

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 003 383**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/702** (2006.01)  
**A61K 31/715** (2006.01)  
**A61P 1/14** (2006.01)  
**A23L 33/21** (2006.01)  
**C07H 3/06** (2006.01)  
**C08B 37/00** (2006.01)  
**C08L 5/00** (2006.01)  
**C12N 9/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2020 PCT/US2020/035748**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2020 WO20247389**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2020 E 20817695 (8)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024 EP 3980024**

54 Título: **Oligosacáridos sintéticos producidos a partir de polisacáridos**

30 Prioridad:

**05.06.2019 US 201962857685 P**  
**19.12.2019 US 201962950483 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.03.2025**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.00%)**  
**Office of Technology Transfer 1111 Franklin Street 12th Floor**  
**Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**LEBRILLA, CARLITO B.;**  
**GERMAN, BRUCE;**  
**AMICUCCI, MATTHEW J.;**  
**NANDITA, ESHANI;**  
**CASTILLO, JUAN y**  
**MILLS, DAVID A.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 3 003 383 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Oligosacáridos sintéticos producidos a partir de polisacáridos

- 5 La presente solicitud reivindica la prioridad respecto de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 62/857.685, presentada el 5 de junio de 2019 y la solicitud provisional de EE. UU. n.º 62/950.483, presentada el 19 de diciembre de 2019.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Los oligosacáridos son hidratos de carbono que suelen contener de 3 a 20 unidades de monosacáridos unidas covalentemente. Debido a la posibilidad de muchos constituyentes monosacáridos, posiciones variables de los enlaces glucosídicos y estereoquímica asociada, ramificación y modificación de grupos funcionales, los oligosacáridos pueden tener estructuras muy variables que provocan una gran cantidad de bioactividades diferentes. La bioactividad de muchos oligosacáridos aún no se ha estudiado ni determinado. Sin embargo, algunas fuentes de oligosacáridos, en particular los de la leche humana<sup>1-4</sup>, la leche bovina,<sup>5</sup> y los galactooligosacáridos producidos por la transgalactosilación de la lactosa<sup>6</sup>, están bien estudiados y han demostrado actuar como prebióticos, inmunomoduladores, antidiarreicos, protectores de patógenos y estimuladores de la absorción de minerales. Por lo tanto, se espera que los oligosacáridos de otras fuentes provoquen bioactividades similares. Los polisacáridos son biomoléculas grandes que alcanzan y posiblemente superan el millón de restos de monosacáridos.<sup>7</sup> Los polisacáridos constituyen las paredes celulares de las plantas, bacterias, levaduras, hongos, y de forma más limitada, animales.<sup>8-9</sup> Los polisacáridos son muy conocidos por sus propiedades físicas y reológicas, que incluyen proporcionar rigidez estructural, unión de agua y capacidades antioxidantes. En cambio, las bioactividades de los polisacáridos se conocen mucho menos que las de los oligosacáridos, pero, en algunos casos, pueden proporcionar beneficios prebióticos e inmunomoduladores similares.<sup>10-12</sup> La diferencia en las bioactividades a pesar de tener componentes estructurales similares se puede atribuir a su baja solubilidad y a su limitado transporte intracelular.

- Mientras que los oligosacáridos se pueden encontrar en gran abundancia en los animales, la mayor parte de la materia vegetal está comprendida por polisacáridos con escasa o nula contribución de oligosacáridos. Por lo general, los polisacáridos se sintetizan mediante la adición de monosacáridos activados por UDP al material de partida de hidratos de carbono que suele estar unido a proteínas o lípidos.<sup>13-14</sup> Esto no deja ningún mecanismo directo para la biosíntesis de oligosacáridos, lo que da lugar a pocos oligosacáridos endógenos. Los polisacáridos vegetales más abundantes en la naturaleza incluyen amilosa, amilopectina y celulosa. Sin embargo, las plantas contienen otros polisacáridos que se pueden agrupar según sus funciones estructurales. Las pectinas se refieren a polímeros aniónicos con carga negativa, tales como ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II y poligalacturonano, mientras que las hemicelulosas se refieren a polímeros neutros que unen fibrillas de celulosa, tales como xiloglucano, glucomanano y arabinogalactano. Además, las paredes celulares secundarias de las plantas contienen en gran parte arabinanos y xilanos.<sup>15-17</sup>

- Los oligosacáridos se producen generalmente de tres formas y se ordenan posteriormente según la frecuencia de uso: 1) síntesis *de novo* mediante métodos químicos y/o enzimáticos y/o biosintéticos para construir oligosacáridos<sup>18-20</sup>, 2) liberación enzimática o química a partir de proteínas y/o lípidos<sup>21</sup>, 3) mediante la despolimerización de polisacáridos utilizando enzimas<sup>22</sup>. Debido al elevado coste de desarrollo de la síntesis *de novo* de oligosacáridos, en la actualidad, esta estrategia sólo se aplica a los oligosacáridos de mamíferos. Además, las plantas no tienen grandes cantidades de oligosacáridos unidos a proteínas y lípidos que puedan liberarse. En consecuencia, la despolimerización de polisacáridos mediante enzimas es actualmente la principal forma de producir oligosacáridos vegetales. Sin embargo, la especificidad de sustrato de las enzimas conduce a la producción de oligosacáridos altamente específicos con poca variación en las estructuras. Además, las enzimas no están disponibles para todos los polisacáridos.

- El documento US 2016/366909 A1 divulga composiciones para piensos animales que comprenden glucooligosacáridos.

**Breve resumen de la invención**

- En el presente documento se proporcionan oligosacáridos sintéticos y mezclas de los mismos, como se define en las reivindicaciones, que se asemejan a los polisacáridos producidos por las plantas, levaduras y otros hongos, bacterias y algas.

- En algunas realizaciones, el oligosacárido sintético incluye monómeros de glucosa unidos por  $\beta$ 1-4 y monómeros de glucosa unidos por  $\beta$ 1-3.

- Los oligosacáridos y composiciones proporcionados en el presente documento son útiles como simbióticos, prebióticos, inmunomoduladores, auxiliares digestivos, aditivos alimentarios, suplementos, excipientes farmacéuticos y patrones analíticos.

- Breve descripción de los dibujos**

En las figuras 1A a 1C se muestran **a)** cromatograma de pico base anotado de oligosacáridos procedentes de xiloglucano caracterizados; **b)** El cromatograma de iones extraídos de 771,27 m/z muestra cuatro isómeros; **c)** Espectros de masas en tándem anotados de los cuatro isómeros de 771,27 m/z y sus estructuras finales elucidadas.

5 En las **figuras** 2A a 2N se muestran cromatogramas de pico base anotados de oligosacáridos procedentes de patrones de polisacáridos: **a)** curdlano, **b)** celulosa, **c)** β-glucano, **d)** liquenano, **e)** galactano, **f)** manano, **g)** glucomanano, **h)** galactomanano, **i)** arabinano, **j)** xilano, **k)** arabinoxilano, **l)** amilosa, **m)** amilopectina y **n)** xiloglucano.

10 En la figura 3 se muestran **a)** cromatograma de pico base anotado de oligosacáridos agrupados procedentes de la despolimerización de los patrones de polisacáridos; y cromatogramas de pico base anotados de oligosacáridos caracterizados procedentes de **b)** salvado de trigo y **c)** salvado de avena.

En la figura 4 se muestra una representación del polisacárido xiloglucano. El grado de polimerización puede alcanzar hasta 100.000 monosacáridos.

15 En la figura 5 se muestra el cromatograma de pico base para los oligosacáridos parecidos al xiloglucano. El cromatograma se extrajo para masas entre m/z de 400 a 3000 con el ion calibrante de m/z 922.00 excluido. Los oligosacáridos marcados corresponden a los oligosacáridos descritos en la tabla 4.

20 En las figuras 6A a 6D se muestran **a)** El espectro de fragmentación de m/z 477,19 a un tiempo de retención de 11,04 minutos. Este oligosacárido representa el n.º 3 en la tabla 4. **b)** El espectro de fragmentación de m/z 771,28 a un tiempo de retención de 15,12 minutos. Este oligosacárido representa el n.º 12 en la tabla 4. **c)** El espectro de fragmentación de m/z 903,32 a un tiempo de retención de 20,41 minutos. Este oligosacárido representa el n.º 20 de la tabla 4. **d)** El espectro de fragmentación de m/z 1227,43 a un tiempo de retención de 26,59 minutos. Este oligosacárido representa el n.º 42 de la tabla 4.

En la figura 7 se muestra un diagrama de flujo en el que se esbozan las estrategias para elucidar la estructura de los oligosacáridos.

30 En la figura 8A se muestra un cromatograma anotado con oligosacáridos completamente elucidados a partir del galactomanano, que se determinaron utilizando la estrategia lógica 4.

En la figura 8B se muestra un cromatograma construido que representa la concentración de los monosacáridos de galactosa y manosa en cada fracción y la composición relativa de enlaces glucosídicos de las fracciones mostradas en los gráficos circulares.

35 En la figura 8C se muestra el análisis de RMN de los oligosacáridos.

40 En la figura 8D se muestra una representación de la estructura elucidada del galactomanano mediante la integración de oligosacáridos, monosacáridos, enlaces glucosídicos y análisis de RMN.

### Descripción detallada de la invención

45 En el presente documento se proporcionan nuevos oligosacáridos sintéticos, como se define en las reivindicaciones, que, cuando se formulan de manera conjunta entre sí, se parecen a los polisacáridos producidos por las plantas, levaduras y otros hongos, bacterias y algas. Los oligosacáridos se pueden utilizar para numerosas aplicaciones, incluidos prebióticos, inmunomoduladores, salud intestinal y patrones analíticos. Los oligosacáridos, cuya longitud varía de 3 a 6 monosacáridos, mantienen los mismos epítomos reconocibles que constituyen sus polisacáridos parentales y, por tanto, pueden proporcionar bioactividades de amplio espectro. La reducción de su tamaño les permite ser reconocidos e internalizados más fácilmente por las células.

50 La invención se define mediante las reivindicaciones.

### I. Realizaciones de la invención

55 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "oligosacárido sintético" se refiere a un oligosacárido producido por la despolimerización de un polisacárido. Los oligosacáridos sintéticos de acuerdo con la presente invención se pueden obtener mediante la despolimerización de polisacáridos heteropolímeros y polisacáridos homopolímeros de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "polisacárido heteropolímero" se refiere a un polisacárido que contiene dos o más tipos de subunidades monosacáridas unidas entre sí por el mismo tipo de enlace glucosídico o por diferentes tipos de enlaces glucosídicos; los polisacáridos heteropolímeros también incluyen polisacáridos que contienen subunidades monosacáridas repetidas del mismo tipo unidas entre sí por diferentes tipos de enlaces glucosídicos. Los enlaces glucosídicos en un polisacárido heteropolímero pueden ser enlaces β1-2, enlaces β1-3, enlaces β1-4, enlaces β1-6, enlaces α1-3, enlaces α1-4, enlaces α1-6 o una combinación de los mismos. Los ejemplos de polisacáridos heteropolímeros incluyen, pero sin limitación, xiloglucano, liquenano, β-glucano, glucomanano, galactomanano, arabinano, xilano y arabinoxilano.

Algunas realizaciones de la presente divulgación proporcionan oligosacáridos sintéticos que comprenden una cadena principal que contiene monómeros de glucosa, en donde cada monómero de glucosa está unido opcionalmente a un monómero de xilosa colgante, y en donde el número total de monómeros en el oligosacárido sintético varía de 3 a 30.

