

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580043302.6

[51] Int. Cl.

C08B 37/00 (2006.01)

C12S 3/02 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月23日

[11] 公开号 CN 101111523A

[22] 申请日 2005.10.18

[21] 申请号 200580043302.6

[30] 优先权

[32] 2004.10.18 [33] US [31] 10/711,980

[86] 国际申请 PCT/CA2005/001605 2005.10.18

[87] 国际公布 WO2006/042403 英 2006.4.27

[85] 进入国家阶段日期 2007.6.15

[71] 申请人 进取生物活性有限公司

地址 加拿大爱德华太子岛

[72] 发明人 P·A·J·库里 S·佩特莱基希

A·J·迈尔斯

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

代理人 张广育 姜建成

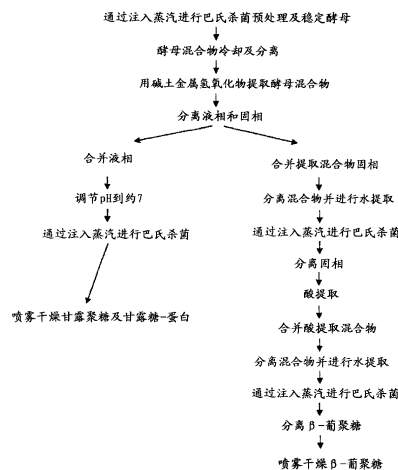
权利要求书 5 页 说明书 39 页 附图 4 页

## [54] 发明名称

制备天然免疫生物提取物的方法及其用途

## [57] 摘要

本发明提供一种由源细胞生产  $\beta - (1, 3/1, 6) - D -$  葡聚糖的方法，包括碱提取源细胞；水提取；酸提取及水提取步骤，其中至少一个水提取步骤中包括通过注入蒸汽使温度达到约  $100^{\circ}\text{C}$ ，进行巴氏灭菌约 15 到约 30min。生产的固体组分包括至少 70% 的  $\beta - (1, 3/1, 6) - D -$  葡聚糖(以干重计)。本发明还提供一种生产甘露聚糖和甘露糖-蛋白复合物的方法，包括收集  $\beta - (1, 3/1, 6) - D -$  葡聚糖工艺的一个碱提取步骤中得到的液相；用酸调节该液相的 pH 值到约 5.0 - 8.0；通过注入蒸汽使温度达到约  $100^{\circ}\text{C}$ ，对该液相进行巴氏杀菌约 15min 到约 30min；及从经过巴氏杀菌的液相中分离出甘露聚糖和甘露糖-蛋白复合物。本发明还提供一种含本发明的方法生产的  $\beta - (1, 3/1, 6) - D -$  葡聚糖和/或甘露聚糖及甘露糖-蛋白的动物饲料。



1. 一种由源细胞生产  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的方法, 所述方法包括:

a) 碱提取源细胞;

b) 水提取;

c) 酸提取; 及

d) 水提取, 以生产一种含至少约 70%  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖 (以干重计) 的固体组分,

其中至少一个水提取的步骤中包括通过注入蒸汽使温度达到约 100°C, 进行巴氏灭菌约 15 到约 30 min。

2. 权利要求 1 的方法, 其中两步水提取都包括巴氏灭菌。

3. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述碱提取步骤 (步骤 a) ) 包括用一种碱溶液处理源细胞, 并加热至约 45°C 到约 80°C 的温度范围内, 持续约 30 min, 接着在约 1 psi 到约 25 psi 的压力范围内提高温度至约 95°C 到约 150°C 的温度范围内, 持续时间在约 15 min 到约 120 min 的范围内。

4. 权利要求 3 的方法, 其中所述碱提取步骤包括加热到温度约 80°C, 持续约 45 min, 接着在约 1 psi 到约 25 psi 的压力下提高温度到约 121°C, 持续约 30 min。

5. 权利要求 3 或 4 的方法, 其中所述碱溶液为碱金属氢氧化物溶液或碱土金属氢氧化物溶液, 源细胞与该碱溶液之比为约 1:5 到 1:15。

6. 权利要求 1 至 5 之一的方法, 其中所述水提取步骤 (步骤 b) 和 d) ) 中, 以固体与水之比在约 1:4 到约 1:20 的范围内的比例添加水, 在约 20°C 到约 100°C 的温度下, 持续约 15 min 到约 2.5 h。

7. 权利要求 1 至 6 之一的方法, 其中所述酸提取步骤 (步骤 c) ) 包括用一种酸溶液进行处理, 固体与酸溶液之比在约 1:4 到约 1:20 的范围内, 并加热到约 45°C 到约 120°C 的温度范围内, 持续约 15 min 到约 2 h。

8. 权利要求 1 至 7 之一的方法, 其中步骤 a) 到 d) 的每一步之后都进行一个将经过处理的物料分离为液相和固相的步骤, 并且其后的步骤针对固相进行。

9. 权利要求 8 的方法, 其中进行步骤 a) 然后对处理物料进行分

离的工序进行1、2或3次。

10. 权利要求8或9的方法，其中步骤c)到d)的工序进行1、2或3次。

11. 权利要求1至10之一的方法，其中将步骤a)的液相收集并合并。

12. 权利要求1至11之一的方法，其中在步骤a)之前，通过注入蒸汽使温度达到约100℃，对源细胞进行巴氏杀菌约15到约30 min。

13. 权利要求1至12之一的方法，其中所述源细胞选自面包酵母、酿酒酵母、失效的酵母及酵母细胞壁物质。

14. 一种由酵母生产 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的方法，所述方法包括：

a) 通过注入蒸汽使温度达到约100℃，对酵母进行巴氏杀菌约15到约30 min；

b) 将经过巴氏杀菌的酵母分离为第一液相和第一固相；

c) 用碱金属或碱土金属的氢氧化物溶液对该第一固相进行碱提取，固体与碱溶液之比在约1:5到约1:15的范围内，加热到约45℃到约80℃的温度范围内，持续约30 min；

d) 在约1 psi到约25 psi的压力范围内，提高温度到约95℃到约150℃的温度范围内，持续时间约15 min到约120 min，以形成碱提取混合物。

e) 将该碱提取的混合物分离为第二液相和第二固相；

f) 在约20℃到约100℃的温度下，用水对该第二固相进行水提取，固体与水之比在约1:4到约1:20的范围内，持续时间为约15 min到约2.5 h，以形成水提取的混合物；

g) 通过注入蒸汽使温度达到约100℃，对该水提取的混合物进行巴氏杀菌约15 min到约30 min；

h) 将该水提取的混合物分离为第三液相和第三固相；

i) 用酸溶液对该第三固相进行酸提取，固体与酸溶液之比在约1:4到约1:20的范围内，并加热到约45℃到约120℃的温度范围内，持续约15 min到约2 h，以形成酸提取的混合物；

j) 将该酸提取的混合物分离为第四液相和第四固相；

k) 用水对该第四固相进行水提取，固体与水之比在约1:4到约

1:20 的范围内, 温度在约 20°C 到约 100°C 的范围内, 持续约 15 min 到约 2.5 h, 以形成水提取的混合物;

1) 通过注入蒸汽使温度达到约 100°C, 对该水提取的混合物进行巴氏杀菌约 15 到约 30 min; 及

m) 将该水提取的混合物分离为第五液相和第五固相, 该第五固相含有至少约 70%  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖 (以干重计)。

15. 权利要求 14 的方法, 其中步骤 a) 到 e) 的工序进行 1、2 或 3 次。

16. 权利要求 14 或 15 的方法, 其中步骤 i) 到 m) 的工序进行 1、2 或 3 次。

17. 权利要求 1 至 13 之一的方法, 该方法还包括通过以下步骤生产甘露聚糖和甘露糖-蛋白复合物:

i) 收集在一个或一个以上的碱提取步骤 (步骤 a)) 中得到的液相;

ii) 用酸将步骤 i) 的液相的 pH 值调节到约 5.0 到约 8.0 的范围内;

iii) 通过注入蒸汽使温度达到约 100°C, 对步骤 ii) 的液相进行巴氏杀菌约 15 min 到约 30 min; 及

iv) 从步骤 iii) 的经过巴氏杀菌的液相分离出甘露聚糖和甘露糖-蛋白复合物。

18. 权利要求 14 至 16 之一的方法, 该方法还包括通过以下步骤生产甘露聚糖和甘露糖-蛋白:

i) 收集在一个或一个以上碱提取步骤 (步骤 e)) 中获得的第二液相;

ii) 用酸调整步骤 i) 中液相的 pH 到约 5.0 到约 8.0 的范围内;

iii) 通过注入蒸汽使温度达到约 100°C, 对步骤 ii) 的液相进行巴氏杀菌约 15 到约 30 min; 及

iv) 从步骤 iii) 经过巴氏杀菌的液相中分离出甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物。

19. 权利要求 17 或 18 的方法, 其中所述分离步骤 (步骤 iv) 通过沉淀和离心或通过干燥来完成。

20. 权利要求 17 至 19 之一的方法, 其中从 iv) 得到的固体包括

至少约 30%甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物。

21. 权利要求 20 的方法，其中从 iv) 得到的固体包括至少约 5% 的蛋白质。

22. 一种动物饲料，包括根据权利要求 1 至 16 之一的方法生产的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖，其量为可有效地提高动物的免疫能力的量。

23. 权利要求 22 的动物饲料，其中该动物饲料用于选自家禽、猪、马类、牛及甲壳类的动物。

24. 权利要求 23 的动物饲料，其中有效量为在约 5 g/1000 kg 到约 500 g/1000 kg 饲料的范围内的浓度。

25. 权利要求 24 的动物饲料，其中动物为家禽，并且有效量在约 20 g/1000 kg 到约 50 g/1000 kg 饲料的范围内。

26. 权利要求 24 的动物饲料，其中动物为猪，并且有效量在约 20 g/1000 kg 到约 500 g/1000 kg 饲料的范围内，取决于猪的生长周期和饲料的使用期。

27. 权利要求 24 的动物饲料，其中动物为马类，并且有效量在约 25 g/1000 kg 到约 300 g/1000 kg 饲料的范围内。

28. 权利要求 24 的动物饲料，其中动物为虾，并且有效量在约 35 g/1000 kg 到约 300 g/1000 kg 饲料的范围内。

29. 一种增强猪体内抗体形成的方法，所述方法包括在饲料中添加有效量的由权利要求 1 至 16 之一的方法生产的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖并用该动物饲料喂猪。

30. 一种增强动物体内抗体的形成并减小常常与使用疫苗相关的负生长反应的方法，所述方法包括在动物饲料中添加有效量的由权利要求 1 至 16 之一的方法生产的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖并用该动物饲料饲养动物。

31. 一种动物饲料，包括：

- a) 根据权利要求 1 至 16 之一的方法生产的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖，其量为可有效地提高动物的免疫能力的量；及
- b) 根据权利要求 17 至 21 之一的方法生产的甘露聚糖及甘露糖-蛋白，其量为足以抑制细菌在动物肠壁的附着的量。

32. 权利要求 31 的动物饲料，其中动物饲料中  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的量在约 5 g/1000 kg 到约 500 g/1000 kg 全饲料的范围内，

---

并且甘露聚糖和/或甘露糖-蛋白在动物饲料中的量在约 100 g/1000 kg 到约 4000 g/1000 kg 全饲料的范围内。

## 制备天然免疫生物提取物的方法及其用途

### 技术领域

本发明涉及一种生产天然免疫生物提取物的方法以及该提取物的用途。更具体而言，本发明涉及一种生产经济而且生态可靠的天然免疫生物提取物的方法，该提取物可用作健康管理手段及用作家畜、家禽、伴侣动物和水产养殖物种的生长促进抗生素的替代物。

### 背景技术

抗生素抗性菌由于其根除困难及费用问题，近十年来已成为一种严重威胁。抗生素抗性菌的出现与人类日益增加地而且经常是不正当地使用抗生素，以及在饲养动物的饲料中广泛使用抗生素作为“生长促进剂”有关。

出于对抗生素抗性菌的广泛出现的关注，欧盟已禁止在动物饲料中使用抗生素作为“生长促进剂”。在过去的几年中，美国也提出多项禁止或显著减少在农业方面使用抗生素的议案。由于消费者意识的增强及科学家们和各政府组织的关注，禁止在农业中使用抗生素在美国和许多其它国家很可能变成现实。禁止使用生长促进抗生素毫无疑问将加大饲养动物的费用，增加肉类价格及减少肉类供应，除非能够找到生长促进抗生素的安全替代品。

由于这些原因，对天然免疫生物物质(natural immunobiotics)用途的研究得到了关注。免疫生物物质是通过对肠、粘膜或全身的免疫刺激/调节进行广谱激活来增强健康的制剂或生物体。动物免疫系统的增强将导致动物抗感染和疾病的能力提高从而无需在饲料中添加抗生素。

已经过考察可用于人类和动物的免疫增强剂中的一种是从酵母细胞得到的 $\beta$ -葡聚糖组合物。葡聚糖、甘露聚糖和甘露糖-蛋白可从多种酵母菌、蘑菇、植物以及一些细菌、地衣及藻类的细胞壁提取得到(参见 Chemistry and Biology of (1,3)- $\beta$ -Glucans, B. A. Stone and A. E. Clarke, 1992, La Trobe University Press, 澳大利亚)。通过这些来源，可提取出多种具有不同的骨架组成、支链、单体或取代

基类型的不同类型的 $\beta$ -葡聚糖,得到具有不同的物理和生物性质的多糖。例如,酵母和真菌产生一类称为聚-(1,3)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1,6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖或 $\beta$ -(1,3/1,6)葡聚糖的多糖,其由一条以 $\beta$ -(1,3)配糖键相联结的葡萄糖亚单元主链和多条通过 $\beta$ -(1,6)配糖键联结于主链的支链组成。 $\beta$ -(1,3/1,6)葡聚糖的生物活性可能与 $\beta$ -(1,6)-支链的出现率有关。

