



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102257011 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 200980150833. 3 *A23K 1/06* (2006. 01)
(22) 申请日 2009. 12. 18 *A23L 1/09* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *A61K 31/715* (2006. 01)
20080665 2008. 12. 18 FI *A61K 36/064* (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日 *C12P 19/04* (2006. 01)
2011. 06. 16 *C12N 1/16* (2006. 01)
(86) PCT申请的申请数据
PCT/FI2009/051017 2009. 12. 18
(87) PCT申请的公布数据
W02010/070207 EN 2010. 06. 24
(71) 申请人 格莱科斯芬兰公司
地址 芬兰赫尔辛基
(72) 发明人 朱哈尼·沙里宁 里特瓦·尼玛拉
贾里·何琳 贾里·纳图宁
尤卡·希尔图宁
(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262
代理人 申基成 郑霞
(51) Int. Cl.
C08B 37/00 (2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 33 页 附图 6 页

(54) 发明名称

通过酵母细胞的碱水解和酸水解生产包含葡聚糖和甘露聚糖的糖类组合物

(57) 摘要

本发明涉及制备包含糖类成分的免疫刺激组合物, 该方法包括酵母细胞的水解和回收可溶成分的步骤。由此获得的包含糖类成分的组合物可作为食品或饮料组分掺入, 或可用作治疗特定疾患的药物。

1. 制备含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的方法,包括以下步骤:
 - i) 提供酵母细胞材料,
 - ii) 使所述酵母细胞材料经受碱水解和酸水解的步骤,以从酵母细胞材料释放甘露聚糖和葡聚糖,且任选地中和所获得的材料和 / 或任选地对所述材料脱盐,
 - iii) 从步骤 ii) 获得的材料分离可溶和不溶成分,并且任选地
 - iv) 使步骤 iii) 的可溶成分经受进一步的分级分离步骤,其中可溶成分包括甘露聚糖和 β -1,6 葡聚糖,且其中可溶成分基本上无臭无味。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中步骤 ii) 中获得的材料进一步与水溶液接触,并优选地在所述水溶液中混合。
3. 一种制备含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的方法,包括以下步骤:
 - i) 提供酵母细胞材料,
 - ii) 使所述酵母细胞材料在 pH 约 9 至 14 和约 10° 至 100°C 的温度经受碱水解约 10 分钟至 18 小时,且在 pH 约 1.5 至 4 和约 30° 至 100°C 的温度经受酸水解约 1 至 48 小时,中和所述材料,任选地使所述材料与水溶液接触,
 - iii) 从所获得的材料分离可溶成分,
 - iv) 任选地使步骤 iii) 的可溶成分经受超滤分级分离,且
 - v) 任选地缩减经超滤的成分成固体材料。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述碱水解在 pH 约 9 至 13 和约 10° 至 90°C 的温度持续约 10 分钟至 8 小时,且所述酸水解在 pH 约 2 至 3 和约 30° 至 90°C 的温度进行约 3 至 48 小时。
5. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述碱水解在 pH 约 9 至 13 和约 50°C 至 100°C 的温度持续约 0.5h 至 8 小时,且所述酸水解在 pH 约 2 至 3 和约 60°C 至 90°C 的温度进行约 1 至 4 小时。
6. 如权利要求 3 所述的方法,其中碱水解通过用 pH 9-13 的碱溶液洗涤 0.1 至 3h 来进行,更优选在 10-45°C 下进行。
7. 如权利要求 3 所述的方法,其中碱水解在 pH 9-12.5, 1h 至 12h 的反应时间,和 60-100 摄氏度的温度范围下进行。
8. 如权利要求 3 所述的方法,其中碱水解在 pH 11.5-14, 1h 至 12h 的反应时间,和 60-100 摄氏度的温度范围下进行。
9. 一种可溶酵母甘露聚糖组合物,其中糖类成分包括 0.001-10%、更优选 0.005-5%、且更加优选 0.01-3%、且最优选 0.01-1.5% 干重的 β 1-6 葡聚糖。
10. 如权利要求 9 所述的组合物,其中所述组合物包括 5-25% 或 10-20% w/w 干重的甘露聚糖,且 β 6- 葡聚糖或 β - 葡聚糖的量小于 5% w/w 干重。
11. 如权利要求 9 或 10 所述的组合物,其中所述组合物包括至少约 80mol % 的大于 5000Da 的材料和最高 20mol % 的分子量在 1000 和 5000Da 之间的材料。
12. 如权利要求 9-11 所述的组合物,其中包含 Man α 3Man α 2 的糖类的量是所有甘露糖表位的至少 5%,且所述组合物基于质子 H1 信号积分,具有至少约 0.95 的甘露聚糖 / 淀粉比,和至少约 0.5 的甘露聚糖 / 多肽比。
13. 如权利要求 9-11 中任一项所述的组合物,其中所述组合物由权利要求 3-8 中任一

项的方法制备。

14. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述糖类成分包括小于 0.1% w/w 的 β -1,3 葡聚糖干物质,或基本上不含 β -1,3 葡聚糖,或 β 1,3 聚糖的量小于 β 1,6 葡聚糖的量的 30%。

15. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中甘露聚糖和 / 或葡聚糖具有至少 1,000Da 的分子量,或通过用至少 500Da 截留的膜超滤可分离的成分的去除来获得。

16. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述膜的截留是至少 1000Da 或 3000Da。

17. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述方法在步骤 iii) 之前包括至少一个分离步骤。

18. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中不溶和可溶组分在步骤 ii) 之前分离,并在水解后合并。

19. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中不溶和可溶组分在水解步骤之间分离,且在水解后合并。

20. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中任何步骤的材料被热处理,和 / 或机械处理、气动处理和 / 或流体静力学处理。

21. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中来自步骤 i)-iv) 任一步的材料用酶处理。

22. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述碱水解在约 9 至约 13,优选约 11 至 13 之间,且更优选约 12 和 13 之间的 pH 下进行。

23. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述酸水解在约 1 至 4 的 pH 下,优选在 pH 约 2 至约 3 下进行。

24. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述碱水解在约 10°C 至约 90°C,优选约 55°C 至 90°C,或约 25°C 至 55°C 的温度下进行。

25. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述碱水解进行 30 分钟至 12 小时,优选 1 至 6 小时,更优选 1 至 3 小时,且最优选约 2 小时。

26. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述酸水解在约 30°C 至约 90°C,优选约 55°C 至 90°C,或约 40°C 至 55°C 的温度下进行。

27. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述酸水解进行 1 至 48 小时,2 至 6 小时,优选 3 至 5 小时,且最优选约 4 小时。

28. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述碱水解在约 9 至约 13 的 pH,约 70° 至约 90°C 的温度下进行 3 至 5 小时。

29. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述酸水解在约 2 至约 3 的 pH 和约 70° 至约 90°C 的温度下进行 3 至 5 小时。

30. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述酵母细胞材料在 70°C 至 100°C 的温度下处理 2 至 8 小时。

31. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述可溶糖类成分从可溶成分分级分离、离析、分离或纯化。

32. 一种制备含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的方法,包括以下步骤:

i) 提供酵母细胞材料,

ii) 使酵母细胞材料在 pH 约 9 至 13 和约 10° 至 90°C 的温度经受碱水解约 10 分钟至 8 小时,且在 pH 约 2 至 3 和约 30° 至 90°C 的温度经受酸水解约 3 至 48 小时,中和所述材料,任选地使所述材料与水溶液接触,

iii) 从所获得的材料分离可溶成分,

iv) 使步骤 iii) 的可溶成分经受超滤分级分离,且

v) 缩减超滤的成分成固体材料。

33. 权利要求 32 所述的方法所制备的组合物,其中所述糖类成分包括 1,6-连接的葡萄糖单体和甘露聚糖,且其中 1,6-连接的葡萄糖单体和甘露聚糖的比是 1 比 40,或优选小于 1 比 20。

34. 如权利要求 33 所述的组合物,其中所述糖类成分包括例如 0.001-10%,优选 0.005-5%,更优选 0.01-3%,且最优选 0.01-1.5% 干重的 β 1-6 葡聚糖,和例如 1.0-50%,优选 2-50%,更加优选 3-50%,更加优选 4-50%,更加优选 4-40%,更加优选 5-35%,更加优选 5-25%,且最优选 10-20% w/w 干重的甘露聚糖。

35. 根据权利要求 1 所述的方法获得的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物。

36. 一种可溶免疫刺激组合物,其含有糖类成分,且其中糖类成分包括甘露聚糖和 β -1,6 葡聚糖和小于 1% 的 β -1,3 葡聚糖干物质,且优选地 β 3-葡聚糖的量小于 β 3-葡聚糖的 50%,且其中所述组合物基本上无臭无味。

37. 如权利要求 35 或 36 所述的组合物,其中所述组合物包括 0.001-10%,优选 0.005-5%,更优选 0.01-3%,且最优选 0.01-1.5% 干重的 β 1-6 葡聚糖,和 / 或其中所述组合物包括 1-50%,优选 2-50%,更优选 3-50%,更加优选 4-50%,更加优选 4-40%,更加优选 5-35%,最优选 5-25% 或 10-20% w/w 干重的甘露聚糖,和 / 或其中所述组合物包括比为 14 : 0.32,或高于 40 : 1 的甘露聚糖 : 葡聚糖。

38. 如权利要求 35 或 36 所述的组合物,其中所述组合物包括至少约 14% w/w,优选至少约 15% w/w,且最优选至少约 22% w/w 组合物干重的量的可溶 β -葡聚糖和甘露聚糖。

39. 如权利要求 35 或 36 所述的组合物,其中所述甘露聚糖和葡聚糖具有至少 500Da,优选至少 1000Da 的分子量。

40. 如权利要求 35 或 36 所述的组合物,其中当 5000 的 Mw 标志在约 10.5 分钟、Mw 标志在约 15.8 分钟从 Superdex Peptide 10/300GL 柱洗脱,且总洗脱体积为 18ml,柱长度 30cm,且糖类作为还原末端的二氨基苯标记的结构进行分析时,所述组合物包括在空体积和 5000Da 的己糖多糖 Mw 标志位置之间洗脱的葡聚糖和甘露聚糖糖类材料作为主要部分,和任选地,在 1000 和 5000Da 的 Mw 标志之间洗脱的材料作为次要部分。

41. 如权利要求 35 所述的组合物,其中所述组合物包括约 80mol% 的大于 5000Da 的材料,和约 20mol% 在 1000 和 5000Da 的 Mw 标志之间洗脱的材料,和 / 或其中所述组合物包括至少约 91% (w/w)、更优选至少 95% w/w 的大于 5000Da 的可溶甘露聚糖材料,和 / 或其中所述组合物包括小于 10%,更优选小于 5% w/w 的 Man α 3Man α 2-甘露糖寡糖,或作为来自总 Man α 3Man α 2-甘露糖糖类的非衍生糖类在 12-16 分钟之间洗脱的其他甘露糖糖类。

42. 如权利要求 35 至 41 任一项所述的组合物,其中所述组合物包括末端 Man α 3(Man α 2)_mMan α 6- 和 Man α 2Man α 6- 和 Man α 2(Man α 2)_nMan α 6 结构,其中 m 和 n 独立为 1 至 10 的整数,并且 Man α 6 结构可以形成包含 Man α 6 残基聚合物的多价载体,并且

优选地,存在大约等摩尔量的 Man α 2- 和 Man α 3- 非还原末端结构,优选类似于 NMR 谱中观察到的。

43. 如权利要求 42 所述的组合物,其中所述结构的分子量高于 5000Da,且材料是水溶性的。

44. 根据权利要求 1 的方法或通过对所述成分进一步的纯化步骤获得的可溶糖类成分。

45. 如权利要求 44 所述的糖类成分,其中包含 Man α 3Man α 2 的糖类的量是至少 5%,优选至少 10%,更优选至少 20%,且最优选至少 25%。

46. 一种食品补充剂、药物或营养制品,包括权利要求 9-13 和 33-43 中任一项所述的组合物。

47. 一种治疗组合物,包括根据权利要求 9-13 和 33-43 中任一项的组合物,所述治疗组合物选自以下的组:药品、具有药物活性的临床营养组合物、用作药品的具有药物活性的营养治疗组合物。

48. 根据权利要求 47 所述的治疗组合物,其中所述组合物用于预防或治疗其中需要免疫调节活性或抗粘连活性的疾病。

49. 权利要求 9-13 和 33-43 中任一项的组合物用于制备治疗传染病或通过免疫调节可治疗的疾病的药物中的用途。

50. 一种治疗方法,包括向患者施用权利要求 47 或 48 的治疗组合物的步骤。

51. 一种动物饲料,包括权利要求 9-13 和 33-43 中任一项所述的组合物。

通过酵母细胞的碱水解和酸水解生产包含葡聚糖和甘露聚糖的糖类组合物

[0001] 本发明涉及制备包含糖类成分 (fraction) 的免疫刺激组合物的方法,该方法包括酵母细胞的水解和回收可溶成分的步骤。由此获得的包含糖类成分的组合物可作为食品或饮料组分掺入,或用作用于治疗具体疾患的药物。

[0002] 发明背景

[0003] 葡聚糖,特别是 β (1-3)-葡聚糖,已经被非常广泛地研究,并已显示出具有多种药理活性,包括但不限于,抗胆固醇血症活性、降血糖活性 (hypoglycaemic activity) 和对免疫系统的刺激。因为这一原因,包含 β -葡聚糖的产物已经被用作家禽、动物、鱼或甲壳动物生产中的食品添加剂。葡聚糖是不溶性聚合物。本发明揭示了包含增加量的水解的水溶性酵母糖类和其他可溶分子的新的酵母衍生材料。

[0004] 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的细胞壁主要包括 β -连接的葡聚糖,其主要是 β (1-3)-连接的葡萄糖单元的骨架,具有经 β (1-6)-键分支的分子间和分子内的次要组分。现有技术中的酵母葡聚糖大部分是不溶于水的聚合物。本发明揭示包含增加量的不同水溶性水解酵母糖类和可溶 α -甘露糖材料以及具有特定分子大小的其他可溶分子的新的酵母衍生材料,所述不同水溶性水解酵母糖类包括包含 β 6-连接的葡萄糖作为主要结构的特定聚合物材料。

[0005] 现有技术的酵母衍生材料已经描述为包括不溶性糖蛋白,或可能为寡糖的甘露聚糖。本发明揭示了主要在低分子量多糖范围内的具有特定分子大小的新 α -甘露糖材料。在优选的实施方案中,可溶性 α -甘露糖材料是主要的糖组分。新的成分还具有有用的特征,包括透明性、减少的味道和气味,特别是在由来自生产啤酒的废酵母产生酵母时。

[0006] 因为在食品和酿酒工业以及工业级乙醇的生产中酵母的非常广泛的使用,废酵母细胞是主要的工业副产物。酵母衍生的产物自身具有相当大的商业价值,例如在诸如酵母提取物、调味剂、鲜味剂 (诸如单磷酸鸟苷和单磷酸肌酐) 的产品中,在酶、精细化学品和用于生物化学和制药工业的产品 (诸如海藻糖、胸苷、核苷和核苷等) 的制造中。来自酿酒工业的废酵母是 β -葡聚糖的主要来源。

[0007] 此外,酵母的其他种类也用作 β -葡聚糖或含有甘露糖的聚糖的来源,包括但不限于酿酒酵母的其他酵母菌株,食品和饮料发酵过程中使用的其他酵母,诸如酵母属 (*Sacchromyces species*),包括例如卡尔酵母 (*Saccharomyces carlsbergiensis*)、脆壁克鲁维酵母 (*Kluyveromyces fragilis*) 和念珠菌属菌株,诸如产朊假丝酵母 (产朊假丝酵母)。所有这些酵母菌株的产生可通过分批发酵或连续发酵,使用在食品级营养物中培养。

[0008] 由酵母和其他生物体产生 β -葡聚糖已经被广泛研究,且已知多种方法。这些方法中大多数依赖于 β (1-3)-葡聚糖在碱或在有机溶剂中的不溶性。主要已知的方法是:

[0009] (a) 用浓氢氧化钠高温提取,随后用酸高温提取,并用乙醇沉淀 (例如 Manners, D. J. 等人, *Biochem. J.* 135:19-30 (1973), Jamas, S. 等人, 美国专利号 4, 810, 646、5, 028, 703 和 5, 250, 436)。这些程序中许多需要酵母细胞的预均化,且许多需要每个提取步骤的多次重复。

[0010] (b) 用浓氢氧化钠提取, 随后用酸高温提取, 并且酶处理以修饰或纯化葡聚糖 (参见例如 Masler, L. 等人的捷克专利申请号 890038, 其报道了通过碱-酸提取纯化 β -D-葡聚糖, 随后用具有淀粉酶活性的酶处理)。

[0011] (c) 源自浓苯酚: 水 (1 : 1) 自溶或酶降解酵母的酵母细胞壁制品提取 (参见 Truscheit, E. 等人例如美国专利号 4, 138, 479)。

[0012] (d) 用诸如异丙醇、乙醇、丙酮或甲醇的有机溶剂单独或在碱存在下提取 (参见例如日本专利公开号 7051081、6340701、5295003 和 3002202 ; 欧洲专利申请号 515216)。

[0013] 已知酸治疗减少葡聚糖材料中的 β (1-6)- 键的数目, 并且这导致粘度增加。

[0014] 酵母的细胞壁主要包括:

[0015] (i) 具有 β (1-6)- 连接的葡聚糖的侧链的丝状不溶于碱的 β (1-3)- 连接的葡聚糖。

[0016] (ii) 具有 β (1-6)- 连接的葡聚糖的侧链的可溶于碱的 β (1-3)- 连接的葡聚糖。

[0017] (iii) 具有间隔 β (1-3)- 键的无定形可溶于酸的 β (1-6)- 葡聚糖。

[0018] (iv) 连接于蛋白质的无定形可溶于碱的甘露聚糖。

[0019] 分离 β - 葡聚糖的现有方法通常使用多步骤碱-酸提取过程。碱提取步骤去除了大多数无定形甘露糖蛋白和葡聚糖材料, 且随后的酸提取步骤除去糖原, 并从主要的丝状 β (1-3) 连接的葡聚糖除去大部分 β (1-6) 侧链。最终的溶剂提取步骤有时用于除去脂质。

[0020] 葡聚糖方法包括强碱提取和任选地弱酸处理, 以获得主要不溶的 β 3- 连接的葡聚糖。本发明包括产生更易溶的材料的首选在升高的温度下的更有效的酸水解, 和增加溶解的碱水解, 碱性反应被用于提取碱性可溶材料, 但没有除去而是保留了可溶成分。本发明还包括分离和 / 或分级分离步骤, 以除去例如包括 β 3- 葡聚糖的不溶材料, 且任选地将该不溶材料再循环到水解步骤, 以产生更加易溶的糖, 并除去低分子量材料, 诸如单糖, 或低分子量寡糖, 或实际上所有的寡糖, 并除去盐。应了解, 酸和碱处理产生盐。

[0021] 清楚地是, 考虑到用于一些应用的葡聚糖的零售价格, 使用现有公开的或授予专利的方法生产葡聚糖的成本不是商业上可行的。这些方法具有至少一个主要缺点, 它们的目标是仅产生丝状不溶于碱形式的葡聚糖。细胞壁中存在的其他形式的葡聚糖和甘露聚糖以过程的副产物被除去。这些表明可具有显著增加的葡聚糖收率, 且可以是功能上重要的额外量的葡聚糖。此外, 在水解处理之后或之间, 除去可溶组分, 而保留不溶的大部分 β (1-3) 葡聚糖。本发明的制备方法可用于产生可溶的 β 6- 葡萄糖连接结构, 其包括糖或糖类材料, 用于或用作免疫刺激和 / 或调节组合物。增加的溶解度和 β 3- 葡聚糖结构的量的减少可区别本可溶材料和已知的含 β - 葡萄糖的材料。