5 Se pueden obtener oligosacáridos sintéticos de este tipo, por ejemplo, mediante la despolimerización del xiloglucano de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Se sabe que el xiloglucano contiene una cadena principal de glucosa con ramificaciones de xilosa de una sola unidad, donde las ramas de xilosa pueden estar modificadas con una caperuza terminal de galactosa o una caperuza terminal de arabinosa. El xiloglucano de tamarindo, por ejemplo, contiene una cadena principal de glucosa unida por  $\beta$ 1,4 con frecuentes ramificaciones de  
10 una sola unidad de xilosa unida por  $\alpha$ 1,6 que, ocasionalmente, puede unirse a una caperuza terminal de galactosa unida por  $\beta$ 1,2. En otras fuentes de xiloglucano, la arabinosa puede estar unida por  $\alpha$ 1,2 al resto de xilosa. El xiloglucano de otras fuentes puede contener un único resto de fucosa unido por  $\alpha$ 1,2 a la galactosa.

En algunas realizaciones, los oligosacáridos comprenden 2, 3, 4, 5 o 6 restos de hexosa.

15 En algunas realizaciones, los monómeros de glucosa de la cadena principal del oligosacárido sintético son monómeros de glucosa unidos por  $\beta$ 1-4.

Los  $\beta$ -glucanos presentes en los cereales (por ejemplo, arroz, trigo, avena, salvado, cebada y malta), por ejemplo, consisten en una cadena principal de glucosa unida por  $\beta$ 1-4 con restos de glucosa únicos  $\beta$ 1-3 dispersos entre cada 2 a 3 restos de glucosa unidos por  $\beta$ 1-4 (31). El liquenano es un polisacárido que se encuentra en los líquenes, que tiene una estructura similar al  $\beta$ -glucano en la que los enlaces consisten en  $\beta$ 1-4 y  $\beta$ 1-3 de restos de glucosa (32). Sin embargo, a diferencia del  $\beta$ -glucano, el liquenano tiene enlaces  $\beta$ 1-3 mucho más frecuentes.

25 El oligosacárido se selecciona de un grupo que consiste en cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de los siguientes compuestos:

Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-3Glc,  
Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc,  
30 Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc,  
Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-3Glc1-4Glc,  
Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc,  
Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc,  
Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-4Glc,  
Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-3Glc1-4Glc1-4Glc,  
35 Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc1-4Glc,  
Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-3Glc,  
Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc,  
Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-3Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc,  
Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc1-4Glc1-4Glc,  
40 Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-3Glc1-4Glc,  
Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc y  
Glc1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc.

Los oligosacáridos sintéticos se pueden obtener también mediante despolimerización de polisacáridos homopolímeros de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "polisacárido homopolímero" se refiere a un polisacárido que contiene subunidades monosacáridas repetidas del mismo tipo, unidas entre sí por el mismo tipo de enlace glucosídico, incluido, pero sin limitación, una combinación de enlaces  $\beta$ 1-3, enlaces  $\beta$ 1-4, enlaces  $\beta$ 1-6, enlaces  $\alpha$ 1-3, enlaces  $\alpha$ 1-4 y enlaces  $\alpha$ 1-6. Los ejemplos de homopolímeros incluyen, pero sin limitación, curdlano, galactano y manano. Los homopolímeros incluyen, pero sin limitación, curdlano (un polímero lineal de glucosa unida por  $\beta$ 1-3 que se encuentra como exopolisacárido de *Agrobacterium*; 28), galactano (un polímero lineal de galactosa unida por  $\beta$ 1-4 que se ha aislado en forma de arabinogalactano antes del tratamiento posterior con arabinofuranosidasa para eliminar las unidades de arabinosa; 29), y manano (un polímero lineal de glucosa unida por  $\beta$ 1-3 que se encuentra como exopolisacárido de *Agrobacterium* y también de algunos frutos secos; 30).

55 Los oligosacáridos sintéticos se pueden preparar mediante cualquier método adecuado que incluye, pero sin limitación, la iniciación de Fenton hacia grupos de oligosacáridos definidos (FITDOG, del inglés *Fenton's Initiation Toward Defined Oligosaccharide Groups*) que es un método para la degradación controlada de polisacáridos en oligosacáridos. Se describen procedimientos FITDOG ilustrativos, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente n.º 2018/0363016 A1. En algunas realizaciones, los polisacáridos en bruto se someten primero a un tratamiento oxidativo inicial con peróxido de hidrógeno y un catalizador de metal de transición o metal alcalinotérreo (es decir, sulfato de hierro(III)) para hacer más lábiles los enlaces glucosídicos. A continuación, se utiliza NaOH u otra base para la escisión inducida por base, lo que da lugar a una variedad de oligosacáridos. Se produce una neutralización inmediata para reducir la reacción de desprendimiento. Este método tiene la capacidad de generar grandes cantidades de oligosacáridos biológicamente activos a partir de una variedad de fuentes de hidratos de carbono.

Si se desea, el polisacárido se puede tratar opcionalmente con una o más enzimas degradadoras de polisacáridos para reducir el tamaño medio o la complejidad del polisacárido antes de que los polisacáridos resultantes se traten con el tratamiento oxidativo y el catalizador metálico. Ejemplos no limitantes de enzimas polisacáridas incluyen, por ejemplo, amilasa, isoamilasa, celulasa, maltasa, glucanasa o combinaciones de las mismas.

5 El tratamiento oxidativo inicial puede incluir peróxido de hidrógeno y un metal de transición o un metal alcalinotérreo. Se han probado metales con diferentes estados de oxidación, tamaños, grupos periódicos y números de coordinación para comprender la aplicación con el proceso FITDOG. Cada uno de los diferentes metales ha mostrado actividad en la reacción FITDOG. Mientras que estos metales trabajan con cualquier polisacárido, se pueden utilizar diferentes metales para producir oligosacáridos con grados preferenciales de polimerización. El tratamiento oxidativo va seguido de un tratamiento de base. El método es capaz de generar oligosacáridos a partir de polisacáridos que tienen diversos grados de ramificación, y que tienen una variedad de composiciones de monosacáridos, incluidos los polisacáridos naturales y modificados.

15 También se proporcionan mezclas que contienen dos o más oligosacáridos sintéticos diferentes como se describe en el presente documento. Los productos de despolimerización no purificados o semipurificados pueden utilizarse para preparar mezclas de oligosacáridos o, como alternativa, los oligosacáridos se pueden purificar para producir grupos especialmente formulados. Se pueden obtener los oligosacáridos sintéticos de las mezclas, por ejemplo, mediante despolimerización de un polisacárido homopolímero, un polisacárido heteropolímero o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, al menos uno de los oligosacáridos sintéticos de la mezcla se obtiene mediante despolimerización de xiloglucano, curdlano, galactano, manano, liquenano, β-glucano, glucomanano, galactomanano, arabinano, xilano, arabinoxilano o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la cantidad de al menos uno de los oligosacáridos sintéticos en la mezcla es al menos un 1 %, basándose en la cantidad total de oligosacáridos en la mezcla de caucho. El oligosacárido sintético puede estar presente, por ejemplo, en una cantidad que varía de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 %, o de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 95 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 90 %, o de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 80 %, o de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 70 %. El oligosacárido sintético puede estar presente, por ejemplo, en una cantidad que varía de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %, o de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 30 %, o de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 40 %, o de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 50 %, o de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 60 %, o de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 70 %, o de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 80 %, o de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 90 %, o de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 99 %. El porcentaje puede ser un % en moles, basado en el número total de moles de oligosacáridos en la mezcla, o un % en peso, basado en el peso total de oligosacáridos en la mezcla. En algunas realizaciones, la cantidad de al menos uno de los oligosacáridos sintéticos es al menos 5 % en moles.

Como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" y la expresión "alrededor de" indican un intervalo cercano en torno a un valor numérico cuando se utilizan para modificar ese valor específico. Si "X" fuera el valor, por ejemplo, "aproximadamente X" o "alrededor de X" indicaría un valor de aproximadamente 0,9X a 1,1X, por ejemplo, un valor de 0,95X a 1,05X, o un valor de 0,98X a 1,02X, o un valor de 0,99X a 1,01X. Cualquier referencia a "aproximadamente X" o "alrededor de X" indica específicamente los valores de X, 0,9X, 0,91X, 0,92X, 0,93X, 0,94X, 0,95X, 0,96X, 0,97X, 0,98X, 0,99X, 1,01X, 1,02X, 1,03X, 1,04X, 1,05X, 1,06X, 1,07X, 1,08X, 1,09X y 1,1X, y valores dentro de este intervalo.

45 Los oligosacáridos sintéticos y las composiciones descritas en el presente documento son útiles como simbióticos, prebióticos, inmunomoduladores, auxiliares digestivos, aditivos alimentarios, excipientes farmacéuticos o patrones analíticos. Los oligosacáridos sintéticos se pueden combinar con otros ingredientes para producir productos alimenticios y suplementos, incluidos leche artificial, suplementos geriátricos, harinas panificables y aperitivos. Los oligosacáridos sintéticos se pueden combinar con bacterias beneficiosas para formar simbióticos. Los oligosacáridos sintéticos también se pueden utilizar como productos farmacéuticos.

Los oligosacáridos sintéticos se pueden utilizar para hacer crecer o mantener microorganismos específicos en seres humanos, otros mamíferos o en la rizosfera de las plantas. Los oligosacáridos sintéticos pueden contener enlaces glucosídicos específicos que no se pueden digerir por el hospedador particular (es decir, una persona, un animal de cría o un animal de compañía) pero se pueden metabolizar por grupos específicos de microorganismos comensales o probióticos. De esta manera, los oligosacáridos sintéticos pueden funcionar como portadores para transportar microorganismos exógenos (probióticos o fármacos) a un nicho específico, o como fuente nutricional para microorganismos ya presentes en el hospedador.

60 El xiloglucano se puede utilizar para el crecimiento selectivo de especies específicas de *Bacteroides*, como *B. ovatus* (39). Se ha demostrado que los loci de utilización del xiloglucano, con genes de glucósido hidrolasa, pertenecen a las familias GH5 y GH31 que se encuentran en *B. ovatus*. La presencia de estos genes permite el crecimiento de esta especie cuando se utiliza como única fuente de carbono. Otras especies importantes de *Bacteroides* en el intestino como *B. thetaiotaomicron*, *B. caccae* o *B. fragilis*, carecen de estos loci o parte de ellos en sus genomas, y, por tanto, son incapaces de metabolizar el xiloglucano.

El curdlano se puede utilizar para el crecimiento selectivo de especies específicas de *Bacteroides*, como *B. thetaiotaomicron* o *B. distasonis*, cuando sus genomas codifican un tipo específico de glucósido hidrolasa perteneciente a la familia GH16. Los ortólogos de este gen están ausentes en los genomas de otras especies de *Bacteroides* como *B. caccae* o *B. ovatus*, y son incapaces de crecer en curdlano (40).

El  $\beta$ -glucano o la liquenina se pueden utilizar para el crecimiento selectivo de especies específicas de *Bacteroides*, como *B. ovatus*. Esta especie codifica en su genoma un tipo específico de GH16, con actividad  $\beta$  1-3,4 glucano (41). Se ha demostrado que estos polisacáridos potencian el crecimiento de especies de Firmicutes como *Enterococcus faecium*, *Clostridium perfringens*, *Roseburia inulinivorans* y *R. faecis* (42, 43).

El galactano puede seleccionar el crecimiento de especies específicas de *Bacteroides*, tal como *B. thetaiotaomicron*, *B. dorei* y *B. ovatus*. Diferentes tipos de endogalactanasas pueden ser responsables de este crecimiento selectivo, que pertenecen a las familias GH53 y GH147 (44; 45). La capacidad de consumir galactano también se ha descrito en algunas especies de *Bifidobacterium* (*Bif. breve*, *Bif. longum*, *Bif. longum* subsp. *infantis*) (46)

El manano puede hacer crecer selectivamente especies específicas de *Bacteroides*, como *B. fragilis* o *B. ovatus*, que codifican una endo- $\beta$  1-4-manosidasa GH26 (48). Este gen está ausente en el genoma de las principales especies intestinales como *B. thetaiotaomicron*, que son incapaces de crecer en manano o glucomanano. *R. intestinalis* y *R. faecis* pueden agotar enlaces de manano (49), así como miembros del grupo XIVa de *Clostridium* (47, 43), con GH26 codificada en sus genomas. También, GH26 se ha caracterizado en especies específicas de *Bifidobacteria*, tales como *Bif. adolescentis* (50), lo que confirma la capacidad de esta especie para crecer en manano. El galactomanano sólo lo consumen los microorganismos que codifican la endo- $\beta$  1-4-manosidasa GH26 y la alfagalactosidasa GH27 en sus genomas, como *B. ovatus*, *B. xylanisolvens* (51) o *Roseburia intestinalis* (47, 49).