具有 $\beta$ -(1,6)支链的 $\beta$ -(1,3)葡聚糖已显示出可激活脊椎生物体及无脊椎生物体的免疫系统(Abel and Czop, "Stimulation of human monocyte beta-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1 Beta" (1992) Int. Journal Immunopharmacolol, 14:1363-1373; Vetvicka 等, "Pilot Study: Orally-Administered Yeast  $\beta$ -1,3-glucan Prophylactically Protects Against Anthrax Infection and Cancer in Mice" (2002) The Journal of the American Nutraceutical Association, Vol 5, No. 2; Ueno, H., "Beta-1,3-D-Glucan", (2000) Japanese Journal Society Terminal Systemic Diseases, 6:151-154; 美国专利 4,138,479)。由酵母获得的 $\beta$ -葡聚糖通过结合到巨噬细胞的细胞膜的特定受体之上而激活免疫系统(Czop and Kay, "Isolation and Characterization of  $\beta$ -glucan Receptors on Human Mononuclear Phagocytes" (1991) J. Exp. Med. 173:1511-1520)。激活的巨噬细胞增强了其吞噬细胞活性和杀菌活性并产生一定数量的细胞因子,然后该细胞因子又激活了免疫系统的其它部分(Di Luzio 等, "The Macrophage in Neoplasia", M. Fink, ed., 1976 Academic Press, New York, NY, pp 181-182)。

从其天然状态分离出来的葡聚糖,显示出不同的生物活性,例如抗感染及抗菌性(Onderdonk 等, "Anti-infective effect of poly- $\beta$ -1,6 glucotriosyl- $\beta$ -1,3-glucopyronose glucan in vivo" (1992) Infection and Immunity, 60: 1642-1647)、抗肿瘤性(Mansell 等, "Macrophage mediated destruction of human malignant cells in vivo" (1975) Journal National Cancer Institute, 54: 571-80)、抗肿块性(DeLuzio 等, (1979) Advances in Experimental Medicine and Biology, 21A: 269-290)及抗胆固醇性(参见例如美国专利



3, 081, 226)。

甘露聚糖和甘露糖-蛋白复合物是天然存在的多糖复合物,也可以从多种酵母菌、蘑菇、植物以及某些细菌、地衣及藻类中提取得到。甘露聚糖为甘露糖聚合物,在全部细胞壁多糖组分中占有主要的比例;已发现葡聚糖以共价键与蛋白质联结,也可包括磷酸部分。

甘露聚糖和甘露糖-蛋白分子有利于阻止细菌例如大肠杆菌在肠壁的附着,从而减少了动物体内总的感染风险。甘露聚糖和甘露糖-蛋白复合物通过阻止致病生物在肠内的附着从而增加了额外的保护并降低了总的感染风险,因而动物发生感染的可能性较小。已显示出甘露聚糖可通过免疫系统的细胞对物质——包括 $\beta$ -葡聚糖——的噬菌作用进行调节(Giaimis等(1993) *Journal of Leukocyte Biology*, 54, 564-571)。因而,甘露聚糖和甘露糖-蛋白复合物作为免疫生物物质也是有价值的,当与免疫增强剂组合使用时可能尤为有用。

有关由酵母得到的 $\beta$ -葡聚糖的纯化和使用已有数篇报导,其通常采用纯面包酵母或酿酒酵母或纯化的细胞壁及多种包括在不同温度下进行碱提取和酸提取的提取方法。(参见例如 Hassid 等, (1941) *Journal of the American Chemical Society*, 63: 295-298; Manners 等, (1973), *Biochem. J.* 135: 19-30)。已知有多种方法可从酵母细胞提取 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖,包括 Jamas 等(美国专利 4, 810, 646; 5, 028, 703 及 5, 250, 436)、Donzis (美国专利 5, 223, 491) 及 Kelly (美国专利 6, 242, 594) 所公开的方法。这些方法提出用碱对酵母细胞进行提取,然后用酸提取,并分离出 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖。但这些方法会导致 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的质量和纯度的不稳定以及生物活性水平的变化。另外,由于非活性 $\beta$ -葡聚糖的降解和/或分离问题,该方法难以适应更经济的大规模批处理过程。而且,现有技术方法丢弃了从细胞壁提取出来的甘露聚糖和甘露糖-蛋白而没有将其分离出来,而这些制剂对动物的健康是有益的。

美国专利 6, 444, 448 (Wheatcroft) 公开了通过自体分解制备不溶性的酵母 $\beta$ -葡聚糖-甘露聚糖复合物的方法。该方法形成一种包括 $\beta$ -葡聚糖、甘露聚糖及甘露糖-蛋白的组合物。然而,该组合物中甘露聚糖和 $\beta$ -葡聚糖的结合会引起 $\beta$ -葡聚糖生物活性及对巨噬细胞激活作用的下降。

另外, 尽管  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖已显示出作为免疫活性增强剂 (参见例如美国专利 4, 138, 479; 5, 817, 643; 6, 444, 448 及 6, 214, 337) 和生长促进抗生素的替代品的潜力, 但常常由于现有技术方法在收率和生物活性方面的不稳定, 在建立将其作为补充物的指导方针方面进展很小。而且, 鉴于目前分离  $\beta$ -葡聚糖的方法, 其经济可行性依旧是问题。

### 发明内容

本发明涉及一种生产天然免疫生物提取物的方法以及该提取物的用途。更具体而言, 本发明涉及一种生产经济而且生态可靠的天然免疫生物提取物的方法, 该提取物可用作一种健康管理手段和/或一种家畜、家禽、伴侣动物和水产养殖物种的生长促进抗生素的替代物。

本发明的目的之一是提供一种生产天然免疫生物提取物的方法以及该提取物的用途。

本发明提供一种由源细胞生产  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的方法, 该方法包括:

- a) 碱提取源细胞;
- b) 水提取;
- c) 酸提取; 及

d) 水提取, 以生产一种含至少约 70%  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖 (以干重计) 的固体组分。

水提取的至少一个步骤中包括通过注入蒸汽使温度达到约 100°C 进行巴氏灭菌约 15 min 到约 30 min。在上述方法中, 两步水提取过程都可包括巴氏灭菌。

上述方法的碱提取步骤 (步骤 a)) 可包括用一种碱溶液处理源细胞, 并加热到约 45°C 到约 80°C 的温度范围持续约 30 min, 然后在约 1 psi 到约 25 psi 的压力范围内提高温度到约 95°C 到约 150°C 的温度范围, 持续时间在约 15 min 到约 120 min 的范围内。或者, 碱提取步骤可包括加热到温度约 80°C, 持续约 45 min, 接着在约 1 psi 到约 25 psi 的压力下提高温度到约 121°C, 持续约 30 min。

上述方法的碱提取步骤中, 加入的碱溶液可为碱金属氢氧化物溶液或碱土金属氢氧化物溶液, 源细胞与该碱溶液之比为约 1:5 到 1:15。

上述方法的水提取步骤（步骤 b）和 d）可包括以固体与水之比在约 1:4 到约 1:20 的范围的比例添加水，在约 20℃ 到约 100℃ 的温度范围持续约 15 min 到约 2.5 h。

上述方法的酸提取步骤（步骤 c）可包括用一种酸溶液处理，固体与酸溶液之比在约 1:4 到约 1:20 的范围内，并可包括加热到约 45℃ 到约 120℃ 的温度范围，持续约 15 min 到约 2 h。

如上所述的方法中，步骤 a) 到 d) 的每一步之后都紧接着一个将经处理的物料分离为液相和固相的步骤，其后的步骤针对固相进行。

任选地，进行步骤 a) 然后对处理物料进行分离的工序可进行 1、2 或 3 次。另外，步骤 c) 到 d) 的工序可进行 1、2 或 3 次。所述方法也可包括在步骤 a) 之前，通过注入蒸汽使温度达到约 100℃，对源细胞进行巴氏杀菌约 15 min 到约 30 min 的任选步骤。

上述方法可使用任何适合的源细胞，例如选自面包酵母、酿酒酵母、失效的酵母及酵母细胞壁物质的源细胞。

上述方法中，步骤 a) 得到的液相可收集并合并。

本发明还提供一种由酵母生产  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的方法，该方法包括：

a) 通过注入蒸汽使温度达到约 100℃，对酵母进行巴氏杀菌约 15 min 到约 30 min；

b) 将经过巴氏杀菌的酵母分离为第一液相和第一固相；

c) 用碱金属或碱土金属的氢氧化物溶液对该第一固相进行碱提取，固体与碱溶液之比在约 1:5 到约 1:15 的范围内，加热到约 45℃ 到约 80℃ 的温度范围，持续约 30 min；

d) 在约 1 psi 到约 25 psi 的压力范围内，提高温度到约 95℃ 到约 150℃ 的温度范围，持续时间约 15 min 到约 120 min，以形成碱提取的混合物。

e) 将该碱提取的混合物分离为第二液相和第二固相；

f) 用水对该第二固相进行水提取，固体与水之比在约 1:4 到约 1:20 的范围内，在约 20℃ 到约 100℃ 的温度范围内持续约 15 min 到约 2.5 h，以形成水提取的混合物；

g) 通过注入蒸汽使温度达到约 100℃，对该水提取的混合物进行巴氏杀菌约 15 min 到约 30 min；

h) 将该水提取的混合物分离为第三液相和第三固相;

i) 用酸溶液对该第三固相进行酸提取, 固体与酸溶液之比在约 1:4 到约 1:20 的范围内, 并加热到约 45°C 到约 120°C 的温度范围, 持续约 15 min 到约 2 h, 以形成酸提取的混合物;

j) 将该酸提取的混合物分离为第四液相和第四固相;

k) 用水对该第四固相进行水提取, 固体与水之比在约 1:4 到约 1:20 的范围内, 并在约 20°C 到约 100°C 的温度范围下持续约 15 min 到约 2.5 h, 以形成水提取的混合物;

l) 通过注入蒸汽使温度达到约 100°C, 对该水提取的混合物进行巴氏杀菌约 15 min 到约 30 min; 及

m) 将该水提取的混合物分离为第五液相和第五固相, 该第五固相含有至少约 70%  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖 (以干重计)。

上述方法中, 步骤 a) 到 e) 的工序可进行 1、2 或 3 次。在另外任选的步骤中, 步骤 i) 到 m) 的工序可进行 1、2 或 3 次。

上述方法可包括甘露聚糖和甘露糖-蛋白复合物的生产, 通过以下步骤完成:

i) 收集在一个或一个以上的碱提取步骤中得到的液相;

ii) 用酸将步骤 i) 的液相的 pH 值调节到约 5.0 到约 8.0;

iii) 通过注入蒸汽使温度达到约 100°C, 对步骤 ii) 的液相进行巴氏杀菌约 15 min 到约 30 min; 及

iv) 从步骤 iii) 的经过巴氏杀菌的液相中分离出甘露聚糖和甘露糖-蛋白复合物。

如上所述的分离步骤 (步骤 iv) 可通过沉淀和离心分离或通过干燥来完成。

如上所述的生产甘露聚糖和甘露糖-蛋白复合物的方法在步骤 iv) 中可产生包括至少约 30%甘露聚糖碳水化合物的固体。另外, 步骤 iv) 中获得的固体可包括至少约 5%的蛋白质。

本发明还提供一种包括由上述方法生产的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的动物饲料,  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的量为可有效地提高动物的免疫活性的用量。该动物饲料可用于选自家禽、猪、马类例如马、牛及甲壳类动物。 $\beta$ -葡聚糖在上述动物饲料中的有效量可在约 5 g/1000 kg 到约 500 g/1000 kg 全饲料的范围内。 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的有效

量可根据动物的类型变化。如果动物为家禽，有效量可在约 20 g/1000 kg 到约 50 g/1000 kg 饲料的范围内。如果动物为猪，有效量可在约 20 g/1000 kg 到约 500 g/1000 kg 饲料的范围内。如果动物为马类，有效量可在约 25 g/1000 kg 到约 300 g/1000 kg 饲料的范围内。如果动物为虾，有效量可在约 35 g/1000 kg 到约 300 g/1000 kg 的范围内。

本发明还提供一种通过添加由上述方法生产的有效量的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖并用该动物饲料喂猪来增加猪体内抗体形成的方法。

本发明还提供一种方法，该方法可增加动物体内抗体的形成及减小常常与使用疫苗相关的负生长反应，包括添加有效量的由上述方法生产的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖并用该动物饲料来饲养动物。

另外，本发明提供一种动物饲料，包括：

- a) 根据权利要求 1-18 中任一权利要求的方法生产的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖，其用量为可有效提高动物的免疫活性的量；及
- b) 根据权利要求 19-22 中任一权利要求的方法生产的甘露聚糖及甘露糖-蛋白，其用量为足以抑制细菌在动物肠壁的附着的量。

如上所述的动物饲料中  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的量可在约 5 g/1000 kg 到约 500 g/1000 kg 全饲料的范围内，而甘露聚糖及甘露糖-蛋白在动物饲料中的量可在约 100 g/1000 kg 到约 4000 g/1000 kg 全饲料的范围内。

与现有技术的工艺及方法相比，本发明可保护和稳定  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖、甘露聚糖及甘露糖-蛋白避免微生物降解，因此萃取效率和产率提高。从而确保了萃取出多糖及复合物质量和生物活性的稳定。从葡聚糖提取过程中的碱提取步骤回收的液相中回收甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物也降低了生产成本。将分离出的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖用作饲料添加剂提高了饲养动物的免疫活性并提供了一种对目前使用的抗生素补给物的经济的替代品。根据本方法分离的甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物可与上述的  $\beta$ -葡聚糖组合使用，通过阻止致病生物例如大肠杆菌在肠道的吸附，增加额外的保护并降低总的感染风险。

由本发明的方法分离出的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖已显示出能够

激活动物先天的免疫系统，从而提高疾病治理的能力。此外还观察到其有益于健康和生产力，例如增加每头母猪产仔的数量及之后仔猪的存活性。在接种疫苗之前，用本发明制备的 $\beta$ -葡聚糖对动物进行处理，可通过提高动物体内生成抗体的滴度同时减少或者抑制通常由于疫苗的使用所引起的负生长情形，从而增强疫苗的有效性。而且还显示出可提高初乳质量，从而增强被动免疫。因而， $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖可减少和/或替代动物饲料中用以维持动物尤其是饲养动物的健康和以最适宜的速率生长的生长促进抗生素。