[0022] 甘露聚糖是包含甘露糖单元的聚合物。在酵母中, 甘露聚糖与酵母细胞壁的外表面中的蛋白作为 muscigenous 多糖缔合, 并与细胞内膜中的蛋白缔合。其通常占细胞壁干重的约 20-50%。甘露聚糖以寡聚物或聚合物连接于核肽链。复合物含有约 5-50% 的蛋白质。寡聚甘露聚糖直接键合于丝氨酸和苏氨酸, 而聚合甘露聚糖经 N- 乙酰葡糖胺键合于天冬酰胺。在甘露糖蛋白复合物中, 甘露糖单元通过 α -1,6、 α -1,2 和 α -1,3- 键连接。本发明产生浓缩的可溶甘露聚糖和甘露糖聚糖, 它们具有有用的生物活性和在 NMR 分析中不同的特征。

[0023] 已显示甘露聚糖-寡糖 (MOS) 通过蛋白水解作用从酵母细胞壁释放。蛋白水解产

生的甘露聚糖可具有高分子量,含有变应原蛋白,并可能具有大的分子量和差的溶解度。这种释放的 MOS 类型产品具有有限的有用性。在一个具体的实施方案中,本方法可包括额外的酶促和蛋白水解的步骤。应认识到,本方法中碱水解 β -消除 O-连接的和 / 或 N-连接的甘露糖糖肽。还应理解,该肽材料可具有产物结构的不利影响,并甚至具有不利的免疫影响。

[0024] 根据本发明的更易容和有用的甘露聚糖有效结合肠道的细菌性病原体,并阻断它们在肠道中定居 (colonize) 的能力。例如大肠杆菌 (*E. coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella* spp.) 和霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*) 在它们表面具有结合甘露聚糖的甘露糖糖残基的蛋白质 (凝集素)。本发明揭示了新的活性糖类组合物,其包括大多数具有大于寡糖的分子量的聚糖,并能够多价和寡价 (oligovalent) 呈递的寡糖表位。本方法还产生用于病原体结合的大量的有用末端寡糖序列。寡价和多价糖表位用于针对感染的抗粘连疗法和治疗或用于与细胞表面凝集素受体的相互作用的有用性是本领域公知的,且经常综述于例如 K-A. Karlsson 和 Beachey 1981 的 Nathan Sharon 的出版物中 (Beachey, E. H. (1981) *J. Infect. Dis.* 143, 325-345)。多价聚糖用于抗粘连,以防止病原体对患者组织的结合。通过定义,寡糖含有小于 10 个单糖残基, M_w 小于 1700,而本材料含有大量大于约 5000Da 的糖。本材料用于对抗病原体,和有害微生物,因为高化合价提高新的甘露糖聚糖的结合和溶解度。

[0025] 本领域明确需要糖类成分提取的快速和便宜的方法,其避免损失可溶于碱的葡聚糖和甘露聚糖,提高了葡聚糖和甘露聚糖的回收,并产生生物活性制品。

[0026] 目前,我们已经惊奇地发现,含糖类成分的可溶免疫刺激组合物可使用包含简单的两次水解步骤的程序分离,并获得具有高免疫刺激活性的可溶产品的出色收率。水解可补充有酶或其他剂的处理,或机械、气动或流体静力处理,或热处理,且必要时,糖类成分的性质可通过酸处理、均化程度或通过改变使用的酶的类型来调整。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1. 生产根据本发明的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的过程的一个实施方案的流程图。

[0029] 图 2. 生产根据本发明的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的过程的另一个实施方案的流程图。

[0030] 图 3. 可溶糖组分通过 NMR 的定量。将如实施例 1 所示制备的材料 (A) 和商业上的酸水解的酵母材料的样品 (B) 溶解于重水。加入 $0.5 \mu\text{mol}$ 苯丙氨酸甲酯 (PheCOOMe) 作为定量标准。示出通过积分定量的 PheCOOMe 质子和酵母甘露聚糖的信号。

[0031] 图 4. 在 336nm 分析 2-AB 衍生糖类成分的 Superdex Peptide 色谱。在该系统中, 2-AB 衍生葡聚糖 5000 和葡聚糖 1000 标准品分别在 10.5 分钟和 15.8 分钟洗脱。如图所示,由色谱面积计算 $MW > 5000\text{Da}$ 和 1000-5000Da 的材料的相对丰度。

[0032] 发明概述

[0033] 本发明涉及制备含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的方法,包括以下步骤:

[0034] a) 提供酵母细胞材料,

[0035] b) 使所述酵母细胞材料经受碱水解和酸水解的步骤,以从酵母细胞材料释放甘露聚糖和葡聚糖,且任选地中和所获得的材料和 / 或任选地对所述材料脱盐,

[0036] c) 从步骤 ii) 获得的材料分离可溶和不溶成分,并且任选地

[0037] d) 使步骤 iii) 的可溶成分经受进一步的分级分离步骤,其中可溶成分包括甘露聚糖和 β -1,6 葡聚糖,且其中可溶成分基本上无臭无味。

[0038] 优选地,本发明涉及该方法,其中酵母细胞材料首先用酸处理。

[0039] 优选地,本发明涉及该方法,其中步骤 ii) 中获得的材料进一步与水溶液接触,并优选地在所述水溶液中混合。

[0040] 优选地,本发明涉及该方法,其中酵母细胞材料是干含量的约 5% 至 50%,10% 至 30%,优选 15% 至 25%,更优选 17% 至 23%,更加优选 19% 至 21%,且最优选约 20%。

[0041] 优选地,本发明涉及该方法,其中糖类成分包含小于 0.1% w/w β -1,3 葡聚糖干物质,或基本上不含 β 1,3 葡聚糖,或 β 1,3 葡聚糖的量小于 β 1,6 葡聚糖的量的 30%。

[0042] 优选地,本发明涉及该方法,其中甘露聚糖和 / 或具有至少 1,000Da 的分子量,或通过用至少 500Da 截留的膜超滤可分离的成分的去除来获得。

[0043] 优选地,本发明涉及该超滤方法,其中所述膜的截留是至少 1000Da 或 3000Da。

[0044] 优选地,本发明涉及该方法,其中步骤 iv) 的可溶成分被浓缩。

[0045] 优选地,本发明涉及该方法,其中浓缩用超滤进行。

[0046] 优选地,本发明涉及该方法,其中所述碱水解在约 9 至约 13,优选约 11 至 13 之间,且更优选约 12 和 13 之间的 pH 下进行。

[0047] 优选地,本发明涉及该方法,其中所述酸水解在约 1 至 4 的 pH 下,优选在 pH 约 2 至约 3 下进行。

[0048] 本发明涉及制备含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的方法,包括以下步骤:

[0049] i) 提供酵母细胞材料,

[0050] ii) 使酵母细胞材料在 pH 约 9 至 13 和约 10° 至 90°C 的温度经受碱水解约 10 分钟至 8 小时,且在 pH 约 2 至 3 和约 30° 至 90°C 的温度经受酸水解约 3 至 48 小时,中和所述材料,任选地使所述材料与水溶液接触,

[0051] iii) 从所获得的材料分离可溶成分,

[0052] iv) 使步骤 iii) 的可溶成分经受超滤分级分离,且

[0053] v) 缩减 (reducing) 经超滤的成分成固体材料。

[0054] 优选地,本发明涉及该方法,其中所述可溶糖类成分从可溶成分分级分离、离析、分离或纯化。在优选的实施方案中,这些被称为进一步纯化。

[0055] 优选地,本发明涉及该方法,其中分级分离、离析、分离或纯化的进行通过选自以下组成的组的方法或方法的任何组合:

[0056] 选自以下组成的组的色谱方法:带电和或亲脂(疏水)杂质的吸收色谱、分子排阻色谱、基质结合糖类的亲和色谱和 / 或相分离溶液方法;和 / 或

[0057] 离心。

[0058] 本发明涉及根据本发明的方法获得的可溶糖类成分和根据该方法获得的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物,该方法任选地包括进一步的纯化步骤。

[0059] 本发明涉及可溶免疫刺激组合物,其含有糖类成分,且其中糖类成分包括甘露聚糖和 β -1,6 葡聚糖和小于 1% 的 β -1,3 葡聚糖干物质,且优选地 β 3- 葡聚糖的量小于 β 3- 葡聚糖的 50%,且其中所述组合物基本上无臭无味。

[0060] 本发明涉及可溶免疫刺激组合物,其中所述组合物包括干重的 0.001-10%,优选

0.005-5%，更优选 0.01-3%，且最优选 0.01-1.5% 的 β 1-6 葡聚糖。

[0061] 本发明涉及可溶免疫刺激组合物，其中所述组合物包括 1-50%，优选 2-50%，更优选 3-50%，更加优选 4-50%，更加优选 4-40%，更加优选 5-35%，最优选 5-25% 或 10-20% w/w 干重的甘露聚糖。

[0062] 本发明涉及可溶免疫刺激组合物，其中所述组合物包括比为 14 : 0.32，或高于 40 : 1 的甘露聚糖：葡聚糖，或一种或多种 β 6- 葡聚糖，或基于干重优选小于 20% w/w，更优选小于 10% w/w，更优选小于 5% w/w，更优选小于 4%，更加优选小于 3.5%，更加优选小于 2.5%，最优选小于 2.3% 的甘露聚糖。

[0063] 本发明涉及可溶免疫刺激组合物，其中所述组合物包括至少约 14% w/w，更优选至少约 15% w/w，且更优选至少约 22% w/w 组合物干重的量的可溶 β - 葡聚糖和甘露聚糖。

[0064] 本发明涉及可溶免疫刺激组合物，其中所述甘露聚糖和葡聚糖具有至少 500Da，更优选至少 1000Da 的分子量。

[0065] 本发明涉及可溶免疫刺激组合物，其中当 5000 的 Mw 标志在约 10.5 分钟、Mw 标志在约 15.8 分钟从 Superdex Peptide 10/300GL 柱洗脱，且总洗脱体积为 18ml，柱长度 30cm，且糖类作为还原末端的二氨基苯甲酰胺标记的结构进行分析时，所述组合物包括在空体积和 5000Da 的己糖多糖 Mw 标志位置之间洗脱的葡聚糖和甘露聚糖类材料作为主要部分，和任选地，在 1000 和 5000Da 的 Mw 标志之间洗脱的材料作为次要部分。

[0066] 本发明涉及可溶免疫刺激组合物，其中所述组合物包括约 80mol% 的大于 5000Da 的材料，和约 20mol% 在 1000 和 5000Da 的 Mw 标志之间洗脱的材料。

[0067] 本发明涉及可溶免疫刺激组合物，其中所述组合物包括至少约 91% (w/w)、更优选至少 95% w/w 的大于 5000Da 的可溶甘露聚糖材料。

[0068] 应理解，包括可溶的，尤其是溶解度为 1% 水溶液的称为甘露聚糖的聚合 α - 甘露糖糖类的组合物不是公知的。聚合物通常大于 10-mer，其为诸如“MOS 产物”的寡糖限制。本发明还揭示了新的可溶聚合 6- 葡聚糖和它们与甘露聚糖的浓缩组合物。

[0069] 本发明人具有先前 PCT 申请，描述了优化的酸溶质化的酵母产品，与这些相比，本发明揭示了具有高于 14% 或甚至更高的较高的甘露聚糖和 β 6- 葡聚糖的糖含量的材料，而先前申请具有约 2% 的甘露糖材料。为了通过相同方法提供更加准确的定量，先前的酸水解产物通过图 3 和实施例 2 中的 NMR 对比，显示出先前的材料仅含有约 12% 的本发明的甘露糖材料。此外，当先前的材料含有至少 10% 甘露糖寡糖时，在优选的成分中，本材料实际不含有寡糖，因此通过包含碱 / 碱性水解的新过程，最有用的多价甘露聚糖的量增加了约 10 倍。本发明还揭示了相对于甘露聚糖 β 6- 葡聚糖比相似地增加的较高甘露聚糖量，并由此改变组合物。

[0070] 尽管来自发酵工业的废酵母在本发明的方法中特别有用，但应清楚地理解，本发明适用任何来源，诸如在食品和发酵工业中使用的其他酵母。这些包括但不限于在粘性赋予剂、乳化剂、纤维、薄膜、包衣物质、亲和色谱和凝胶电泳的支持体的制备中使用的酵母、细胞培养基中使用的酵母、滤板中使用的酵母和粘固剂中使用的酵母。它们还广泛用作食品增稠剂，并用作膳食纤维的来源，并用作药品中的载体和包衣剂。本发明涉及源自用于人类食品或饮料生产的发酵过程的酵母。优选类型的酵母包括源自酒精工业的酵母，在优选的实施方案中，源自酿酒厂酵母和 / 或源自红酒工业 (vine industry) 的酵母，在另一个优

选的实施过程中,源自啤酒生产过程的酵母残渣 / 废酵母。

[0071] 术语“酵母”在本文中指具有用于通过根据本发明的方法制备免疫刺激聚糖 / 糖类组合物的糖的可培养真核微生物,在优选的实施过程中,酵母是真菌物种。

[0072] 本领域技术人员将能够容易地确定最合适的条件,在该条件下,本发明的过程可适用于其他酵母属。

[0073] 本领域技术人员将注意到,对于使用本发明的方法制备的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的一些应用,有利地以干形式提供。对该制品适当的干燥是通过任何合适的方法,包括但不限于冷冻干燥、滚筒转鼓式干燥、烘箱干燥、喷雾干燥、环式干燥 (ring-drying) 或使用薄膜形成设备干燥,并且该制品可不经进一步的加工而使用,或可使用任何合适的技术碾磨成优选小于 20 微米的粒度。对于其他应用,诸如粘稠的糊的湿产品是合适的,且该制品可不经进一步的加工而使用,或在增加其粘性和减少粒度的机械破碎后使用。

[0074] 根据一个方法,本发明提供了通过本发明的方法制备的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物。根据本发明的干形式的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物优选包括 β 1-6 葡聚糖 (例如干重的 0.001-10%,更优选 0.005-5%,且最优选 0.01-3%,且最优选 0.01-1.5%) 和甘露聚糖 (例如干重的 1-50%,更优选 2-50%,更加优选 3-50%,更加优选 4-50%,更加优选 4-40%,更加优选 5-35%,且最优选 5-25%,更加优选 10-20% w/w 之间),其优选地为水溶形式,具有根据本发明的 NMR 特征。

[0075] 该制品或组合物可优选包括 β 1-6 和 1-4,更优选 β 1-6 葡聚糖和甘露聚糖,和小于 8% 或优选基本上没有 β 1-3 葡聚糖,或含有少量量的 β 1-3 葡聚糖。该组合物包括优选小于 50% 的 β 1-6 葡聚糖的量的 β 3 葡聚糖,更优选小于 30% 的 β 1-6 葡聚糖的量的 β 3 葡聚糖,更加优选小于 25% 的 β 1-6 葡聚糖,优选从 5 至 25% 的 β 6- 葡聚糖的量的 β 3 葡聚糖。在优选的实施过程中,通过积分 NMR 谱的信号分析糖类的量。

[0076] 可单独使用含糖类成分的可溶免疫刺激组合物。然而,最常见地,将提供与其他组分结合的该组合物。

[0077] 因此,在本发明的一个方面,优选地实施方案包括但不限于用于营养品或治疗的组合物,优选包括例如食品组合物、食品补充剂组合物、膳食组合物、药物组合物 (包括处方和 OTC 药物组合物)、临床营养组合物、局部药物组合物、天然药物组合物、营养组合物和营养添加剂。本组合物的目标是被需要该组合物的受治疗者或患者,优选被人类或动物,且最优选被人类受治疗者使用。

[0078] 本发明还涉及新的糖类成分在制备药物组合物和 / 或治疗组合物和 / 或营养组合物中的用途,优选当组合物的目标是用于需要免疫调节或免疫刺激或抗感染治疗的受治疗者或患者。

[0079] 因此,在本发明的这一方面,优选的实施方案还包括但不限于优选猫或狗的宠物动物、牛、猪、家禽、鱼、甲壳动物或贝壳类动物的饲料组合物,其包含含有本发明的糖类成分的可溶免疫刺激组合物和抗感染组合物,以及一种或多种兽医可接受的食物组分;含有本发明的糖类成分以及药学上可接受的载体的可溶免疫刺激组合物;药物组合物,其包含药学活性剂,和含本发明的糖类成分的可溶免疫刺激组合物作为载体或佐剂,或作为固体剂型 (诸如片剂或胶囊) 的包衣。含糖类成分的可溶免疫刺激组合物还可应用于牛、宠物、

家禽或动物的饮用水,或鱼、甲壳动物或贝壳类动物的环境水。

[0080] 本发明的其他实施方案包括动物饲料、食品补充剂、药物和营养制品,它们包含由本发明的方法制备的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物。

[0081] 应清楚地理解,本发明的组合物一般适合于已知 β -葡聚糖和甘露聚糖对其有用的产品。在一些情况下,进一步的纯化可能是需要的或必要的,且如果这样,可使用本身已知的纯化步骤。

[0082] 发明详述

[0083] 还应理解,本文引用的任何数字范围包括从下限值到上限值的所有值。例如,如果浓度范围被陈述为 1%至 50%,则期望诸如 2%至 40%、10%至 30%或 1%至 3%等的值被明确列入本说明书中。这些仅为具体所期望的实例,且列举的最低值和最高值之间的所有可能的数值组合被认为是清楚地陈述于本申请中。

[0084] 除非另外说明,本说明书和权利要求中所使用的表达成分的量、反应条件等的所有数字被理解为在所有的情况中,被术语“约”修饰。因此,除非相反地说明,否则以下说明书和所附权利要求中列出的数字参数都是近似值,其可基于寻求通过本发明获得的所需性质而变化。最后,且并不试图限制与权利要求的范围等同的理论的应用,每个数字参数至少应该依据报告的有效数字的数并通过应用普通舍入技术来解释。

[0085] 本文使用的术语“含糖类成分的免疫刺激组合物”指含有糖类成分的免疫刺激组合物,其刺激(例如具有对脊椎动物淋巴细胞促有丝分裂作用,或诱导或增加脊椎动物淋巴细胞的细胞因子表达,和/或另外活化白细胞,特别是巨噬细胞。

[0086] 本文使用的术语“糖类成分”指通过本发明的方法获得的,并含有源自本发明的酵母细胞材料的糖、寡糖和其他糖分子的可溶成分。

[0087] 如本文和所附权利要求中所用,“味觉”应该指任何味觉,其为咸、苦、甜、酸(sour)、碱、鲜味(umami)、涩、刺激(tangy)、干、辛辣(sharp)、冷、热、灼烧、酸(acidic)、香辣(spicy)、辣(pungent)和/或金属味(metallic)。这种味觉应该包括任何和所有的味觉,以及任何和所有的余味。另外,该列表并未全部包括本领域技术人员所知的。

[0088] 本文使用的术语“基本上无味”指化合物或组合物在开始摄取时,基本上无味。

[0089] 本文使用的术语“基本上无气味”指化合物或组合物在开始鼻接触或通过鼻吸入时,基本上无气味。

[0090] 根据本发明的物质或药物组合物可以任何合适的方式施用,尽管优选使用口服施用。

[0091] 本文使用的术语“治疗”同时指为了治愈或缓解疾病或疾患的治疗,和为了预防疾病或疾患的发展的治疗,还指预防性治疗。在优选的实施方案中,预防性治疗是减少病原体载量的抗粘连预防性治疗,在另一优选的实施方案中,预防性治疗是细胞因子或趋化因子表达增加的免疫调节治疗。治疗可以快速方式或长期方式进行。