El xilano, el arabinano y el arabinoxilano se pueden utilizar para cultivar selectivamente especies específicas de *Bacteroides*. El xilano se puede metabolizar por *B. ovatus* y *B. uniformis*, mientras que *B. thetaiotaomicron* o *B. caccae* son incapaces de crecer en este sustrato. El arabinano favorece el crecimiento de *B. thetaiotaomicron* y *B. ovatus*, mientras que el arabinoxilano muestra una selección elevada para el crecimiento de *B. ovatus* (52, 47). Se ha demostrado que las cepas de *R. intestinalis*, *E. rectale* y *R. faecis* pueden consumir xilano o arabinoxilano como única fuente de carbono (47, 43). Determinadas bifidobacterias tienen la capacidad de fermentar xilano u oligosacáridos que contienen arabinofuranosilo. Se demostró el crecimiento selectivo de *B. adolescentis* en glucanos procedentes de xilosa y arabinoxilano *in vitro* (53). También, un experimento adicional confirmó que *B. longum* subsp. *longum* también era capaz de metabolizar arabinoxilano (54)

## II. Ejemplos

### Ejemplo 1. Materiales y métodos

**Materiales experimentales.** El acetato de sodio, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el hidróxido de sodio (NaOH), el borohidruro sódico ( $NaBH_4$ ), el sulfato de hierro(III) pentahidratado ( $Fe_2(SO_4)_3$ ) y el ácido acético glacial se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La amilopectina se obtuvo de Carbosynth (Compton, Reino Unido). La amilosa, xiloglucano, arabinoxilano, xilano, glucomanano, galactomanano, manano, curdlano, galactano,  $\beta$ -glucano, arabinano y liquenano se adquirieron de Megazyme (Bray, Irlanda). La celulosa microcristalina se adquirió de ACROS Organics. El ácido fórmico (AF) se adquirió en Fisher Scientific (Bélgica, Reino Unido). El acetonitrilo (grado HPLC) se adquirió de Honeywell (Muskegon, MI). En todos los experimentos se utilizó agua nanopura.

**Generación de oligosacáridos mediante la iniciación de Fenton hacia grupos de oligosacáridos definidos (FITDOG).** Se preparó una solución que contenía el 95 % (v/v) de tampón de acetato de sodio 40 mM ajustado a pH 5 con ácido acético glacial, 5 % (v/v) de peróxido de hidrógeno (30 % v/v) y sulfato de hierro(III) 65 nM. Esta mezcla se agitó en vórtex y se añadió a los patrones de polisacáridos secos para obtener una solución final de 1 mg/ml. La reacción se incubó a 100 °C durante una hora. La reacción se detuvo mediante la adición de la mitad del volumen de reacción de NaOH 2 M frío. Se añadió ácido acético glacial para la neutralización.

Los oligosacáridos se redujeron mediante incubación con  $NaBH_4$  1 M durante una hora a 65 °C. Los oligosacáridos se aislaron utilizando cartuchos de carbón grafitizado no poroso. Los cartuchos se lavaron con acetonitrilo al 80 % y TFA al 0,1 % (v/v) en agua. Los oligosacáridos se cargaron y lavaron con cinco volúmenes de columna de agua. Los oligosacáridos se eluyeron con acetonitrilo al 40 % con TFA al 0,05 % (v/v). Las muestras se secaron completamente mediante centrifugación evaporativa y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

**Preparación de muestras para identificación fecal.** Para separar los oligosacáridos endógenos de los polisacáridos, las muestras con pera y heces se sometieron a una precipitación con etanol al 80 % durante la noche a -80 °C. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos para precipitar la fracción de polisacáridos y separarla de los oligosacáridos endógenos en el sobrenadante. La fracción granulada se sometió al tratamiento FITDOG para generar oligosacáridos representativos. Los oligosacáridos del tratamiento FITDOG se redujeron y purificaron siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior.

**Análisis por MALDI-MS.** Para análisis por MALDI-MS, se vertió 1 µl directamente en una placa MALDI de acero inoxidable. A esto, se añadieron 0,3 µl de NaCl 0,01 M y 0,7 µl de ácido 2,5-dihidroxibenzoico 25 mg/ml y se mezclaron dentro de la punta de la pipeta. Las muestras se secaron al vacío y se analizaron en un instrumento Bruker UltraFlex extreme mediante MALDI-tiempo de vuelo en tándem (MALDI-TOF/TOF). El instrumento funcionó en modo positivo y al 95 % de la potencia máxima del láser.

**Análisis Nano-HPLC-chip/Q-TOF.** Las muestras se reconstituyeron en agua nanopura antes de analizarlas mediante nano-HPLC-chip/Q-TOF MS. El sistema incluye dos bombas, una bomba capilar para la carga de muestras y una nanobomba para la separación analítica. En este sistema, un HPLC Agilent serie 1200 está acoplado a un espectrómetro de masas Q-TOF Agilent 6520 a través de una interfaz de chip cubo. El chip contiene una columna de enriquecimiento de 40 nl y una columna analítica de 75 µm × 43 mm; ambas columnas tienen PGC como fase estacionaria. La carga de la muestra se realizó con acetonitrilo/agua al 3 % (v/v) + ácido fórmico al 0,1 % a un caudal de 4 µl/min. La separación cromatográfica se realizó con un gradiente binario de disolvente A: (acetonitrilo/agua al 3 % (v/v) + ácido fórmico al 0,1 %) y disolvente B: (acetonitrilo/agua al 90 % + ácido fórmico al 0,1 %) con un caudal de 0,4 µl/min. El gradiente se realizó durante 60 minutos, 1-5 % de B, 0-2 min; 5-30 %, 2-33 min; 30-99 %, 33-38 min; 99-99 %, 38-48 min; 99-1 %, 48-50 min; 1-1 %, 50-60 min antes de empezar la siguiente ejecución.

Los datos se recogieron en el modo positivo y se calibraron con iones calibrantes internos comprendidos entre una m/z de 118,086 y 2721,895. El gas de secado se ajustó a 325 °C y con un caudal de 5 l/min. Los voltajes de RF del fragmento, *skimmer* y Octapole 1 se ajustaron a 175, 60 y 750 V, respectivamente. La fragmentación se realizó a una velocidad de 0,63 espectros/segundo. La energía de colisión se basó en la masa del compuesto y se expresó mediante la función lineal (Energía de colisión) = 1,8\*(m/z)-2,4.

**Análisis por HPLC Q-TOF.** Las muestras se reconstituyeron en agua nanopura antes del análisis por HPLC Q-TOF MS. La separación analítica se llevó a cabo utilizando un HPLC Agilent 1260 Infinity II acoplado a un Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF MS. La separación cromatográfica se realizó en una columna Hypercarb de 150 mm × 1 mm de Thermo Scientific con un tamaño de partícula de 5 µm. Se empleó un gradiente binario que consistía en el disolvente A: (acetonitrilo/agua al 3 % (v/v) + ácido fórmico al 0,1 %) y disolvente B: (acetonitrilo/agua al 90 % + ácido fórmico al 0,1 %). Para la separación cromatográfica se utilizó un gradiente de 45 min con un caudal de 0,150 ml/min: 3-25 % de B, 0-15 min; 25-25 % de B, 15-18 min; 25-99 % de B, 18-30 min; 99-99 % de B, 30-32 min; 99-3 % de B, 32-34 min; 3-3 % de B, 34-45 min. Las muestras se ejecutaron en modo positivo. Los iones del calibrador interno variaban de m/z 121,051 a m/z 2421,914. La temperatura y el caudal del gas de secado se fijaron en 150 °C y 11 l/min, respectivamente. Los voltaje de RF de funcionamiento del fragmento, *skimmer* y Octupole 1 fueron de 175, 60 y 750 V, respectivamente. La velocidad de adquisición se fijó en 0,63 espectros/segundo. Cuando se utilizó la fragmentación, se empleó la función lineal, energía de colisión = 1,45\*(m/z)-3,5.

**Muestras fecales infantiles.** La muestra fecal se recogió de un lactante a término de 6 meses sano que completó el estudio de nutrición y desarrollo del microbioma infantil (Infant MiND, del inglés *Infant Microbiome Nutrition and Development*) de UC Davis. El lactante había recibido lactancia materna exclusiva en el momento de la inscripción. El lactante fue asignado a consumir pera (Earth's Best Fase 1) al mismo tiempo que leche materna durante siete días. Después de siete días, se indicó a los padres que rasparan el pañal sucio con utensilios estériles, colocar las muestras fecales en tubos estériles y sellar y almacenar las muestras en los congeladores de sus cocinas. Las muestras fecales se transportaron al campus de la Universidad de California Davis en hielo seco y se almacenaron a -80 °C antes de ser analizadas. La Junta de Revisión Institucional de la Universidad de California Davis aprobó todos los aspectos de este estudio y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los participantes. Este estudio se registró en clinicaltrials.gov (NCT01817127).

**Análisis de monosacáridos.** Los monosacáridos se analizaron a la manera de Amicucci *et al.*<sup>24</sup> En resumen, los oligosacáridos se hidrolizaron con ácido trifluoroacético (TFA) y se derivatizaron con 3-metil-1-fenil-pirazolina-5-ona (PMP). Los oligosacáridos derivatizados se extrajeron dos veces con cloroformo y agua y se analizaron mediante UHPLC/QqQ MS como se describe en Xu *et al.*<sup>25</sup>

**Análisis de enlaces glucosídicos.** Los enlaces glucosídicos se analizaron de la manera de Galermo *et al.*<sup>26</sup> En resumen, los oligosacáridos se permetilaron primero con yodometano en presencia de hidróxido de sodio y dimetilsulfóxido. Los oligosacáridos permetilados se extrajeron con agua y DCM para eliminar el dimetilsulfóxido. A continuación, los oligosacáridos se hidrolizaron con TFA y se derivatizaron con PMP. Los monosacáridos parcialmente permetilados se analizaron a continuación mediante UHPLC-QqQ MS en las mismas condiciones descritas por Galermo *et al.*<sup>26</sup>

## Ejemplo 2. Producción de oligosacáridos mediante FITDOG

Se utilizó un polisacárido de estructura conocida, el xiloglucano, para determinar las características del método. El xiloglucano estaba comprendido por una cadena principal β(1→4) con frecuentes ramificaciones β(1→6) de xilosa que a menudo terminaban con un único resto β(1→2) de galactosa.<sup>13,30-32</sup> La reacción del xiloglucano produjo más de 20 oligosacáridos estructuralmente únicos según se determinó mediante nano-HPLC-chip/Q-TOF MS. Los oligosacáridos

más abundantes se muestran en la **figura 1A**.

El perfil de nanoLC-MS de los oligosacáridos de xiloglucano varían desde disacáridos hasta hexasacáridos. Para obtener el cromatograma, la mezcla del producto se redujo primero utilizando borohidruro sódico para obtener un alditol si estaba presente un azúcar reductor. La mezcla se enriqueció y purificó como se describe en la sección de métodos. El análisis de masas preciso y la MS en tándem de los productos indicaron que la reacción producía principalmente especies de oligosacáridos inalterados. Los espectros de masas de fragmentación obtenidos mediante CID se interpretaron y dieron lugar a las estructuras insertas en la **figura 1A**. En los cromatogramas estaba presente una combinación de oligosacáridos con varios grados de polimerización (GP). El número relativamente pequeño de oligosacáridos indica cierto grado de especificidad en la reacción FITDOG.