另外，本发明还证实了生物活性量与纯化程度的变化具有直接关系。而且，在多个饲料试验中观察到了钟形曲线效应 (bell curve effect)，表明使用大剂量 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的现有技术方法可能不能获得 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖在用于家畜及其它动物体内的免疫调节中的最优使用效果。

本发明内容部分没有对本发明的全部特征进行描述。

### 附图说明

本发明的这些及其它特征在后面的参照了附图的说明书中变得更加清晰，其中：

图 1 所示为本发明方法的一个实施方案的流程图。

图 2 所示为 FTIR 光谱显示的 $\beta$ -葡聚糖的结构特征。图 2A 为药用级酵母 $\beta$ -葡聚糖的 FTIR 光谱，图 2B 为本发明的方法获得的 $\beta$ -葡聚糖的 FTIR 光谱。

图 3 为多种酵母 $\beta$ -葡聚糖组合物的比较效果图，酵母 $\beta$ -葡聚糖组合物包括 YBG (YBG Complex™)，其根据本发明的方法制备。MacroGuard™为一种市售产品，Zymosan 为一种粗制的酵母细胞壁制剂，也为市售产品。

### 具体实施方式

本发明涉及一种生产天然免疫生物提取物的方法以及该提取物的用途。更具体而言，本发明涉及一种生产经济而且生态可靠的天然免疫生物提取物的方法，该提取物可用作健康管理手段及用作家畜及伴侣动物的生长促进抗生素的替代物。

以下描述为一种优选的实施方案。

本发明提供一种由源细胞生产  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的方法，该方法包括：

a) 碱提取源细胞；

b) 水提取；

c) 酸提取；及

d) 水提取，以生产一种含至少 70%  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖（以干重计）的固体组分。

上述方法中，至少一个水提取的步骤中包括通过注入蒸汽使温度达到约 100℃ 进行巴氏灭菌约 15 min 到约 30 min。

术语“ $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖”，此处也称“ $\beta$ -葡聚糖”，指可在多种细胞的细胞壁中找到的聚-(1, 3)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1, 6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖，所述多种细胞包括——但不限于——植物、真菌和细菌的细胞。 $\beta$ -葡聚糖由  $\beta$ -(1, 3) 键合的葡萄糖单元组成，具有由  $\beta$ -(1, 6) 键合的分子内和分子间支链。 $\beta$ -葡聚糖可由细胞壁中包含  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的源细胞分离得到。

“源细胞”指现有技术中已知的任何适合的  $\beta$ -(1, 3)/(1, 6)-D-葡聚糖源。可分离出  $\beta$ -葡聚糖的源细胞包括——但不限于——真菌细胞、植物细胞和/或细菌细胞。用作本发明方法原料的源细胞可以为现有技术领域已知的任何适合的形式，例如液体、浆液或干粉，或者可以为由适合的真菌、植物和/或细菌得到的细胞壁物质。在一个非限制性的实施例中，该源细胞是酵母，其可以是能存活的活体也可以为失效的不能存活的形式。使用的酵母或其它真菌的菌株可以是天然生成的菌株，或由遗传工程获得的菌株。可使用现有技术领域已知的任何适合的酵母或真菌菌株，例如——但不限于——酵母菌属 (*Saccharomyces* spp)、裂褶菌属 (*Shizophyllum* spp)、毕赤氏酵母属 (*Pichia* spp)、汉森酵母属 (*Hansenula* spp)、念珠菌属 (*Candida* spp)、球拟酵母属 (*Torulopsis* spp) 以及科普属 (*Kluyveromyces* spp)。其具体的实施例包括——但不限于——酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、德尔布酵母 (*Saccharomyces delbrueckii*)、罗斯酵母 (*Saccharomyces rosei*)、*Saccharomyces microellipsodes*、卡氏酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*)、二孢酵母 (*Saccharomyces bisporus*)、发酵性酵

母 (*Saccharomyces fermentati*)、鲁酵母 (*Saccharomyces rouxii*)、葡萄汁酵母 (*Saccharomyces uvarum*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、*Kluyveromyces polysporus*、白假丝酵母 (*Candida albicans*)、阴沟假丝酵母 (*Candida cloacae*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)、温奇汉逊酵母 (*Hansenula wingei*)、野水牛汉逊酵母 (*Hansenula arni*)、*Hansenula henricii*、美洲汉逊酵母 (*Hansenula Americana*)、*Hansenula canadiensis*、*Hansenula capsulata*、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、*Kluyvecomyces fragilis*、*Pichia kluyveri*、甲醇酵母 (*Pichia pastoris*)、多形毕赤氏酵母 (*Pichia polymorpha*)、*Pichia rhodanensis*、奥默毕赤氏酵母 (*Pichia ohmeri*)、*Torulopsis bovina* 及光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*)。作为源细胞关注的是酿酒酵母、德尔布酵母、卡氏酵母和/或鲁酵母，它们存在于面包酵母或酿酒酵母 (*Brewer's yeast*) 中，可以是可存活的活体或失效的不能存活的形式，可直接从啤酒厂获得或从其他合适的供应者处得到。一个具体的、非限制性的实例为失效的酿酒酵母，该酵母可用于本发明的方法中。

由源细胞生产  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖可通过现有技术领域已知的任何适宜的碱提取、水提取和酸提取方法进行，其具体的条件可由本领域普通技术人员确定。这些提取方法已被描述于，例如，但并不限于，Hassid 等 (1941, *Journal of the American Chemical Society*, 63: 295-298)、Manners 等 (1973, *Biochem. J.* 135, 19-30)、Jamás 等 (美国专利 4, 810, 646; 5, 028, 703 及 5, 250, 436)、Donzis (美国专利 5, 223, 491) 和 Kelly (美国专利 6, 242, 594)，所有这些文献的全部内容通过引证的方式纳入本说明书。本发明方法的适合的条件的一个非限制性例子如下所述。

术语“碱提取”(步骤 a))指用碱和加热处理源细胞以溶解和/或提取非  $\beta$ -葡聚糖组分，包括甘露聚糖及甘露糖-蛋白；如果用细胞作为源细胞，碱提取可能导致细胞溶解。将  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的源细胞与一种碱溶液合并，并可将生成的源细胞-碱溶液的混合物进行搅拌。术语“搅拌”指现有技术领域中已知的任何适宜的物理搅动方法。例如，但并不作为限制，该混合物可通过搅拌装置、搅拌器或乳化泵



进行搅拌。

该碱溶液可以是本技术领域中的任何适宜种类的强碱溶液，例如，但并不限于，碱金属的氢氧化物或碱土金属的氢氧化物溶液。具体的非限制性的碱溶液的例子是氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙及氢氧化锂。例如，该碱溶液可以是氢氧化钠。该碱溶液可以为任何适宜的浓度，例如在 0.5N 到 5.0N 范围内，或为任何介于其之间的浓度，例如约 0.5N、0.7N、1.0N、1.2N、1.5N、1.7N、2.0N、2.2N、2.5N、2.7N、3.0N、3.2N、3.5N、3.7N、4.0N、4.2N、4.5N、4.7N 及 5.0N，或此处所公开的任意两个浓度所限定的范围内的一个浓度。碱溶液通常以源细胞与碱溶液之比约 1:3 到 1:15 的比例加入源细胞中，或以介于其之间的任何比例，例如约 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14 或 1:15，或此处所公开的任意两个比例所限定的范围内的一个比例加入。该源细胞-碱溶液混合物的最终 pH 值通常在约 8 到约 14 的范围内，或为介于其之间的任何 pH 值；例如，该源细胞-碱溶液混合物的最终 pH 可为约 8、9、10、11、12、13 或 14，或此处所公开的任意两个 pH 值所限定的范围内的一个 pH 值。该源细胞-碱溶液混合物的 pH 值的一个非限制性例子为在约 12 到约 14 的范围内。

然后该源细胞-碱溶液混合物被加热到约 45℃ 到约 120℃ 的温度范围，或介于其之间的任何温度，持续约 30 min 到约 240 min 的时间，或介于其之间的任何时间长度。例如，该源细胞-碱溶液混合物可被加热到约 45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、90℃、95℃、100℃、105℃、110℃、115℃ 或 120℃，或此处所公开的任两个温度的组合所限定的范围内的任意温度，持续时间约 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235 或 240 min，或此处所公开的任两个时间所限定的范围内的任意长度的时间。例如，但并不作为限制，该源细胞-碱溶液混合物可被加热到约 45℃ 到约 80℃ 的温度范围，持续约 30 min 到约 60 min 的时间；在另一个非限制性的实施例中，该源细胞-碱溶液混合物可被加热到约 45℃ 的温度范围，持续约 45 min。在这一加热步骤中，如前所述，该

源细胞-碱溶液混合物可被搅拌。

本领域普通技术人员可以理解的是，该碱溶液的浓度以及该混合物被加热到的温度对反应时间有反向影响；例如，碱溶液的浓度和/或温度越高，反应时间越短。本领域普通技术人员也可以理解的是，加热该源细胞-碱溶液混合物可能导致压力的增大。通常，但并不作为限制，压力可增加约 0 到约 25 psi，或介于其之间的任何压力值；例如，压力可增加约 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 psi，或此处所公开的任两个压力的组合所限定的范围内的压力。

碱提取还可包括另一个步骤，包括增加该源细胞-碱溶液混合物的温度，及增大压力。该源细胞-碱溶液混合物的温度可增加到约 95°C 到约 150°C 的温度范围，或介于其之间的任何温度，持续约 15 min 到约 240 min 的时间，或介于其之间的任何时间长度，压力为约 1 psi 到约 25 psi。例如，温度可增加到约 95°C、100°C、105°C、110°C、115°C、120°C、125°C、130°C、135°C、140°C、145°C 或 150°C，或此处所公开的任两个温度的组合所限定的范围内的任意温度，持续的时间约 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235 或 240 min，或此处所公开的任两个时间所限定的范围内的任意长度的时间，压力处于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 psi，或此处所公开的任两个压力所限定的范围内的压力。例如，但并不作为限制，温度可增加到约 95°C 到约 150°C 的范围，持续约 15 min 到约 120 min 的时间，压力为 1 psi 到约 25 psi；在另一个非限制性的实施例中，在 1 psi 到约 15 psi 的压力下，温度可增加到约 121°C，持续约 30 min。在该加热步骤中，如前所述，该源细胞-碱溶液混合物可被搅拌。

本领域普通技术人员还可以理解的是，该混合物被加热到的温度对反应时间有反向影响；例如，碱溶液的浓度和/或温度越高，反应时间越短。

如上所述的碱提取方法形成一种碱提取混合物。将该碱提取的混

合物或合并的碱提取混合物进行分离。

术语“分离的”或“分离”意指将所述的混合物分成其液体组分和固体组分。该液体组分和固体组分此处也称为“液相”和“固相”。可使用现有技术领域已知的任何适合的分离方法。例如，但并不作为限制，该固体和液体组分可通过离心、过滤、膜过滤或反渗透进行分离。在一个具体的非限制性的实施例，该混合物可通过离心进行分离。

对碱提取混合物进行分离后获得的液相——“碱提取液相”——包含了源细胞中大部分碱溶性非目标  $\beta$ -葡聚糖组分和非  $\beta$ -葡聚糖组分。将碱提取的液相收集并合并，如下所述，可通过进一步处理获得甘露聚糖及甘露糖-蛋白。碱提取后得到的固相——“碱提取固相”——中含有  $\beta$ -葡聚糖。

本领域普通技术人员可意识到，任选地，可对“新鲜的”源细胞物质进行重复的碱提取循环。“新鲜的”材料指以前尚未经过碱提取的物质。例如，但并不作为限制，碱提取可进行1-20次，或介于其之间的任何重复次数；例如，碱提取可重复1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次，或由此处所公开的任两个数的范围所限定的重复次数。碱提取步骤可进行例如，但并不限于，1、2或3次。如果针对新鲜的源细胞物质进行碱提取步骤，则将每一次碱提取循环得到的碱提取固相进行合并。

本领域普通技术人员也可意识到，碱提取的连续循环可根据需要任选地进行，以增加非目标  $\beta$ -葡聚糖组分和非  $\beta$ -葡聚糖组分的移除量。在这种情况下，碱提取针对碱提取固相或合并的碱提取固相进行。例如，但并不作为限制，碱提取可连续进行1-20次，或按需要可为介于其之间的任何重复次数；例如，碱提取可进行1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次，或此处公开的任两个数的范围所限定的重复次数。碱提取步骤可进行例如，但并不限于，1、2或3次。正如普通技术人员应当理解的，碱提取的连续循环将增加碱提取固相中  $\beta$ -葡聚糖的纯度；但该方法的总造价也将随着碱提取的每一次连续循环而增加。因而，本领域普通技术人员必须考虑碱提取的次数和方法的经济可行性之间的平衡。

然后对该碱提取固相或合并的碱提取固相进行水提取(步骤b))。

术语“水提取”，在本技术领域中也称为“水洗”，指用水洗涤该固体组分以除去任何残留的非 $\beta$ -葡聚糖组分；该水提取步骤也可以起到降低碱提取固相的pH值的作用。水提取步骤可按照现有技术领域已知的任何适宜的方法进行。例如，但并不作为限制，固体组分可以固体组分与水之比为约1:4到约1:20的比例，或以介于其之间的任何比例再悬浮于水中；例如，可以固体组分与水之比约1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19或1:20，或此处所公开的任两个比例所限定的范围内的比例在固相中加入水。该再悬浮的固体被加热到约20℃到约100℃的温度范围，或介于其之间的任何温度，持续约15 min到约240 min，或介于其之间的任何时间长度。例如，该再悬浮固体可被加热到约20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、90℃、95℃、100℃，或此处所公开的任两个温度的组合所限定的范围内的任何温度，持续约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235或240 min，或此处所公开的任两个时间所限定的范围内的任意长度的时间。例如，但并不作为限制，该再悬浮固体可被加热到约20℃到约100℃，持续约15到约150 min的时间；在另一个非限制性实施例中，再悬浮固体可被加热到约20℃到约60℃，持续约30 min的时间。

