的衍生物和/或盐。为便于论述的原因，此类化合物被称为“碳水化合物衍生物”。衍生物包括：化学修饰、酶修饰和/或热修饰的碳水化合物。适合用于本发明的方法的优选碳水化合物衍生物的例子包括但不限于：被还原的碳水化合物（例如，甘油、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、乳糖醇、麦芽糖醇、赤藻糖醇甘油、苏醇、阿糖醇、核糖醇、异麦芽糖（isomalt）和异麦芽糖醇）、氨基-碳水化合物、糖酰胺(glyconamides)、糖胺(glycosylamines)、含氮碳水化合物衍生物、去氧碳水化合物、含硫碳水化合物、硫还原的碳水化合物、不饱和碳水化合物、碳水化合物的酐类衍生物、还原碳水化合物的酐类衍生物、碳水化合物糖苷、碳水化合物醚、碳水化合物醚和碳水化合物酯（包括羧酸酯、磺酸酯、磷酸酯、硼酸酯、硝酸酯、硫酸酯、碳酸酯、硫代碳酸酯和氨基甲酸酯）。

优选地，碳水化合物或碳水化合物衍生物将选自淀粉、葡萄糖、海藻糖、麦芽-寡糖、异麦芽-寡糖、葡萄糖浆、麦芽糊精、甘油和山梨糖醇或它们中的两种或更多种的混合物。

反应介质

将按重量计为至少 10%，优选至少 20%，更优选至少 30%，进一步更优选至少 40%的碳水化合物和/或碳水化合物衍生物干物质加入到初始的反应介质中，其中“初始的”反应介质指在氧化反应开始之前的反应介质。

反应介质可以是水性介质、均质混合的介质（例如，醇/水或醚/

水混合物）或异质介质（例如，水和与水不能混溶的有机溶剂例如疏水性醚、碳氢化合物或卤化的碳氢化合物的混合物）。

根据一种优选的实施方式，反应介质还可以是固体/液体混合物，其中，本发明的硝基氧基介体和/或过氧化物酶被固定在惰性支持物上。可以使用本领域已知的任何方法（例如，化学共价连接、凝胶捕获、吸附、胶囊化到半透膜上、交联等）来固定所述介体和/或酶。

硝基氧基介体

不考虑其形式，初始的反应介质将有利地包含与伯醇基团的摩尔比为 1：4 至 1：150 的硝基氧基介体，优选地，大约 1：40 至 1：70 的摩尔比。仅举个例子而言，硝基氧基介体可以是二叔硝酰基化合物例如 2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧基（TEMPO）；缺少 a-氢原子的有机硝酰基化合物，例如，2,2,5,5-四甲基吡咯烷-N-氧基（PROXYL），4-羟基、4-甲氧基、4-烷氧基、4-乙酰氧基、4-膦酰氧基（phosphonooxy）或 4-苯甲酰氧基-TEMPO，其酰化衍生物，例如，4-乙酰氨基-或 4-马来酰亚氨基-TEMPO 或脱氢-TEMPO（1,2,3,6-四氢-2,2,6,6-四甲基嘧啶-1-氧基）。优选地，硝基氧基介体是 TEMPO 或 4-甲氧基 TEMPO。

硝基氧基介体的活性氧化种类是亚硝鎓离子（$>N^{+}=O$），术语“硝基氧基介体”被用于指硝酰基化合物的活化或非活化形式。活化的硝基氧基介体可以直接加入到反应介质中，但其优选通过氧化原位产生。

硝基氧基介体还可以是上述任何一种的衍生物或类似物，或它们中的两种或多种的混合物。理想地，在使用之后，将使用任何已知的方法（例如，WO96/36621A1 中描述的方法）回收硝基氧基介体，将其循环用于反应介质。

过氧化物酶

过氧化物酶将被加入到初始的反应介质中，优选地，按照每摩尔伯醇 2000 至 540,000 个单位的量加入，更优选地，按每摩尔伯醇大约 5000 个单位的量加入。可以用本领域的标准方法来测定过氧化物的单位，例如，在 Chance, B. and Maehly, A.C. (1955) Methods in Enzymology II, 773-775 页中列出的方法。