[0092] 本文使用的术语“患者”指需要根据本发明的治疗的任何人类或非人哺乳动物。

[0093] 糖的命名基本上依照 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会的推荐。键是指端基异构体结构和键位置,或对于根据本发明的结构,缩短形式例如 β 1,3、 β (1,3) 或 β 1-3、或 β 1-3 或 β 3 的含义相同。假设 Glc(葡萄糖)、Man(甘露糖)、Gal、GlcNAc、GalNAc、NeuAc 和 NeuGc 具有 D 构型,Fuc 具有 L 构型,且所有的糖以吡喃糖形式存在。

[0094] 根据本发明,可将在适合于治疗由于病原体(诸如病毒或细菌)存在引起的疾患的药物组合物中的根据本发明的物质,任选地连同载体引入患者,在优选的实施方案中,引入患者的胃肠道或呼吸道,或将根据本发明的物质用于这种疾患的治疗方法。根据本发明可治疗的疾患的实例是传染病和腹泻。

[0095] 根据本发明的药物组合物还可以包括其他物质,诸如惰性媒介物,或药学上可接受的佐剂、载体、防腐剂等,它们是本领域技术人员公知的。

[0096] 此外,根据本发明的物质可与优选目标为免疫刺激治疗和/或抗粘连治疗的其他药物或治疗物质或组合物一起施用。

[0097] 此外,可使用根据本发明的物质,以通过筛选结合根据本发明的物质的序列,鉴别一种或多种粘附素。所述序列可以是例如蛋白质或糖。糖结合蛋白可以是凝集素或糖结合酶。例如,可通过亲和色谱或亲和交联方法,进行筛选。

[0098] 通过抗粘连的抗感染治疗

[0099] 根据本发明的更加可溶和有用的甘露聚糖有效结合肠道的细菌病原体,并阻断它们定居在肠道的能力。例如,大肠杆菌、沙门氏菌和霍乱弧菌在它们的表面具有结合到甘露聚糖的甘露糖残基的蛋白(凝集素)。一部分发明人已显示人类胃肠道含有结合甘露糖的引起腹泻的病原体(诸如引起腹泻的大肠杆菌)的受体,其还具有结合包含甘露糖聚糖,特别是 Man α 3Man 的结构(PCT FI2003/00528)的受体。本发明揭示了新的活性糖类组合物,其包括大多数具有大于寡糖的分子量的聚糖,并能够多价和寡价(oligovalent)呈递寡糖表位。本方法还产生用于病原体结合的大量的有用末端寡糖序列。寡价和多价糖表位用于针对感染的抗粘连疗法和治疗或用于与细胞表面凝集素受体的相互作用的有用性是本领域公知的,且经常综述于 K-A. Karlsson 和 Beachey 1981 的 Nathan Sharon 的出版物中(Beachey, E. H. (1981) J. Infect. Dis. 143, 325-345)。多价聚糖用于抗粘连,以防止病原体对患者组织的结合。微生物的粘连是感染发病的第一步,其中传染原的粘附素的特异性以及由宿主靶组织的上皮细胞表达的受体结构,诸如聚糖结构,是病原体的宿主范围和组织嗜性的重要决定因素。为了治疗由于病原体存在于患者的胃肠道引起的疾病或疾患,可能使用根据本发明的物质用于抗粘连,即抑制在患者的肠上皮中,病原体对受体的结合。当施用根据本发明的物质或药物组合物时,其将与结合细菌的受体竞争,并且然后,胃肠道中存在的细菌的全部或一些将结合于根据本发明的物质,而不是胃上皮上的受体。然后,附连于根据本发明的物质的细菌将通过肠,并离开患者,产生细菌对患者健康的减少的影响。

[0100] 根据本发明,通过抗粘连和免疫刺激,可治疗由致泻病原体的存在引起的疾病,特别是腹泻。

[0101] 通过免疫刺激的治疗

[0102] 本发明涉及免疫刺激治疗,优选以刺激用于预防病原体的免疫系统。在优选的实施方案中,这一免疫刺激的目标是诱导抗病原体微生物(诸如病毒、细菌和/或真菌)的白细胞,诸如巨噬细胞。在另一个优选的实施方案中,免疫刺激被用于平衡免疫反应,以预防有害的疾患(harmfull contition),诸如自身免疫疾患和/或变应性疾患。免疫刺激的平衡通常涉及特异性 T 辅助淋巴细胞群体的活化和失活。在优选的实施方案中,免疫刺激的介导是通过特异性因子,包括趋化因子或细胞因子分子,诸如白介素和/或干扰素,且免疫刺激的作用可测量为因子的变化,和/或白细胞的抗微生物作用。

[0103] 本文使用的术语“组合物”指可由人口服摄取施用于人的组合物、棒剂、丸剂、胶囊、可由陪伴动物口服摄取施用于陪伴动物的组合物、陪伴动物的补充物、宠物食品、狗粮、猫粮、零食 (treats)、饼干、生皮 (raw hide)、零食 (treats)、口香糖 (chews)、充填剂、肉汁、调味品、饮料、补充水及其组合。组合物可以是潮湿的、含水的和 / 或干的。

[0104] 除非另外说明, 本文使用的所有百分比、份和比是按总组合物的重量计。有关列出的成分的所有这种重量是基于有效水平, 并因此不包括商业上可获得的材料中包含的溶剂或副产物, 除非另外说明。

[0105] 用作酵母细胞材料的本发明的合适酵母属包括但不限于酵母属的酵母菌株和酿酒酵母的酵母菌株 (包括面包酵母菌株和啤酒酵母菌株)、脆壁克鲁维酵母和念珠菌菌株, 诸如产朊假丝酵母, 及其组合。为含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的合适来源的, 用于并用作酵母细胞材料的酵母的其他菌株优选地包括食品级酵母物质, 诸如德尔布酵母 (*Saccharomyces delbruekii*)、玫瑰酵母 (*Saccharomyces rosei*)、微球酵母 (*Saccharomyces microellipsodes*)、卡尔酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、乳酸克鲁维斯酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、多孢克鲁维酵母 (*Kluyveromyces polysporus*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、阴沟念珠菌 (*Candida cloacae*)、热带念珠菌 (*Candida tropicalis*)、吉利蒙念珠菌 (*Candida guilliermondii*)、温奇汉森酵母 (*Hansenula wingei*)、arni 汉森酵母 (*Hansenula arni*)、亨氏汉森酵母 (*Hansenula henricii*)、美洲汉森酵母 (*Hansenula Americana*) 及其组合。这些酵母菌株可使用在食品级营养物中培养, 通过分批发酵或连续发酵来生产。

[0106] 具体地, 根据本发明的方法涉及制备含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的方法。在一个示例性实施方案中, 该方法或生产或过程包括提供酵母细胞材料, 例如啤酒酵母 (通常是干含量的 5% 至 50%, 5% 至 40%, 10% 至 30%, 具体是 15% 至 25%, 且更具体是 17% 至 23% 或 19% 至 21%, 且最优选干含量的约 20%) 的第一步, 随后使酵母细胞材料经受碱和酸的水解步骤, 以从酵母细胞材料释放甘露聚糖和葡聚糖。

[0107] 在优选的实施方案中, 使用啤酒酵母或啤酒酵母膏。这种酵母材料包括植物源不溶材料, 特别是含植物多糖 (诸如半纤维素糖类) 的植物源不溶材料和植物源 β -葡聚糖材料, 诸如谷物 β -葡聚糖, 优选地, 谷物是在酿酒过程中使用的谷物, 最优选大麦。在另一个优选的实施方案中, 由啤酒酵母产生的材料包括大量的啤酒酵母材料, 并不含植物糖类或仅包含少量的植物糖类。在另一个优选的实施方案中, 用基于植物的或植物源的材料发酵的任何酵母适合用作酵母细胞材料。

[0108] 碱水解和酸水解的反应条件

[0109] 本发明涉及能够改善可溶产物的味道和气味的碱反应, 优选当该碱水解与酸水解组合进行时。本发明还涉及碱水解和酸水解的组合, 此时碱处理能够提高可溶甘露聚糖的量, 在优选的实施方案中, 这是通过消除反应引起 N-连接的聚糖的释放, 和 / 或通过 β 消除反应释放 O-连接的聚糖。

[0110] 这些反应减少结合于聚糖的肽 / 蛋白, 并提高产物的质量。已知聚糖肽键可通过多种碱切割, 例如通过约 0.1-0.2M NaOH 和数小时至约 48 小时的培育, 或在升高的温度, 诸如约 50-70 摄氏度下持续约 0.5 至 8 小时, 优选在 50-60 摄氏度下持续约 2-8 小时, 这是优选的条件, 假设将 pH 调节至约 13 的相应值, 这是因为酵母材料的缓冲能力。

[0111] 碱水解可能适合于在至少 9, 至少 9.5, 具体地至少 9.7, 且更具体地至少 10, 更具体地至少 10.5, 且更具体地至少 11.5 的 pH 下进行。碱水解可能适合于在 pH 约 11 至约 14, 优选 pH 约 12 至约 13, 最优选 pH 约 12.5 下进行。碱水解可能适合于在约 9.0 和 11 之间的 pH, 或约 11.0 和 13 之间的 pH 或约 9.0 和 13 之间的 pH 下进行。

[0112] 用于水解的优选的碱试剂是氢氧化钠, 可使用其他食品可接受的碱材料, 诸如其他碱金属氢氧化物, 特别是氢氧化钾 KOH, 或碱土金属氢氧化物, 优选 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 或 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 或其混合物, 或碳酸盐, 诸如钠 $(\text{Na})_2\text{CO}_3$ 或钾 $(\text{K})_2\text{CO}_3$ 或碳酸钙 CaCO_3 , 或在具体的实施方案中, 为氨 NH_3 。啤酒酵母材料优选含钠的碱试剂。在具体的实施方案中, 该过程包括磷酸离子的产生, 诸如通过磷酸的酸水解, 并且还包括以下步骤, 其中将其脱盐和 / 或中和和 / 或通过碱的碱水解, 并沉淀出盐, 诸如 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 沉淀磷酸盐为磷酸 Ca^{2+} 。沉淀脱盐步骤在分离步骤中进行, 分离出沉淀的磷酸盐和不溶材料, 或在分级分离步骤前进行。

[0113] 酸水解可能适合于在小于 4.5, 具体地小于 3.5, 且更加具体地小于 2.5 的 pH 下进行。酸水解可能适合于在 pH 约 1 至 4, 优选 pH 约 2 至约 3, 更优选 pH 在约 2.1 和 2.8 之间, 更优选 pH 在约 2.2 和 2.7 之间, 最优选 pH 约 2.3、2.4 或 2.5 下进行。

[0114] 进行优选碱水解和酸水解两者的温度可能适合于至少优选在升高的温度下进行, 优选至少 30°C , 更加优选 40°C , 更加优选至少 45°C , 至少 50°C , 具体地至少 60°C , 更具体地至少 70°C , 且更加具体地至少 75°C 。

[0115] 在优选的实施方案中, 碱水解步骤的进行是在 0°C 至 100°C 的温度, 更优选在 0°C 至 60°C 的更低温度范围, 且更加优选 10°C 至约 90°C , 且在优选的实施方案中, 从 10°C 至约 50°C 。碱水解特别优选接近 50°C 的温度, 30°C 至 65°C , 更优选 40°C 至 55°C , 且更优选 45°C 至 55°C , 尤其是在啤酒酵母和氢氧化钠的情况下。

[0116] 进行水解反应的时间从数分钟, 例如 5 分钟 (特别对于碱水解) 到数天 (对于酸水解)。

[0117] 在优选的实施方案中, 酸水解进行至少 2 小时, 具体地至少 3 小时, 更具体地至少 5 小时, 具体地至少 6 小时, 且更具体地至少 7 至 8 小时, 且更具体地至少 8-24 小时。水解可能适合进行小于 48 小时, 更优选小于 32 小时或更优选小于 24 小时, 更优选小于 12 小时, 具体地小于 10 小时, 且更具体地小于 9 小时。在优选的实施方案中, 水解进行 2 至 6 小时, 优选 3 至 5 小时, 且最优选约 4 小时。

[0118] 酸水解优选在 pH 约 2 至 3 的酸, 和约 30°C 至 90°C 的温度下进行 2 至 48 小时。

[0119] 在优选的实施方案中, 碱水解进行至少 1 分钟, 更优选至少 5 分钟, 更优选至少 10 分钟, 更优选至少 30 分钟, 更优选至少约 10 分钟至 1 小时, 更优选 15 分钟至 45 分钟, 20 分钟至约 40 分钟或约 30 分钟。

[0120] 在另一个优选的实施方案中, 增加反应时间, 并使用降低的温度和 / 或碱浓度, 且反应持续至少 1 小时, 更优选至少 1.5 小时, 更具体地至少 2 小时, 更具体地至少 3 小时, 具体地至少 4 小时, 且更具体地至少 5 至 8 小时, 且更具体地至少 1-4 小时或至少 1-8 小时。水解可能适合进行小于 48 小时, 更优选小于 24 小时, 更优选地小于 12 小时, 具体地小于 10 小时, 且更具体地小于 9 小时。在优选的实施方案中, 水解进行 1 至 6 小时, 优选 1 至 5 小时, 且最优选约 1-3 小时。

[0121] 应认识到, 诸如 55°C 或更高的温度可加强焦糖化反应, 且对某些产物不利, 需要较

少颜色的焦糖化产物的产物优选在较低温度下进行较长的反应时间。

[0122] 碱水解可能适合进行至少 10 分钟、30 分钟、1 小时、具体地至少 2 小时，和至少 3、4、5、6、7 或 8 小时。水解可能适合进行小于 12 小时、具体地小于 10 小时，且更具体地小于 9、8、7、6、5、4 或 3 小时。酸水解可能适合进行 1 至 8 小时，2 至 6 小时，优选 3 至 5 小时，且最优选约 4 小时。酸水解可能适合进行至少 30 分钟、1 小时、具体地至少 2 小时，和至少 3、4、5、6、7 或至 8 小时。

[0123] 在优选的实施方案中，碱水解的进行是通过在 pH 约 9 至 13 和约 10°C 至 90°C 的温度下，使酵母细胞材料经受碱水解约 10 分钟至 8 小时。

[0124] 反应中酸的优选浓度

[0125] 本发明涉及最少量的酸和碱的使用。该过程中酸的优选最终浓度依据反应混合物中干物质的量。在优选的实施方案中，作为干物质酵母粗材料的量是约 5-70%，更优选 5-50%，更优选 5-30%，更加优选 10-25%，更加优选 15-25% 或约 20%。应认识到，来自发酵过程的优选浓缩废酵母，诸如废啤酒酵母的使用浓度包括诸如干重的约 20% 的优选的酵母干重的量。在另一实施方案中，中度浓缩为干重的约 30%，或在另一实施方案中，高度浓缩为干重的约 40%。优选的中度浓度范围为干重的 20% 至 40%，更优选 22% 至 38%，更优选 25% 至 35%，更加优选干重的 27% 至 33%。优选的高浓度范围为干重的 30% 至 60%，更加优选干重的 30% 至 50%，更加优选 32% 至 48%，更加优选 35% 至 45%。在优选的实施方案中，本过程包括优选的酸水解和碱水解，并使用酵母干物质的优选浓度，更优选中度或高浓度范围，或其任何组合。优选高浓度以改善过程有效性和能效。

[0126] 应认识到，酸的最佳效果的获得是通过向酵母材料加入浓酸和或碱，进而调节酵母材料的 pH。浓酸或碱可具有 0.1 至 10M，优选 0.5M 至约 8M 的浓度。酸或碱的浓度高于每反应体积所需施用的酸浓度几个数量级。

[0127] 本发明涉及优化的约 0.1 至 0.75M 的低酸量，更优选 0.1-0.5M，和与浓缩粗材料一起使用的至的较高酸量，或以较低 pH 范围（例如 pH 0.5-1.5）和约 0.5M 至 1.5M，更优选 0.75M 至 1.25M 的较高浓度。在优选的实施方案中，使用低酸量和磷酸。应认识到，优选每反应体积较高的施用浓度（最终浓度）为约 0.3M 至约 2.0M，更优选约 0.3M 至约 1.5M，优选约 0.5M 至约 1.5M，或 0.75M 至 1.25M 的较高量，以获得优选的聚糖的较高溶解。

[0128] 优选的强无机酸；盐酸、硫酸或磷酸 (H_3PO_4) 的优选的施用的最终浓度是约 0.3M 至约 2.0M，更优选约 0.3M 至约 1.5M，优选约 0.5M 至约 1.5M 或 0.75M 至 1.25M，并获得聚糖的较高溶解，此时反应在约 80 摄氏度的温度（优选 70-100 摄氏度之间，更加优选 70 和 95 摄氏度之间，更加优选 75 和 85 摄氏度之间）下进行。优选的反应时间是约 4 小时，优选 2 至 8 小时，更优选 3 至 5 小时，最优选 3.5 至 4.5 小时。在优选的实施方案中，使用最终浓度范围，以将 pH 调节至优选的值，优选在 pH 1.5-4.0 之间，更优选在 2.0 和 3.5 之间，更加优选在 2.0 和 3.0 之间。

[0129] 优选地施用碱以获得优选的 pH。每反应体积施用的碱浓度优选约 0.01M 至约 10M，更优选约 0.05M 至约 5.0M，更优选约 0.05M 至约 4.0M。

[0130] 优选的酸包括无机酸，诸如磷酸 (H_3PO_4)、盐酸和硫酸。在优选的实施方案中，该酸是磷酸 (H_3PO_4)。

[0131] 应认识到，如果温度增加，则酸 / 碱的量和反应时间可能降低，反之亦然。

[0132] 所得材料如果水解步骤的后期包括酸,则优选使用碱中和,如果后期水解步骤包括碱,则用酸中和。酸和碱优选适合于人类或动物使用,优选食品级。

[0133] 在优选的实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中至少酸水解和碱水解以及任选的中和步骤是在一个容器或反应器中进行。应认识到,这有益于增加效力,并减少该方法的成本。

[0134] 来自水解步骤的,含有不溶和可溶成分两者的,优选被中和的所得材料在水解步骤中使用的物质中的较低干物质含量 / 浓度进一步稀释,并使材料与水溶液接触合适的时间,优选约 30 分钟至约 2 小时,更优选约 45 分钟至 1h 15 分钟,和最优选约 1 小时。水解的,且优选中和的材料与水溶液的接触,增强了材料的可溶组分的溶解(参见图 1 和 2)。

[0135] 在可选择的实施方案中,在水解步骤之前,将酵母细胞材料分离成不溶和可溶组分,对分离的酵母细胞材料组分进行碱和酸的水解,并将可溶成分从水解的酵母细胞材料分离,并合并可溶成分。在合并可溶组分之前,将两种组合与水溶液接触,以增加可溶成分的溶解。本发明的可选择的实施方案显示于图 2。

[0136] 在可选择的实施方案中,酵母细胞材料首先用碱处理,任选地中和,分离不溶和可溶组分,并对分离的组分进行酸水解步骤。应认识到,在较高酸量和 / 或较高反应温度和 / 或较长反应时间的条件下,优选地水解不溶材料。酸水解后,合并可溶组分。合并可溶组分之前,两种组合可与水溶液接触,以增加可溶成分的溶解。

[0137] 在可选择的实施方案中,酵母细胞材料首先用酸处理,任选地中和,分离不溶和可溶组分,并对分离的组分进行碱水解步骤。应认识到,在较高碱量和 / 或较高反应温度和 / 或较长反应时间的条件下,优选地水解不溶材料。碱水解后,合并可溶组分。合并可溶组分之前,两种组合可与水溶液接触,以增加可溶成分的溶解。