正如本领域普通技术人员可理解的，该混合物被加热到的温度将对反应时间有反向影响；例如，碱溶液的浓度和/或温度越高，反应时间越短。在水提取过程中，如前所述，该再悬浮固体可通过现有技术领域已知的任何适宜的方法进行搅拌。水提取过程生成一种水提取混合物。

然后将该水提取混合物通过前述方法分离成液相和固相。该水提取混合物的液相通常弃掉，而其固相则保留进行酸提取。

对本领域普通技术人员而言很显然的是，可根据需要任选进行水提取的连续循环，直到所有的酵母固体被分离。这种情况下，水提取针对水提取固相进行。例如，但并不作为限制，水提取可根据需要连续进行1到10次，或介于其之间的任何重复次数；例如，水提取可进

行 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 次，或此处公开的任两个数的范围所限定的重复次数。碱提取步骤可进行例如，但并不限于，1、2 或 3 次。但在水洗次数和方法的经济性之间存在一个平衡。然后对由该连续水提取步骤得到的固相进行酸提取（步骤 c）。

术语“酸提取”指用酸和加热处理水提取混合物的固相以溶解和/或提取出任何残留的非目标  $\beta$ -葡聚糖组分和非  $\beta$ -葡聚糖组分，包括但不限于其它多糖/糖类及某些脂类。水提取混合物的固相与一种酸溶液一起形成一种固相-酸溶液混合物，可对其搅拌。搅拌可通过上述的本现有技术领域已知的任何适宜的方法完成。

该酸溶液可以是本技术领域已知的任何适宜种类的酸溶液，例如——但并不限于——任何弱酸溶液。用于酸提取的受关注的是乙酸。该酸溶液可为任何适宜的浓度，例如在 2%到 10% (v/v) 范围内，或介于其之间的任何浓度；例如，该酸溶液可以是一种 2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5% 或 10% (v/v) 的酸溶液，或一种浓度介于此处所公开的任两个浓度所限定的范围内的酸溶液。在一个非限制性实施例，该酸溶液是 3% 的溶液。该酸溶液通常以固体组分与酸溶液之比约 1:4 到约 1:20 的比例，或介于其之间的任何比例加入到水提取混合物的固相中；例如，酸溶液可以固体组分与酸溶液之比约 1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19 或 1:20，或此处所公开的任两个比例所限定的范围内的一个比例加入到固相。在一个非限制性实施例，酸溶液以固体组分与酸溶液之比为 1:10 的比例加入。固相-酸溶液的最终 pH 通常在约 2 到约 5 的范围内，或介于其之间的任意 pH；例如，源细胞-碱溶液混合物的最终 pH 可为约 2、3、4 或 5，或此处所公开的任两个 pH 值所限定的范围内的一个 pH 值。在一个非限制性的实施例，固相-酸溶液混合物的 pH 值介于约 3 到约 4 之间，或在另一实施例中，其值为 4。

该固相-酸溶液而后被加热到约 45℃到约 120℃的温度范围内，或介于其之间的任何温度，持续约 15 min 到约 120 min 的时间，或介于其之间的任意长度的时间。例如，该固相-酸溶液混合物可被加热到约 45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、90℃、95℃、100℃、105℃、110℃、115℃ 或 120℃，或此处所公开的任两

个温度的组合所限定的范围内的任意温度，持续时间约 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115 或 120 min，或此处所公开的任两个时间所限定的范围内的任意长度的时间。例如，但并不作为限制，该固相-酸溶液混合物可被加热到约 45℃ 到约 80℃ 的温度范围内，持续约 15 到约 60 min；在另一个非限制性的实施例中，该固相-酸溶液混合物可被加热到约 80℃ 持续约 60 min。

正如本领域普通技术人员可理解到的，该酸溶液的浓度及该混合物被加热到的温度将对反应时间有反向影响；例如，酸溶液浓度和/或温度越高，反应时间越短。本领域普通技术人员还可理解到，加热固相-酸溶液可引起压力的增大。通常，但并不作为限制，压力可增加约 0 到约 25 psi，或介于其之间的任何压力值；例如，压力可增加约 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 psi，或此处所公开的任两个压力的组合所限定的范围内的压力。

如上所述的酸提取方法产生酸提取混合物。然后如前所述对该酸提取混合物进行分离。酸提取混合物分离后得到的液相弃掉。酸提取后得到的固相——“酸提取固相”——中含  $\beta$ -葡聚糖。

本领域普通技术人员可意识到，重复的酸提取循环可针对尚未经过酸提取的水提取固相任选进行。例如，但并不作为限制，酸提取可进行 1-20 次，或介于其之间的任何重复次数；例如，酸提取可进行 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 次，或由此处所公开的任两个数的范围所限定的任意重复次数。酸提取步骤可进行例如，但并不限于，1、2 或 3 次。在针对尚未经过酸提取的水提取固相进行酸提取步骤中，将每一次酸提取循环得到的酸提取固相进行合并。

本领域普通技术人员也可意识到，酸提取的连续循环可根据需要任选地进行，以除去非  $\beta$ -葡聚糖组分。在这种情况下，酸提取针对酸提取固相或合并的酸提取固相进行。例如，但并不作为限制，酸提取可连续进行 1-20 次，或按需要进行介于其之间的任何重复次数；例如，酸提取可进行 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 次，或此处公开的任两个数的范围所限定

的重复次数。酸提取步骤可进行例如，但并不限于，1、2或3次。正如普通技术人员可理解的，酸提取的连续循环将提高酸提取固相中 $\beta$ -葡聚糖的纯度；但该方法的总造价也将随着酸提取的每一次连续循环而增加。因而，本领域普通技术人员必须考虑碱提取的次数和方法的经济可行性之间的平衡。

然后对该酸提取固相或合并的酸提取固相进行水提取(步骤d))。该酸提取固相或合并的酸提取固相的水提取可在前述条件下进行，生成一种水提取混合物。然后将该水提取混合物通过前述方法分离成液相和固相。该水提取混合物的液相通常弃掉，而其固相则保留。如上所述，而且对本领域普通技术人员而言也很显然的是，水提取可根据需要任选重复进行，直到所有的酵母固体被分离。当重复进行水提取时，将水提取生成的固相进行合并。

在本发明的方法中，不管是在上述的碱提取、酸提取和水提取的条件下，还是在现有技术的条件下，至少一个水提取步骤包括在分离之前的巴氏杀菌步骤。例如，紧接碱提取步骤(步骤a))的水提取步骤(步骤b))可包含巴氏杀菌，紧接酸提取步骤(步骤c))的水提取步骤(步骤d))可包含巴氏杀菌，或者紧接碱提取步骤的水提取步骤(步骤b))和紧接酸提取步骤的水提取步骤(步骤d))都可包含巴氏杀菌。

术语“巴氏杀菌”指对再悬浮于水中的固体进行处理以使该混合物稳定，使 $\beta$ -(1,3/1,6)-D-葡聚糖的微生物降解降到最小。巴氏杀菌可通过现有技术领域已知的任何方法进行，例如，但并不作为限制，直接注入蒸汽或间接注入蒸汽，例如使用蒸汽夹套。例如，但并不作为限制，水提取混合物的巴氏杀菌可在约75°C到约100°C的温度，或介于其之间的任意温度下进行，持续约15到约240 min，或介于其之间的任意长度的时间。例如，水提取混合物的巴氏杀菌可在温度约75°C、78°C、80°C、82°C、85°C、88°C、90°C、92°C、95°C、98°C或100°C，或此处所公开的任两个温度的组合所限定的范围内的任何温度下进行，持续约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235或240 min，或此处所公

开的任两个时间所限定的范围内的任意长度的时间。非限制性地，巴氏杀菌可在约 85℃ 到约 100℃ 的温度下持续约 15 到约 30 min；在另一个非限制性的实施例中，巴氏杀菌可在约 100℃ 下进行，持续约 20 min。

正如本领域普通技术人员可理解到的，混合物进行巴氏杀菌的温度将对反应时间有反向影响；例如，温度越高，反应时间越短。

水提取混合物一旦经过巴氏杀菌，即如前所述将其分离为液相和固相。

任选地，在碱提取之后、酸提取之后或碱提取及酸提取之后的经过巴氏杀菌的水提取混合物，在分离之前，可通过如前所述的本技术领域已知的任何适宜的方法进行搅拌，持续约 2 h 到约 7 天或介于其间的任何长度的时间。例如，经过巴氏杀菌的水提取混合物可被搅拌约 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、1 天、1.5 天、2 天、2.5 天、3 天、3.5 天、4 天、4.5 天、5 天、5.5 天、6 天、6.5 天或 7 天，或此处公开的任两个数的范围所限定的时间长度。在一个非限制性的实施例中，水提取混合物可在室温下搅拌约 2 h 到 2 天。在分离前对经过巴氏杀菌的水提取混合物进行搅拌可使来自各个过程的经过巴氏杀菌水提取混合物积聚，以便最终的分离步骤可在更大的规模上进行。由于对水提取混合物进行了巴氏杀菌，因而  $\beta$ -葡聚糖的降解被抑制或减少最小。

在另一个任选的步骤中，如上所述的本发明的方法还可包括预处理步骤。例如，源细胞可在碱提取步骤（步骤 a）之前通过巴氏杀菌进行预处理。在这种情况下，源细胞可由酵母浆液、酵母乳、压缩的酵母饼提供。酵母浆液、酵母乳或酵母饼可包括的固含量约为 15% 到 80%，或介于其之间的任何量；例如，酵母浆液可包括约 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75% 或 80% 的固体，或所公开的任两个百分比的组合所限定的范围内的任意百分比的固体。在一个非限制性实施例中，浆液可包括约 60% 到约 70% 的固含量。在预处理步骤中的巴氏杀菌通常按如前所述进行，其后可任选紧接水提取步骤。

对上述方法的步骤 d) 中所获得的水提取混合物分离后产生包含一定量  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的固体组分，其范围为 最小约 70% 到约



98% (干重), 或介于其之间的任意百分比; 例如, 该固体混合物可包含约 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%或 98%, 或此处所公开的任两个百分比的组合所限定的范围内的任意百分比的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖 (以干重计)。在一个非限制性的实施例中, 固体组分可包括约 70%到约 90%的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖 (以干重计), 或在另一个实施例中, 可包括 80%的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖 (以干重计)。

根据本方法制备的最终  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖组合物的生物活性为每毫克  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖释放至少约 30  $\mu$ g Bb, 或为介于其之间的任何活性, 由旁路补体激活试验 (alternative complement activation experiment) (National Jewish Medical & Research Center, Denver, CO) 测得。例如,  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖组合物的活性为每毫克  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖释放至少约 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50  $\mu$ g Bb, 或为此处所公开的任两个活性所限定的范围内的活性。在一个具体的非限制性的实施例中, 最终的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖组合物的活性为每毫克  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖释放至少 40  $\mu$ g Bb。

在最后的分离步骤之后, 固体组分可由现有技术领域已知的任何适宜的方法干燥。术语“干燥”指除去水 (水分) 或溶剂。对固体组分进行干燥产生最终的  $\beta$ -葡聚糖产品, 干燥可通过现有技术领域已知的任何适宜的方法进行。例如, 但并不作为限制, 固体组分可通过冷冻干燥、热干燥、空气干燥、转筒式干燥、喷雾干燥、红外干燥、微波或射电 (radiowave) 干燥、辐射热干燥或任何适宜的方法进行干燥。在一个非限制性的实施例中, 固体组分可通过喷雾干燥进行干燥。

最终的固体组分可被干燥到湿含量低于约 10%, 或介于其之间的任何百分比; 例如最终产品的湿含量可低于约 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或 10%, 或由此处公开的任两个百分比的组合所限定的范围内的任意湿含量。在一个具体的非限制性的实施例中, 最终产品的湿含量低于约 10%。

干燥的最终产品—— $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖组合物, 为一种含平均粒径小于约 7  $\mu$ m 的颗粒的粉剂; 例如, 平均粒径可小于约 7  $\mu$ m、6.5

$\mu\text{m}$ 、6  $\mu\text{m}$ 、5.5  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 、4.5  $\mu\text{m}$ 、4  $\mu\text{m}$ 、3.5  $\mu\text{m}$ 、3  $\mu\text{m}$ 、2.5  $\mu\text{m}$ 、2  $\mu\text{m}$ 、1.5  $\mu\text{m}$  或 1  $\mu\text{m}$ ，或此处所公开的任两个尺寸的组合所限定的范围内的任意尺寸。对该粉剂还可进一步处理以获得需要尺寸的颗粒。例如，但并不作为限制，该粉剂可被研磨，如通过锤磨研磨或通过球磨研磨。

该经过干燥的最终  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖组合物是稳定的，当将其在密闭容器中、在约 15°C 到约 25°C 下储存时，可具有至少约 12 个月的储存期。例如，当将本发明的  $\beta$ -葡聚糖在约 15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C 或 25°C 的温度，或此处所公开的任两个温度的组合所限定的范围内的任何温度下储存时，其储存期可为至少约 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 或 36 个月，或此处所公开的任两个时间的组合所限定的范围内的任意储存期。在一个非限制性实施例中，最终的  $\beta$ -葡聚糖组合物在约 20°C 到约 25°C 的温度下于密闭容器中储存时，储存期至少约 24 个月。密封容器可为现有技术中已知的任何适宜的容器，例如，但并不作为限制，可以由任何适宜的材料制成的容器或包装袋，例如由塑料制成，以避免接触潮气。

本发明还提供由源细胞生产甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物的方法，包括：

- i) 收集由上述生产  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的过程中的一个或一个以上碱提取步骤（步骤 a）中获得的液相；
- ii) 用酸调整步骤 i) 中液相的 pH 到约 5.0-8.0；
- iii) 通过注入蒸汽使温度达到约 100°C，对步骤 ii) 的液相进行巴氏杀菌约 15 min 到约 30 min；及
- iv) 从巴氏杀菌的液相分离出甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物。

术语“甘露聚糖”指以甘露糖聚合物为代表的多糖类；发现甘露聚糖主要与蛋白质共价结合，存在于称为“甘露糖-蛋白复合物”，本文也称之为“甘露糖-蛋白”的复合物中。这些类型的多糖复合物可在多种细胞的细胞壁中发现，包括——但并不限于——植物、酵母、真菌和细菌的细胞，并可由本领域中已知的任何合适的这类源细胞分离得到。在一个非限制性的实施例中，该源细胞是真菌（例如酵母），其