用于本发明方法中的过氧化物酶是从油料种子获得的过氧化物酶，优选地，选自酶分类 EC 1.11.1，更优选地，来自 EC 1.11.1.7。此类酶的合适来源包括但不限于，大豆、油菜籽、红花、向日葵、亚麻、棉花、芥菜、海甘蓝（或 Brassica 属的其它植物）、油棕（oil palm）以及落花生。优选地，过氧化物酶将是大豆或油棕过氧化物酶。

pH 控制

使用过氧化物酶要求存在有电子受体。用于本发明方法的电子受体将是氢过氧化物。氢过氧化物优选是过氧化氢或其来源，例如，过氧化氢前体，例如，过硼酸盐或过碳酸盐；产生过氧化氢的酶；过氧化羧酸或其盐。对每摩尔伯醇而言，向反应介质中加入 0.5 至 4 mmol/分钟的氢过氧化物。这种加入应当是缓慢的、受到控制的，使得反应介质的 pH 可以保持在 3.5 至 10.0 之间。

在某种程度上，反应介质的最优 pH 将取决于待氧化的底物。因此，对于大多数碳水化合物而言，更具体地，对海藻糖而言，优选的 pH 在 3.5 至 8.0 之间。更优选地，其在 4.0 至 7.5 之间，进一步更优选地，大约为 7。但是，对某些碳水化合物衍生物（例如，被还原的碳水化合物，以及具体而言，甘油）而言，优选的 pH 将在 5.0 至 10.0 之间。

除氢过氧化物外，还通过逐步加入碱性化合物来保持反应介质的 pH。因此，对每摩尔伯醇基团而言，向反应介质中加入 0.1 至 1.1 mmol/分钟的碱性化合物。碱性化合物优选为氢氧化钠（NaOH）。使用 pH stat 来控制氢过氧化物和碱性化合物的加入。

除反应介质的 pH 之外，理想得，还要对其温度加以控制。因此，反应介质优选保持于 15 至 50°C 之间，优选在 20 至 30°C 之间，进一步优选地，大约 25°C。根据一种实施方式，反应时间可以少至 20 小时。根据另一种实施方式，其可多达或超过 100 小时。但是，优选地，反应时间在 40 至 55 小时之间，进一步更优选地，45 至 52 小时之间。

在上文所述的条件下，我们吃惊地发现，高水平的碳水化合物（和/或碳水化合物衍生物）干物质可被包括进初始的反应介质。具体而言，已经发现，初始反应介质中存在的伯醇基团中的 10%或更多，优选至少 20%，更优选至少 30%，更优选至少 40%，更优选至少 50%，更优选至少 60%，更优选至少 70%，更优选至少 80%，进一步更优选至少

90%都将被氧化。根据一种优选的实施方式，被氧化的伯醇基团将被氧化为羧基。根据一种特别优选的实施方式，被氧化的伯醇基团中的至少 50%将被氧化为羧基。理想地，被氧化的伯醇基团中的至少 90%都将被氧化为羧基。

制造葡萄糖酸和/或葡糖二酸

氧化反应的实际产物当然将取决于用作为底物的碳水化合物和/或碳水衍生物。在一种可能的实施方式中，其中，加入到初始反应介质中的碳水化合物是葡萄糖，反应的产物就将是葡萄糖酸（C1 氧化）或葡糖二酸（C1 和 C6 氧化）。因此，本发明提供了一种通过氧化葡萄糖来制造葡萄糖酸或葡糖二酸的方法。

制造 D-葡萄糖醛酸内酯

本发明氧化反应的产物还可被进一步修饰，例如，通过额外的氧化、羟基烷基化、羧甲基化、阳离子化、酰胺化、酯化、交联或通过水解来修饰。

因此，例如，本发明提供了一种制造 D-葡萄糖醛酸内酯的方法，所述方法包括：（a）按照上述方法氧化海藻糖；（b）可选地，回收硝基氧基介体；（c）水解步骤（a）的反应的被氧化产物；（d）对步骤（c）的水解反应的产物进行内酯化，以及（e）结晶步骤（d）的产物。优选地，所述海藻糖的至少 15%被转化为 D-葡萄糖醛酸内酯。

海藻糖是非还原二糖，其包含 D-葡萄糖作为组成性糖。其可以从植物、细菌、真菌、藻类或昆虫中提取，或者，其可从，例如，麦芽糖或淀粉获得。可通过将其与一种或多种水解剂（选自酸，例如，氢氯酸、硝酸、磷酸、硫酸、超级酸和/或阳离子交换树脂）反应，来水解被氧化的海藻糖。