Mientras que el GP puede obtenerse a partir de las masas exactas, la información estructural requiere MS en tándem. Los isómeros que tienen el mismo GP, pero estructuras diferentes, también estuvieron presentes en varios GP y se dilucidaron del siguiente modo. Cuatro isómeros con la composición, tres hexosas, dos pentosas (*m/z* 771,27) se observaron a los 16,0, 18,9, 21,0 y 31,2 minutos, respectivamente (**Figura 1B**). Estos isómeros se distinguieron por sus espectros MS/MS (**Figura 1C**). Se determinó que los compuestos que eluían a los 16,0 (*I*) y 18,9 (*II*) minutos contenían una cadena principal 2Hex, debido a la ausencia de un pico que representa tres hexosas con un monosacárido reductor (*m/z* 507,19), así como a la presencia de un pico que representa dos hexosas sin un monosacárido reductor (*m/z* 325,11). Ambos isómeros contenían el pico que representa dos hexosas, dos pentosas y un extremo reductor (*m/z* 609,22), pero no estaba presente ningún pico que representara dos pentosas sin un extremo reductor (*m/z* 265,09). Esto sugiere que hay una pentosa ramificada a partir de cada hexosa. Debido a que la cadena principal contenía sólo dos hexosas, la hexosa restante debe haberse extendido desde una de las pentosas. El isómero (*I*) mostró un pico que representaba dos hexosas, una pentosa, sin extremo reductor (*m/z* 457,15), que localizó la hexosa restante en la pentosa que no está situada en la hexosa del extremo reductor. El isómero (*II*) carece del fragmento con *m/z* 457,15, que localizó la hexosa restante en la pentosa conectada a la hexosa del extremo reductor. Los dos isómeros finales a los 21,0 (*III*) y 31,2 (*IV*) minutos mostraron ambos un fuerte pico correspondiente a tres hexosas con un extremo reductor (*m/z* 507,19), lo que sugería que las tres hexosas componen la cadena principal del oligosacárido. Ambos isómeros mostraron también un pico abundante que representaba una hexosa, una pentosa y un extremo reductor (*m/z* 315,13), lo que evidenció la ramificación de una pentosa desde el extremo reductor. Por último, la pentosa restante debe estar ramificada desde una de las dos hexosas del extremo no reductor. El isómero (*III*) mostró un pico que correspondía a dos hexosas, dos pentosas y un extremo reductor (*m/z* 609,22), lo que sugería que la segunda pentosa estaba localizada en la hexosa adyacente a la hexosa del extremo reductor. El isómero (*IV*) carecía del fragmento *m/z* 609,22 y, por tanto, la segunda pentosa se asignó a la hexosa más alejada del extremo reductor. Este riguroso enfoque se empleó para caracterizar todos los oligosacáridos mostrados en este informe. De acuerdo con la estructura conocida del xiloglucano, se observó que los oligosacáridos derivados estaban compuestos principalmente por cadenas principales de hexosa con frecuentes ramificaciones pentosas que, en ocasiones, terminaban en una hexosa.

Otros patrones de polisacáridos también se sometieron a FITDOG y todos dieron oligosacáridos representativos (**Figuras 2A a 2N**). Los patrones de polisacáridos estaban compuestos por muchas combinaciones de monosacáridos, tipos de enlace y patrones de ramificación. Algunos contenían modificaciones de monosacáridos. Los patrones incluían amilosa, amilopectina, celulosa, curdlano, liquenano,  $\beta$ -glucano, arabinano, xilano, arabinoxilano, manano, galactomanano, glucomanano, galactano y xiloglucano. Los cromatogramas anotados para cada polisacárido tras el tratamiento con FITDOG se muestran en las **figuras 2A a 2N**. Los picos prominentes se marcaron con el GP y una abreviatura de sus componentes monosacáridos (Hexosa/Hex, Pentosa/Pent, Ácido hexurónico/HexA).

Entre el grupo más simple de polisacáridos se encontraban los homopolisacáridos, que se componen de un único monosacárido y un enlace glucosídico. Se espera que los oligosacáridos resultantes de estos polisacáridos tengan una estructura por GP. Por ejemplo, el curdlano, un polímero de glucosa lineal unido por  $\beta(1\rightarrow3)$  produjo oligosacáridos con composiciones correspondientes a 3Hex (TR 12,56 min), 4Hex (19,28 min) y 5Hex (26,44 min) (**Figura 2A**). Otros homopolisacáridos, tales como la celulosa y la amilosa produjeron también un oligómero por GP indicativo de su composición uniforme de monosacáridos y enlaces (**Figuras 2B y 2C**). Se observaron tendencias similares en galactano, un polisacárido de galactosa unido por  $\beta(1\rightarrow4)$ , y manano, un polisacárido de manosa unido por  $\beta(1\rightarrow4)$ . Sin embargo, se observaron algunas impurezas inherentes como resultado de las etapas de procesamiento para el aislamiento de polisacáridos por el fabricante (**Figuras 2D y 2E**).

Los heteropolisacáridos lineales contienen más de un monosacárido o enlace glucosídico. La heterogeneidad estructural contribuyó a la producción de varios isómeros de oligosacáridos para cada GP. Entre el grupo, tanto el  $\beta$ -glucano como el liquenano tenían una estructura similar y comprendían restos de glucosa unido por  $\beta(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$ , pero en proporciones diferentes. De hecho, el análisis LC-MS produjo varios isómeros asociados a cada GP. Por tanto, se observó que la composición correspondiente a 6Hex generaba ocho isómeros a partir de liquenano y cuatro isómeros a partir de  $\beta$ -glucano (**Figuras 2F y 2G**). Además, las similitudes estructurales en la composición de monosacáridos y enlaces entre el liquenano y el  $\beta$ -glucano dieron lugar a muchos oligosacáridos similares a partir de ambos polisacáridos. Por ejemplo, la 3Hex (13,73 min), 4Hex (19,46, 19,70, 20,41 min), 5Hex (24,92, 25,79 min) y 6Hex (30,90 min) son estructuras potencialmente similares compartidas entre el liquenano y el  $\beta$ -glucano (**Figuras 2F y 2G**). Asimismo, el glucomanano, otro heteropolímero lineal que contiene restos de glucosa y manosa unidos por

$\beta(1\rightarrow4)$ , produjo varios isómeros para cada GP (**Figura 2H**).

Los heteropolisacáridos ramificados contenían una capa adicional de complejidad originada por la frecuencia de ramificación y/o variaciones en los enlaces glucosídicos y los constituyentes monosacáridos. Como era de esperar, las variaciones en las posiciones y la frecuencia de las ramificaciones produjeron muchos isómeros para cada GP. Por ejemplo, el galactomanano contenía una cadena principal de manosa unida por  $\beta(1\rightarrow4)$  con ramas terminales de galactosa que producían tres isómeros 3Hex. En las secciones de la cadena principal del polisacárido en las que faltaba la ramificación de galactosa, la disposición de los monosacáridos se parecía a la del manano. Mediante la comparación de los oligosacáridos generados a partir de polisacáridos estructuralmente similares, se dedujo información adicional sobre sus estructuras de oligosacáridos. Por lo tanto, los tres isómeros de 3Hex podrían producirse desde la cadena principal de manosa o desde la cadena principal de manosa con ramificaciones de galactosa. Se determinó que la 3Hex que eluyó a 1,51 min estaba comprendida por tres restos de manosa unidos por  $\beta(1\rightarrow4)$  porque se produjo desde ambas fuentes (**Figura 2I**). Por deducción, se concluyó que los oligosacáridos 3Hex que eluyen a 1,78 min y 2,55 min procedían de dos constituyentes de manosa unidos por  $\beta(1\rightarrow4)$  con una rama de galactosa (**Figura 2J**). Otros heteropolisacáridos ramificados, tales como el arabinano, xilano, arabinoxilano y xiloglucano, se disociaron con éxito y generaron de forma similar varios isómeros por GP (**Figuras 2J a 2M**). La despolimerización de dichas estructuras diversas demuestra además la reactividad del método frente a polisacáridos que contienen pentosas. De manera inesperada, la amilopectina, otro heteropolisacárido ramificado que contiene una cadena principal de glucosa unida por  $\alpha(1\rightarrow4)$  con ramas de glucosa  $\alpha(1\rightarrow4,6)$  bisectadas produjo sólo una estructura por GP, lo que puede deberse a la elevada labilidad oxidativa que se ha señalado para los enlaces  $(1\rightarrow6)$  (**Figura 2N**).<sup>33</sup>

También se examinaron los polisacáridos que contenían restos de monosacáridos modificados. El xilano era un polisacárido de xilosa unido por  $\beta(1\rightarrow4)$  con restos terminales de ácido 4-O-metil-glucurónico (GlcAOMe). En condiciones de FITDOG, se generaron varios oligosacáridos con composiciones únicas que incluían isómeros 3Pent:1GlcAOMe (13,06, 14,00, 14,27 y 16,47 min), isómero 4Pent:1GlcAOMe (17,68, 18,87 y 19,55 min), isómeros 5Pent:1GlcAOMe (20,93, 22,82, 23,13 y 23,46 min), isómeros 6Pent:1GlcAOMe (24,51, 26,88 y 27,34 min) e isómeros 7Pent:1GlcAOMe (27,61 y 29,69 min). La presencia de estos oligosacáridos indicaba que la O-metilación en el ácido glucurónico terminal se conservaba tras el tratamiento con FITDOG (**Figura 2J**).

### Ejemplo 3. Identificación de polisacáridos mediante identificación de oligosacáridos

Con las composiciones de oligosacáridos únicas para cada polisacárido, se examinó si los oligosacáridos podían utilizarse como marcadores de diagnóstico para la identificación de polisacáridos en mezclas complicadas, tales como las que se encuentran en los alimentos comunes. Los productos oligosacáridos se utilizaron como identificadores únicos de los respectivos polisacáridos parentales. A partir de los patrones de polisacáridos se creó una biblioteca de referencia de oligosacáridos con cerca de 400 oligosacáridos únicos. Se ejecutó un grupo que contenía todos los oligosacáridos junto con muestras desconocidas para la alineación del tiempo de retención (**Figura 3A**).

Se seleccionaron el salvado de trigo y de avena para validar el método de identificación de oligosacáridos, ya que era conocido que contenían cantidades grandes de polisacáridos no amiláceos, incluidos arabinoxilanos<sup>34</sup>,  $\beta$ -glucanos de enlace mixto<sup>35</sup> y celulosa<sup>36</sup>. El salvado de avena y de trigo produjeron cada uno más de 50 oligosacáridos distintos con una gran fracción que coincidía con las entradas de la biblioteca de referencia (**Figuras 3B y 3C**).

Para determinar la composición en polisacáridos de los dos salvados, se utilizó un enfoque análogo al de la identificación peptídica para la identificación de proteínas. La principal advertencia es que las proteínas se componen de una longitud determinada de polipéptidos, mientras que los polisacáridos se componen de una distribución de longitudes de sacáridos. En este enfoque, se utilizó el número de oligosacáridos producidos en los patrones individuales para determinar la fracción de los productos polisacáridos que se observan en la mezcla. El número de oligosacáridos producidos varió en cada polisacárido convencional. Para la celulosa, sólo se observaron cuatro oligosacáridos en la ventana cromatográfica, mientras que para la amilopectina se observaron más de 20 oligosacáridos, y para el arabinoxilano más de 40 oligosacáridos. Se propuso que el número de picos de oligosacáridos encontrados en la mezcla se puede representar como una fracción de los encontrados en el patrón puro y utilizarse como "porcentaje de cobertura". Se espera que la cobertura sea mayor si el recuento de oligosacáridos en la muestra se aproxima al número de oligosacáridos producidos en el patrón.