[0138] 在另一实施方案中,酵母细胞材料可分离成可溶和不溶组分,其可用根据本发明的水解步骤处理,并且例如在中和步骤之前或之后,可以合并由此获得的材料,接触水溶液,混合并分级分离成可溶和不溶成分。由此获得的可溶成分包括根据本发明的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物。

[0139] 优选地中和的,并任选地稀释于低干物质含量 / 浓度的水解步骤中使用的物质中的所得材料优选地通过离心或过滤,被分离成可溶和不溶成分,并将(水)溶液不溶材料弃去或再循环到水解步骤中(参见图 1 和 2)。

[0140] 获得的可溶成分可经受分级分离步骤,通过色谱方法和 / 或相分离溶液方法和 / 或具有某些尺寸排阻标准的超滤。色谱方法包括但不限于带电和或亲脂(疏水)杂质的吸收、尺寸排阻色谱或亲和色谱。

[0141] 可进行具有 1000Da、2000Da 或 3000D 的尺寸排阻或截留或更高分子量截留的超滤。优选的截留为约 1000Da,更优选的截留为约 3000Da,且最优选的截留为约 2000Da。滤掉盐、降解杂质和其他小分子,诸如糖类单体,并将免疫刺激糖类组分保留在分级分离并浓缩的可溶成分中。

[0142] 优选的分级分离方法包括具有合适容量且可分级分离优选的分子的工业方法,优选凝胶过滤、超滤或沉淀,更加优选沉淀或超滤。

[0143] 优选的沉淀方法包括用溶剂,优选地在低温下从来自水解步骤的任选地含大量的盐的酸水解和碱水解产物,或从脱盐产物沉淀。

[0144] 进行优选的分级分离,以从产物分离较低活性的分子,低分子量成分,优选地,低分子量分子小于约 500-5000Da。在优选的实施方案中,被分离的低分子量分子具有低于 500Da 的分子量,更加优选地具有低于约 1000

[0145] Da 的分子量,更加优选地具有低于约 2000Da 的分子量,更加优选地具有低于约 3000Da 的分子量。本发明揭示了,与葡萄糖聚合物标准定义的 Mw 相比,主要部分的活性糖类分子基本上大于 5000Da。因此,在具体的实施方案中,优选增加分级分离步骤(例如过滤)的速度,并通过除去更大分子(优选具有低于约 4000Da 的分子量),甚至是除去具有低于 5000D 的分子量的分子的方法,除去低分子量材料。应认识到,截留水平 2000 和 3000 除去作为单价分子无用的寡糖,和产物的特性结构不需要的肽,并除去低于 2000 的低 Mw 成分,或在优选的实施方案中。

[0146] 本发明尤其涉及通过尺寸分级分离过程产生的新的分级分离的产物,该尺寸分级分离过程基本上使得分子具有高于除去的低分子量成分的分子量,优选至少高于 500Da,更加优选高于 1000Da,更加优选高于 2000Da 或最优选高于 3000Da,且在高制备功效过程的具体实施方案中,除去低于 5000Da 或更优选 4000Da 的 Mw 的成分。

[0147] 通过迫使由本文描述的过程产生的提取物,诸如可溶成分在压力下通过超滤器,可进行超滤步骤。超滤器适当地包括一个或多个半透膜。半透膜或超滤器可具有例如至少 1000Da,具体地至少 1500Da,且更加具体地至少 2000Da 的分子量截留。在一些实施方案中,对于高功效方法,可优选使用至少 3000Da,甚至截留 4000 或更大,更加优选截留 5000Da 或更大。应理解,超滤器可具有本文引用的那些之间的任何值的分子量截留,包括但不限于 500Da、1000Da、1500Da、2000Da、2500Da 和 3000Da 的分子量截留,且在具体的实施方案中,3500Da、4000Da、4500Da 和 5000Da 的分子量截留。合适的超滤器膜包括但不限于可购自 A/G Technology Corp, Needham, Mass 的中空纤维膜,或 Millipore 的纤维素膜滤器。应认识到,本领域技术人员可使用可用的滤膜和合适的分子量标准,测试并优化用于在超滤中分离所需的低分子量成分的合适截留,所述分子量标准优选包括具有己糖单糖残基的糖分子量标准。

[0148] 在优选的实施方案中,分子滤器截留是实践值,类似于纤维素膜截留,更优选 Mw 1000Da 的 Millipore 纤维素膜,或 3000Da 的 Millipore 纤维素膜,或在其他优选的实施方案中,截留对应于与具有以下标称截留(基于具有 Mw 1000 和 3000 的膜的截留)的相应膜相似的截留:500-2500Da,更优选 500-2000Da,更优选 1000-2000D 和更高范围(接近截留 3000),2000-5000Da,更优选 2000-4000 之间或更优选 2500 和 3500Da 之间。应认识到,超滤膜可截留次要部分的低 Mw 分子,并允许高 Mw 分子通过。

[0149] 超滤步骤可任选地包括使可溶成分通过不同分子量截留的两个或更多个超滤器。最终成分包括富集的糖类组合物,其中大多数糖类具有在超滤器的分子量截留之间的分子量,对于这样的成分,下限是根据本发明除去的较低 Mw 成分的大小。

[0150] 可溶成分可进一步经受分级分离步骤,以纯化、离析或分离糖类成分。纯化、离析或分离可以与以上或实施例中所描述地相似方式进行。

[0151] 根据本发明获得的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物基本上无臭无味。当在制备食品补充剂、药物和营养制品中使用含糖类成分的可溶免疫刺激组合物时,这些特征是有用的。根据本发明获得的无臭无味(免疫刺激)糖类成分可用于制备食品补充剂、添加剂、

药物和营养制品。

[0152] 根据本发明的可溶免疫刺激组合物的糖类成分通常包括甘露聚糖、 β 1,6 葡聚糖和小于 8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或 0.1% 或 0.05% 的 β -1,3 葡聚糖干物质。在一个更优选的实施方案中,糖类成分基本上不含 β -1,3 葡聚糖。

[0153] 以上描述的这一示例性过程显示于图 1 的流程图和图 2 中的可选择的过程。

[0154] 在含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的制备的优选的实施方案中,该方法包括以下步骤,提供酵母细胞材料,优选啤酒酵母细胞材料,并使酵母细胞材料在 pH 约 12 至 13 和约 20° 至 60°C 或约 60° 至 90°C 的温度下经受碱水解约 0.5 至 5 小时,并在 pH 约 2 至 3 和约 70° 至 90°C 的温度下经受酸水解约 3 至 5 小时,随后中和所得材料,使材料与水溶液接触,从而增强可溶组分的溶解,优选在水解步骤中使用的酵母细胞材料中的低浓度或干物质含量,将可溶和不溶成分从获得的材料分离,并使前述步骤的可溶成分经受超滤分级分离,优选使用约 1000 至 2000 或 3000Da 的截留,并将超滤成分缩减成固体材料。

[0155] 本发明的制品和组合物和成分的干燥可通过任何合适的方法,包括但不限于冷冻干燥、滚筒转鼓式干燥、烘箱干燥、喷雾干燥、环式干燥及其组合和 / 或使用薄膜形成设备干燥,且可使用任一种而不用进一步加工,或可使用任何合适的技术碾磨。

[0156] 在一个实施方案中,酵母细胞材料可以被破碎,或该方法的各步骤中的任何材料可以用热处理和 / 或机械处理、气动处理和 / 或流体静力学处理,从而增加糖类成分的溶解度,和 / 或从酵母细胞材料释放甘露聚糖和葡聚糖,和 / 或从该方法的任何步骤中获得的材料释放甘露聚糖和葡聚糖。在本发明的方法的步骤 i) 之前,可均化酵母细胞材料,例如啤酒酵母或啤酒酵母细胞膏。在一个可选择的实施方案中,对于本发明的方法中获得的任何材料可进行物理均化和 / 或热处理,或气动、机械和 / 或流体静力处理。

[0157] 优选的纯化、离析或分级分离方法包括除去主要的非糖类组分的一部分,诸如 1) 脱盐,在优选的实施方案中,通过沉淀盐,诸如通过钙或其他离子沉淀磷酸盐,或使用超滤, 2) 通过特异性吸附剂,诸如疏水或离子交换基质除去离子性分子或疏水性分子,和 / 或 3) 除去不溶材料。

[0158] 纯化或分离增加糖类成分的糖类含量。在强磷酸水解后,超滤脱盐增加了制品中糖类的量。优选地,优选通过超滤获得的,并含有糖类成分的可溶成分基本上无味无臭,并且非常适合于食品添加剂和补充剂,和饮料和药物组合物。

[0159] 可溶糖类成分的分级分离、纯化或离析

[0160] 本发明还涉及包含一种或几种糖类的具有增加的生物和免疫刺激活性的纯化的或富集的糖类成分。

[0161] 优选的纯化方法包括以下及其组合：

[0162] a) 色谱方法,诸如

[0163] i. 吸收带电和或亲脂(疏水)杂质的色谱

[0164] ii. 尺寸排阻色谱,特别是除去低分子量杂质的凝胶过滤

[0165] iii. 具有结合糖类或其部分的基质的亲和色谱,优选活性炭载色谱

[0166] 和 / 或

[0167] b) 相分离溶液方法,诸如用溶剂提取和 / 或沉淀杂质或糖类。在优选的实施方案中,使用有机溶剂用于沉淀,优选醇或酮,诸如甲醇或乙醇,更优选乙醇;或丙酮用于沉淀优

选尺寸的糖类。

[0168] 和 / 或

[0169] c) 离心及溶液与沉淀的分离

[0170] 和 / 或

[0171] d) 化学或酶促方法, 以降解所需组分, 优选温和的碱水解以降解碱不稳定的杂质, 和 / 或含 Glc α 的糖原 / 淀粉型糖类的酶促水解。

[0172] 溶剂, 例如以上提到的那些, 可用于沉淀和 / 或洗涤本方法的任何步骤中的材料。在一个实施方案中, 碱水解步骤在溶剂 (优选醇, 诸如乙醇) 的存在下进行。

[0173] 在一个实施方案中, 在制备含本发明的糖类成分的可溶免疫刺激组合物的方法期间, 酶可被用于降解细胞组分和 / 或增强糖类的提取。

[0174] 酶促步骤可在碱性 pH, 例如至少 8.5, 具体地至少 9, 且更具体地至少 9.2 的 pH 下利用高 pH 蛋白酶。pH 还可适当地为小于 10.5, 具体地小于 10, 且更加具体地小于 9.5。蛋白酶处理可适合于在至少 45°C, 且具体地至少 50°C 的温度下进行。蛋白酶处理可适合于在小于 70°C, 具体地小于 65°C, 且更具体地小于 60°C 的温度下进行。蛋白酶处理可适合于进行至少 5 小时, 具体地至少 8 小时, 更具体地至少 10 小时, 更加具体地至少 12 小时。蛋白酶处理可适合进行小于 48 小时, 具体地小于 36 小时, 更具体地小于 24 小时, 且更加具体地小于 18 小时。在蛋白酶酶促步骤之前或之后, 用葡萄糖淀粉酶 (例如来自曲霉属)、淀粉酶 (例如来自枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的 α -淀粉酶; 来自黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 或根霉 (*Rhizopus mold*) 的淀粉葡萄糖苷酶) 和 / 或脂酶 (例如来自洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas cepacia*)、皱褶念珠菌 (*Candida rugosa*) 和爪哇毛霉 (*Mucor javanicus*) 的脂酶; 通常按重量计为约 0.05% -1%) 孵育, 用葡萄糖淀粉酶、淀粉酶和 / 或脂酶孵育适合在中性至略酸性的 pH 和升高的温度下进行。例如, pH 的范围可适合于从至少 3.5, 具体地从至少 4, 且更具体地从至少 4.5 开始。例如, pH 的范围还可适合于从小于 7, 具体地小于 6, 且更具体地小于 5.5 开始。进行用葡萄糖淀粉酶、淀粉酶和 / 或脂酶孵育的温度可适合于从至少 40°C, 具体地至少 45°C, 且更具体地至少 50°C 开始。温度可适合于从小于 70°C, 具体地小于 65°C, 更具体地小于 60°C 开始。可适当使用至少 60°C、至少 65°C、至少 70°C、至少 75°C、至少 80°C、至少 85°C 或至少 90°C 的温度, 特别是如果蛋白酶、淀粉酶或脂酶是热稳定的酶。还可在用碱性蛋白酶孵育之后或之前, 用葡萄糖淀粉酶和脂酶的组合、淀粉酶和脂酶的组合或葡萄糖淀粉酶、淀粉酶和脂酶的组合孵育。

[0175] 适当地, 高 pH 蛋白酶在 pH 高于 7 时具有最佳的蛋白水解活性。合适的蛋白酶包括但不限于从以下获得的那些: 猕猴桃 (*Actinidia chinensis*)、菠萝 (*Ananas comosus*)、曲霉属 (例如黑曲霉、黑曲霉变种 *awamori*、米曲霉、酱油曲霉 (*A. sojae*)、蜂蜜曲霉 (*A. melleus*))、杆菌属 (例如枯草杆菌、嗜碱芽胞杆菌 (*B. alcalophilus*)、解淀粉芽胞杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、耐盐嗜碱芽胞杆菌 (*B. halodurans*)、迟缓芽胞杆菌 (*B. lentus*)、藓样芽胞杆菌 (*B. licheniformis*)、嗜热脂肪芽胞杆菌 (*B. stearothermophilus*)、嗜热溶蛋白芽胞杆菌 (*B. thermoproteolyticus*))、番木瓜 (*Carica papaya*)、板栗疫病菌 (*Cryphonectria parasitica*)、栗疫菌 (*Endothia parasitica*)、无花果 (*Ficus glabrata*)、乳酸克鲁维斯酵母、桔青霉 (*Penicillium citrinum*)、米赫根毛霉 (*Rhizomucor miehei*)、雪白根霉 (*Rhizopus niveus*) , 来自牛、羊或牛的胃, 或猪的胰腺, 及其组合。合

适的蛋白酶包括但不限于市售的酶,诸如枯草蛋白酶 Carlsberg、枯草蛋白酶 BPN'、枯草蛋白酶 Novo、枯草蛋白酶 309、枯草蛋白酶 147 和枯草蛋白酶 168、Alcalase™、Savinase™、Primase™、Duralase™、Durazym™、Esperase™ 和 Kannase™(购自 Novo Nordisk A/S); Maxatase™、Maxacal™、Maxapem™、Optimase™、Properase™、Purafect™、Purafect OxP™、FN2™ 和 FN3™(购自 Genencor International Inc.);和 Validase™ AFP、Validase™ FP 浓缩物、Validase™ FP 500、Validase™ FP II、Validase™ TSP 浓缩物、碱性蛋白酶浓缩物、菠萝蛋白酶(购自 Valley Research, South Bend, Ind.) 及其组合。

[0176] 合适的淀粉酶包括植物、动物、细菌或真菌源的那些淀粉酶,及其组合。淀粉酶包括但不限于获自以下葡萄糖淀粉酶或 α -淀粉酶:杆菌属(例如蕈样芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌、枯草杆菌、嗜热脂肪芽胞杆菌)、米曲霉、黑曲霉、黑曲霉变种 awamori (*Aspergillus niger* var. awamori)、蛾微杆菌 (*Microbacterium imperiale*)、绿色热单孢菌 (*Thermomonospora viridis*)、大麦芽(大麦属)、猪的胰腺(猪属 *Sus* spp.),及其组合。有用的淀粉酶的实例包括但不限于市售的淀粉酶,诸如葡萄糖淀粉酶浓缩物、Duramyl™、Termamyl™、Fungamyl™ 和 BAN™(购自 Novo Nordisk A/S);Rapidase™ 和 Purastar™(购自 Genencor International Inc.);和 Validase™ BAA、Validasem™ HT340L、Validase™ FAA、Validase™ AGS、Validase™ GA、Validase™ RGA(购自 Valley Research, South Bend, Ind.),及其组合。淀粉酶可适当地以至少 0.001%,具体地至少 0.01%,且更加具体地至少 0.02%的最终浓度使用。淀粉酶可适当地以小于 0.1%,具体地小于 0.05%,且更加具体地小于 0.1%的最终浓度使用。

[0177] 本发明中有用的脂酶包括但不限于来自以下的脂酶:腐质霉属 (*Humicola*) (同义词嗜热真菌 *Thermomyces*),例如来自柔毛腐质霉 (*H. lanuginosa*) (疏绵状嗜热丝孢菌 *T. lanuginosus*)、特异腐质霉 (*H. insolens*);假单胞菌属脂酶,例如来自产碱假单胞菌 (*P. alcaligenes*) 或类产碱假单胞菌 (*P. pseudoalcaligenes*)、洋葱假单胞菌、施氏假单胞菌 (*P. stutzeri*)、萤光假单胞菌 (*P. fluorescens*)、假单胞菌属菌株 SD 705、威斯康辛假单胞菌 (*P. wisconsinensis*);杆菌脂酶,例如来自枯草杆菌、嗜热脂肪芽胞杆菌或短小芽胞杆菌 (*B. pumilus*) (WO 91/16422);米曲霉、黑曲霉、溶脂念珠菌 (*Candida lipolytica*)、皱褶念珠菌、爪哇毛霉、萎地青霉 (*Penicillium roqueforti*)、米赫根毛霉、德氏根霉 (*Rhizopus delemar*)、雪白根霉、米根霉 (*Rhizopus oryzae*)、少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*),及其组合。市售的脂酶包括但不限于 Lipolase™ 和 Lipolase Ultra™ (Novo Nordisk A/S),以及真菌脂酶 8000 和胰腺脂酶 250(购自 Valley Research, South Bend, Ind.)。

[0178] 新的组合物

[0179] 组合物结构的研究是通过实施例 2 所示的 NMR,和实施例 3 中的色谱。

[0180] 本发明涉及新的可溶免疫刺激组合物,其含有糖类成分,且其中糖类成分包括甘露聚糖和 β -1,6 葡聚糖和小于 1%的 β -1,3 葡聚糖干物质,优选 β 3-葡聚糖的量小于 β 6-葡聚糖的 50%,且其中组合物基本上无臭无味。

[0181] 优选的糖类组合物是在水中可溶的,优选至少 95%可溶,更加优选 98%可溶,更加优选 99%可溶,且最优选 100%可溶,至少为 1% w/w 溶液,在优选的实施方案中,也为 1.5%或 2.0%的溶液。在优选的实施方案中,组合物在水中的总溶解度在 98%和 100%之

间,优选 100%,为 1% w/w 溶液。

[0182] 发明人使用 NMR 谱来揭示根据本发明的可溶甘露聚糖和 β -6-葡聚糖组分的量。NMR 用内标校准,并且如实施例 2 和图 3 所示,依据揭示以下组分的 NMR 谱的积分分析单糖表位的量。优选的组合物包括难溶的 β 1-6 葡聚糖,为 0.001-10%,更优选 0.005-5%,更加优选 0.01-3%,且最优选 0.01-1.5% w/w,且在优选的实施方案中,干重的约 0.32%。

[0183] 优选的组合物包括新的可溶甘露聚糖,为干重 1-50%,更优选 2-50%,更加优选 3-50%,更加优选 4-50%,更加优选 4-40%,更加优选 5-35%,最优选 5-25% 或 10-20%,且在优选的实施方案中,为约 14% w/w。

[0184] 数据揭示了与增加可溶分子的量的优化的酸水解方法相比,该方法明显增加了组合物中可溶甘露聚糖而非 β 6-聚糖的量。在优选的实施方案中,新组合物包括 $4.4 \mu\text{mol}$ 对 $0.016 \mu\text{mol}$ (14% 对 0.32%) 的比的可溶甘露聚糖和 β 6-葡聚糖。相比于仅使用酸水解并产生少得多的甘露糖聚糖的方法相比,这是非常不同的配比 (ration)。