可以是天然生成的菌株，或由遗传工程获得的菌株。可使用现有技术领域已知的任何适合的酵母或真菌菌株，例如——但不限于——酵母菌属、裂褶菌属、毕赤氏酵母属、汉森酵母属、念珠菌属、球拟酵母属以及科普属。其具体的实施例包括——但不限于——酿酒酵母、德尔布酵母、罗斯酵母、*Saccharomyces microellipsodes*、卡氏酵母、二孢酵母、发酵性酵母、鲁酵母、葡萄汁酵母、粟酒裂殖酵母、*Kluyveromyces polysporus*、白假丝酵母、阴沟假丝酵母、热带假丝酵母、产朊假丝酵母、温奇汉逊酵母、野水牛汉逊酵母、*Hansenula henricii*、美洲汉逊酵母、*Hansenula canadiensis*、*Hansenula capsulata*、多形汉逊酵母、*Kluyvecomyces fragilis*、*Pichia kluyveri*、甲醇酵母、多形毕赤氏酵母、*Pichia rhodanensis*、奥默毕赤氏酵母、*Torulopsis bovina* 及光滑球拟酵母。作为源细胞关注的是酿酒酵母、德尔布酵母、卡氏酵母和/或鲁酵母，它们存在于面包酵母或酿酒酵母中，可以是可存活的活体或失效的不能存活的形式，可直接从啤酒厂获得或从其他合适的供应者处得到。一个具体的、非限制性的实例为酿酒酵母，该酵母可用于本发明的方法中。

本发明方法的甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物由对前述生产 $\beta$ -(1,3/1,6)-D-葡聚糖的过程中一个或一个以上碱提取步骤（步骤a）中得到的液相进行分离得到。

如前所述，该碱提取液相中包含了源细胞中的大部分碱溶性非 $\beta$ -葡聚糖组分，包括甘露聚糖及甘露糖-蛋白。将由一个或一个以上碱提取步骤得到的碱提取液相收集起来并可根据需要合并。

然后用酸将该一个或一个以上碱提取液相的pH值调节到约5.0到约8.0的范围，或介于其之间的任意pH值。例如，该碱提取液相的pH值可被调节到约5.0、5.2、5.5、5.7、6.0、6.2、6.5、6.7、7.0、7.2、7.5、7.7或8.0，或此处所公开的任两个pH值所限定的范围内的任意pH值。例如，但并不作为限制，该碱提取液相的pH值可被调节到约7.0。本技术领域已知的任何适宜的酸都可用于调节pH值，例如，但并不作为限制，可以使用本技术领域已知的任何强酸。例如，盐酸、硝酸或硫酸都可用于调节该液相的pH值。在另一个非限制性的实施例中，可用盐酸（HCl）调节pH值。

在调节pH值的过程中、该过程之后、或过程中及过程之后都可对

该碱提取液相进行搅拌。术语“搅拌”指现有技术领域已知的任何适宜的物理搅拌方法。例如，但并不作为限制，可对该混合物通过搅拌装置、搅拌器或乳化泵进行搅拌。

然后对该经过调节 pH 值的碱提取液相进行巴氏杀菌。该巴氏杀菌步骤按照前述方法进行。例如，但并不作为限制，巴氏杀菌可通过本技术领域已知的任何方法完成，例如，但并不限于，直接或间接注入蒸汽，例如通过蒸汽夹套。例如，但并不作为限制，水提取混合物的巴氏杀菌可在约 75°C 到约 100°C，或介于其之间的任何温度下进行，持续约 15 到约 240 min，或介于其之间的任何长度的时间。例如，水提取混合物的巴氏杀菌可在约 75°C、78°C、80°C、82°C、85°C、88°C、90°C、92°C、95°C、98°C 或 100°C，或此处所公开的任两个温度的组合所限定的范围内的任意温度下进行，持续约 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235 或 240 min，或此处所公开的任两个时间所限定的范围内的任意长度的时间。非限制性地，巴氏杀菌可在约 85°C 到约 100°C 的温度下进行，持续约 15 到约 30 min；在另一个非限制性的实施例中，巴氏杀菌可在约 100°C 的温度下进行，持续约 20 min。

正如本领域普通技术人员可理解到的，混合物进行巴氏杀菌的温度将对反应时间有反向影响；例如，温度越高，反应时间越短。

巴氏杀菌之后，甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物自经过巴氏杀菌和 pH 值调节的碱提取液相中分离出来。这些分子的分离可通过现有技术领域已知的任何适宜的方法完成，例如通过沉淀或通过干燥。

经过 pH 值调节的碱提取液相的干燥可通过现有技术领域已知的任何适宜的方法进行。例如，但并不作为限制，固体组分可通过冷冻干燥、热干燥、空气干燥、转筒式干燥、喷雾干燥、红外干燥、微波或射电干燥、辐射热干燥或其他任何适宜的方法进行干燥。在一个非限制性的实施例中，固体组分可通过喷雾干燥进行干燥。对液相进行干燥后获得甘露聚糖及甘露糖-蛋白产品。

或者，可通过使液相沉淀将甘露聚糖及甘露糖-蛋白分离出来；液相的沉淀可由现有技术领域已知的任何适宜的方法完成，例如使用醇

类。任何食品级的醇类都可使用，例如——但并不限于——乙醇或丙醇。根据现有技术中已知的方法，醇类的用量可为液体与醇类之比约 1:0.25 到约 1:3。沉淀出的甘露聚糖及甘露糖-蛋白被离心分离出来，液相弃掉；然后将甘露聚糖及甘露糖-蛋白沉淀物用现有技术领域已知的任何适宜方法进行干燥，获得甘露聚糖及甘露糖-蛋白产品。

上述方法的步骤 iv) 中对甘露聚糖及甘露糖-蛋白进行的分离生成含甘露聚糖碳水化合物类至少约 25% (以干重计) 的最终产品；例如，该最终产品可含至少约 25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39% 或 40%，或此处所公开的任两个百分比的组合所限定的范围内的任意百分比的甘露聚糖碳水化合物类 (以干重计)。在一个非限制性的实施例中，最终的甘露聚糖及甘露糖-蛋白产品包括至少约 30% 甘露聚糖碳水化合物类 (以干重计)。另外，最终产品可包括至少约 5% 的蛋白质 (以干重计)；例如，固体组分可包括至少约 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29% 或 30% (以干重计)。在一个非限制性的实施例中，最终的甘露聚糖及甘露糖-蛋白产品包括至少 5% 蛋白质 (以干重计)。因而，最终产品可包括至少约 35% 的甘露糖-蛋白 (以干重计)；例如，最终产品可包括至少约 30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49% 或 50% 甘露糖-蛋白 (以干重计)。

甘露聚糖及甘露糖-蛋白产品可被干燥到湿含量低于约 15%，或介于其之间的任何百分比；例如最终产品的湿含量可低于约 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14% 或 15%，或由此处公开的任两个百分比的组合所限定的范围内的任意湿含量。在一个具体的非限制性的实施例中，最终产品的湿含量低于约 15%。

干燥的甘露聚糖及甘露糖-蛋白产品为一种粉剂，该粉剂还可进一步处理以获得需要尺寸的颗粒。例如，但并不作为限制，该粉剂可被研磨，如通过锤磨研磨或通过球磨研磨。

本发明还涉及一种包括由上述方法制得的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的动物饲料。可将该  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖以能够有效提高所关注动物的免疫活性的量添加到动物饲料中。术语“提高免疫活性”指以

非特异性的方式增强动物的先天免疫系统。 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖通过与巨噬细胞及其它免疫细胞的细胞膜上的特定受体结合来激活免疫系统, 增强其噬菌活性和杀菌活性和/或提高产生细胞因子的数量, 所述细胞因子再激活免疫系统的其它部分。

正如本领域普通技术人员可理解到的,  $\beta$ -葡聚糖的有效量随动物类型而变。本发明的动物饲料可用于任何类型的家畜、家禽、鱼类、甲壳类、虾或伴侣动物。例如, 但并不作为限制, 该动物饲料可用于饲养鸟类比如家禽, 猪, 马类比如马, 牛, 山羊, 绵羊和其它家畜, 伴侣动物包括鱼、狗、猫, 以及水产养殖品种例如甲壳类、虾和养殖鱼。通常,  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的有效量在约 5 g/1000 kg 全饲料到约 500 g/1000 kg 全饲料的范围内, 或为任何介于其之间的量。例如,  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的有效量可为 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495 或 500 g/1000 kg 全饲料, 或此处所公开的任两个量所限定的范围内的任意量。在更具体的实施例中, 但并不作为限制, 可使用下述有效量的  $\beta$ -葡聚糖:

- 动物为家禽的情况, 有效量可在约 20 g/1000 kg 到约 50 g/1000 kg 全饲料的范围内, 例如约 40 g/1000 kg 全饲料;
- 动物为猪的情况, 有效量可在约 20 g/1000 kg 到约 500 g/1000 kg 全饲料的范围内, 取决于猪的生长周期; 例如对于哺乳猪和小猪, 介于约 75 到约 95 g/1000 kg 全饲料或 80 g/1000 kg 全饲料之间; 在另一个实施例中, 对于孕猪, 有效量可为约 150 g/1000 kg 到约 450 g/1000 kg 全饲料, 或约 200 g/1000 kg 到约 400 g/1000 kg 全饲料, 取决于持续时间和怀孕期; 在一个非限制性的实施例中, 一头孕猪在整个怀孕期可被喂养约 200 g/1000 kg 全饲料, 或在最后的约 30 天到约 40 天的孕期内可被喂养约 400 g/1000 kg

全饲料;

- 动物为马类比如马的情况,有效量可介于约 25 g/1000 kg 到约 300 g/1000 kg 全饲料之间,例如,介于约 25 g/1000 kg 到约 100 g/1000 kg 全饲料之间,或在另一个实施例中,有效量可为约 60 g/1000 kg 全饲料。

- 动物为虾的情况,有效量可介于约 35 g/1000 kg 到约 300 g/1000 kg 全饲料之间,例如约 100 g/1000 kg 全饲料。

本发明还提供一种动物饲料,包括:a) 根据前述方法生产的 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖,其量为可有效提高动物的免疫活性的量;及 b) 由前述方法生产的甘露聚糖及甘露糖-蛋白,其量为足以降低或抑制细菌在动物肠壁的附着的量。例如,动物饲料可包括的 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的量在约 5 g/1000 kg 到约 500 g/1000 kg 全饲料的范围内,或介于其之间的任意量,而包括的甘露聚糖及甘露糖-蛋白的量可在约 100 g/1000 kg 到约 4000 g/1000 kg 全饲料的范围内,或介于其之间的任意量;例如,动物饲料可包括的 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的量约为 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495 或 500 g/1000 kg 全饲料,或此处所公开的任两个量所限定的范围内的任意量,并且包括甘露聚糖及甘露糖-蛋白的量约为 100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、1900、1950、2000、2050、2100、2150、2200、2250、2300、2350、2400、2450、2500、2550、2600、2650、2700、2750、2800、2850、2900、2950、3000、3050、3100、3150、3200、3250、3300、3350、3400、3450、3500、3550、3600、3650、3700、3750、3800、

3850、3900、3950 或 4000 g/1000kg 全饲料，或此处所公开的任两个量所限定的范围内的任意量。

在使用本发明生产的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖进行的现场试验中，多个饲养试验中观察到剂量关联效应或钟形曲线效应，尤其是在猪的试验中。具体地讲，接种市售 PRRS 疫苗并随后以 0、40、80 或 120 g/1000 kg 全饲料的剂量饲以  $\beta$ -葡聚糖的小猪显示出剂量关联效应，其中 80 g/1000 kg 全饲料产生的抗体应答和平均每天增重最大，而 120 g/1000 kg 全饲料产生的应答与对照样相似（见实施例 4）。

在另一个试验中，在母猪分娩前用 0、0.5 或 1 g  $\beta$ -葡聚糖/头猪/天的剂量饲养 4 周，并在分娩前 14 天接种市售的油佐剂猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)。以 1 g/天的剂量饲以  $\beta$ -葡聚糖的母猪在将抗支原体抗体被动传递给小猪方面显示出明显的增强。0.5 g  $\beta$ -葡聚糖/头猪/天的剂量显示出的抗体应答与对照样的抗体应答没有明显不同（见实施例 6）。

不囿于理论，产生钟形曲线效应的机理可能与生物的反馈机制有关，即在高剂量时反向调节免疫作用。这是一项非常重要的发现，可引导商业中正确而且最优地将纯化的  $\beta$ -葡聚糖用于家畜/动物的免疫调节。这与现有技术中错误地推荐使用大剂量的 1 到 2 kg/1000 kg 全饲料的方法也是相抵触的，大剂量可能是无效的并且/或者产生不稳定的效果。因而，所用的提取方法、 $\beta$ -葡聚糖的纯度和剂量看起来都是影响其最优应用方法的因素。

本发明现在将参照下述非限制性的实施例进行更详细的描述。

#### 实施例 1: 来自酵母的 $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的纯化

由酵母细胞提取  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的方法如下，通常如图 1 的流程图所示。将 150 L 失效酵母浆液（约 15%的固体）的试样通过注入蒸汽到约 100°C 进行巴氏杀菌约 20 min。而后对该混合物以 1000-3000 x g 进行离心分离，直到将液相和固相分离开来。液相被弃掉，而将酵母固体以与水之比为 1:5 (v/v) 的比例再悬浮于水中，并在 20°C 下搅拌 15 min。之后混合物通过离心进行分离，液相弃掉而固相则悬浮于 10 倍体积 (w/v) 的 1.5N NaOH 中。接下来将该混合物加热到 80°C 保持约 45 min 并搅拌，然后在 121°C 及 15 psi 的条件下热