Según el análisis, se observó que el salvado de trigo contenía amilosa/amilopectina (20 picos, cobertura del 100 %), celulosa (3 picos, 75 %),  $\beta$ -glucano (11 picos, 34 %) y liquenano (9 picos, 24 %). El salvado de avena estaba compuesto de amilosa/amilopectina (20 picos, 100 % de cobertura), celulosa (3 picos, 75 %),  $\beta$ -glucano (12 picos, 38 %) y liquenano (9 picos, 24 %). El salvado de avena también contenía arabinoxilano (5 picos, 20 %) y xilano (7 picos, 32 %). Curiosamente, el salvado de avena contenía oligómeros de pentosa no emparejados (3 picos) y oligómeros mixtos que contenían hexosas y pentosas (7 picos), lo que sugiere la presencia de un polisacárido aún no identificado. No obstante, los resultados coincidieron con la composición general esperada de polisacáridos de los salvados.<sup>34-36</sup>

### Ejemplo 4. Producción de oligosacáridos similares al xiloglucano

El polisacárido xiloglucano se extrajo del tamarindo y se sometió al proceso FITDOG para producir oligosacáridos que se asemejan a su estructura.<sup>27</sup> Se sabe que el xiloglucano del tamarindo comprende una cadena principal de glucosa  $\beta$ 1,4 con frecuentes ramificaciones de una sola unidad de xilosa  $\alpha$ 1,6 que ocasionalmente puede estar unida además a una única caperuza terminal de galactosa unida por  $\beta$ 1,2. El xiloglucano de otras fuentes puede contener un único resto de fucosa unido por  $\alpha$ 1,2 a la galactosa. En otras fuentes de xiloglucano, la arabinosa puede estar unida por  $\alpha$ 1,2 al resto de xilosa. Por tanto, los oligosacáridos parecidos al xiloglucano son los que se pueden describir por cadenas de 3 a 30 monosacáridos con una estructura fundamental que contiene una glucosa unida por  $\beta$ 1,4 y entre 1 y n restos de xilosa ramificados, donde n es el número de glucosas en el oligosacárido. La xilosa se puede unir a cualquier glucosa mediante un enlace  $\alpha$ 1,6. La xilosa puede, pero no se requiere que sea así, unirse además a un resto de galactosa principalmente a través de un enlace  $\beta$ 1,2. Además, la xilosa puede, pero no se requiere que sea así, unirse además a un resto de arabinosa principalmente a través de un enlace  $\alpha$ 1,2. La galactosa puede, pero no se requiere que sea así, unirse además a un resto de fucosa principalmente a través de un enlace  $\alpha$ 1,2. Un ejemplo de estructura de xiloglucano se muestra en la **figura 4**.

El proceso FITDOG creó más de 45 oligosacáridos que no existen de forma natural. Los oligosacáridos observados mediante HPLC/Q-TOF MS se resumen en la **tabla 4**. Los oligosacáridos observados variaban de un grado de polimerización (GP) de 3 a 9 y contenían combinaciones de hexosas, que pueden proceder de la glucosa o la galactosa, y pentosas, que proceden de la xilosa. En la tabla 4, cada subunidad marcada como "Hex" se selecciona independientemente de Glu unida por  $\beta$ 1 no sustituida, Glu unida por  $\beta$ 1 6 sustituido (por ejemplo, (Xyl $\alpha$ 1-6)Glu), y Gal unida por  $\beta$ 1 no sustituida. Cada Glu unida por  $\beta$ 1 no sustituida o Glu unida por  $\beta$ 1 6 sustituida está unida a la posición 4 de una Glu o Glu 6 sustituida vecina, y cada Gal está ligada a la posición 2 de una Xyl vecina. En la tabla 4, cada subunidad marcada como "Pent" se selecciona independientemente de Xyl unida por  $\alpha$  no sustituida y Xyl unida por  $\alpha$  2 sustituida (por ejemplo (Gal $\beta$ 1-2)Xyl).

**Tabla 4.**

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición
1	477,18	474,16	6,88	2Hex:1Pent	24	933,33	930,31	19,61	4Hex:2Pent
2	477,18	474,16	7,68	2Hex:1Pent	25	933,33	930,31	22,84	4Hex:2Pent
3	477,18	474,16	10,94	2Hex:1Pent	26	933,33	930,31	24,50	4Hex:2Pent
4	579,21	576,19	12,47	3Pent1Hex	27	933,33	930,31	25,19	4Hex:2Pent
5	609,22	606,20	13,71	2Hex:2Pent	28	933,33	930,31	27,07	4Hex:2Pent
6	639,23	636,21	12,21	3Hex:1Pent	29	1065,36	1062,35	18,18	4Hex:3Pent
7	639,23	636,21	13,03	3Hex:1Pent	30	1065,36	1062,35	20,70	4Hex:3Pent
8	639,23	636,21	15,72	3Hex:1Pent	31	1065,36	1062,35	20,95	4Hex:3Pent
9	639,23	636,21	16,66	3Hex:1Pent	32	1065,36	1062,35	26,27	4Hex:3Pent
10	639,23	636,21	17,32	3Hex:1Pent	33	1065,36	1062,35	27,35	4Hex:3Pent
11	771,28	768,25	14,92	3Hex:2Pent	34	1095,38	1092,36	18,98	5Hex:2Pent
12	771,27	768,25	15,15	3Hex:2Pent	35	1095,38	1092,36	19,94	5Hex:2Pent
13	771,27	768,25	18,13	3Hex:2Pent	36	1095,38	1092,36	23,14	5Hex:2Pent
14	771,27	768,25	18,65	3Hex:2Pent	37	1095,38	1092,36	23,74	5Hex:2Pent
15	801,29	798,26	16,84	4Hex:1Pent	38	1095,38	1092,36	24,78	5Hex:2Pent
16	801,29	798,26	17,94	4Hex:1Pent	39	1095,38	1092,36	25,44	5Hex:2Pent
17	801,29	798,26	21,76	4Hex:1Pent	40	1227,43	1224,40	21,27	5Hex:3Pent
18	801,29	798,26	22,86	4Hex:1Pent	41	1227,43	1224,40	24,96	5Hex:3Pent
19	801,29	798,26	23,17	4Hex:1Pent	42	1227,43	1224,40	25,81	5Hex:3Pent
20	903,32	900,30	20,34	3Hex:3Pent	43	1257,44	1254,41	22,74	6Hex:2Pent
21	933,33	930,31	16,00	4Hex:2Pent	44	1389,47	1386,45	26,47	6Hex:3Pent
22	933,33	930,31	18,78	4Hex:2Pent	45	1389,47	1386,45	26,73	6Hex:3Pent
23	933,33	930,31	19,20	4Hex:2Pent	46	1389,47	1386,45	27,33	6Hex:3Pent

La fragmentación de oligosacáridos se utilizó para elucidar la estructura secundaria del oligosacárido. La reducción con borohidruro sódico se utilizó para reducir el aldehído a un alditol, que se puede observar como un aumento de m/z 2,014 en el espectro de fragmentación. Esta masa adicional permitió identificar claramente el resto reductor del extremo y proporcionó adicionalmente pruebas para determinar las disposiciones regiospecíficas de los monosacáridos.

Un cromatograma HPLC-MS de los picos descritos en la **tabla 4** se muestra en la **figura 5**. La mezcla de oligosacáridos se analizó para determinar sus atributos generales, incluido el análisis de monosacáridos y enlaces glucosídicos. El análisis de monosacáridos confirmó que el proceso FITDOG no modificó drásticamente la composición de monosacáridos del polisacárido durante el procesado. El análisis de monosacáridos mostró que la glucosa, la

galactosa y la xilosa eran los tres elementos básicos principales de los oligosacáridos parecidos al xiloglucano. El análisis de los enlaces glucosídicos del grupo confirmó además que el proceso FITDOG no alteró mucho la composición. Como era de esperar, la glucosa terminal, la glucosa unida por 4 enlaces, la glucosa ramificada en 4,6, la xilosa terminal, la xilosa unida por 2 enlaces y la galactosa terminal eran los principales enlaces glucosídicos. Los análisis de monosacáridos y enlaces glucosídicos observados se utilizó junto con las anotaciones MS/MS para deducir la estructura absoluta de los oligosacáridos.

En la **figura 6A** se muestra el espectro de masas anotado de un oligosacárido más pequeño con un GP de tres. Este oligosacárido se correspondía con el oligosacárido n.º 3 de la **tabla 4**. El fragmento m/z 345,14 confirmó que había dos hexosas en la cadena principal de los oligosacáridos. Esta se caracterizó también por ser una cadena principal de glucosa  $\beta$ 1,4 porque la glucosa de 4 enlaces fue la única hexosa unida que se encontró a partir del análisis de enlaces glucosídicos. Además, el fragmento m/z 315,13 mostró que una fracción de pentosa estaba unida a la glucosa del extremo reductor. La xilosa fue la pentosa primaria en el análisis de monosacáridos y se conoce por estar unida directamente la cadena principal de glucosa a través de un enlace glucosídico  $\beta$ 1,6 en el xiloglucano.

El espectro de masas en tándem anotado que se muestra en la **figura 6B** corresponde al oligosacárido n.º 12 de la **tabla 4**, que tiene un GP de cinco. De nuevo, el fragmento m/z 345,14 mostró una cadena principal de dos hexosas correspondientes a dos restos de glucosa unidos por  $\beta$ 1,4, donde la m/z 315,13 correspondía a una xilosa en la glucosa del extremo reductor. El fragmento m/z 609,22 correspondía a xilosas unidas a dos glucosas. La ausencia de un pico a m/z 265,08 indica que las dos pentosas no están unidas entre sí y deben estar situadas con una pentosa en cada hexosa. Además, un pico con una m/z 507,17, que corresponde a tres hexosas, no se observó. Esto demuestra que las tres hexosas no están unidas entre sí, y que una debe estar unida a uno de los restos de pentosa. Por último, se descubrió que la regioloalización de esta hexosa estaba situada en el resto de xilosa que se extiende desde el resto de hexosa no reductora por el fragmento m/z 457,15, que corresponde a una pentosa, y dos hexosas sin extremo reductor. Se determinó que la hexosa que recubre la xilosa era una galactosa, basándose en la galactosa terminal observada en el análisis del enlace glucosídico. De nuevo, esta estructura de oligosacárido se confirmó mediante la comparación con la estructura conocida del xiloglucano, donde la xilosa puede estar unida por enlaces  $\alpha$ 1,6 a restos terminales de galactosa.

El espectro de fragmentación anotado en la **figura 6C** corresponde al oligosacárido n.º 20 de la **tabla 4**, que es un oligosacárido de GP seis muy ramificado. Varios fragmentos clave ayudaron a dilucidar este oligosacárido. Por ejemplo, los fragmentos con m/z 295,10 y m/z 315,13 corresponden a una hexosa de extremo no reductor unida a una pentosa y a una hexosa de extremo reductor unida a una pentosa, respectivamente. La ausencia de picos a m/z 265,08 y m/z 397,12, que corresponden a dos pentosas y tres pentosas, respectivamente, indica que ninguna de las pentosas está unida entre sí y que todas deben estar unidas exclusivamente a restos de hexosas.

Además, el pico m/z 589,20 corresponde a dos pentosas y dos hexosas no reductoras, mientras que m/z 609,32 corresponde a dos hexosas con un extremo reductor y dos pentosas. Estos dos picos juntos sugieren que hay una cadena principal de tres hexosas con cada hexosa conteniendo una rama de pentosa. Con conocimiento de la composición de monosacáridos y enlaces glucosídicos, se puede concluir que este pico corresponde a un oligosacárido con tres restos de glucosa unidos por  $\beta$ 1,4, cada uno con su propio resto de xilosa ramificada por  $\beta$ 1,6.