进一步更优选地，被氧化的海藻糖将被酶水解。合适的水解酶包括但不限于，*O*-糖基化合物水解酶，例如，半乳糖醛酸酶。优选地，水解酶是外-聚半乳糖醛酸酶。该酶将按照 0.05-30% w/w 的量被加入到反应介质中，优选地，2-20% w/w 的量。酶可以在溶液中自由存在，或者其可以被固定于惰性支持物上，这可以通过任何已知的方法来进行。

水解优选发生于液相，例如水、溶剂例如直链或带支链的低级醇（例如，甲醇、乙醇、丁醇丙醇和异丙醇）或它们中两种或多种的混合物。反应时间可以在 1 至 150 小时之间，优选地，5 至 80 小时，进一步更优选地，5 至 10 小时。pH 优选被保持于 3 至 6 之间，进一步更优选地，大约 4 至 5 之间，使得水解的葡糖醛酸酯（glucuronate）产物可被酸化为葡糖醛酸。孵育温度可被设置为 30-50°C 之间，优选地，大约 40°C。

可用内酯化步骤将葡糖醛酸转化为葡萄糖醛酸内酯（例如，用酸来进行，例如，氢氯酸、硫酸、硝酸或磷酸）。然后可以通过结晶以及下述方法中的一种或多种从反应产物中分离出 D-葡萄糖醛酸内酯，所述方法是过滤、萃取、固液分离、部分沉淀、渗析蒸馏等。如果需要更高纯度的 D-葡萄糖醛酸内酯，可以应用本领域通常用于纯化糖或糖衍生物的技术，例如，薄层色谱、柱色谱、离子交换色谱、气相色谱、蒸馏和结晶。根据本发明的方法制造的 D-葡萄糖醛酸内酯可被用于，例如，营养组合物、能量食品或饮料，以及药物产品。

下述非限制性的实施例将对本发明进行进一步的阐述。

实施例

实施例 1　　制造葡萄糖酸和葡糖二酸

将 15 g D-葡萄糖（来自 Aldrich）溶解于 21.5 ml 去矿物质水中（= 39.9%干物质）。将 1.056 g TEMPO（来自 Aldrich）加入到葡萄糖溶液中。加入 0.0206 g 大豆过氧化物酶（SIGMA™），反应在搅拌下于 25°C 进行 24 小时。过氧化氢（30%，来自 Merck 的 Perhydrol™）被持续加入，剂量速率为 0.138 mmol/分钟。通过加入 4 M NaOH（来自 Merck）将 pH 保持恒定于 7。

24 小时后，通过 HPLC 分析反应混合物。在 75°C，以 1 ml/分钟在两根不同的柱上分析样品：Shodex K-S-801（Na^+形式）柱，用水进行；Shodex KC-811（H^+形式）柱，用 0.01 M H_2SO_2 进行。获得的两种色谱被用于测定通过氧化反应获得的葡糖醛酸（4.4%）、葡萄糖酸（86.5%）、葡糖二酸(6.8%)的水平。

实施例 2　　测定被氧化的海藻糖中的醛含量（试验 1）

氧化流程

对 20 g D-海藻糖（来自 Cargill 的 ASCEND™）进行的选择性 C6-氧化在实验室试验中进行，其中用大豆过氧化物酶/过氧化氢和 TEMPO（来自 Aldrich）作为介体(mediator)。使用下述条件：

- 干物质 D-海藻糖：40% d.s.
- 摩尔比 TEMPO/伯醇官能*：1/40
- 大豆过氧化物酶（OrganicTec™）：10 000 单位/mol 伯 OH
- 过氧化氢（30% Perhydrol™）：0.01 ml/分钟
- 4 M 氢氧化钠溶液，用于进行 pH stat 控制，控制为 pH 7
- 反应温度：25 °C

*上面提到的伯醇官能(primary alcohol function)具有化学式-CH_2-OH，但其可被缩写为“伯 OH”。

用磁性搅拌器对反应介质进行持续搅拌。增加反应时间（10、21、28 和 36 小时）后，取出样品，反应时间对应于 17、42、60 和 74 mol% NaOH/伯 OH 的氢氧化钠消耗量，这是对氧化程度的量度。

醛测定

用氢氧化钠进行盐酸羟胺滴定是基于专利 EP1 077 221 A1（“Polysaccharide aldehydes prepared by oxidation method and used as strength additives in papermaking”）所述的方法来进行的。

用 1 M HCl 将含有 15 mmol 伯醇的样品的 pH 调节为 pH 3.2，即，HCl 等当点的 pH。

加入过量的盐酸羟胺（来自 Merck 的 1.5 M 溶液）。

按照上述反应机理，通过肟衍生化形成 HCl，通过 Metrohm pH Stat 718 Titrino，加入 0.1 M NaOH，以保持 pH 值为 3.2。加入的 NaOH 的摩尔量是对存在的醛基数量的量度。