压处理约 30 min。将该混合物冷却到 50℃并在室温下搅拌。将固相和液相通过离心分离开来并进行收集。对分离所得的酵母固体再进行两次碱提取，将得到的固相合并。碱提取的液相合并后留作进一步处理，如实施例 2 所述。对合并的碱提取固相进行如前所述的水提取，而后通过离心进行分离，液相弃掉，固相被保留，再如前所述进行水提取。在第二次水提取之后并且在分离之前，通过注入蒸汽到约 100℃对溶液进行巴氏杀菌 20 min。而后通过离心对混合物进行分离；液相被弃掉而固相则保留。在 80℃及搅拌的情况下，以固体与酸之比为 1:10 (v/v) 的比例，用 3%的乙酸对该固体进行酸提取 1 h。混合物通过离心进行分离；液相被弃掉而固相被保留。而后如前所述将固相用水洗涤、巴氏杀菌并分离。而后收集固体，在下述条件下进行喷雾干燥：

进料固体=10.0% (范围：5-25%)

干粉残留水分=8.0% (范围：5-15%)

入口空气温度=400°F (204℃) (范围：400-750°F)

出口空气温度=200°F (93℃) (范围：200-240°F)

使用旋转雾化器使进料雾化

使用空气冷却/输送系统冷却干粉到<100°F

喷雾干燥材料的组成如表 1 所示。

表 1 纯化的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖的组成

成分	含量 <sup>1</sup>
碳水化合物	85.5%
脂类	<12%
蛋白质	2.87%
水分	8.5%
生物活性 (旁路补体)	>释放 40 $\mu$ g Bb /mg YBG

<sup>1</sup>所示结果为 3 种不同制剂的平均值 (批号 040816, 040511, 040601)。

$\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖组合物的生物活性由生物体外旁路补体激活实验 (在 National Jewish Medical & Research Center, Denver, CO 进行) 确定。简言之，将一份  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖组合物悬浮液 (1 mg/ml, 0.4 mg/ml, 和 0.1 mg/ml) 与 9 份新鲜的人类血清混合。

将混合物在 37°C 培养 30 min 后，通过离心除去不溶颗粒。通过定量测定 Bb——一种在激活补体蛋白因子 B 时释放出的蛋白质片段，检测上清液的补体活性。用 5 mg/ml 的酵母多糖作为对照样。

对由上述方法得到的动物级  $\beta$ -葡聚糖的结构特征与药用级  $\beta$ -葡聚糖（纯度>90%）的结构特征作了比较。图 2A 和 2B 分别显示了药用级酵母  $\beta$ -葡聚糖和本发明方法得到的  $\beta$ -葡聚糖的 FTIR 光谱。尽管 X 轴和 Y 轴的刻度不一致，但能够确定在药用级  $\beta$ -葡聚糖和由适才描述的方法得到的  $\beta$ -葡聚糖中存在着类似的联结和/或化学键。

药用级酵母  $\beta$ -葡聚糖和本发明方法得到的  $\beta$ -葡聚糖的 NMR 光谱在 60-140 范围内显示出相似的信号（数据未示出），与这些信号对应的特征可能对  $\beta$ -葡聚糖的免疫活性有贡献。MacroGuard™ 产品的 NMR 光谱显示出这些信号的明显缺失（数据未示出），这点可解释该产品的有限的生物活性。

#### 实施例 2: 自液相中分离甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物

对实施例 1 中保留的碱提取液相作进一步处理，如图 1 的流程图所述。将液相的 pH 值用 HCl 调整到 7.0。然后通过注入蒸汽使温度达到 100°C，对该溶液进行巴氏杀菌 20 min。甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物经过下述条件的喷雾干燥后从液相中分离：

进料固体=10.0%（范围：5-25%）

干粉残留水分=8.0%（范围：5-15%）

入口空气温度=400°F (204°C)（范围：400-750°F）

出口空气温度=200°F (93°C)（范围：200-240°F）

使用旋转雾化器使进料雾化

使用空气冷却/输送系统冷却干粉到<100°F

干燥的甘露聚糖及甘露糖-蛋白材料的组成示于表 2 中。

表 2 甘露聚糖及甘露糖-蛋白复合物的组成

成分	含量 <sup>1</sup>
碳水化合物	>30 %
脂类	0.17%
蛋白质	22%
硫酸化灰分	11%

<sup>1</sup> 批号 0410-0531

### 实施例 3: 多种酵母 $\beta$ -葡聚糖组合物的对照效果

根据 Baggionlini 的方法 ( (1986) Methods in Enzymology, 132: 395 ), 并作了一些改进, 由对 RAW264 巨噬细胞样细胞的巨噬细胞激活作用确定了多种酵母  $\beta$ -葡聚糖组合物的对照效果。简言之, 将 BAC 或 RAW264 靶细胞接种于 96 孔组织培养皿中并培养到在不含酚红的  $\alpha$ -最小量必须培养基中汇合, 所述培养基中用 10% 的牛胎儿血清补充。之后, 除去培养基, 洗涤细胞, 接着加入基质 (高香草酸) 和测试物质。经过 1 h 的培养期后, 停止检定反应 (assay reaction), 产生的荧光用一种 ELISA-分析仪在最大激发=312 nm, 最大发射=420 nm 的条件下进行检测。使用工业级酵母聚糖作为阳性对照; 测试物质包括药用级  $\beta$ -葡聚糖、MacroGuard™产品及根据实施例 1 制备的  $\beta$ -葡聚糖 (YBG)。为确定用各种  $\beta$ -葡聚糖组合物处理的细胞释放的  $H_2O_2$  量, 建立了标准曲线 (被检物中加入外源  $H_2O_2$ )。

对照检定的结果以半对数坐标的形式示于图 3。该检定对于 1 到 10 纳摩尔  $H_2O_2$  释放量的剂量范围最为有用。YBG 组合物显示出的效果基本与药用级  $\beta$ -葡聚糖的效果相同, 比酵母聚糖和 MacroGuard™都更为有效。

### 实施例 4: $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖组合物的稳定性

对如实施例 1 所述生产的  $\beta$ -葡聚糖 (YBG) 的稳定性进行了检验以确定产品的储存期。检测了批号 020331AF 的 YBG 在产出时及在密闭容器中于阴凉 (20-25℃) 干燥 (例如不含聚集的水分) 处储存 12 个月和 24 个月后的稳定性。检测结果如表 3 所示。另外, 测定了 3 种不同批号 YBG 的活性稳定性。如实施例 1 所述测定了产品产出时及在阴凉干燥处 (例如不含聚集的水分) 于密闭的和/或塑料衬里的容器中储存 3、6、12 及 24 个月后的稳定性。这些检验的结果如表 4 所示。

表 3 批号 020331AF 的 YBG 的稳定性

测试内容	最初值	12 个月	24 个月
形态	粉末	粉末	粉末
含水率	< 10%	< 10%	< 10%

鉴定 (FTIR)	通过	通过	通过
总需氧菌平板计数 (CFU/g)	< 1000	< 1000	< 1000
金黄色葡萄球菌 (S. aureus)	阴性	阴性	阴性
大肠杆菌 (E. coli)	阴性	阴性	阴性
绿脓杆菌 (Ps. aeruginose)	阴性	阴性	阴性
总霉菌和酵母 (CFU/g)	< 1000	< 1000	< 1000
碳水化合物	87.9%	87.2%	86.5%
蛋白质 <sup>1</sup>	2.95%	2.93%	2.93%

<sup>1</sup> N x 6.25

表 4 YBG 活性稳定性

批号 (产出年份)	活性 <sup>1</sup>				
	最初值	3个月	6个月	12个月	24月
020331AF (2002)	56.0	55.4	55.2	51.3	50.2
030227AF (2003)	69.49	69.25	68.3	67.5	NC <sup>2</sup>
040601 (2004)	54.24	54.1	53.2	NC	NC

<sup>1</sup> 用  $\mu\text{g Bb/mg}$  样品表示

<sup>2</sup> 测试未完成

表 3 和表 4 的结果显示, 当将 YBG 在阴凉干燥处储存时至少在产出日期起 24 个月内是非常稳定的。

实施例 5:  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖作为猪饲料添加剂的用途及其效果

对在猪饲料中使用如实施例 1 所述生产的  $\beta$ -葡聚糖 (YBG) 的效果与市售的疫苗和佐剂进行了比较。本研究对断奶仔猪进行, 比较了从 3 周 (断奶的时间) 开始持续 5 周在仔猪的进食中逐渐增加酵母  $\beta$ -

葡聚糖的剂量时的生长、健康及对疫苗接种的应答。研究涉及 48 头猪，圈养在两个围圈中。对这些猪进行下述之一的 YBG 处理：注射盐水（对照），或注射活性的猪呼吸繁殖综合症（PRRS）减毒疫苗并同时使用 0、40、80 或 120 g YBG/1000 kg 全饲料，每种处理重复 3 次。另外，对 12 头猪多次注射氢氧化铝佐剂并注射一次或两次油基的佐剂。在研究进行到 7 天、21 天和 35 天时从前腔静脉抽取血样。PRRS 病毒（PRRSv）抗体通过使用 IDEXX™ PRRS ELISA 试剂盒进行定量。

$\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖对注射了 PRRSv 减毒疫苗的猪和注射了盐水的对照组的生长效率和免疫响应的影响如表 5 所示。结果表明两个剂量的油佐剂和活性病毒的注射对断奶仔猪的生长速率和饲料转化有负影响。根据实施例 1 的方法生产的  $\beta$ -葡聚糖（YBG）在剂量为 80 g/1000 kg 全饲料时能够减小疫苗引起的生长变缓程度。另外，当含有 80 g/1000kg 全饲料的 YBG 时能够增加对疫苗接种的抗体应答。因而，即使在感染时或免疫系统受到威胁时，YBG 都能够在提高猪的生长速率的同时提高猪的免疫响应。

表 5: YBG 对接种了 PRRS 疫苗的猪的生长效率和免疫响应的影响

平均日生长速率	g/天	标准误差	
对照	436	21	a <sup>1</sup>
YBG 40 g/1000kg	425	25	a
YBG 80 g/1000kg	390	25	a
Al(OH) 佐剂	397	25	a
一剂量的油佐剂	415	25	a
两剂量的油佐剂	275	25	b <sup>1</sup>
PRRSv 对照 @ YBG 0 g/1000kg	363	22	c <sup>1</sup>
PRRSv @ YBG 40 g/1000kg	400	21	a, c
PRRSv @ YBG 80 g/1000kg	428	22	a
PRRSv @ YBG 120 g/1000kg	362	21	c
饲料转化	F: G	标准误差	
对照	1.626	0.044	a
YBG 40 g/1000kg	1.618	0.054	a

YBG 80 g/1000kg	1.773	0.053	b
YBG 120 g/1000kg	1.607	0.047	a
A1(OH) 佐剂	1.735	0.053	b
一剂量的油佐剂	1.779	0.053	b
两剂量的油佐剂	2.010	0.055	c
PPRSv 对照 @ YBG 0 g/1000kg	1.735	0.046	b
PPRSv @ YBG 40 g/1000kg	1.655	0.045	a, b
PPRSv @ YBG 80 g/1000kg	1.716	0.046	a, b
PPRSv @ YBG 120 g/1000kg	1.653	0.045	a, b
处理	S/P 比值	标准误差	
对照	1.49	0.18	a
PPRSv @ YBG 40 g/1000kg	1.62	0.18	a
PPRSv @ YBG 80 g/1000kg	2.20	0.18	b
PPRSv @ YBG 120 g/1000kg	1.26	0.22	a

<sup>1</sup>a, b 和 c 表示  $p < 0.05$  时统计结果不同的组 (即, 在每一类中, 组“a”明显不同于组“b”和组“c”); 具有同一字母的组的结果在  $p < 0.05$  时没有明显不同。

#### 实施例 6: $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖对妊娠母猪的影响

对根据实施例 1 生产的  $\beta$ -葡聚糖 (YBG) 对孕猪及断奶仔猪的存活性的影响进行了研究。研究涉及 207 头母猪, 在分娩前 28 天进行, 分成 3 组。第一组 (对照) 用常规饮食饲养, 不补充维生素; 第二组用常规饮食饲养并补充维生素; 最后一组以 1 g/头猪/天 (相当于 400 g/1000 kg) 的量喂给 YBG。所有母猪随机地分配到分娩室, 在彼此相隔大约 10 天时间内产下一批仔猪。在出生后的最初两周测定仔猪的死亡率。本研究重复进行了 3 次。

$\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖对妊娠母猪的影响和对仔猪出生存活数量的影响, 以及对断奶数量的影响示于表 6。当将本发明生产的  $\beta$ -葡聚糖以 1g/头猪/天 (相当于 400 g /1000 kg) 的剂量喂给孕猪时, 与对照组相比, 仔猪的出生数量增加了 10.8%以上, 且每头母猪的断奶数增加量超过 7.3%。这与对照数据相比显示出明显的增加 ( $p < 0.05$ ), 并转化为生产量及养猪者的节余和成本收益比的明显增加。

表 6 TBG 对胎仔数和存活性的影响

处理	平均仔猪出生存活数		平均仔猪断奶数	
对照	10.35	a <sup>1</sup>	9.27	a
$\beta$ -葡聚糖	11.47	b <sup>1</sup>	9.96	b
维生素预混物	11.15	a, b	9.32	a

<sup>1</sup> a 和 b 表示  $p < 0.05$  时统计结果不同的组(即,在每一类中,组“a”明显不同于组“b”);具有同一字母的组的结果在  $p < 0.05$  时没有明显不同。

#### 实施例 7: $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖对猪的初乳质量的影响

对于用实施例 1 生产的  $\beta$ -葡聚糖 (YBG) 饲养孕猪是否会提高抗支原体抗体向仔猪的被动传递进行了研究。从母猪中抽样 150 头,在分娩前以 0、0.5 或 1.0 g YBG/头猪/天的量饲养 4 周。所有的母猪在分娩前 14 天接种市售油佐剂猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) (Boehringer Ingelheim, 加拿大), 仔猪出生后 18 天进行抽样。抗体的滴度通过市售 (DAKO™) ELISA 试剂盒测定。数据使用混合模型回归分析, 控制胎仔数, 出生重量及产次作为随机效应。结果示于表 7。

表 7 YBG 对于抗体被动传递的影响

处理	平均滴度	
对照	53.2	a <sup>1</sup>
YBG 0.5 g/天	75.7	a
YBG 1.0 g/天	137.7	b <sup>1</sup>