El espectro de fragmentación anotado en la **figura 6D** corresponde al oligosacárido n.º 42 de la **tabla 4**, que está muy ramificado y tiene un GP de ocho. La cadena principal de este oligosacárido se puede deducir del pico a m/z 831,29, que representa una cadena principal con cinco hexosas y un extremo reductor. Este oligosacárido carece de un pico a m/z 315,13, que corresponde a una hexosa de extremo reductor con una pentosa. Esto significa que el oligosacárido carece de una ramificación de pentosa a partir de la hexosa del extremo reductor. El pico m/z 883,29, que representa tres hexosas en el extremo no reductor y tres pentosas, y corrobora además la ausencia de una pentosa en el extremo reductor. Además, m/z 883,29 sugiere que las tres pentosas están unidas a restos de hexosas adyacentes. Por último, la regioloalización de la pentosa puede limitarse a la 2.<sup>a</sup>, 3.<sup>a</sup> y 4.<sup>a</sup> hexosas desde el extremo reductor por la presencia del pico m/z 477,21, que corresponde a dos hexosas con un extremo reductor y una pentosa. El pico m/z 477,21 se puede deducir que representa una cadena principal de dos hexosas con la pentosa unida a la hexosa no reductora debido a la evidencia anteriormente explicada de que las pentosas no están unidas al extremo reductor. Por lo tanto, se determinó que este oligosacárido contenía cinco glucosas unidas por  $\beta$ 1,4, con las tres glucosas centrales conteniendo restos de xilosa ramificada en  $\beta$ 1,6.

A continuación se muestran las identidades de los compuestos correspondientes a los picos de la tabla 4. Los picos se agrupan cuando un oligosacárido individual no puede asociarse a un pico específico, pero donde grupos de oligosacáridos que tienen la misma masa podrían estar ligados a grupos de picos.

1	((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
2	(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu
3	Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu

(continuación)

5	(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
6	Glu $\beta$ 1-4((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
7	((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu
8	Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
9	(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4Glu
10	Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu
-11	(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
12	((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
13	(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
14	Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
15	(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu
16	Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
17	Glu $\beta$ 1-4((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu
18	((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4Glu
19	Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
20	Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4Glu
21	Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu
22	(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4Glu
23	(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
24	((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu
25, 26, 27, 28, 29 y 30	Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu, Glu $\beta$ 1-4((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu, (Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu, ((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu, ((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu o (Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4((Gal $\beta$ 1-2)Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu
31, 32, 33, 34 y 35	Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu, Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu, (Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu, Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu o (Xyl $\alpha$ 1-6)Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4Glu $\beta$ 1-4(Xyl $\alpha$ 1-6)Glu

**Ejemplo 5. Producción y caracterización de oligosacáridos a partir de polisacáridos homopolímeros y heteropolímeros**

5 La composición de monosacáridos de los polisacáridos antes de la despolimerización FITDOG se muestra a continuación en la tabla 5-1. La notación "--" representa un monosacárido que existe en una cantidad inferior al 2 % del peso total del polímero.

10 Tabla 5-1.

	Glucosa	Galactosa	Manosa	Arabinosa	Xilosa	Ramnosa	Gal A	Fructosa	Otros
Galactano	--	88,2	--	2,95	--	2,20	2,83	--	3,80
Liquenano	80,16	10,58	5,53	--	--	--	--	--	3,72
$\beta$ -glucano	95,97	--	--	--	--	--	--	2,80	1,24
Glucomanano	34,6	--	60,9	--	--	--	--	2,37	2,11
Galactomanano	23,3	--	73,2	--	--	--	--	--	3,52
Arabinano	13,3	--	--	81,6	--	--	--	--	5,15
Xilano	--	--	--	--	94,2	--	--	--	5,77
Arabinoxilano	--	--	--	36,3	59,7	--	--	--	3,97

La composición de enlaces glucosídicos de los polisacáridos antes de la despolimerización FITDOG se muestra a

continuación en la tabla 5-2. La notación "--" representa un monosacárido que existe en una cantidad inferior al 2 % del peso total del polímero.

Tabla 5-2.

	4-Gal	T-Gal	4-Man	T-Man	3-Glu	4-Glu	T-Glu	4,6-Man
<b>Galactano</b>	58,84	30,53	--	--	--	--	--	--
<b>Liquenano</b>	--	26,25	--	--	24,51	26,61	2,46	--
<b><math>\beta</math>-glucano</b>	--	--	3,19	--	31,24	56,80	3,84	--
<b>Glucomanano</b>	--	--	80,46	3,06	--	13,66	--	--
<b>Galactomanano</b>	--	17,17	72,18	--	--	--	--	4,53
<b>Arabinano</b>	7,79	12,28	--	--	--	--	--	--
<b>Xilano</b>	--	2,43	--	--	--	--	--	--
<b>Arabinoxilano</b>	--	--	--	--	--	--	--	--
	4-P-Xyl	3,4-P-Xyl	T-P-Xyl	2-F-Ara	3-P-Ara	T-F-Ara	Otros	
<b>Galactano</b>	--	--	--	--	--	--	10,63	
<b>Liquenano</b>	--	--	--	--	--	3,80	16,37	
<b><math>\beta</math>-glucano</b>	--	--	--	--	--	--	4,93	
<b>Glucomanano</b>	--	--	--	--	--	--	2,82	
<b>Galactomanano</b>	--	--	--	--	--	--	6,11	
<b>Arabinano</b>	27,84	18,60	--	--	2,70	25,18	5,61	
<b>Xilano</b>	80,06	--	6,55	3,03	--	--	7,92	
<b>Arabinoxilano</b>	34,59	11,73	--	2,43	2,55	43,05	5,65	

5 **Curdano.** Debido a que la estructura del curdano es un homopolisacárido, lo que significa que tanto el enlace como los monómeros concuerdan y no varían, sólo se espera un isómero para cada grado de polimerización (GP). De hecho, se produjeron al menos cuatro oligosacáridos sin ningún isómero, como se muestra en la **tabla 5-3**. Probablemente, se produjeron oligosacáridos con mayores grados de polimerización; sin embargo, no estaban dentro del intervalo cromatográfico.

Tabla 5-3.

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	Compuesto
1	507,19	504,17	12,57	3Hex	Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-3Glc
2	669,25	666,22	19,28	4Hex	Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-3Glc
3	831,30	828,27	26,44	5Hex	Glc $\beta$ 1-3[Glc $\beta$ 1-3] <sub>3</sub> Glc
4	993,35	990,33	40,09	6Hex	Glc $\beta$ 1-3[Glc $\beta$ 1-3] <sub>3</sub> Glc

15 **Galactano.** Debido a que el galactano es un homopolisacárido, sólo se espera un isómero para cada grado de polimerización (GP). De hecho, se produjeron al menos siete oligosacáridos sin ningún isómero (**Tabla 5-4**). Probablemente, se produjeron oligosacáridos con mayores grados de polimerización; sin embargo, no estaban dentro del intervalo cromatográfico.

Tabla 5-4

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	Compuesto
1	507,19	504,17	2,34	3Hex	Gal $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Gal
2	669,25	666,22	7,50	4Hex	Gal $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Gal
3	831,30	828,27	11,19	5Hex	Gal $\beta$ 1-4[Gal $\beta$ 1-4] <sub>3</sub> Gal
4	993,35	990,33	12,40	6Hex	Gal $\beta$ 1-4[Gal $\beta$ 1-4] <sub>4</sub> Gal
5	1155,40	1152,38	13,10	7Hex	Gal $\beta$ 1-4[Gal $\beta$ 1-4] <sub>5</sub> Gal
6	1317,46	1314,43	13,68	8Hex	Gal $\beta$ 1-4[Gal $\beta$ 1-4] <sub>6</sub> Gal
7	1479,51	1476,49	14,62	9Hex	Gal $\beta$ 1-4[Gal $\beta$ 1-4] <sub>7</sub> Gal

20 **Manano.** Debido a que la estructura del manano es un homopolisacárido, lo que significa que tanto el enlace como

los monómeros concuerdan y no varían, sólo se espera un isómero para cada grado de polimerización (GP). De hecho, se produjeron al menos siete oligosacáridos sin ningún isómero (Tabla 5-5). Probablemente, se produjeron oligosacáridos con mayores grados de polimerización; sin embargo, no estaban dentro del intervalo cromatográfico.

5 Tabla 5-5.

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	
1	507,19	504,17	1,51	3Hex	Manβ1-4Manβ1-4Man
2	669,25	666,22	3,51	4Hex	Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Man
3	831,30	828,27	9,15	5Hex	Manβ1-4[Manβ1-4] <sub>3</sub> Man
4	993,35	990,33	11,93	6Hex	Manβ1-4[Manβ1-4] <sub>4</sub> Man
5	1155,40	1152,38	13,10	7Hex	Manβ1-4[Manβ1-4] <sub>5</sub> Man
6	1317,46	1314,43	14,06	8Hex	Manβ1-4[Manβ1-4] <sub>6</sub> Man
7	1479,51	1476,49	14,75	9Hex	Manβ1-4[Manβ1-4] <sub>7</sub> Man

10 **β-glucano de cereales.** El proceso FITDOG produjo oligosacáridos que concuerdan con la estructura polisacárida de los β-glucanos como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un trisacárido puede tener tres combinaciones estructurales posibles: Glcβ1-4Glcβ1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc, Glcβ1-3Glcβ1-4Glc. De hecho, se observaron tres isómeros correspondientes a la masa de tres hexosas. Además, el isómero en el tiempo de retención (TR) 13,73 minutos correspondía con el mismo TR que una estructura que también se encuentra en la celulosa, que puede identificarse como Glcβ1-4Glcβ1-4Glc. Por lo tanto, los picos al TR 11,38 y 15,17 minutos se asignaron a las estructuras que contienen enlaces β1-3 simples entre la primera y la segunda glucosas o entre la segunda y la tercera glucosas. Se obtuvo mayor confianza en la asignaciones debido a la ausencia de un cuarto isómero trisacárido, que no se espera que esté en el β-glucano, y que correspondería con Glcβ1-3Glcβ1-3Glc, que se observó a un TR de 12,57 minutos en el curdlano. Se utilizó una lógica similar para confirmar la creación de al menos 22 oligosacáridos observados a partir de la degradación FITDOG del β-glucano de cereales (Tabla 5-6). Se enumeran varios compuestos para los picos que no han podido asociarse definitivamente a un único oligosacárido, sino, más bien, a grupos de oligosacáridos que tienen la misma masa.

20 En la tabla 5-6, cada subunidad marcada como "Hex" se selecciona independientemente de Glu unida por β1 no sustituida que está unida a la posición 3 o a la posición 4 de una Glu vecina no sustituida.

Tabla 5-6

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	Compuesto
1	507,19	504,17	11,38	3Hex	Glcβ1-4Glcβ1-3Glc o Glcβ1-3Glcβ1-4Glc
2	507,19	504,17	13,73	3Hex	
3	507,19	504,17	15,17	3Hex	Glcβ1-4Glcβ1-3Glc o Glcβ1-3Glcβ1-4Glc
4	669,25	666,22	17,46	4Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc-4Glc o Glcβ1-4Glcβ1-4Glc-3Glc
5	669,25	666,22	19,46	4Hex	
6	669,25	666,22	19,70	4Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc-4Glc o Glcβ1-4Glcβ1-4Glc-3Glc
7	669,25	666,22	20,41	4Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc-4Glc o Glcβ1-4Glcβ1-4Glc-3Glc
8	831,30	828,27	22,69	5Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc-4Glc-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc-4Glc-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc-3Glc-4Glc o Glcβ1-4Glcβ1-4Glc-4Glc-3Glc
9	831,30	828,27	23,52	5Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc-4Glc-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc-4Glc-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc-3Glc-4Glc o Glcβ1-4Glcβ1-4Glc-4Glc-3Glc
10	831,30	828,27	24,92	5Hex	

25

(continuación)

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	Compuesto
11	831,30	828,27	25,79	5Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-3Glc1-4Glc, o Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-3Glc
12	831,30	828,27	26,70	5Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-3Glc1-4Glc o Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-3Glc
13	993,35	990,33	13,35	6Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-3Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-3Glc1-4Glc, Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc
14	993,35	990,33	22,79	6Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-3Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-3Glc1-4Glc, Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc
15	993,35	990,33	25,10	6Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-3Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-3Glc1-4Glc, Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc
16	993,35	990,33	28,87	6Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-3Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-3Glc1-4Glc, Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc
17	993,35	990,33	30,90	6Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-3Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-3Glc1-4Glc, Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc
18	993,35	990,33	39,26	6Hex	
19	993,35	990,33	41,49	6Hex	Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-3Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-3Glc1-4Glc1-4Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-3Glc1-4Glc, Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc, Glcβ1-4Glcβ1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc
20	1155,40	1152,38	26,05	7Hex	
21	1155,40	1152,38	27,23	7Hex	
22	1155,40	1152,38	27,47	7Hex	
23	1155,40	1152,38	28,61	7Hex	

**Liquenano.** Estas diferencias estructurales entre el homopolímero liquenano y el homopolímero β-glucano, como se ha descrito anteriormente, se reflejaron en el número de isómeros observados en los productos oligosacáridos obtenidos a partir de liquenano. Por ejemplo, la despolimerización del β-glucano no puede producir el tetrasacárido Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-3Glc porque debe haber al menos dos restos de glucosa β1-4 entre cada resto de glucosa β1-3. Sin embargo, se descubrió que el liquenano tiene los mismos isómeros que el β-glucano y, además, un isómero adicional, que, por tanto, debe estar asociado al oligosacárido Glcβ1-3Glcβ1-4Glc1-3Glc. Se utilizó una lógica similar para confirmar la creación de al menos otros 42 oligosacáridos (**Tabla 5-7**).