反应机理：R-CHO + $NH_2OH.HCl$ -> RCHNOH + HCl

下表 1 中给出了测定结果。

表 1：醛测定

氧化反应时间（小时）	糖醛酸/伯 OH（mol%）	醛/伯 OH（mol%）
10	17	13
21	42	10
28	60	6
36	74	5

在形成羧酸之前，D-海藻糖的伯 OH 被氧化成醛。在不同氧化程度进行的醛测定显示，较高氧化程度下有较低的醛值。相应于 17、42、60 和 74 mol%糖醛酸/伯 OH 的氧化程度的醛含量分别为 13、10、6 和 5 mol%醛/伯 OH。

实施例 3　测定被氧化的海藻糖中的醛含量（试验 2）

氧化流程

对 20 g D-海藻糖进行的选择性 C6-氧化在实验室试验中进行，其中用大豆过氧化物酶/过氧化氢和 TEMPO（来自 Aldrich）作为介体。使用下述条件：

- 干物质 D-海藻糖：40% d.s.
- 摩尔比 TEMPO/伯 OH：1/40
- 大豆过氧化物酶（OrganicTec™）：5 000 单位/mol 伯 OH
- 过氧化氢（30% Perhydrol™）：0.01 ml/分钟
- 4 M 氢氧化钠溶液，用于进行 pH stat 控制，控制为 pH 5、pH6、pH 7 和 pH 8
- 反应温度：25 °C

增加反应时间后取出样品。表 2 中显示了对应的氢氧化钠消耗。

羧基和醛测定

除 NaOH 消耗之外，用标准 Blumenkrantz（特异性糖醛酸定量）和 HPLC 方法来测定氧化水平。HPLC 在 25 °C 以 1 ml/分钟进行于两根连续的 Shodex KC-811（H^+形式）柱上，其中使用 0.01 M H_2SO_2。

用上文实施例 2 中描述的方法来测定醛水平。

获得的结果被展示于表 2 中。

	氧化反应时间 (h)	氧化 (%) (HPLC)	(NaOH消耗)	(Blumenkrantz)	醛 (%)
pH 5	10	30	20	23	12.8
	28	71	67	70	7.4
	52	95	93	94	4.7
pH 6	28	28	18	20	13.2
	10	67	60	66	7.3
	48	98	96	99	3.7
pH 7	10	29	19	23	11.0
	28	63	58	58	8.9
pH 8	21	21	19	16	7.8

表 2

在形成羧酸之前，D-海藻糖的伯 OH 被氧化为醛。在不同氧化程度下进行的醛测定表明，在较高的氧化程度下能获得较低的醛值。

实施例 4 没有 pH 控制的情况下氧化海藻糖（比较实施例）

在实验室试验中，用大豆过氧化物酶/过氧化氢和 TEMPO（来自 Aldrich）作为介体，来进行海藻糖氧化。使用下述条件：

- 干物质 D-海藻糖：40% d.s.
- 摩尔比 TEMPO/伯 OH：1/70
- 大豆过氧化物酶（OrganicTec™）：5 000 单位/mol 伯 OH
- 过氧化氢（30% Perhydrol™）：2.4 mol/mol 伯 OH，加入时间超过 52 小时
- 反应温度：25 °C

不用 pH 控制的情况下，我们发现，仅有 9%的海藻糖被氧化，而 83%的海藻糖都还留在溶液里。

实施例 5 用非油料种子的过氧化物酶进行氧化（比较实施例）

按照 1/40 的 TEMPO/伯 OH 摩尔比，向 40% ds 的 20 g 海藻糖溶液中加入 TEMPO（来自 Aldrich）。辣根过氧化物酶（来自 Fluka）作为过氧化物酶以 10 000 U/mol 伯 OH 的剂量使用。

氧化在 25°C 进行。按照 0.01 ml/分钟的流速加入过氧化氢（30% Perhydrol™）。通过加入 4 M NaOH 将 pH 保持为 pH 7。1 小时的反应之后，过氧化氢浓度超过 25 ppm。反应持续最多 49 小时，总共加入

29.3 ml 过氧化氢，消耗 0.6 ml 的 NaOH。HPLC 分析显示了 0.7%的氧化。因此，如果使用辣根过氧化物酶的话，没能获得显著的氧化。