[0185] 从本发明的方法获得的糖类成分包括 14 : 0.32 或高于 40 : 1 的比的甘露聚糖 : 葡聚糖,或 β 6-葡聚糖或 β -葡聚糖,或以干重计优选小于 20% w/w,更优选小于 10% w/w,更优选小于 5% w/w,更优选小于 4%,更加优选小于 3.5%,更加优选小于 2.5%,且最优选小于 2.3% 的甘露聚糖。

[0186] 在优选的实施方案中,可溶 β -葡聚糖和甘露聚糖的量为组合物干重的至少约 14% w/w,更优选至少约 15% w/w,且其可通过优化和 / 或除去淀粉而被明显增加,优选至少至 19% w/w。

[0187] 从本发明的方法获得的产物包括以干固体计 (w/w),总产物的至少约 10%,具体地至少约 14%,更具体地至少 15% 的糖类,更加具体地至少约 16% 的糖类。其中糖类是可溶 β -葡聚糖和 α -甘露糖寡 / 多糖材料,优选基本上为多糖。组合物任选地包括约 5% 至 50%,优选 10-25% 的可溶淀粉残基。在优选的实施方案中,例如通过淀粉酶处理,除去淀粉,并因此增加可溶 β -葡聚糖和 α -甘露糖寡 / 多糖材料的量。

[0188] 从本发明的方法获得的糖类成分包括以干固体计,总细胞壁 β 6-葡聚糖和 α -甘露聚糖糖类的至少 75%,具体地至少 80% 和更具体地至少 85% 的甘露聚糖。

[0189] 在一个具体的实施方案中,从本发明的方法获得的糖类成分包括以干固体计,总糖类的至少 1%,具体地至少 2%,更具体地至少 2.2% 和更具体地至少 2.3% 的 β 1-6 葡聚糖。

[0190] 产品还适合包括以干固体计,总细胞壁 β 6-葡聚糖和 α -甘露聚糖糖类的小于 8%,具体地小于 2%,更具体地小于 1%,更具体地小于 0.5%,更具体地小于 0.1%,更加具体地小于 0.06% 的 β 1-3-葡聚糖。

[0191] 产品还适合包括以干固体计,总组合物质量的小于 8%,具体地小于 2%,更具体地小于 1%,更具体地小于 0.5%,更具体地小于 0.1%,更加具体地小于 0.05%,更加具体地小于 0.01% 的 β 1-3-葡聚糖。

[0192] 如图 3 和实施例 2 所示,NMR 数据还揭示了可溶 α -甘露聚糖的主要结构特征。该组合物包括末端 $\text{Man } \alpha 3 (\text{Man } \alpha 2)_m \text{Man } \alpha 6-$ 和 $\text{Man } \alpha 2 \text{Man } \alpha 6-$ 和 $\text{Man } \alpha 2 (\text{Man } \alpha 2)_n \text{Man } \alpha 6$ 结构,其中 m 和 n 独立地是 1 至 10 的整数,且 $\text{Man } \alpha 6-$ 结构可形成包括 $\text{Man } \alpha 6-$ 残基的聚合物的多价载体,且优选地存在约等摩尔量的 $\text{Man } \alpha 2-$ 和 $\text{Man } \alpha 3-$ 非还原末端结构,优选地与

从 NMR 谱所观察到的相似。

[0193] 新的可溶甘露聚糖和葡聚糖的大小分布

[0194] 糖类成分中总甘露聚糖的至少 80% (w/w), 具体地至少 85% (w/w), 更具体地至少 90% (w/w), 更加具体地至少 91% (w/w) 可具有大于 3000Da 的分子量。

[0195] 在优选的实施方案中, 甘露聚糖和葡聚糖具有至少 500Da, 更优选至少 1000Da 的分子量。

[0196] 如图 4 所示, 还参见实施例 3, 发明人还通过凝胶过滤色谱研究了优选的组合物, 且当 5000 的 M_w 标志在约 10.5 分钟、 M_w 标志在约 15.8 分钟从 Superdex Peptide 10/300GL 柱洗脱, 且总洗脱体积为 18ml, 柱长度 30cm, 且所述糖作为还原末端的二氨基苯 (2-AB) 标记的结构进行分析时, 优选的组合物包括在空体积和 5000Da 的己糖多糖 M_w 标志位置之间洗脱的葡聚糖和甘露聚糖糖类材料作为主要部分, 和任选地, 在 1000 和 5000Da 的 M_w 标志之间洗脱的材料作为次要部分。

[0197] 实施例 3 中分析的数据揭示了, 优选的组合物包括至少约 50%, 更优选至少约 70%, 更加优选至少约 73%, 更优选至少约 80mol%, 且在优选的实施方案中, 至少约 85%, 更优选至少约 87% 的大于 5000Da 的材料, 和约 13-20mol% 在 1000 和 5000Da 的 M_w 标志之间洗脱的材料。

[0198] 基于摩尔量和分子量分布, 可评价本组合物包含非常少量的寡糖材料, 尤其是在具有 1000Da 的截留, 且更加优选具有 2000Da 或 3000Da 的截留的凝胶过滤后。按重量计, 该组合物包括至少约 91% (w/w) 的大于 5000Da 的可溶糖类, 优选甘露聚糖材料, 包括根据本发明的全部三种 α -甘露聚糖类型, 更优选至少 95% w/w, 更加优选至少 97% w/w, 更优选至少 98% w/w, 且最优选至少 95% w/w。应认识到, 对于针对可溶寡糖组合物而优化的发明人的先前 PCT 专利申请的酸水解产物, 这是非常困难的, 所述酸水解产物包括优选至少超过 10% 的具体甘露聚糖寡糖。

[0199] 具体地, 本发明的优选的较高分子量的多糖组合物包括小于 10% 更优选小于 5%, 更优选小于 2% w/w 的 $\text{Man } \alpha 3\text{Man } \alpha 2$ -甘露糖寡糖或在 12-16 分钟之间洗脱的为非衍生糖类的其他甘露糖糖类, 此时计算为总的含 $\text{Man } \alpha 3\text{Man } \alpha 2$ -甘露糖的糖类的比例。

[0200] 如凝胶过滤实验所示, 本发明揭示了可能产生具有相对分子量的可溶多糖。优选的组合物包括在 Superdex 柱的空体积洗脱的主要部分的糖类材料, 和在空体积在约 7 分钟的高峰肩 (high shoulder of the peak) 洗脱的另一主要部分, 如图 4 所示。本发明涉及在实施例 3 的凝胶过滤和标记实验条件下, 具有与如图 4 所示 2AB 标记的轭合物相似的吸光度特性曲线和吸收率的可溶多糖材料。

具体实施方案

[0201] 本发明涉及根据本发明的新的组合物, 结构的分子量高于 4000Da 或 5000Da, 且材料溶于水。

[0202] 本发明涉及的新的组合物呈基本上干的形式。应认识到, 干形式的组合物尤其有用。优选至少当生产或包装组合物时, 干形式含有优选小于 30%, 更优选小于 20%, 更加优选小于 10%, 且最优选小于 5% 的水。

[0203] 本发明涉及包含根据本发明的组合物的食品补充剂、药物或营养制品。

[0204] 本发明涉及选自以下的组的包含根据本发明的组合物的治疗组合物：药物、具有药物活性的临床营养组合物、用作药物的具有药物活性的营养治疗组合物。

[0205] 本发明涉及根据本发明的治疗组合物，其中该组合物用于预防或治疗其中需要免疫调节活性的疾病，和 / 或用于针对病原体的抗粘连治疗。

[0206] 本发明涉及权利要求中任一项所述的组合物在制备用于治疗需要免疫调节治疗或抗粘连治疗的疾患的药物中的用途。

[0207] 本发明涉及包括向患者施用本发明的治疗组合物的步骤的治疗方法。

[0208] 根据本发明的制品和组合物被认为在例如食品补充剂、药物（例如改善免疫反应）、动物饲料和营养制品中具有价值。例如，治疗组合物或药物、食品或动物饲料可适当地含有 0.050g 至 50g，更优选 0.1g 至 30g 的制品 /kg 食品或饲料。适当地，按重量 / 重量计，制品可占食品或饲料总重量的至少 0.005%，具体地至少 0.01%，更具体地至少 0.02%，更具体地至少 0.05%，且更加具体地至少 0.1%，且小于 5%，具体地小于 2%，更具体地小于 0.5%，且更加具体地小于 0.3%。合适的动物饲料包括但不限于牛、马、猪、家禽、鱼（例如甲壳动物、贝壳类动物）、鸟和宠物（例如猫、狗）饲料。液体组合物可含有按重量计 0.1% -1% 的根据本发明的制品。根据本发明的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物或单独的糖类成分还具有许多用途。例如含糖类成分的可溶免疫刺激组合物或单独的糖类成分可在动物饲料工业中使用，其有利地具有结合真菌毒素并还结合病原细菌的能力，防止细菌在肠道中定居。

[0209] 在优选的实施方案中，本发明涉及高度有效的治疗 / 药物 / 食品 / 饲料组合物，其含有小于 2%（重量 / 重量）的根据本发明的组合物，更加优选小于 1%，且最优选小于 0.5%，在优选的实施方案中，活性浓度在 0.0001% -2% 之间，更加优选 0.001% -1% 之间，更加优选 0.001% -0.5% 之间，更加优选 0.001% -0.1% 之间，更加优选 0.001% -0.05% 之间，更加优选 0.001% -0.04% 之间，更加优选 0.001% -0.025% 之间，且更加优选 0.001% -0.01% 之间。这些高度有效的浓度特别优选地用于免疫调节。在优选的实施方案中，抗粘连的组合物以 5 倍的先前浓度应用，例如在 0.0005% -10%，0.005-5%，和 0.005% -0.2%，和 0.005% -0.05% 之间，或以 10 倍的先前浓度应用，例如 0.0010% -20%，和 0.010-10%，和 0.010% -0.4% 和 0.01% -0.1%。在产物是补充剂的情况下，浓度优选地计为人类患者或动物使用的最终制剂浓度。应认识到，具有增加的量的有效化合物的本组合物可以较低剂量使用，减少了成本和可能的治疗副作用。

[0210] 例如，包括根据本发明制备的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物或单独的糖类成分的（食品）补充剂可适合于用作动物和人类的食品和饮料、药物或软化剂、减少胆固醇的剂中的免疫刺激剂。如果加入到软化剂、洗液或乳膏，并用于治疗疾患，则含糖类成分的可溶免疫刺激组合物或单独的糖类成分可适当地以至少 0.05%，具体地至少 0.1%，且更具体地至少 0.5%，且小于 10%，具体地小于 5%，且更具体地小于 2% 的浓度 (w/w) 存在。适当地，根据本发明制备的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物或单独的糖类成分可用于治疗湿疹，例如通过掺入乳膏、洗液或软化剂。湿疹包括多种炎症皮肤疾患，包括特应性皮炎（“特应性湿疹”），并且影响约 10% 至约 20% 的儿童期的世界人口。湿疹显示为机体免疫系统的异常反应。

[0211] 因此，在本发明的一个方面中，优选的实施方案包括但不限于用于营养或治疗的

组合物,优选包括例如食品组合物、食品补充剂组合物、膳食组合物、包括处方和 OTC 药物组合物的药物组合物、临床营养组合物、局部药物组合物、天然药物组合物、营养组合物和营养添加剂。组合物的目的是用于需要该组合物的受治疗者或患者,优选用于人类或动物,且最优选用于人类受治疗者。认为,根据本发明的药品或药物的定义包括处方药和 OTC 药,治疗性临床营养组合物、局部药物组合物、天然药物组合物、具有治疗作用的营养组合物和具有治疗性的营养添加剂。

[0212] 还可能将根据本发明的物质用于人类和动物的食物或营养组合物,例如用于食品、牛奶、酸奶酪或其他乳制品,饮料组合物和婴儿配方食品。本文描述的营养组合物或食物不是天然的人乳。优选地将根据本发明的物质用作所谓的功能或功能性食品的一部分。所述功能食品通过免疫刺激作用,或通过抑制或防止病原体与靶细胞或组织(尤其在胃肠道中)的结合,而对人或动物的健康具有积极的作用。根据本发明的物质可以是限定的食品或功能食品组合物的一部分。功能食品可含有被视频管理当局(如美国的食品和药品管理局)所接受的其他已知食品成分。根据本发明的物质还可以用作营养添加剂,优选地用作食品或饮料添加剂,以生产功能食品或功能饮料。食品和食品组合物或补充剂含有至少一些固定的主要营养物,诸如脂肪、蛋白质和糖,和优选地少量需要的营养物,诸如维生素、矿物质和盐。

[0213] 本发明还涉及新的糖类成分在制备药物和/或治疗和/或营养组合物的方法中的用途,优选当组合物的目标是用于需要免疫调节或免疫刺激或抗感染治疗的受治疗者或患者。

[0214] 包含通过本发明的方法生产或制备的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物或单独的糖类成分的本食品添加剂或(功能食品)补充剂可口服或肠内施用。包含含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的食品添加剂或补充剂将要施用的形式(例如粉剂、片剂、胶囊、悬浮液、溶液、乳剂)将依据患者和特定的治疗。所施用的制品、补充剂或组合物的量将基于个体来确定,并将部分基于对以下的考量:受治疗者的疾患、受治疗者的总体健康和待治疗或缓解的免疫刺激病症的严重性。

[0215] 包含含糖类成分的可溶免疫刺激组合物或单独的糖类成分的补充剂或添加剂可在室温或低温时,以液体或固体形式口服施用,或可通过饲管肠内施用。含糖类成分的可溶免疫刺激组合物,或含该可溶免疫刺激组合物的任何补充剂或添加剂可单独施用,在生物可接受的载体(例如盐水或水)中与其他成分(诸如维生素和矿物质)一起施用,或作为完全营养食品(complete-nutritional food)的一部分施用。例如,含糖类成分的可溶免疫刺激组合物或单独的糖类成分可作为高纤维液体食品中的组分口服施用,通过连续或间歇滴注到饲管(例如鼻胃、鼻十二指肠、空肠)肠内喂养。包含含本发明的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物或单独的糖类成分的制品,或包含其的任何补充剂或添加剂,可任选地包括其他组分,这将主要通过组合物所施用的方式来确定。例如,以片剂或粉剂形式口服施用的制品或组合物除了含糖类成分的可溶免疫刺激组合物之外,还包括填充剂(例如玉米淀粉、蔗糖、乳糖)、粘合剂(例如羧甲基纤维素、阿拉伯树胶、明胶)、佐剂、调味剂、着色剂和/或包衣材料(例如蜡或增塑剂)和/或其他营养补充剂。以液体形式施用的包含含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的制品可包括通过本发明的方法制备的组合物,和任选地,乳化剂、稀释剂(例如水、无菌盐水)和/或着色剂或调味剂,或合并到将口服或通过到消

化道的饲管施用的完全喂养配方中。完全喂养配方可包含所有的营养需求。例如,这种用于口服或肠内施用的喂养配方可含有本发明的方法制备的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物、水、糖来源(例如蔗糖、水解玉米淀粉)、油(例如玉米油或大豆油)、选定的维生素来源(例如胆碱、氯化物、抗坏血酸、乙维生素 E、烟酰胺、泛酸钙、硫胺、核黄素、叶绿醌、维生素 B12、维生素 D₃);选定的矿物质来源(例如柠檬酸钾、氯化镁、磷酸三钙、柠檬酸钠、氯化钾、硫酸锌);蛋白质来源(例如大豆蛋白分离物、酪蛋白酸钙)和卵磷脂。

[0216] 进一步纯化

[0217] 本发明还涉及根据本发明的方法获得的可溶糖类成分,或通过对所述成分的进一步纯化步骤获得的可溶糖类成分。进一步纯化可优选地选自以下的组:通过色谱方法优选疏水或离子交换或反相方法或进一步的大小分级分离除去蛋白质、脂质、芳族分子或离子型分子。进一步纯化的优选目的是将甘露聚糖和/或 b-聚糖材料任选地与可溶淀粉组分分离。在一个具体的实施方案中,淀粉被淀粉酶降解,在优选的实施方案中,在至少一个水解步骤之后,优选在酸水解之后,且通过根据本发明的分级分离或单独的分级分离除去所得葡萄糖和/或低聚麦芽糖(malto-oligosaccharides)。

[0218] 本发明还涉及糖类成分在用于人或动物的免疫刺激中的用途,和用于制备在人或动物中用于免疫刺激和/或抗粘连的食品或饮料或治疗剂或药物或药品的用途。

[0219] 本发明还涉及根据本发明的方法,还包括在人或动物的食品或饲料中使用步骤 iii) 或 iv) 的可溶成分。

[0220] 本发明还涉及根据本发明的方法,还包括在选自食品补充剂、药物、化妆品和营养制品的产品中使用步骤 iii) 或 iv) 的可溶成分。

[0221] 本发明还涉及可溶酵母源的组合物,其包括根据本发明的糖类成分或进一步纯化的糖类组合物,其用于人或动物中的免疫刺激,和/或用于制备用于人或动物中的免疫刺激的食品或饮料,优选其中食品是固体食品或乳制品或包括牛奶组分的食品或婴儿配方,或其中饮料是治疗性饮料或乳饮料产品或婴儿配方,或用于通过加入液体产生乳饮料产品或婴儿配方的组合物。

[0222] 使用酸和碱的高收率过程

[0223] 一般方法

[0224] 高于 pH 9 的碱水解

[0225] 优选的方法包括与强酸水解组合的碱处理。

[0226] 优选的碱处理包括最终反应 pH 高于 8,更优选高于 9,更优选高于 9.5,更加优选高于 10,更加优选高于 11,更加优选高于 11,更加优选高于 12,更加优选 13 或更加优选高达 13.5 的处理碱溶液。碱条件的优选范围是从 pH 9 至 14,更优选从 9.5 至 13.5 变化。碱处理的时间是 10 分钟至 24h,更优选 0.5h 至 18h,对于短反应,更加优选 1h 至 12h,在优选的实施方案中,1 小时和 8 小时之间,且在另一个优选的实施方案中,对于快速反应,在 1 小时和 6 小时之间,更加优选 1.5 小时和 3.5 小时之间,最优选约 2.25 小时,边际 +/-1 小时、+/-0.5 小时、+/-0.25 小时。优选的长反应在 8-30 小时之间,更优选 8-24 小时之间,更优选 8-20 小时之间。

[0227] 优选的碱性反应温度在 0-100 摄氏度之间,更优选 10-90 摄氏度之间。温和反应的优选的温度是从 0-60 摄氏度,优选 10-60 度之间,对于最低范围(在包括洗涤反应的实

施方案中), 优选 10-45 度之间, 优选 15-40 度之间, 更优选 18-35 度之间, 最优选 20-30 摄氏度之间, 且对优化的温和反应避免降解的较高范围在 35-60 摄氏度之间, 更优选 40-60 度之间, 更优选 45-60 摄氏度之间。优选的较高范围是 60-100 摄氏度之间, 更优选 65-100 摄氏度之间, 更优选 70-100 摄氏度之间, 更优选 70-95 摄氏度, 且最优选 70-90 摄氏度之间, 或约 80 摄氏度 +/- 边际 7 度、更优选 5 度且最优选 4 度。