En la tabla 5-7, cada subunidad marcada como "Hex" se selecciona independientemente de Glu unida por β1 no

sustituida que está unida a la posición 3 o a la posición 4 de una Glu vecina no sustituida.

Tabla 5-7.

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición
1	507,19	504,17	5,98	3Hex	25	993,35	990,33	39,26	6Hex
2	507,19	504,17	11,58	3Hex	26	993,35	990,33	40,70	6Hex
3	507,19	504,17	13,73	3Hex	27	1155,40	1152,38	9,59	7Hex
4	507,19	504,17	15,24	3Hex	28	1155,40	1152,38	9,99	7Hex
5	669,25	666,22	14,13	4Hex	29	1155,40	1152,38	10,50	7Hex
6	669,25	666,22	17,58	4Hex	30	1155,40	1152,38	11,19	7Hex
7	669,25	666,22	19,46	4Hex	31	1155,40	1152,38	11,97	7Hex
8	669,25	666,22	19,70	4Hex	32	1155,40	1152,38	12,24	7Hex
9	669,25	666,22	20,41	4Hex	33	1155,40	1152,38	15,65	7Hex
10	831,30	828,27	12,65	5Hex	34	1155,40	1152,38	17,24	7Hex
11	831,30	828,27	13,47	5Hex	35	1155,40	1152,38	17,58	7Hex
12	831,30	828,27	15,45	5Hex	36	1155,40	1152,38	19,55	7Hex
13	831,30	828,27	23,64	5Hex	37	1317,46	1314,43	11,16	8Hex
14	831,30	828,27	24,92	5Hex	38	1317,46	1314,43	16,70	8Hex
15	831,30	828,27	25,79	5Hex	39	1317,46	1314,43	18,17	8Hex
16	831,30	828,27	26,59	5Hex	40	1317,46	1314,43	20,18	8Hex
17	993,35	990,33	9,72	6Hex	41	1479,51	1476,49	20,81	9Hex
18	993,35	990,33	10,28	6Hex	42	1641,56	1638,54	23,51	10Hex
19	993,35	990,33	11,86	6Hex	43	1644,58	1641,56	23,57	10Hex
20	993,35	990,33	14,38	6Hex	44	1317,46	1314,43	18,17	8Hex
21	993,35	990,33	16,23	6Hex	45	1317,46	1314,43	20,18	8Hex
22	993,35	990,33	16,61	6Hex	46	1479,51	1476,49	20,81	9Hex
23	993,35	990,33	29,00	6Hex	47	1644,58	1641,56	23,57	10Hex
24	993,35	990,33	30,90	6Hex					

- 5 El compuesto 6 de la tabla 5-7 se identificó como Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc. Se determinó que los compuestos 8 y 9 de la tabla 5-7 eran Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc, Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-3Glc1-4Glc o Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc, aunque aún no se ha determinado la correlación del pico específico con el oligosacárido específico. Se determinó que el compuesto 15 de la tabla 5-7 era Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-4Glc, Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-3Glc1-4Glc1-4Glc, Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc1-4Glc o Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-3Glc.

- 10 **Glucomanano.** La cantidad de isómeros de oligosacáridos en los productos obtenidos a partir del glucomanano se puede describir como (n.º de isómeros = n<sup>2</sup>) donde "n" es igual al número de monómeros. Por ejemplo, un trisacárido tendría ocho isómeros, y un tetrasacárido tendría 16 isómeros, etc. Esto se confirmó en el número de isómeros creados para cada GP. A GP mayores de 5, se observó un número de isómeros inferior al esperado, lo que podría explicarse por las bajas probabilidades de cadenas largas de un único monómero repetitivo, baja sensibilidad o coelución. Los datos de la mezcla de compuestos observados se muestran en la **tabla 5-8**.

- 15 En la tabla 5-8, cada subunidad marcada como "Hex" se selecciona independientemente de Glu unida por  $\beta$ 1 no sustituida o Man unida por  $\beta$ 1 no sustituida, cada una de las cuales está unida a la posición 4 de una Glu no sustituida o una Man no sustituida vecina.

Tabla 5-8.

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición
1	507,19	504,17	1,51	3Hex	83	1155,40	1152,38	15,72	7Hex

ES 3 003 383 T3

(continuación)

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición
2	507,19	504,17	1,97	3Hex	84	1155,40	1152,38	17,15	7Hex
3	507,19	504,17	6,87	3Hex	85	1155,40	1152,38	17,58	7Hex
4	507,19	504,17	8,71	3Hex	86	1155,40	1152,38	17,64	7Hex
5	507,19	504,17	10,05	3Hex	87	1155,40	1152,38	17,84	7Hex
6	507,19	504,17	10,98	3Hex	88	1155,40	1152,38	18,14	7Hex
7	507,19	504,17	12,88	3Hex	89	1155,40	1152,38	18,38	7Hex
8	507,19	504,17	13,51	3Hex	90	1155,40	1152,38	18,52	7Hex
9	669,25	666,22	3,51	4Hex	91	1155,40	1152,38	18,70	7Hex
10	669,25	666,22	5,91	4Hex	92	1155,40	1152,38	18,87	7Hex
11	669,25	666,22	10,76	4Hex	93	1155,40	1152,38	19,10	7Hex
12	669,25	666,22	10,97	4Hex	94	1155,40	1152,38	19,67	7Hex
13	669,25	666,22	11,42	4Hex	95	1155,40	1152,38	19,71	7Hex
14	669,25	666,22	11,85	4Hex	96	1155,40	1152,38	19,95	7Hex
15	669,25	666,22	14,04	4Hex	97	1155,40	1152,38	20,08	7Hex
16	669,25	666,22	15,07	4Hex	98	1155,40	1152,38	20,24	7Hex
17	669,25	666,22	15,45	4Hex	99	1155,40	1152,38	20,42	7Hex
18	669,25	666,22	15,90	4Hex	100	1155,40	1152,38	20,68	7Hex
19	669,25	666,22	16,28	4Hex	101	1155,40	1152,38	20,96	7Hex
20	669,25	666,22	16,40	4Hex	102	1155,40	1152,38	21,16	7Hex
21	669,25	666,22	16,70	4Hex	103	1155,40	1152,38	21,48	7Hex
22	669,25	666,22	17,26	4Hex	104	1155,40	1152,38	21,59	7Hex
23	669,25	666,22	18,84	4Hex	105	1155,40	1152,38	22,01	7Hex
24	669,25	666,22	19,48	4Hex	106	1155,40	1152,38	22,21	7Hex
25	831,30	828,27	9,15	5Hex	107	1155,40	1152,38	23,24	7Hex
26	831,30	828,27	9,46	5Hex	108	1155,40	1152,38	23,70	7Hex
27	831,30	828,27	10,68	5Hex	109	1155,40	1152,38	24,27	7Hex
28	831,30	828,27	12,85	5Hex	110	1155,40	1152,38	24,62	7Hex
29	831,30	828,27	13,73	5Hex	111	1155,40	1152,38	25,02	7Hex
30	831,30	828,27	13,81	5Hex	112	1155,40	1152,38	25,56	7Hex
31	831,30	828,27	14,03	5Hex	113	1155,40	1152,38	26,62	7Hex
32	831,30	828,27	14,81	5Hex	114	1155,40	1152,38	27,83	7Hex
33	831,30	828,27	15,34	5Hex	115	1155,40	1152,38	28,38	7Hex
34	831,30	828,27	15,85	5Hex	116	1317,46	1314,43	15,14	8Hex
35	831,30	828,27	15,99	5Hex	117	1317,46	1314,43	16,72	8Hex
36	831,30	828,27	16,32	5Hex	118	1317,46	1314,43	17,49	8Hex
37	831,30	828,27	16,46	5Hex	119	1317,46	1314,43	17,86	8Hex
38	831,30	828,27	16,62	5Hex	120	1317,46	1314,43	18,14	8Hex
39	831,30	828,27	16,91	5Hex	121	1317,46	1314,43	18,30	8Hex
40	831,30	828,27	17,65	5Hex	122	1317,46	1314,43	18,54	8Hex
41	831,30	828,27	20,30	5Hex	123	1317,46	1314,43	18,79	8Hex
42	831,30	828,27	20,55	5Hex	124	1317,46	1314,43	18,97	8Hex
43	831,30	828,27	21,05	5Hex	125	1317,46	1314,43	19,20	8Hex
44	831,30	828,27	21,41	5Hex	126	1317,46	1314,43	19,45	8Hex

### ES 3 003 383 T3

(continuación)

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición
45	831,30	828,27	22,68	5Hex	127	1317,46	1314,43	19,59	8Hex
46	831,30	828,27	23,09	5Hex	128	1317,46	1314,43	19,96	8Hex
47	993,35	990,33	11,93	6Hex	129	1317,46	1314,43	20,13	8Hex
48	993,35	990,33	12,46	6Hex	130	1317,46	1314,43	20,38	8Hex
49	993,35	990,33	13,85	6Hex	131	1317,46	1314,43	20,64	8Hex
50	993,35	990,33	14,38	6Hex	132	1317,46	1314,43	20,78	8Hex
51	993,35	990,33	14,49	6Hex	133	1317,46	1314,43	20,96	8Hex
52	993,35	990,33	15,19	6Hex	134	1317,46	1314,43	21,30	8Hex
53	993,35	990,33	16,00	6Hex	135	1317,46	1314,43	21,54	8Hex
54	993,35	990,33	16,19	6Hex	136	1317,46	1314,43	21,95	8Hex
55	993,35	990,33	16,23	6Hex	137	1317,46	1314,43	22,55	8Hex
56	993,35	990,33	16,47	6Hex	138	1317,46	1314,43	22,68	8Hex
57	993,35	990,33	17,17	6Hex	139	1317,46	1314,43	23,13	8Hex
58	993,35	990,33	17,32	6Hex	140	1317,46	1314,43	23,36	8Hex
59	993,35	990,33	17,74	6Hex	141	1317,46	1314,43	23,71	8Hex
60	993,35	990,33	18,04	6Hex	142	1317,46	1314,43	24,47	8Hex
61	993,35	990,33	18,32	6Hex	143	1317,46	1314,43	25,20	8Hex
62	993,35	990,33	18,70	6Hex	144	1317,46	1314,43	25,69	8Hex
63	993,35	990,33	18,95	6Hex	145	1317,46	1314,43	26,01	8Hex
64	993,35	990,33	19,73	6Hex	146	1317,46	1314,43	26,49	8Hex
65	993,35	990,33	19,93	6Hex	147	1317,46	1314,43	26,97	8Hex
66	993,35	990,33	20,39	6Hex	148	1317,46	1314,43	27,44	8Hex
67	993,35	990,33	20,46	6Hex	149	1479,51	1476,49	15,97	9Hex
68	993,35	990,33	21,04	6Hex	150	1479,51	1476,49	20,50	9Hex
69	993,35	990,33	21,22	6Hex	151	1479,51	1476,49	20,97	9Hex
70	993,35	990,33	22,71	6Hex	152	1479,51	1476,49	21,70	9Hex
71	993,35	990,33	23,39	6Hex	153	1479,51	1476,49	22,85	9Hex
72	993,35	990,33	24,38	6Hex	154	1479,51	1476,49	23,90	9Hex
73	993,35	990,33	24,47	6Hex	155	1479,51	1476,49	25,65	9Hex
74	993,35	990,33	24,82	6Hex	156	1479,51	1476,49	26,69	9Hex
75	993,35	990,33	25,27	6Hex	157	1641,58	1638,56	15,38	10Hex
76	993,35	990,33	25,78	6Hex	158	1803,61	1800,59	15,93	11Hex
77	993,35	990,33	26,39	6Hex	159	1965,67	1962,64	16,36	12Hex
78	993,35	990,33	27,44	6Hex	160	2127,72	2124,70	16,82	13Hex
79	1155,40	1152,38	13,11	7Hex	161	2289,77	2286,75	17,12	14Hex
80	1155,40	1152,38	13,65	7Hex	162	2451,83	2448,80	17,54	15Hex
81	1155,40	1152,38	14,53	7Hex	163	2613,88	2610,86	17,87	16Hex
82	1155,40	1152,38	15,49	7Hex	164	2775,93	2772,91	18,18	17Hex