<sup>1</sup> a 和 b 表示  $p < 0.05$  时统计结果不同的组(即,在每一类中,组“a”明显不同于组“b”);具有同一字母的组的结果在  $p < 0.05$  时没有明显不同。

一般而言,在分娩前按照规定速率和时间喂给 YBG 的母猪显示出初乳质量的提高(即增加抗体滴度)及疾病防御能力的提高,从而提高仔猪的存活性。具体而言,结果表明 1.0g YBG/头猪/天的剂量可明显提高对仔猪的抗支原体抗体母体/被动传递,但 0.5 g YBG/头猪/天的剂量则与对照组相比没有明显的影响。因而,对孕猪用 YBG 进行免疫刺激可增加免疫球蛋白向仔猪的被动传递,从而改善对感染的防护、促进生长并提高仔猪的产率。YBG 具有通过母体的抗体增强幼小的免

疫上易受危害的仔猪的被动免疫和疾病防护的净效果。

#### 实施例 8: $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖对肉用仔鸡生长的影响

进行了确定实施例 1 生产的  $\beta$ -葡聚糖 (YBG) 对肉用仔鸡生长的影响的研究。研究在加拿大新斯科舍 (Nova Scotia) 的农场进行。大约 6300 只仔鸡圈养在一个禽舍的底层, 用含 40 g YBG/1000 kg 全饲料的饮食饲养 2 周, 接下来用含 20 g YBG/1000 kg 全饲料的饮食饲养 4 周, 而另一组大约 6300 只仔鸡圈养在同一个禽舍的上层, 用含有生长促进抗生素 Stafac™ (Phibro Animal Health Ltd., ON Canada) 的饮食饲养。总共在整个畜舍建立了四处独立的具有类似条件的地点。所有喂养 YBG 和 Stafac™ 的鸡都补充喂养球虫抑制药 Coban™ (Elanco Animal Health, Guelph, ON Canada)。6 周时间结束时, 使用下述标准对其性能进行评价: 死亡率、最终重量、平均日增重、饲料转化和废弃率。试验结果归纳于下表 8 中, 结果表明用这两种饲养方法饲养的鸡的生长参数相当, 表明不用生长促进抗生素饲养鸡是可行的。

表 8 YBG 与抗生素对鸡生长的影响的比较

标准	YBG + Coban™	Stafac™ + Coban™
放置的禽类总数 <sup>1</sup>	25, 431	25, 564
死亡率 (%)	1.63%	1.81%
重量 (kg)	2.03	2.02
年龄 (天)	40.42	40.42
平均日增重 (g/天)	50.59	50.69
废弃率 %	0.65%	0.65%
饲料转化 <sup>2</sup>	1.82	1.78

<sup>1</sup> 表中概括了总计四 (4) 个独立的约 6300 只鸡/测试/处理的商业地点

<sup>2</sup> 饲料转化基于消耗饲料与禽类质量的比值。商业上的比值一般为 1.5-1.9 kg 饲料/1 kg 增重。

#### 实施例 9: $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖对肉用仔鸡免疫参数的影响

检验了根据实施例 1 生产的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖作为免疫增强剂的有效性。血样取自用含 40 g YBG/1000 kg 全饲料的饮食饲养 2 周、接下来用含 20 g YBG/1000 kg 全饲料的饮食饲养 4 周的仔鸡, 以及用含有生长促进抗生素的常规饮食饲养的仔鸡。血样用加拿大安大



略省 PharmaGap 公司开发的有专有权的淋巴细胞增殖力检定法在下述胚变物质存在下进行分析：伴刀豆球蛋白 A (ConA)、植物血凝素 (phytohemagglutin) (PHA)、豆蔻酸佛波醇乙酸酯 (PMA)+伊屋诺霉素、脂多糖(LPS)+葡聚糖硫酸酯(DxS)和美洲商陆有丝分裂原(PWM)。结果示于表 9 和 10。

表 9 抗生素处理对仔鸡体内淋巴细胞增殖的影响<sup>1</sup>

	C2	C3	C5	C7	C8	C10	C11	C13	C17	C19	C20	C22	平均
对照	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ConA	128	95	95	95	97	87	110	92	100	103	97	92	99
PHA	72	86	56	69	85	94	91	94	83	106	74	81	83
PWM	81	88	106	85	89	73	84	66	92	106	86	104	88
LPS+DxS	100	126	165	100	100	103	139	63	118	133	83	102	111
PMA+Iono	106	103	147	136	97	96	178	53	102	117	89	104	111

<sup>1</sup> 存在刺激时细胞数的增加，表达为没有刺激的条件相当对照组数据的百分比，对照样为用含有生长促进抗生素的饲料饲养的仔鸡。

表 9 显示出用含有生长促进抗生素的饮食饲养的动物体内，淋巴细胞对多种物质的应答是不同的，对免疫细胞的刺激程度很低。对 ConA, PWM 和 LPS 的应答与对照样相比没有明显的不同，并且在一些动物体内，应答明显低于对照样（例如，序号为 2、5、7 和 20 的动物对 PHA 的应答；序号为 13 的动物对 PMA 的应答；序号为 13 和 20 的动物对 PWM 的应答；序号 13 的动物对 LPS 的应答。）。因而，只饲以生长促进抗生素的动物具有未激活的免疫系统，其可能更易受细菌感染，而且也更易受到抗生素不能治疗的病毒感染的感染。另外，抗生素对于处理或抵抗病毒感染没有效果。

表 10 YBG 处理对仔鸡体内淋巴细胞增殖的影响<sup>1</sup>

	C1	C4	C6	C9	C14	C15	C16	C18	C21	C24	平均
对照	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Con A	163	133	134	114	116	113	107	120	107	98	121
PHA	173	95	112	121	108	122	127	100	127	119	120
PWM	147	128	149	121	112	101	116	106	113	164	126
LPS+DxS	139	148	159	118	148	123	147	120	116	152	137
PMA+Iono	173	129	143	100	130	125	126	120	108	160	131

<sup>1</sup> 存在刺激时细胞数的增加，表达为没有刺激的条件相当对照组数据的百分比，对照样为用含有生长促进抗生素的饲料饲养的仔鸡。

相对而言，表 10 所示的用含有 YBG 的饮食饲养的动物中，淋巴细

胞对各种物质的应答明显增强，因为观察到了与无刺激对照样相比淋巴细胞增殖的增加。对 PMA 和 LPS 刺激的应答特别得到了提高。这些数据表明用 YBG 饲养的动物免疫能力增强，而且抗细菌和病毒感染的能力也都增强。

#### 实施例 10: $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖对肉用仔鸡生长情况和器官重量的影响

进行研究以确定与生长促进抗生素相比，根据实施例 1 生产的  $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖 (YBG) 对免疫系统各部分的影响。试验进行了 3 次，每次都使用 912 天大的鸡。把鸡随机地分配到 24 个围圈中 (38 只鸡/圈)，三餐饮食之一喂以：无生长促进剂 (对照)、YBG 或维及霉素。开始的 YBG 饮食中含 40g YBG/1000 kg 全饲料，生长和结束饮食中含 20 gYBG/1000 kg 全饲料。该禽类从第 0 到第 14 天喂养开始饮食，从第 14 到第 24 天喂养生长饮食，并从第 24 到第 38 天喂养结束饮食。所有的禽类在第 0、14、24 和 38 天时人工称重，并监测整个研究过程消耗饲料的情况。在第 14 天和 38 天时，对 48 只肉用鸡 (2 只/圈) 实施安乐死，取出其脾脏和腔上囊并称重。将第 21 天和 35 天时的血样固定于玻片上进行鉴别染色。

器官重量占体重的比例及白细胞数在进行处理的各组之间是相同的。每次饮食处理所用的饲料效用在整个饲养时间段中也是相同的。平均而言，24 天时，用抗生素饲养的禽类 (818g) 比用 YBG 饲养的禽类 (771g) 及对照组的禽类 (752g) 大。然而，到 38 天时，在  $p < 0.05$  时用 YBG 饲养的禽类 (1987g) 不再明显小于抗生素组 (2009g)。在生长期结束时，对照组与进行另两种处理的组相比显示出较小的平均体重 (1934g;  $p > 0.05$ )。这些结果表明 YBG 在促进肉用鸡生长方面与常规使用的抗生素同样有效。因而，用 YBG 代替生长促进抗生素是可行的。

#### 实施例 11: $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖对肉用仔鸡生长的影响

进行了确定根据实施例 1 生产的  $\beta$ -葡聚糖 (YBG) 对肉用仔鸡生长的影响的研究。总计 900 只肉用鸡，用无生长促进剂 (对照)、含生长促进抗生素、20 g YBG/1000 kg 全饲料或 40 g YBG/1000 kg 全饲料的饮食饲养 6 周。实验结果归纳于下面的表 12。

表 11 YBG 对肉用仔鸡生产性能的影响

0-3 周									
处理	日增重 (g)		食物摄入 (g)		饲料转化		21 天时重量 (kg)		
对照	27.49 ± 1.16	b <sup>1</sup>	47.27 ± 1.65	a	1.72 ± 0.06	a	0.634 ± 0.02	b	
抗生素	29.04 ± 1.86	a <sup>1</sup>	48.55 ± 2.30	a	1.67 ± 0.05	b	0.658 ± 0.04	a	
20 g/1000kg	27.66 ± 1.46	b	47.75 ± 2.34	a	1.73 ± 0.07	a	0.629 ± 0.03	b	
40 g/1000kg	27.77 ± 1.26	b	48.06 ± 2.68	a	1.73 ± 0.06	a	0.632 ± 0.03	b	
4-6 周									
处理	日增重 (g)		食物摄入 (g)		饲料转化		6 周时重量 (kg)		死亡率 (%)
对照	63.46 ± 3.34	b	134.99 ± 5.09	a	2.13 ± 0.09	a	1.962 ± 0.07	b	4.46
抗生素	65.32 ± 3.49	a, b	134.36 ± 10.43	a	2.06 ± 0.16	a	2.031 ± 0.10	a	3.12
20g/1000kg	63.91 ± 2.34	a, b	135.29 ± 5.74	a	2.12 ± 0.07	a	1.976 ± 0.06	b	2.68
40g/1000kg	65.59 ± 2.79	a	138.44 ± 12.27	a	2.10 ± 0.12	a	2.01 ± 0.05	a, b	3.27

<sup>1</sup> a 和 b 表示  $p < 0.05$  时统计结果不同的组(即,在每一类中,组“a”明显不同于组“b”);具有同一字母的组的结果在  $p < 0.05$  时没有明显不同。

与对照组相比, YBG 20 g/kg 和 40 g/kg 的组在 0-3 周时, 在日增重、食物摄入、饲料转化或重量方面未显示出不同。而抗生素组则在日增重、饲料转化和重量方面显示出明显的不同, 但在食物摄入方面没有什么不同。该结果表明, 在最初的 3 周, YBG 的作用比抗生素的作用慢。对照而言, 到第 6 周时, 以 40 g YBG/1000 kg 全饲料饲养的鸡的日增重在不同处理方式的组中是最高的。以 40 g YBG/1000 kg 全饲料饲养的鸡的平均重量也与抗生素处理的组相近。另外, 在 YBG 饲养的鸡中观察到有低死亡率的趋势。总体看来, 用两种饲料饲养的鸡的试验结果显示出相当的生长参数, 这表明不用生长促进抗生素养鸡是可行的。

#### 实施例 12: 用 YBG 和抗生素饲养的火鸡的生长对比

进行了确定实施例 1 生产的  $\beta$ -葡聚糖 (YBG) 对火鸡生长的影响的研究。常规饲养的火鸡以 22 g/1000 kg 全饲料量的生长促进抗生素

Stafac™饲养 12 周。YBG 饲养的火鸡先用 40 g/1000 kg 全饲料的量饲养 6 周，剩余的生长期（即 5 周）用 YBG 20 g/1000 kg 全饲料的量饲养。在对照组和 YBG 饲养的饮食中，以 22 g/1000 kg 全饲料的剂量使用抗球虫病的 Coban™。结果示于表 11。

表 12 YBG 与抗生素相比对火鸡生长的影响

	YBG	常规饲养
A 级	92-94 %	89%
废弃率	0.6 %	0.5 %
年龄	67-75 天	65-84

火鸡的响应从一般的 85-90% “A 级” 火鸡增加到 >92% “A 级” 火鸡。

#### 实施例 13: $\beta$ -(1, 3/1, 6)-D-葡聚糖对虾生产力和存活率的影响

与泰国的 Kasetsart University 和加拿大 PEI 的 Atlantic Veterinarian College (AVC) 合作进行研究，以确定根据实施例 1 生产的  $\beta$ -葡聚糖 (YBG) 对饲养的虾的生产力和存活率的影响。从一家养殖场购买了大约 300 万只虾 (*Penaeus monodon*)，为同一批次所得。虾分入 10 个池中，为尺寸和形状相当的 5 个处理池及 5 个对照池。起初从养殖场每批次中通过 PCR 和 RT-PCR 抽查 50 只 PL 虾，检测白斑综合症病毒 (WSSV)、传染性表皮与造血组织坏死症 (IHHNV)、斑节对虾杆状病毒 (MBV)、肝胰腺细小病毒 (HPV)、桃拉综合症病毒 (TSV) 和黄头病毒 (YHV)，以确保不存在疾病。

根据对每一年龄段的虾设定的标准饲养法，将 100 g/1000 kg 全饲料的 YBG 加入处理池的饲料中。对照池中根据与所研究的池相同的饲养法供给同样的饲料，只是不含 YBG。120 天后，收获虾并测定下列参数：饲料转化率 (FCR)、平均日增重 (ADG)、存活率、每亩产量和每磅个数 (即，衡量大小)。试验结束时，从每一批/池抽取代表性的样本，并用 PCR 及 RT-PCR 检测 WSSV、IHHNV、MBV、HPV、TSV 和 YHV。

用 YBG 饲养的组具有较高的抗病毒和细菌疾病的能力，因而能更好地对抗那些发生的疾病。由此，随对照组和 YBG 饲养的虾在试验中遭受的疾病实际程度的变化，总体生长能力有不同程度的提高。而且，