[0228] 碱水解的优化和酸 / 碱水解的顺序

[0229] 实施例 12 和 13 显示出实施例提供了用于制备的高效高收率水解方法, 和优化的碱水解作用表 1 和表 2 显示的高甘露糖含量。

[0230] 一般方法

[0231] 优选的方法包括与强酸水解组合的碱处理。

[0232] 包括洗涤的用强碱的温和反应

[0233] 碱处理包括的温和碱条件具有优选低于或接近室温的范围, 包括 0 至 60 摄氏度, 更优选 10-45 度之间, 且在其之内。温和条件包括用不溶解多糖的溶剂洗涤, 所述溶剂包括优选地相当安全的溶液和无毒性溶剂 (诸如醇, 优选乙醇), 其包含含有碱的溶液, 例如 pH 9-14 之间, 更优选 pH 9-13 之间, 更优选 pH 9-12.5 之间, 更优选 pH 9.5-12 之间, 更优选 pH 10-12 或约 11.0。反应时间非常快, 从 0.1h 至 3h, 或更优选 0.5-2h, 或快速反应在 1 小时和 6 小时之间, 和其中优选的范围。优选的醇是乙醇, 溶剂的功能是保持多糖呈固态, 通过具有一些水解和洗涤作用。碱 (诸如碱性氢氧化物, 诸如 NaOH) 的浓度优选在 1mM 或 1M 之间, 优选约 0.1M 范围 +/-0.7M (即 0.3-1.7M), 更优选 +/-0.5M, 更优选 +/-0.3M。乙醇的浓度优选在 65-95% 之间, 更优选在 70-90% 之间, 更优选在 73-87% 之间, 更优选在 75-85% 之间, 或约 80%。调节乙醇的浓度, 将碱保持在溶液中。

[0234] 表 2 显示了用碱洗涤可令人惊讶地增加酸水解甘露聚糖产物的纯度约 15% 至约 20%。这将相当大地增加收率。在具体地实施方案中, 在酸水解之后进行碱洗涤。

[0235] 中强碱水解处理

[0236] 本发明揭示了中强碱性反应有效地产生了高纯度的聚糖组合物。例如, 实施例 14 和表 2 显示了, 根据实施例 12, 在其中酵母材料首先在 pH

[0237] 10 然后在 pH 2.5 水解的过程中, 获得了甘露聚糖的最高相对量 (纯度), 提取产物的 23.5% (w/w)。如实施例 13 所描述, 当水解步骤逆转, 也获得了 19.3% (w/w) 的高纯度的甘露聚糖。

[0238] 在不同的优选的实施方案中, 本发明涉及其中首先酸水解, 随后碱水解的反应, 且在其他实施方案中, 优选首先进行碱水解, 然后酸水解。优选中强碱水解, 这是由于纯甘露聚糖的高收率和有限的副反应, 诸如显色反应。

[0239] 中强碱水解的进行是在例如 pH 8.5-14 之间, 更优选在 pH 8.5-13, 更优选在 pH 9-12.5, 更优选在 pH 9-12, 更优选在 pH 9.0-11.5, 更加优选在 pH 9.0-11, 或约 10, 具有 0.7, 更优选 0.5 和最优选 0.3pH 单位的 +/- 边际 (例如 pH 9.7 和 10.3 之间)。优选地, 较高温度范围内的中强碱水解的反应温度是在 60-100 摄氏度之间, 更优选在 65-100 摄氏度之间, 更优选在 70-100 摄氏度之间, 更优选在 70-95 摄氏度, 且最优选在 70-90 摄氏度之间, 或约 80 摄氏度, 具有 7 度, 更优选 5 度和最优选 4 度的 +/- 边际。反应时间是 10 分钟至 24h, 更优选 0.5h 至 18h, 对于短反应, 更加优选 1h 至 12h, 在优选的实施方案中, 1 小时

和 8 小时之间,且在另一个优选的实施方案中,对于快速反应,在 1 小时和 6 小时之间,更加优选 1.5 小时和 3.5 小时之间,最优选约 2.25 小时,边际 ± 1 小时、 ± 0.5 小时、 ± 0.25 小时。在不同的实施方案中,优选的长反应在 8-30 小时之间,更优选 8-24 小时之间,更优选 8-20 小时之间。

[0240] 强碱水解处理

[0241] 本发明揭示了强碱性反应有效地产生最高量的优选的聚糖组合物。例如,实施例 14 和表 2 显示了用 pH 13 的最高碱性条件获得了优选的甘露聚糖的最高总收率,和总提取物的最高量。

[0242] 强碱水解的进行例如在 pH 11-14 之间,更优选在 pH 11.5-14 之间,更优选在 pH 11.5-14 之间,更优选在 pH 12-14 之间,更优选约 13,具有 0.7,更优选 0.5,且最优选 0.3pH 单位的 \pm 边际(例如 pH 9.7 和 10.3 之间)。

[0243] 优选地,限定了强碱水解的反应温度和时间。在不同的优选的实施方案中,本发明涉及其中首先进行碱水解,随后酸水解的优选的反应(在实施例 12 和 13 中最高甘露聚糖总收率超过 5%),且在其他实施方案中,优选地,首先进行酸水解,然后碱水解。优选强碱水解反应,这是由于相对纯的甘露聚糖的最高收率。

[0244] 优选的反应中的酸浓度

[0245] 本发明涉及最少量的酸和碱的使用。该过程中,酸的优选的最终浓度依据反应混合物中干物质的量。在优选的实施方案中,作为干物质的酵母粗材料的量为约 5-70%,更优选 5-50%,更优选 5-30%更加优选 10-25%,更加优选 15-25%或约 20%。应认识到,来自发酵过程的优选浓缩废酵母,诸如废啤酒酵母的使用浓度包括诸如干重的约 20%的优选的酵母干重的量。在另一实施方案中,中度浓缩为干重的约 30%,或在另一实施方案中,高度浓缩为干重的约 40%。优选的中度浓度范围为干重的 20%至 40%,更优选 22%至 38%,更优选 25%至 35%,更加优选干重的 27%至 33%。优选的高浓度范围为干重的 30%至 60%,更加优选干重的 30%至 50%,更加优选 32%至 48%,更加优选 35%至 45%。在优选的实施方案中,本过程包括优选的酸水解和碱水解,并使用酵母干物质的优选浓度,更优选中度或高浓度范围,或其任何组合。优选高浓度以改善过程有效性和能效。对于碱水解,优选这些或相似的酵母粗材料浓度。

[0246] 本发明涉及优化的约 0.1 至 0.75M 的低酸量,更优选 0.1-0.5M,和与浓缩粗材料一起使用的较高酸量 (higher acid amounts from about to),或以较低 pH 范围(例如 pH 0.5-1.5)和约 0.5M 至 1.5M,更优选 0.75M 至 1.25M 的较高浓度。在优选的实施方案中,使用低酸量和磷酸。应认识到,优选每反应体积较高的施用浓度(最终浓度)为约 0.3M 至约 2.0M,更优选约 0.3M 至约 1.5M,优选约 0.5M 至约 1.5M,或 0.75M 至 1.25M 的较高量,以获得优选的聚糖的较高溶解。

[0247] 优选的强无机酸;盐酸、硫酸或磷酸 (H_3PO_4) 的优选的施用的最终浓度是约 0.10M 至约 2.0M,约 0.3M 至约 2.0M,更优选约 0.3M 至约 1.5M,优选约 0.5M 至约 1.5M 或 0.75M 至 1.25M,并获得聚糖的较高溶解,此时反应在约 80 摄氏度的温度(优选 70-100 摄氏度之间,更加优选 70 和 95 摄氏度之间,且更加优选 75 和 85 摄氏度之间)下进行。优选的反应时间是约 4 小时,优选 2 至 8 小时,更优选 3 至 5 小时,最优选 3.5 至 4.5 小时。在优选的实施方案中,使用最终浓度范围,以将 pH 调节至优选的值,优选在 pH 1.5-4.0 之间,更优选在

2.0 和 3.5 之间,更加优选在 2.0 和 3.0 之间。

[0248] 组合的酸水解和碱水解

[0249] 本发明涉及使酵母细胞材料在 pH 约 9 至 14,和约 10° 至 100°C 的温度下经受碱水解约 10 分钟至 8 小时,并在 pH 约 1.5 至 4 和约 30° 至 100°C 的温度下,经受酸水解约 1 至 48 小时,中和材料,任选地使材料与水溶液接触。在优选的实施方案中,在 pH 约 9 至 13,和约 10° 至 90°C 的温度下进行碱水解约 10 分钟至 8 小时,并且在 pH 约 2 至 3,和约 30° 至 90°C 的温度下进行酸水解约 3 至 48 小时。

[0250] 本发明还涉及水解方法,在 pH 约 9 至 13,和约 10° 至 90°C 的温度下碱水解约 10 分钟至 8 小时,并且在 pH 约 2 至 3,和约 30° 至 90°C 的温度下进行酸水解约 3 至 48 小时。本发明还涉及水解方法,其中在 pH 约 9 至 13,和约 50°C 至 100°C 的温度下碱水解约 0.5h 至 8 小时,并且在 pH 约 2 至 3,和约 60° 至 90°C 的温度下进行酸水解约 1 至 4 小时。

[0251] 本发明还涉及水解方法,其中碱水解的进行是通过在更优选 10-45 度之间,用碱溶液 pH 9-13 洗涤 0.1 至 3h。本发明还涉及水解方法,其中碱水解是在 pH 9-12.5 之间、1h 至 12h 的反应时间和 60-100 摄氏度之间的温度范围下进行。本发明还涉及水解方法,其中碱水解在 pH 11.5-14 之间、1h 至 12h 的反应时间和 60-100 摄氏度之间的温度范围下进行。

[0252] 本发明还涉及可溶酵母甘露聚糖组合物,其中糖类成分包括干重的 0.001-10%,更优选 0.005-5%,且最优选 0.01-3%,且最优选 0.01-1.5% 的 β 1-6 葡聚糖。组合物包括干重的 5-25% 或 10-20% w/w 的甘露聚糖,且 β 6- 葡聚糖或 β - 葡聚糖的量小于干重的 5% w/w。如 Superdex 凝胶过滤实验所示,组合物包括至少约 80mol% 的大于 5000Da 的材料,和至高 20mol% 分子量在 1000 和 5000Da 之间的材料,更优选存在至少 85% 材料,更优选至少 90% 的超过 5000Da 的材料。本发明还涉及组合物,其中包含 Man α 3Man α 2 的糖类的量是所有甘露糖表位的至少 5%,且更优选所有甘露糖表位的至少 8%,且更优选所有甘露糖表位的至少 10%,更优选所有甘露糖表位的至少 15%,更优选所有甘露糖表位的至少 17%,更优选所有甘露糖表位的至少约 20%,更优选所有甘露糖表位 (或结构) 的至少约 23%,更优选所有甘露糖表位 (或结构) 的至少约 25%,更优选所有甘露糖表位 (或结构) 的至少约 28%,如实施例和表 4 所示。本发明涉及组合物,其中基于质子 H1 信号积分 (如实施例 14 所定义),组合物具有至少约 0.95 的甘露聚糖 / 淀粉比,和至少约 0.5 的甘露聚糖 / 多肽比,以及这些的其他优选的配比。

[0253] 本发明特别涉及优选的组合物,其中该组合物通过使用根据本发明的方法来制备。

[0254] 本发明还涉及材料的预处理,包括选自以下组的一种或几种:1) 自溶,优选通过在 20 至 85 摄氏度,更优选 30 至 80 摄氏度,在优选的实施方案中,在 30 和 60 摄氏度之间或在 60 和 85 摄氏度之间的温度下,在约 3-7,更优选 3.5 和 6.5 之间,更加优选 4 和 6.5 之间的 pH,孵育酵母粗材料至少约 0.5-48h,更优选 1-24h,更加优选 2-16h。完整的酵母 (pH 约 6) 材料在实施例 12 和 13 中热处理,并且在实施例 14 中显示出一些良好的结果。本发明还涉及在较强的碱水解和酸水解之前,使用碱洗涤作为预处理,具有实施例 12 和 13 所示的良好作用。

[0255] JP2006169514 是关于碱水解的相对密切的背景,然而该过程使用非常短的酸反应来沉淀蛋白质,因此材料蓬松,且该过程产生含有基本上较高的葡聚糖量的成分 (无蛋白

质 / 肽连接的甘露聚糖)。US2005020490 的目标是产生无 b6- 葡聚糖的纯甘露聚糖或葡聚糖成分,和优选不用分级分离的对完整酵母材料的酸水解。

[0256] 现在,本发明将通过仅参考以下非限制性实施例的方式详细描述。

[0257] 实施例 1

[0258] 根据图 1 所示的过程加工啤酒酵母

[0259] 方法

[0260] 酵母细胞材料(由约 20%干物质组成的浆状物)在 pH 12 或 12.5 或 13 和 +80°C 用 NaOH 处理 2 小时,之后冷却至室温。然后,该材料在 pH 2.5 和 +80°C 用磷酸 (H_3PO_4) 处理 4 小时,然后在室温下用 NaOH 中和。

[0261] 将该材料用水稀释至 1% 的干物质,并在温和混合和室温下孵育 2 小时。离心混合物 (3000 或 4000rpm ;1811 或 3220rcf, 室温下 5-20 分钟),并弃去不溶成分。上清液在具有超滤膜(再生纤维素, Millipore)NMWL1000 或 3000 的搅动超滤池 (Millipore) 中进行超滤。

[0262] 冻干高于 MW 1000 或 3000 的可溶材料(取决于使用的膜)。

[0263] 市售酸水解的酵母材料用在 80%乙醇中的 50mM NaOH 处理。弃去洗涤物,并在水中由 80%乙醇不溶成分制备 1% 的溶液,并如上所述地孵育。

[0264] Glucanex 处理

[0265] 酵母细胞材料用碱水解,并在 +37°C 用 Glucanex(来自哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 的裂解酶, 1.18U/g, Sigma)1-4mg/ml 处理 6-23 小时。通过在 +80°C 孵育 0.5h 终止处理。然后材料用酸处理,并如实施例 1 所描述进一步加工材料。

[0266] 沉淀磷酸盐的方法

[0267] 中和后,在酸水解的酵母细胞材料中产生的磷酸盐用定量摩尔量的 $CaCl_2$ 在 pH 8 的略微碱性的溶液中沉淀。

[0268] 用于分级分离的沉淀可溶产物的一般方法

[0269] 酸水解后的酵母材料的可溶组分用高浓度(通常至少 80%)的低毒性溶剂(诸如醇, 优选 EtOH 或丙酮),通常在约 1-25 摄氏度,更优选 1-8 摄氏度的温度下,从诸如 1% 的可溶产物的浓缩水溶液中沉淀,且优选从含盐的制品或从酸水解和 $CaCl_2$ 沉淀之后的酵母材料的制品沉淀。沉淀被优化以将本发明的可溶酵母材料分离为沉淀物,和从产物分级分离较低分子量材料。

[0270] 沉淀物可能含有盐,其可通过例如在将沉淀的可溶成分溶解后通过过滤或沉淀除去,例如通过 Ca^{2+} 离子沉淀磷酸盐。

[0271] 酸水解的酵母细胞材料的可溶成分或 $CaCl_2$ 沉淀的酸水解的酵母细胞材料的可溶成分用丙酮,基本上在以上的条件下孵育,沉淀物是根据本发明的方法中的产物。

[0272] 实施例 2

[0273] 根据实施例 1 产生的产物中可溶糖组分的量与市售酸水解的酵母材料对比。将 5mg(干重)实施例 1 型产物和市售酵母材料溶解在 0.7ml 99.9% 的重水中。1h 溶解时间后,通过离心除去任何不溶的物质。取 600 μ l 溶液,向两溶液加入在重水中的 0.5 μ mol 的苯丙氨酸甲酯作为内标定量标准。使用在 296K 操作的 Varian 500MHz 谱仪,收集一维 1H -NMR 谱。

[0274] NMR 谱在图 3 中提供。两个谱显示了预期的可溶糖组分：淀粉、酵母甘露聚糖和酵母 β 1,6- 葡聚糖。通过 5.40ppm 的 Glc α 1-4 残基 H-1 信号检测到淀粉。酵母甘露聚糖单元清楚地反映了在 5.0-5.3ppm 可归属的 H-1 信号：(-2)Man α 1-2 H-1 在 5.30ppm, 末端 Man α 1-3 H-1 在 5.14ppm, (-6) (-2)Man α 1-6 H-1 在 5.12ppm 和 (-2)Man α 1-6 H-1 在 5.10ppm。5.05ppm 的大信号含有 (-6)Man α 1-2、末端 Man α 1-2 以及 (-3)Man α 1-2 的 H-1 信号。通过 4.53ppm 的 Glc β 1,6 残基 H-1 信号显示了酵母 β 1,6- 葡聚糖。

[0275] 通过对比苯丙氨酸甲酯的芳族氢信号和甘露聚糖的 H-1 信号, 评价了可溶糖组分的量。间位和对位氢被用于分析。未测量淀粉。基于这一分析, 5mg (干重) 的实施例 1 产物 (图 3A) 产生 4.4 μ mol (0.7mg) 的 Man α 残基, 而 5mg (干重) 的市售酵母材料 (图 3B) 产生 0.54 μ mol (0.09mg) 的 Man α 残基。因此, 实施例 1 材料的可溶部分含有 14% 重量/重量的甘露糖, 而市售材料含有 1.8% w/w (基于干重的重量%)。

[0276] 如实施例 1 所示制备的材料和市售酸水解的酵母材料两者都含有 4.53ppm 的 Glc β 1,6 H-1 信号显示的 β 1,6- 葡聚糖。发现两种材料均带有约 0.1 μ mol (0.016mg) Glc β 残基 /5mg 干样品。可溶 β 6- 葡聚糖的量为总组合物干质量的约 0.32% (w/w)。

[0277] 在两种材料中, 仅观察到痕量的 β 1,3- 葡聚糖 (小于 β 1,6- 葡聚糖的量的 1/5 或 20%)。因此, 在某些制品中, 含 β 3- 葡萄糖结构的可溶材料的量是约 0.0604%, 且依据过程, 其可以被完全除去。应认识到, 这一材料是可溶的, 且可含有其他结构, 并与常规的酵母 β 3- 葡聚糖材料非常不同。

[0278] 实施例 3

[0279] 通过用 2- 氨基苯甲酰胺还原氨化, 随后凝胶过滤色谱, 获得了如实施例 1 所示制备的材料中可溶糖组分的大小特征。将 1mg 的产物材料溶解于含 100 μ mol 的 2- 氨基苯甲酰胺和 0.5M 氰基硼氢化钠的 1ml 0.2M 硼酸钠缓冲液中。使反应混合物保持在 37°C 持续 22h。0.2mg 小份的产物材料的色谱分析是在 Superdex Peptide 10/300GL 柱上以 1ml/min 用 100mM 碳酸氢铵洗脱。洗脱的标记材料通过 336nm 的 UV 检测。通过在相同的色谱条件下运行相似标记的葡聚糖标准品, 使柱标准化。

[0280] 图 4 显示了产物材料糖的洗脱特征曲线。在图中指示了葡聚糖 5000 和葡聚糖 1000 的洗脱位置。源自根据实施例 1 制备的样品的可溶糖类成分分别具有约 74% (用碱和酸制备; 截留 1000Da) 和 87% (用酸和碱制备; 截留 3000Da) 的 > 5000Da 的和 26% 和 13% 1000-5000Da 的寡糖和多糖, 计算为 AB 源的可溶材料的 Superdex Peptide 色谱的面积 (336nm 的吸收单位乘以洗脱体积)。

[0281] 实施例 4

[0282] 如实施例 1 所示制备的材料的免疫调节活性可通过人类白细胞测定来体外测量, 该测定基本如以下所描述: Savolainen J, Nieminen K, Laaksonen K, Laiho T, Jacobsen L, Lahesmaa R, Terho EO, Valovirta E. Allergen-induced in vitro expression of IL-18, SLAM and GATA-3 mRNA in PBMC during sublingual immunotherapy. (舌下免疫治疗期间, PBMC 中 IL-18、SLAM 和 GATA-3 mRNA 的变应原诱导的体外表达。) Allergy 62:949-53 (2007) 和 Wan CP, Park CS, Lau BH. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. (快速和简单的显微荧光测定吞噬测定) J. Immunol. Methods. 162:1 (1993) 和 Busetto S, Trevisan E, Patriarca P, Menegazzi R. A single-step, sensitive flow

cytofluorometric assay for the simultaneous assessment of membrane-bound and ingested *Candida albicans* in phagocytosing neutrophils (用于吞噬嗜中性粒细胞中膜结合的和摄入的白色念珠菌的同时评价的一步敏感性流式细胞荧光测定). *Cytometry A*. 58 :201 (2004)。

[0283] 为了测量根据本发明加工的酵母细胞材料的可溶成分的细胞因子调节特征,从人类外周血中分离单核细胞 (PBMC)。将 PBMC 应用到细胞培养板上,并在不同浓度的根据图 1 或 2 或实施例 1 制备的材料 (例如 0.1、1、10 和 100 μ g/ml) 存在下孵育。具体地,可从患有变态反应的人类收集 PBMC,且该 PBMC 可用相关的变应原刺激。在典型条件,例如 +37°C,在具有 5% CO₂ 的潮湿气氛中孵育培养物。在合适的孵育时间 (例如 24-72h) 后,收集细胞和上清液。可从细胞提取总 RNA,以例如通过 PCR 技术,测量单个细胞因子 mRNA 水平。可选择地,例如通过发光检查 (luminometric) 技术,从细胞培养物上清液测量蛋白质水平的细胞因子。提供信息的细胞因子包括例如白介素 4、5、10、12、13、18 以及干扰素 - γ 。

[0284] 如实施例 1 所示制备的材料刺激了巨噬细胞的吞噬活性。其测量是通过使用从小鼠或人类获得的巨噬细胞,或通过使用巨噬细胞型细胞系。培养巨噬细胞,然后将其分配到例如 96 孔板中,并孵育,以使得细胞在可溶成分的存在下粘连到孔上。加入荧光素连接的病原体,例如大肠杆菌或白色念珠菌细胞,并孵育合适的一段时间,以使得吞噬发生。通过加入台盼蓝猝灭细胞外荧光,这将引起荧光素标记的细胞的典型的绿色荧光变成红色。被吞噬的细胞保留绿色荧光。因此,通过与摄入的荧光细胞相关的绿色荧光的强度,测量巨噬细胞的吞噬活性。在 485nm 激发和 530nm 发射下,在孔中直接测量荧光。可选择地,通过流式细胞计测量吞噬活性,其中绿色荧光还指示摄入的病原体细胞,而红色荧光为细胞外病原体。

[0285] 实施例 5

[0286] 为了测量实施例 1 型产物的体内免疫调节活性,基本上如 Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. (膳食诱导的肥胖小鼠当被流感病毒感染时,具有增加的死亡率和改变的免疫反应) *J Nutr*. 137 :1236 (2007) 所述准备小鼠动物试验。用补充了实施例 1 材料的标准饲料喂养一组小鼠合适的一段时间,优选数星期。对照组小鼠仅用标准饲料喂养。测量典型的参数,包括饲料摄取量和体重。具体地,测量从血液分离的巨噬细胞的细胞因子和 IgA 水平以及吞噬活性。任选地进行组织学实验,以分析肠道免疫细胞。

[0287] 为了分析膳食对病原体抗性的作用,建立了攻击试验。例如,通过合适的流感病毒菌株攻击小鼠。追踪小鼠的存活率。如果在攻击中使用非致死菌株,通过例如在呼吸道中的病毒滴定度或肺和脑中病毒抗原的免疫组织学,追踪感染的严重性。使用获得标准饲料的对照组小鼠。

[0288] 实施例 6

[0289] 含糖类成分的可溶免疫刺激组合物在健康快餐生产中的用途

[0290] 来自实施例 1 的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物,或单独的糖类成分以 0.5% (w/w) 和 1% (w/w) 被加入到饼干、点心条 (snack bar) 和面包中。补充了含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的饼干、点心条和面包具有比不含含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的

饼干、点心条和面包更好的免疫刺激作用。当摄入补充的饼干、点心条和面包时,预期含糖类成分的可溶免疫刺激组合物刺激了肠道的自身免疫系统,并有益于消费者的免疫状态。

[0291] 实施例 7

[0292] 根据实施例 1 加工啤酒酵母细胞壁乳膏,并将可溶成分分离,并喷雾干燥或冻干。通过例如色谱方法实施例可进一步分离糖类成分。

[0293] 组合物或糖类成分是 FDA 的 G. R. A. S.。组合物可用于在许多中食品中补充 β 1, 6) 葡聚糖和甘露聚糖的高质量天然来源。这一生物活性材料刺激小鼠的免疫系统,并预防病毒、细菌和其他微生物感染。

[0294] 实施例 8

[0295] 提取物在动物饲料中的使用

[0296] 根据实施例 1 制备了含糖类成分的可溶免疫刺激组合物。

[0297] 这一组合物被用于补充保育猪 (nursery pig) 的膳食,持续例如断奶后 28 天。补充剂与猪饲料混合,并以不同剂量,例如总饲料的 0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、% 0.5% 或 2% 添加使用。

[0298] 对照膳食含抗生素。断奶后的猪 (17-22 天大) 基于体重,随机分到对照膳食或治疗膳食。试验期后,对猪称重。在攻击实验中,使用引起腹泻的大肠杆菌,诸如 K88 大肠杆菌 (K88 e coli)。

[0299] 实施例 9

[0300] 功能饮料和食品

[0301] 根据本发明的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物被加入到饮料或食品 (例如酸奶酪),以改善易于感染的人的健康,诸如免疫缺陷个体,剧烈训练中的运动员,具有消耗性的生活方式或患有胃肠道问题的人。用作无酒精饮料的合适制剂:25% 胡萝卜、番茄和 / 或橙的果汁含量、1% (w/v) 含糖类成分的可溶免疫刺激组合物制品,或 1% 单独的糖类成分。

[0302] 对本领域技术人员显然地是,虽然为了清除和理解的目的,在一定程度上详细地描述了本发明,可对本文描述的实施方案和方法进行多种改良和修改,而没有脱离本说明书公开的发明性概念的范围。

[0303] 实施例 10

[0304] 实施例 2 的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物在湿疹治疗中的用途

[0305] 患有对目前接受的皮肤洗液治疗无反应的湿疹的选择的一组患者用含有例如 1% 实施例 2 的含糖类成分的可溶免疫刺激组合物的悬浮液的洗液治疗。洗液一天两次应用。由皮肤病学家每周评价皮肤的损伤和疼痛的改善。预期含糖类成分的可溶免疫刺激组合物洗液减少了与疼痛相关的损伤,并加快损伤愈合。

[0306] 实施例 11

[0307] 新的组合物对病原体结合的作用的优化是通过以下研究:将引起腹泻的标记的大肠杆菌覆盖到固相固定的根据本发明的组合物 (例如为拟糖脂 (neoglycolipids)),并观察对实施例 1 和 / 或通过本发明的其他优选的方法产生的组合物或引起动物腹泻的病毒体的结合,并通过抑制细菌对组合物或天然受体聚糖,特别是含 Man α 的拟糖脂或脂质的结合,诸如 PCT FI2003/00528 所描述。

[0308] 实施例 12

[0309] 酵母细胞材料（由约 20% 干物质组成的浆状物）用 NaOH 滴定至 a) pH 7, b) pH 10 或 c) pH 13, 然后在 +80°C 孵育 2.25 小时。通过孵育完整的酵母材料 (pH 约 6) 相似地进行对照反应。然后将溶液冷却至室温, 并用磷酸 (H_3PO_4) 在 pH 2.5 并在 +80°C 下处理 4.25 小时, 然后在室温下用 NaOH 中和。

[0310] 溶液用水稀释至 1% 干物质, 并且在温和搅拌下在室温孵育 2 小时。将混合物离心 (3000 或 4000rpm; 1811 或 3220rcf, 5-20 分钟, 在 RT 下), 并弃去不溶成分。上清液在具有超滤膜 (再生纤维素, Millipore) NMWL1000 的搅动超滤试池 (Millipore) 中进行超滤, 并冻干渗余物。这些提取物的收率在表 1 中提供。结果显示, 当酵母材料首先在碱溶液中处理时, 获得了 > 1000Da 材料收率的明显增加。最显著地是, 如果酵母材料在 pH 13 进行水解, 获得了 > 1000Da 材料的 2.7- 倍的增加。

[0311] 实施例 13

[0312] 酵母细胞材料（由约 20% 干物质组成的浆状物）用磷酸 (H_3PO_4) 在 pH 2.5 并在 +80°C 下处理 4.25 小时。然后将溶液冷却至室温, 并用 NaOH 滴定至 a) pH 7, b) pH 10 或 c) pH 13, 然后在 +80°C 孵育 2.25 小时。然后, 反应在室温下用 NaOH 中和。对照反应 A 仅包括酸水解步骤。进行另一对照, 其中冻干酸水解材料, 并用 0.1M NaOH (标称 pH 13) 的 80% 乙醇溶液洗涤。弃去洗涤物。

[0313] 在水中制备每干物质的 1% (w/v) 溶液, 并且在温和搅拌下在室温孵育 2 小时。将混合物离心 (3000 或 4000rpm; 1811 或 3220rcf, 5-20 分钟, 在 RT 下), 并弃去不溶成分。上清液在具有超滤膜 (再生纤维素, Millipore) NMWL 1000 的搅动超滤试池 (Millipore) 中进行超滤, 并冻干渗余物。这些提取物的收率在表 1 中提供。结果显示, 当包括碱水解时, > 1000Da 材料收率的明显增加。用碱性乙醇溶液洗涤冻干的酸水解的酵母材料去除一些 > 1000Da 材料, 因为收率比酸水解的材料低。然而, 如以下实施例 14 所示, 这些不主要是甘露聚糖, 因为在碱性乙醇洗涤的材料中相对甘露聚糖收率较高。

[0314] 实施例 14

[0315] 通过 NMR 分析了根据实施例 12 和 13 制备的产物中可溶糖组分的量。将 5mg (干重) 的每种产物和 1.0 μ mol 的苯丙氨酸甲酯溶解于 0.6ml 99.9% 的重水。使用在 296K 操作的 Varian 500MHz 谱仪收集一维 1H -NMR 谱。积分实施例 2 中列出的甘露聚糖 H-1 信号, 并将它们的面积与苯丙氨酸环的芳族质子的积分面积对比。这一定量分析的结果在表 2 中提供。

[0316] 根据实施例 12, 在其中酵母材料首先在 pH 10 然后在 pH 2.5 水解的过程中, 获得了甘露聚糖的最高相对量 (纯度), 提取产物的 23.5% (w/w)。如实施例 13 所描述, 当水解步骤逆转, 也获得了 19.3% (w/w) 的高量的甘露聚糖。然而, 用 pH 13 的最高碱性条件, 获得了优选的甘露聚糖的最高总收率和总提取物的最高量。

[0317] 由 NMR 谱, 还评价了甘露聚糖对淀粉的比。这一数据在表 3 中收集。由甘露聚糖 H-1 信号的积分面积和淀粉源的 H-1 信号 (Glc α 1-4 H-1 5.40ppm, Glc α 1-6 H-1 4.97ppm) 的积分面积计算这一比。在此, 明显地是, 包括碱水解, 随后酸水解的过程产生最高的甘露聚糖 / 淀粉比。此外, 优选中强碱水解的条件, 并且在中性或约 pH 6 (完整材料) 的洗涤和加热显示出改进。基于质子 NMR H1 信号的优选的甘露聚糖 / 淀粉比是至少约 0.85、更优选至少约 0.90、更优选至少约 0.95、更优选至少约 1.0、更优选至少约 1.1、更优选至少约 1.2、更

优选至少约 1.25、更优选至少约 1.3、更优选至少约 1.3、更优选至少约 1.4、更优选至少约 1.5、更优选至少约 1.6、更优选至少约 1.7、更优选至少约 1.8。约指示约 0.1 单位,更优选 0.05 单位,更优选约 0.03 单位的变化。

[0318] 通过对比甘露聚糖信号面积和 0.8-1.0ppm 的脂族质子信号面积,评估甘露聚糖对多肽材料的比。这一质子-NMR 信号面积显示了脂族氨基酸(例如缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)的大多数甲基质子信号。甘露聚糖/多肽比数据在表 3 中提供。该值表示甘露糖 H1 信号的积分与 0.8-1.0ppm 的脂族质子信号(甲基质子信号)的积分的比。在本文使用的提取方法中,包括 pH10 水解步骤的方法似乎产生了最低量的脂族材料信号。洗涤程序也产生了低蛋白质材料。优选这些产物为具有高糖含量的低蛋白质材料。当考虑到制品中甘露糖的量时,来自较强碱水解的较高相对 peptinuos(肽/蛋白)材料含量将表明可溶糖肽也具有有用的多价聚糖供给能力(presentation capacity)。最高 pH 产物的信号还表明可能可溶的蛋白组分。应强调的是,这一分析无意给出真正的甘露聚糖/蛋白质质量比,而是产生较高纯度的甘露聚糖的提取方法的相对功效指数。

[0319] 基于质子 NMR H1 信号的优选的甘露聚糖/(多)肽比是至少约 0.45、更优选至少约 0.40、更优选至少约 0.45、更优选至少约 0.5、更优选至少约 0.55、更优选至少约 0.60、更优选至少约 0.65、最优选至少约 0.70。约指约 0.1 单位,更优选 0.05 单位,更优选约 0.03 单位的变化。

[0320] NMR 谱还提供 Man-键比的评估。这些是由 5.31ppm(-2Man α 1-2 H-1)、5.14ppm(末端 Man α 1-3 H-1)、5.11ppm(-2,6Man α 1-6 H-1 和 -2Man α 1-6 H-1) 和 5.04ppm(-6Man α 1-2 H-1、末端 Man α 1-2 H-1 和 -3Man α 1-2 H-1) 的积分信号面积计算。表 4 收集了这些积分的面积。此外,计算了 5.14ppm 信号(包括末端 Man α 1-3 H-1)对所有 Man H-1 信号的比。数据显示了,该过程略微减少了末端 Man α 3Man α 2 的相对量,这是依据中强碱水解优选的碱强度。另一方面,在高碱强度下形成的产物如在 Man α 3 与 Man α 3Man α 2Man α 2 之间的距离更大,并具有有用的生物活性。

[0321] 实施例 15. 增加的溶解度,缺乏味道和气味

[0322] 将来自实施例 12 和 13 的产物溶解成 2、3、4、5、6、7、8、9 和 10% 的溶液。观察到酸碱处理的材料的高的和增加的溶解度。本发明尤其涉及本发明的材料,其在室温下为可溶的,或基本上溶解为 2、3、4、5 或 6% 的水溶液。本发明尤其涉及来自中强和强碱水解的高度可溶的产品,其可至少以 2%、更加优选以 4%、更加优选以 5%、最优选以 6% 的浓度溶解(或基本上至少 95%,更优选 97% 可溶)。

[0323] 为了测试味道和气味,将本制品溶解于纯水中,成为浓度 1%、0.5%、0.1% 和 0.01% 的溶液。健康的常规试验人测试味道和气味,并在低于 0.5% 浓度或低于 0.1% 浓度的浓度下,通常没有观察到产物的任何(或任何实际的)味道或气味。1% 的溶液可能具有一些味道或气味,但这在最佳过程中被避免。

[0324] 表 1. 如实施例 12 和实施例 13 中描述的可溶酵母产物的提取收率。

[0325]

样品	收率 (mg)/克酵母干物质
pH7 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	139.5
pH10 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	139.4
pH13 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	280.5
完整 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	104.9
pH2.5 - 1% - MWCO1000	160.7
pH2.5 - 冻干 - NaOH/EtOH 洗涤 - 1% - MWCO1000	137.5
pH2.5 - pH7 - 1% - MWCO1000	160.7
pH2.5 - pH10 - 1% - MWCO1000	191.6
pH2.5 - pH13 - 1% - MWCO1000	314.8

[0326] 表 2. 如实施例 12 和实施例 13 中描述地制备的酵母甘露聚糖的收率。通过实施例 14 中所描述的质子 -NMR 实验进行定量。

[0327]

样品	收率 Man (mg/5 mg 产物)	收率 Man (% , w/w)
pH7 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	0.52	10.4
pH10 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	1.17	23.5
pH13 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	0.90	18.1
完整 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	0.82	16.3
pH2.5 - 1% - MWCO1000	0.46	9.3
pH2.5 - 冻干 - NaOH/EtOH 洗涤 - 1% - MWCO1000	0.75	14.9
pH2.5 - pH7 - 1% - MWCO1000	0.71	14.1
pH2.5 - pH10 - 1% - MWCO1000	0.97	19.3
pH2.5 - pH13 - 1% - MWCO1000	0.67	13.5

[0328] 表 3. 酵母提取物中甘露聚糖对比淀粉和多肽型材料的比。由实施例 14 中描述的质子 -NMR 谱测量丰度。甘露聚糖 / 多肽材料比预期描述为这一提取系列中的比,即显示的提取类型分离甘露聚糖的功效。这不是定量的甘露聚糖 / 蛋白质比。

[0329]

样品	甘露聚糖/淀粉比	甘露聚糖/多肽材料比
pH7 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	0.83	0.22
pH10 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	1.59	0.70
pH13 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	1.78	0.33
完整 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	0.96	0.35
pH2.5 - 1% - MWCO1000	0.82	0.32
pH2.5 - 冻干 - NaOH/EtOH 洗涤 - 1% - MWCO1000	0.90	0.48
pH2.5 - pH7 - 1% - MWCO1000	0.95	0.42
pH2.5 - pH10 - 1% - MWCO1000	1.26	0.66
pH2.5 - pH13 - 1% - MWCO1000	0.65	0.33

[0330]

表4. 如实施例12和13所描述制备地酵母提取物中Man残基的比。信号5.31 ppm (-2Man α 1-2 H-1) 的积分面积设置为100。

	-2Man α 1-2 H-1 5.31 ppm	Man α 1-3 H-1 5.14 ppm	-2,6Man α 1-6 H-1 -2Man α 1-6 H-1 5.11 ppm	-6Man α 1-2 H-1 Man α 1-2 H-1 -3Man α 1-2 H-1 5.04 ppm	Man α 1-3 %
pH7 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	100.00	179	97.0	191	31.6
pH10 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	100.00	170	106.0	191	30.0
pH13 - pH2.5 - 1% - MWCO1000	100.00	125	88.0	125	28.5
Intact - pH2.5 - 1% - MWCO1000	100.00	175	87.0	187	31.9
pH2.5 - 1% - MWCO1000	100.00	153	86.0	180	29.5
pH2.5 - 冻干 - NaOH/EtOH 洗涤 - 1% - MWCO1000	100.00	146	92.0	170	28.7
pH2.5 - pH7 - 1% - MWCO1000	100.00	172	90.0	184	31.5
pH2.5 - pH10 - 1% - MWCO1000	100.00	162	92.0	174	30.7
pH2.5 - pH13 - 1% - MWCO1000	100.00	129	87.0	155	27.4