在相似的平均日增重、每亩产量和饲料转化条件下，随池中疾病程度不同，YBG 饲养的虾的存活率超过对照组至少 10%。

参照一个或多个具体实施方式对本发明进行了描述。然而，对于本领域普通技术人员而言显而易见的是，也可进行多种变化和改进而不脱离如权利要求所定义的本发明的范围。

本申请所引用的所用参考文献和专利的全部内容在此通过引证的方式纳入本说明书。

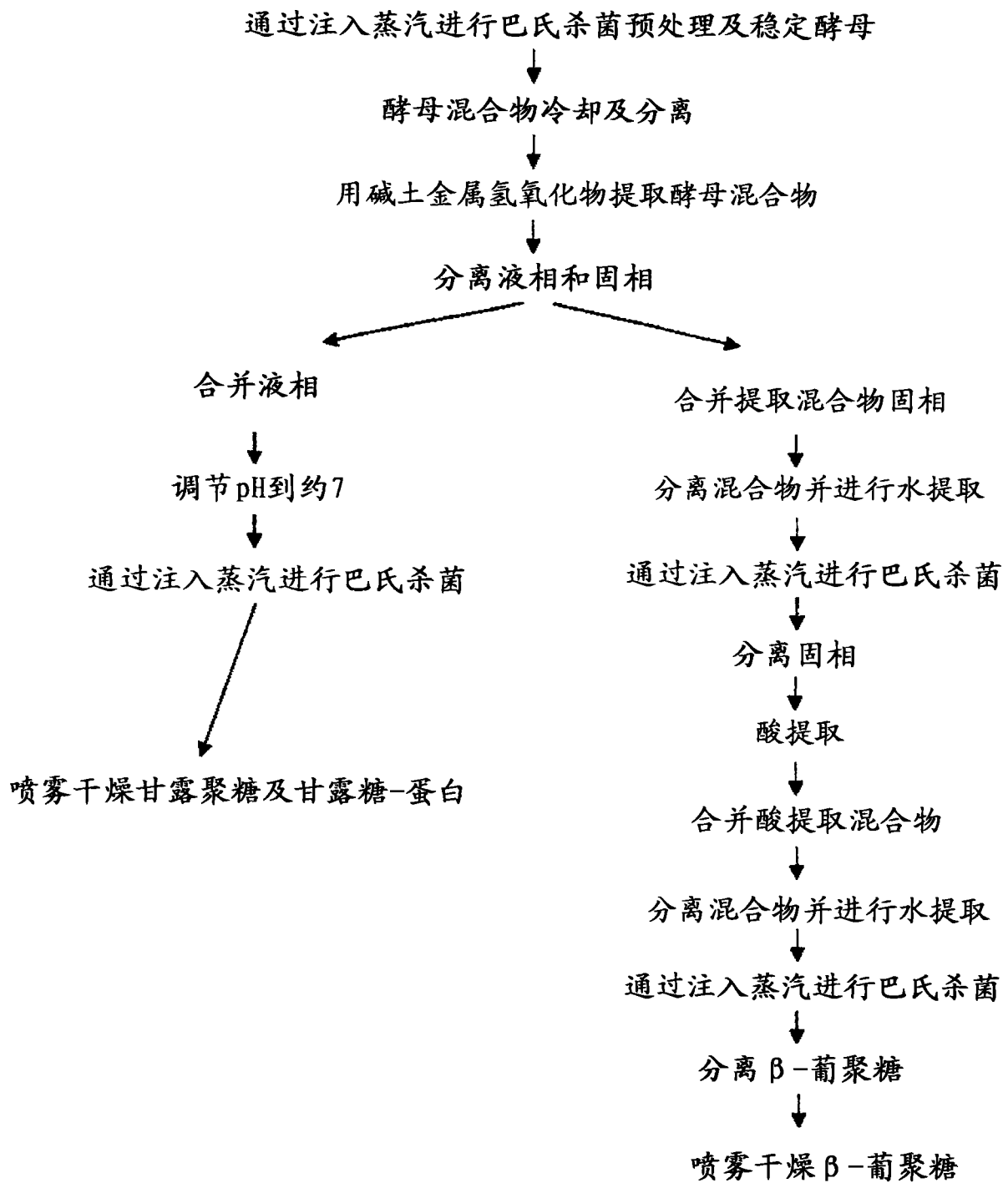


图 1

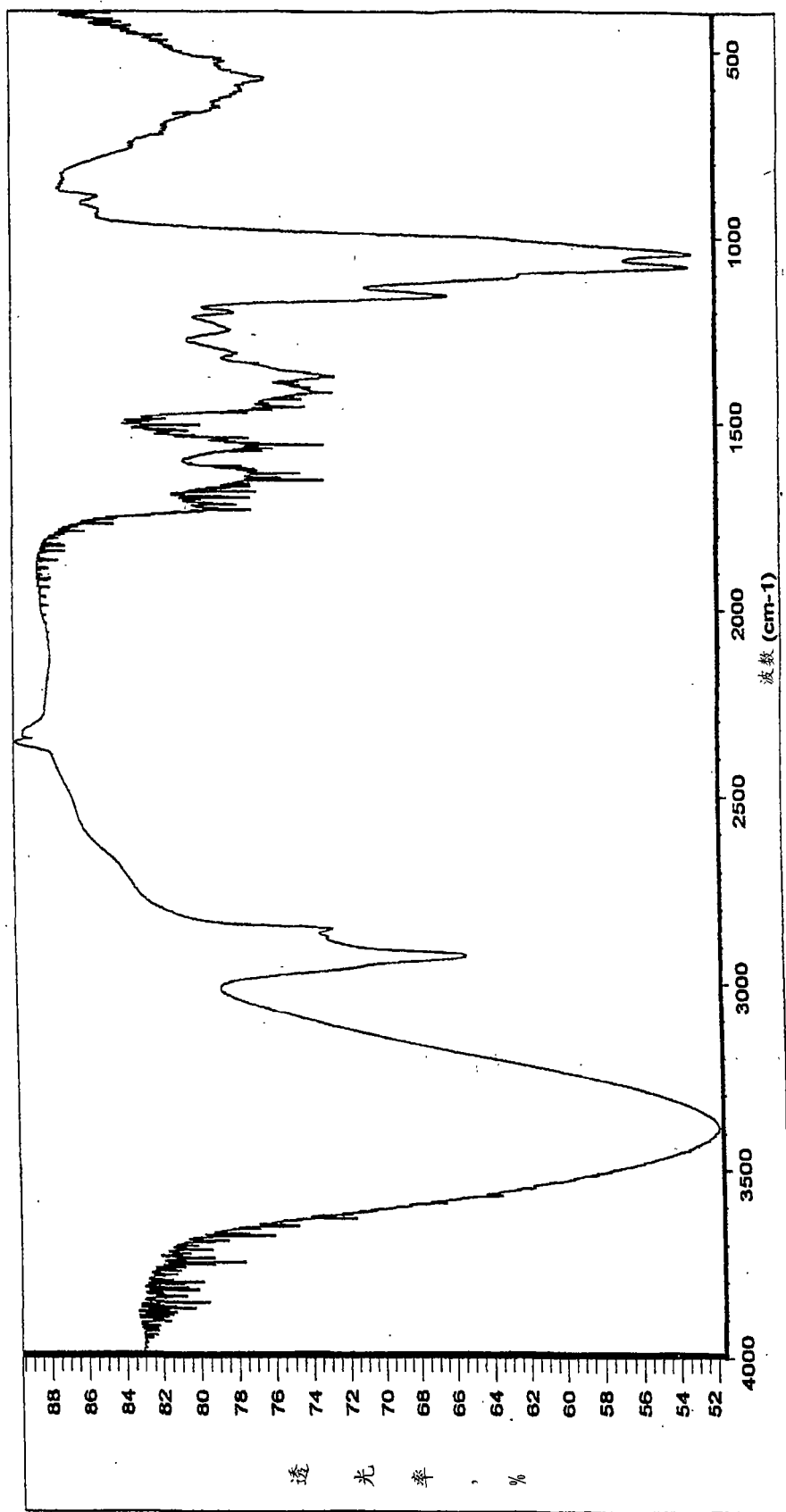


图 2A

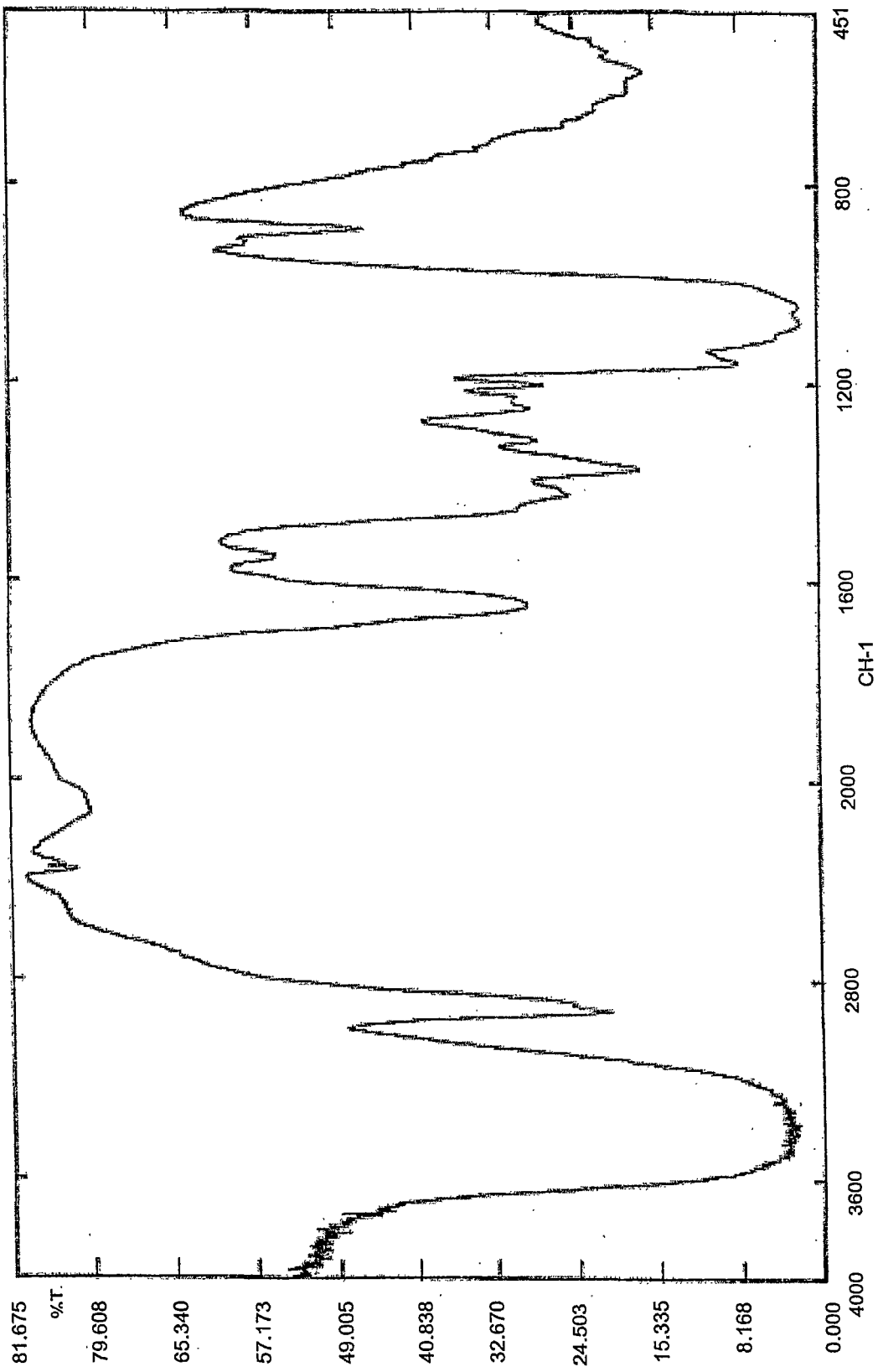


图 2B



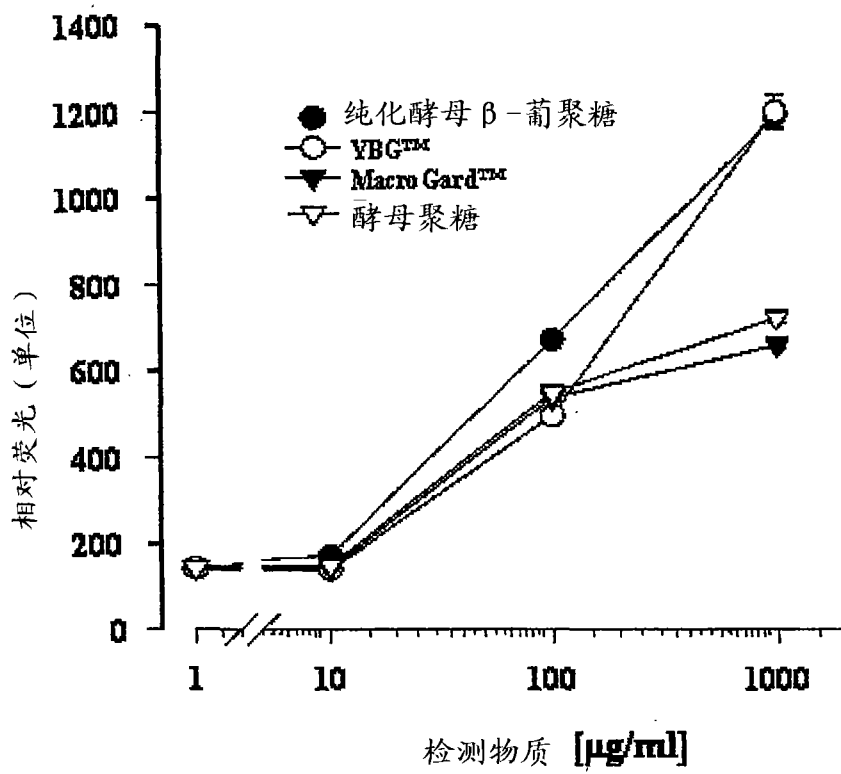


图 3