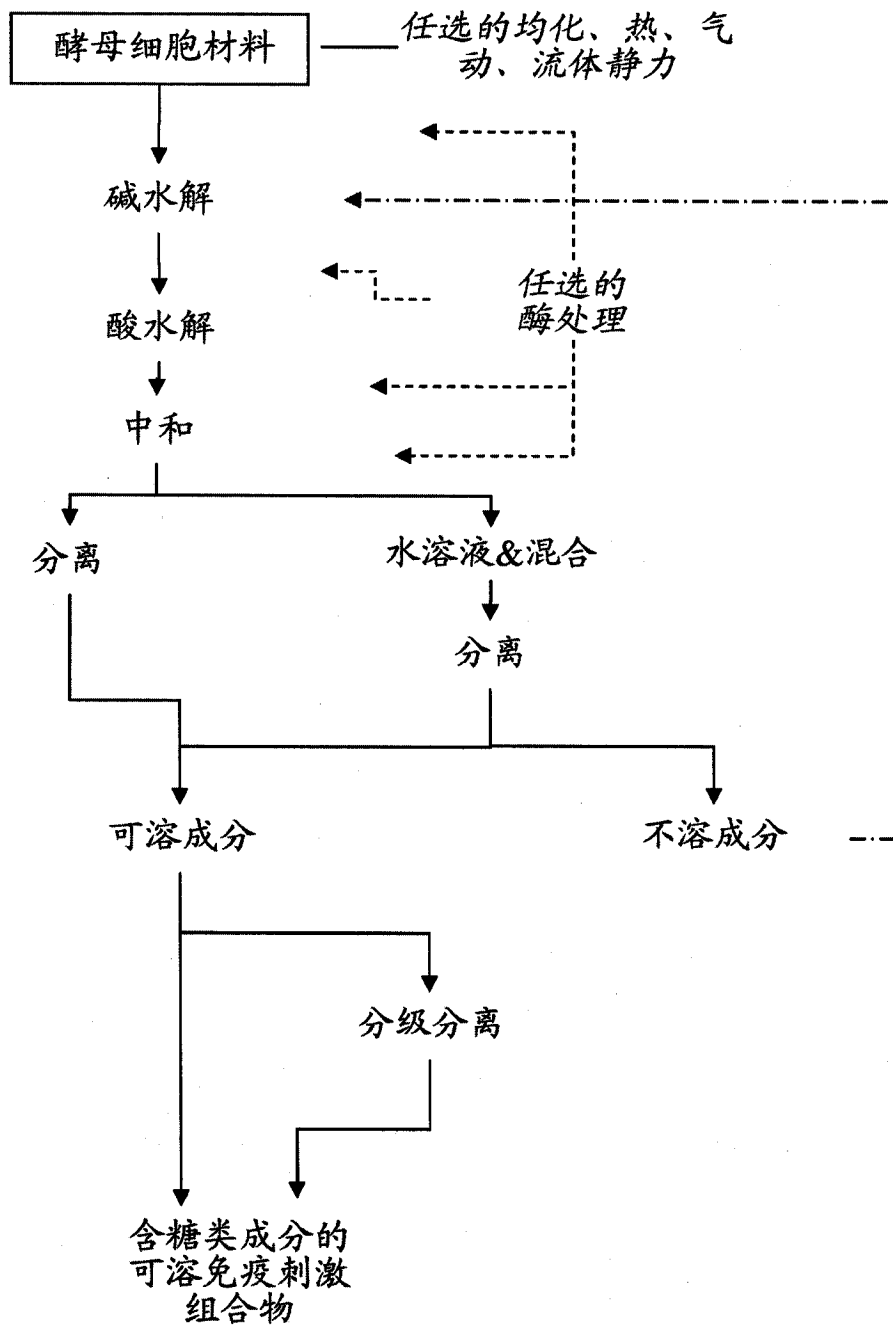


图 1

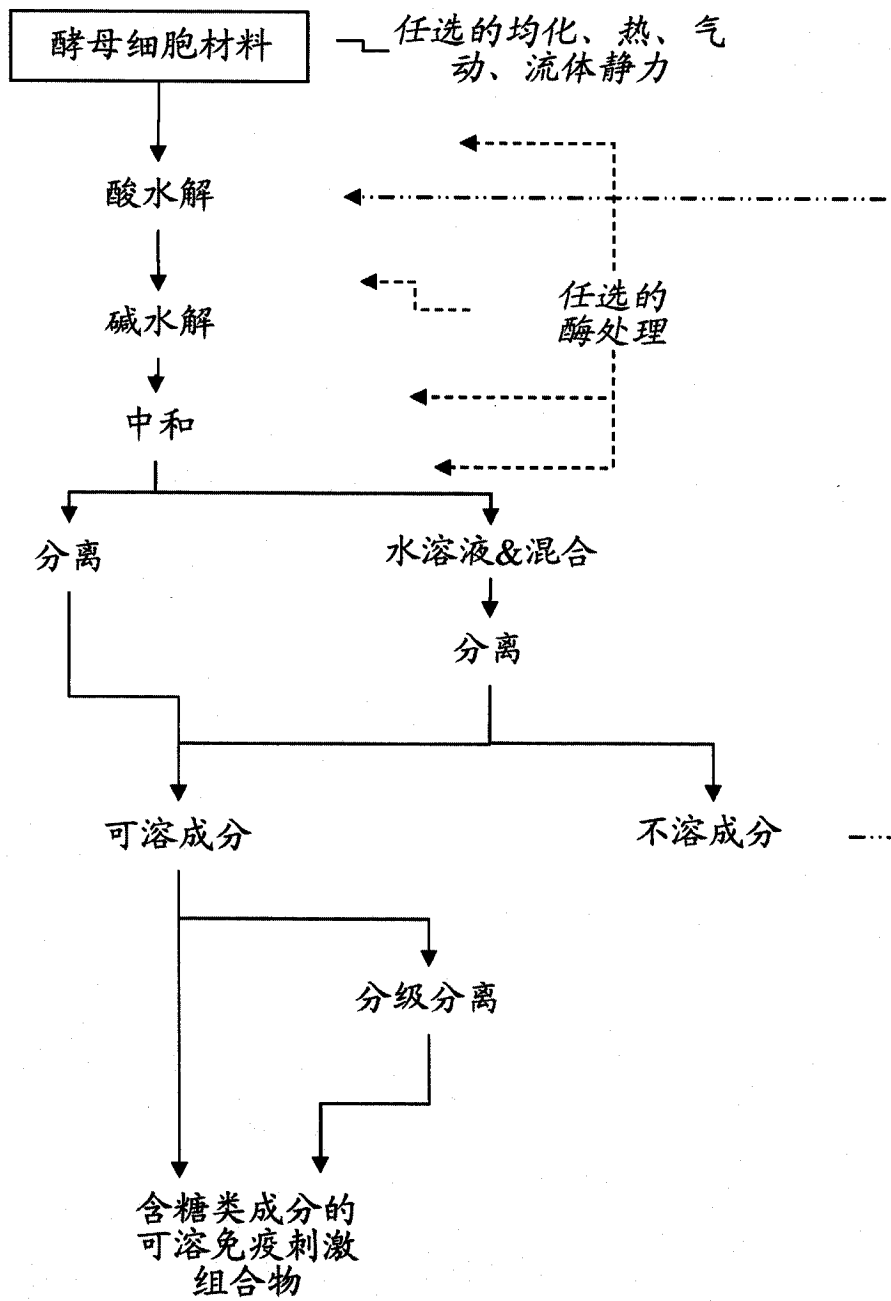


图 2

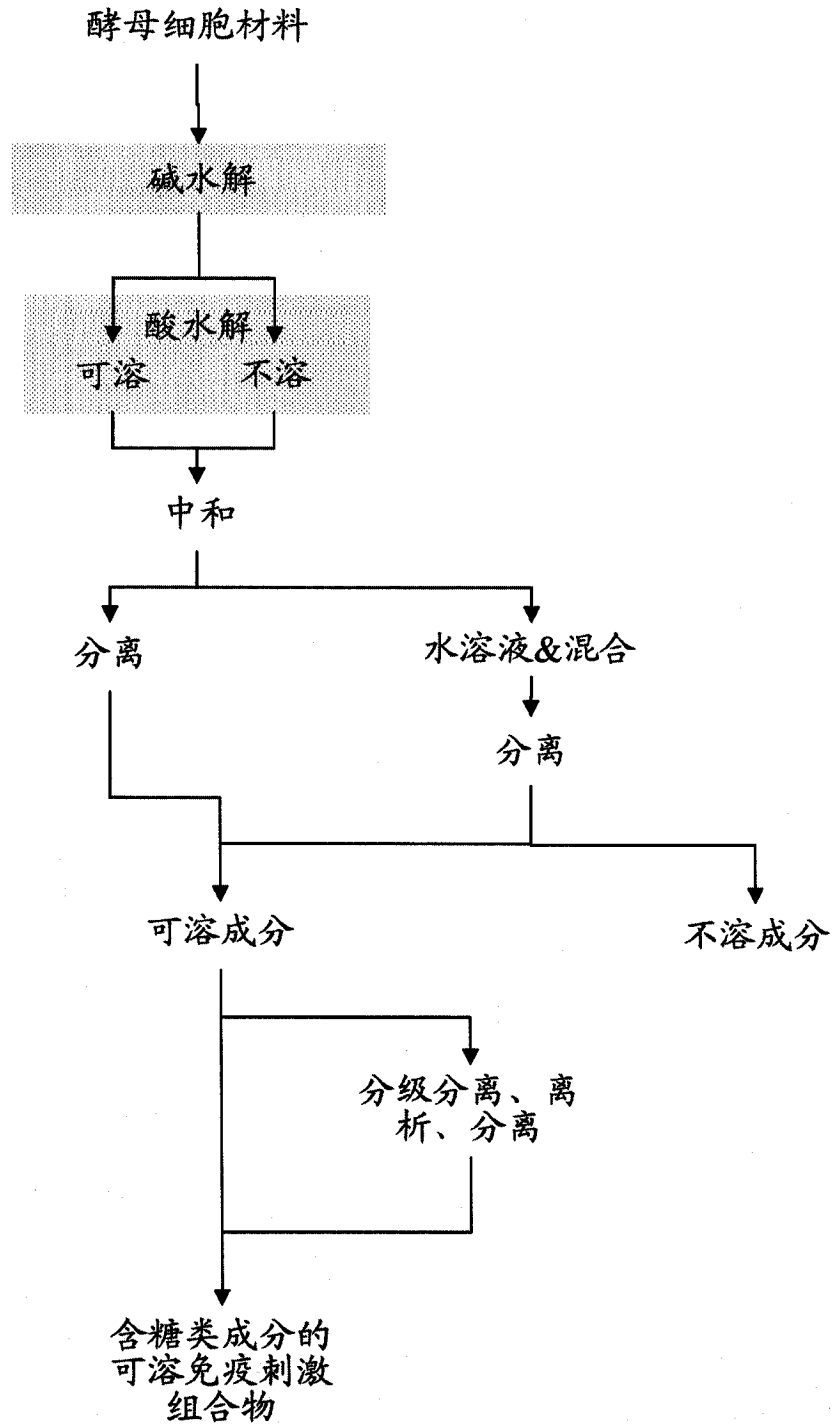


图2(续)

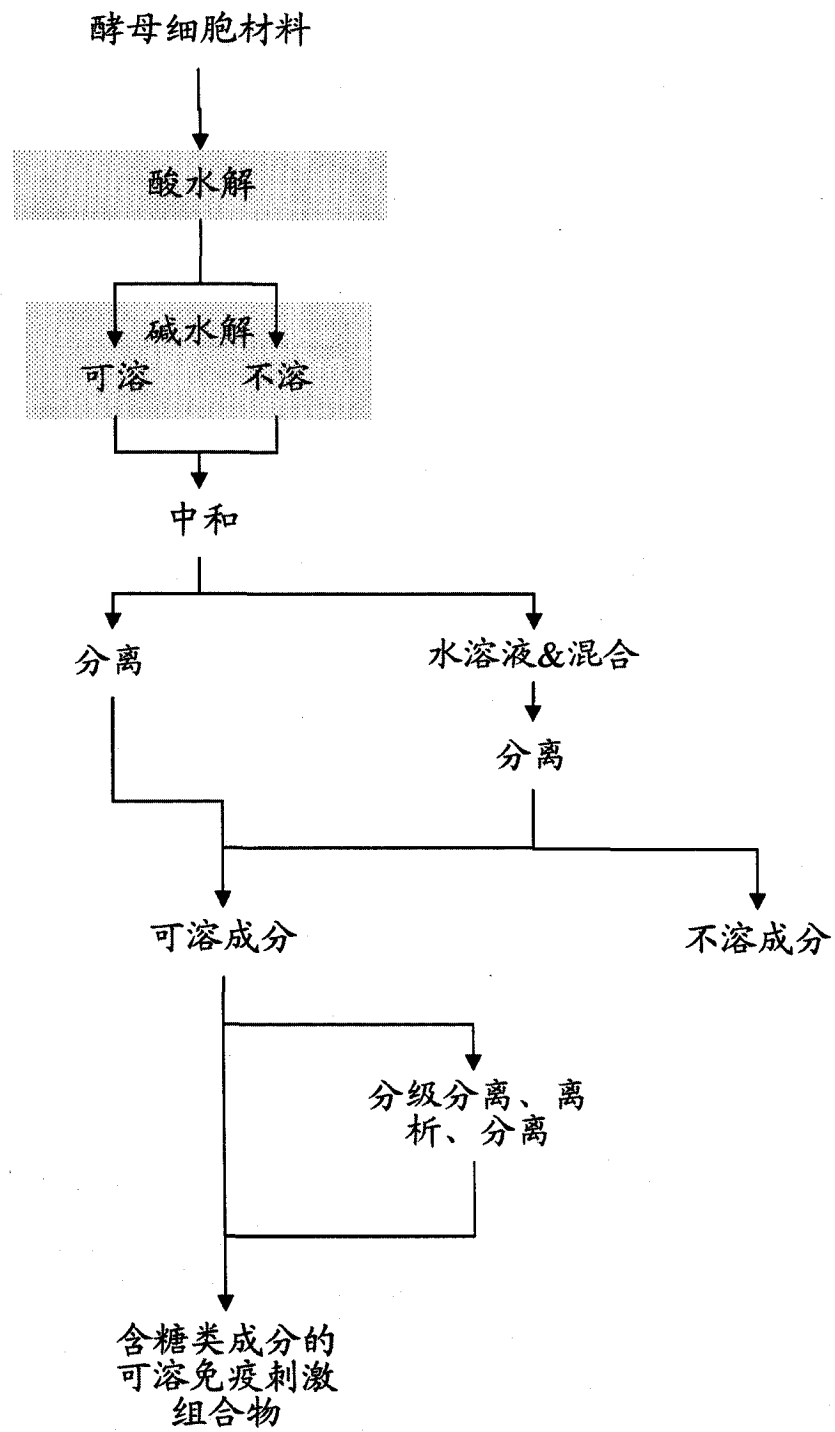


图2(续)

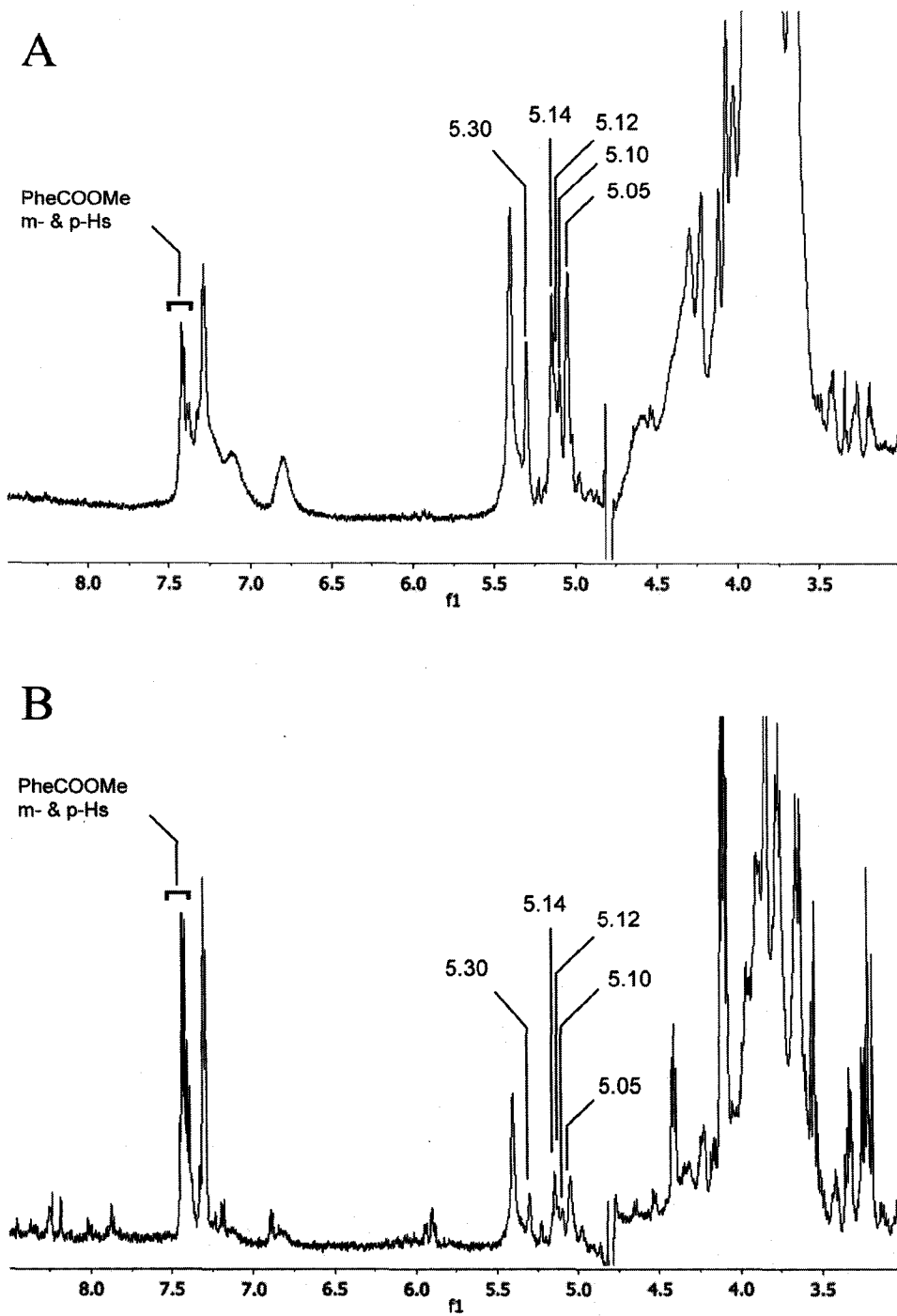


图 3

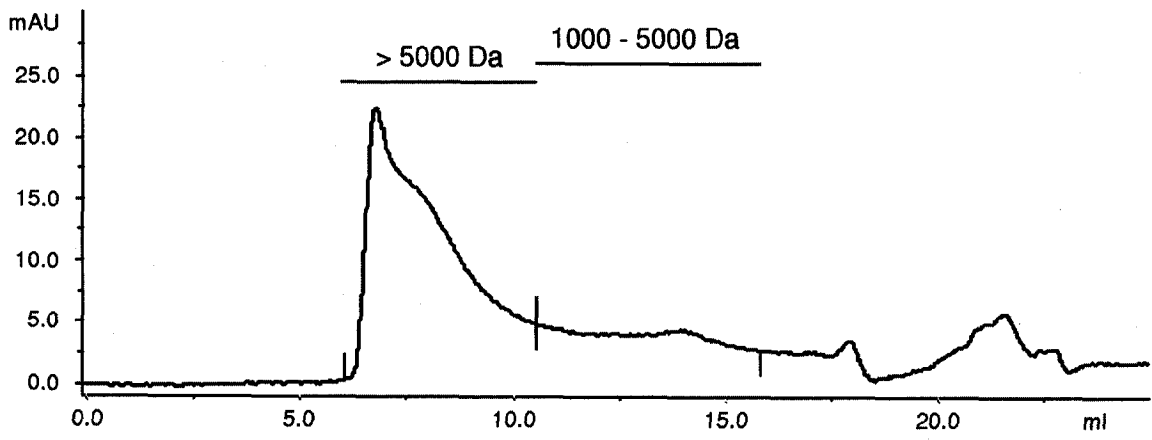


图 4