A continuación se muestran las identidades de los compuestos correspondientes a los picos de la tabla 5-8. Los picos se agrupan cuando un oligosacárido individual no puede asociarse a un pico específico, pero donde grupos de oligosacáridos que tienen la misma masa podrían estar ligados a grupos de picos.

## ES 3 003 383 T3

1	Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man
2, 3, 4, 5, 6 y 7	Glc $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man, Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Man, Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Glc, Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Man o Glc $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Glc o Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc
9	Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man
10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23	Glc $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man, Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man, Glc $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Glc, Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man, Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Glc, Glc $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc, Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man, Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Man, Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Glc, Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Man, Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Glc, Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc o Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc
27	Man $\beta$ 1-4[Man $\beta$ 1-4] <sub>3</sub> Man
47	Man $\beta$ 1-4[Man $\beta$ 1-4] <sub>4</sub> Man
79	Man $\beta$ 1-4[Man $\beta$ 1-4] <sub>5</sub> Man

5 **Galactomanano.** Porque el galactomanano y el manano tienen la misma cadena principal manosa  $\beta$ 1-4, los picos correspondientes a la cadena principal no ramificada se identificaron fácilmente mediante la comparación de los tiempos de retención de los picos que aparecían en ambos cromatogramas. Se dedujo que los picos que sólo se encontraban en el galactomanano y no en el manano, contenían al menos una ramificación. Por ejemplo, el trisacárido Man $\beta$ 1-4Man $\beta$ 1-4Man al TR 1,51 minutos se encontró tanto en el manano como en el galactomanano, lo que confirmó la creación de este trisacárido. Además, se esperaba que el galactomanano contuviera dos isómeros adicionales, (Gal $\alpha$ 1-6)Man $\beta$ 1-4Man y Man $\beta$ 1-4(Gal $\alpha$ 1-6)Man. De hecho, se observaron dos isómeros adicionales a los TR 1,78 y 2,56 minutos que pueden describirse como los dos isómeros anteriormente descritos. Se utilizó una lógica similar para confirmar la creación de otros 47 oligosacáridos (**Tabla 5-9**).

10 En la tabla 5-9, cada subunidad marcada como "Hex" se selecciona independientemente de Man unida por  $\beta$ 1 no sustituida o Man(Gal $\alpha$ 1-6) unida por  $\beta$ 1, cada una de las cuales está unida a la posición 4 de una Man no sustituida vecina o (Gal $\alpha$ 1-6)Man.

15

Tabla 5-9.

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición
1	507,19	504,17	1,51	3Hex	25	993,35	990,33	14,13	6Hex
2	507,19	504,17	1,78	3Hex	26	1155,40	1152,38	13,11	7Hex
3	507,19	504,17	2,56	3Hex	27	1155,40	1152,38	13,51	7Hex
4	669,25	666,22	3,51	4Hex	28	1155,40	1152,38	13,57	7Hex
5	669,25	666,22	4,01	4Hex	29	1155,40	1152,38	13,72	7Hex
6	669,25	666,22	4,41	4Hex	30	1155,40	1152,38	14,12	7Hex
7	669,25	666,22	4,94	4Hex	31	1155,40	1152,38	14,22	7Hex
8	669,25	666,22	8,34	4Hex	32	1155,40	1152,38	14,38	7Hex
9	831,30	828,27	9,20	5Hex	33	1155,40	1152,38	14,65	7Hex
10	831,30	828,27	9,50	5Hex	34	1155,40	1152,38	14,93	7Hex
11	831,30	828,27	10,13	5Hex	35	1155,40	1152,38	15,33	7Hex
12	831,30	828,27	10,54	5Hex	36	1317,46	1314,43	14,06	8Hex
13	831,30	828,27	11,06	5Hex	37	1317,46	1314,43	14,34	8Hex
14	831,30	828,27	11,25	5Hex	38	1317,46	1314,43	14,67	8Hex
15	831,30	828,27	12,06	5Hex	39	1317,46	1314,43	14,90	8Hex
16	831,30	828,27	12,91	5Hex	40	1317,46	1314,43	15,27	8Hex
17	993,35	990,33	11,93	6Hex	41	1317,46	1314,43	15,58	8Hex
18	993,35	990,33	12,02	6Hex	42	1317,46	1314,43	15,90	8Hex
19	993,35	990,33	12,23	6Hex	43	1479,51	1476,49	14,80	9Hex

(continuación)

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición
20	993,35	990,33	12,40	6Hex	44	1479,51	1476,49	15,10	9Hex
21	993,35	990,33	12,60	6Hex	45	1479,51	1476,49	15,97	9Hex
22	993,35	990,33	12,86	6Hex	46	1479,51	1476,49	16,25	9Hex
23	993,35	990,33	13,41	6Hex	47	1479,51	1476,49	16,55	9Hex
24	993,35	990,33	13,64	6Hex					

A continuación se muestran las identidades de los compuestos correspondientes a los picos de la tabla 5-9. Los picos se agrupan cuando un oligosacárido individual no puede asociarse a un pico específico, pero donde grupos de oligosacáridos que tienen la misma masa podrían estar ligados a grupos de picos.

5

1	Manβ1-4Manβ1-4Man
2 y 3	(Galα1-6)Manβ1-4Man o Manβ1-4(Galα1-6)Man
4	Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Man
5, 6 y 7	Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man, (Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Man o Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Man
8	(Galα1-6)Manβ1-4(Galα1-6)Man
9	Manβ1-4[Manβ1-4] <sub>3</sub> Man
10, 11, 12 y 13	(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Man, Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Man, Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man o Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Man
14, 15 y 16	(Galα1-6)Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man, (Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Man o (Galα1-6)Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man
17	Manβ1-4 [Manβ1-4] <sub>4</sub> Man
18, 19, 20, 21 y 22	(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Man, Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Man, Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Man, Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man o Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Man
27, 28, 29, 30, 31 y 32	(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Man, Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Man, Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Man, Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man, Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man o Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Man
26	Manβ1-4[Manβ1-4] <sub>5</sub> Man
36	Manβ1-4[Manβ1-4] <sub>6</sub> Man
43	Manβ1-4[Manβ1-4] <sub>7</sub> Man

**Xilano.** La heterogeneidad de masas entre los restos de xilosa y ácido glucurónico en el xilano permitió determinar cómodamente las estructuras lineales y ramificadas. Por ejemplo, el tetrasacárido Xylβ1-4Xylβ1-4Xylβ1-4Xyl resultó tener una masa de 546,18 daltons, y los tres posibles trisacáridos ramificados tenían una masa de 604,19 daltons y se observaron a TR de 14,00, 15,33 y 16,47 minutos. Se utilizó una lógica similar para confirmar la creación de otros 27 oligosacáridos (**Tabla 5-10**).

10

En la tabla 5-10, cada subunidad marcada como "Pent" se selecciona independientemente de Xyl unida por β1 no sustituida o Xyl(GlcAOMeα1-2) unida por β1, cada una de las cuales está unida a la posición 4 de una Xyl no sustituida vecina o (GlcAOMeα1-2)Xyl. Cada "GlcAOMe" representa un ácido glucurónico, que está metilado en la posición 4-0.

15

Tabla 5-10.

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición
1	417,16	414,14	9,83	3Pent	15	871,30	868,27	23,46	5Pent:1GlcAOMe
2	549,20	546,18	15,33	4Pent	16	871,30	868,27	24,87	5Pent:1GlcAOMe
3	607,21	604,19	14,00	3Pent:1GlcAOMe	17	945,33	942,31	25,73	7Pent
4	607,21	604,19	14,27	3Pent:1GlcAOMe	18	1003,34	1000,32	24,51	6Pent:1GlcAOMe
5	607,21	604,19	16,47	3Pent:1GlcAOMe	19	1003,34	1000,32	26,88	6Pent:1GlcAOMe
6	681,25	678,22	18,79	5Pent	20	1003,34	1000,32	27,34	6Pent:1GlcAOMe
7	739,26	736,23	17,68	4Pent:1GlcAOMe	21	1003,34	1000,32	27,52	6Pent:1GlcAOMe
8	739,26	736,23	18,87	4Pent:1GlcAOMe	22	1003,34	1000,32	28,51	6Pent:1GlcAOMe
9	739,26	736,23	19,55	4Pent:1GlcAOMe	23	1003,34	1000,32	29,39	6Pent:1GlcAOMe
10	739,26	736,23	20,66	4Pent:1GlcAOMe	24	1077,37	1074,35	28,15	8Pent
11	813,29	810,26	21,92	6Pent	25	1135,38	1132,36	27,61	7Pent:1GlcAOMe
12	871,30	868,27	20,93	5Pent:1GlcAOMe	26	1135,38	1132,36	28,47	7Pent:1GlcAOMe
13	871,30	868,27	22,82	5Pent:1GlcAOMe	27	1135,38	1132,36	29,69	7Pent:1GlcAOMe
14	871,30	868,27	23,13	5Pent:1GlcAOMe					

A continuación se muestran las identidades de los compuestos correspondientes a los picos de la tabla 5-10. Los picos se agrupan cuando un oligosacárido individual no puede asociarse a un pico específico, pero donde grupos de oligosacáridos que tienen la misma masa podrían estar ligados a grupos de picos.

5

1	Xylβ1-4Xylβ1-4Xyl
2	Xylβ1-4Xylβ1-4Xylβ1-4Xyl
3, 4 y 5	(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4Xylβ1-4Xyl, Xylβ1-4(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4Xyl, Xylβ1-4Xylβ1-4(OMe-4-GlcAα1-2)Xyl
6	Xylβ1-4[Xylβ1-4] <sub>3</sub> Xyl
7, 8, 9 y 10	(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4Xylβ1-4Xylβ1-4Xyl, Xylβ1-4(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4Xylβ1-4Xyl, Xylβ1-4Xylβ1-4(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4Xyl, Xylβ1-4Xylβ1-4Xylβ1-4(OMe-4-GlcAα1-2)Xyl
11	Xylβ1-4[Xylβ1-4] <sub>4</sub> Xyl
12, 13, 14, 15 y 16	(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4[Xylβ1-4] <sub>3</sub> Xyl, Xylβ1-4(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4[Xylβ1-4] <sub>2</sub> Xyl, Xylβ1-4Xylβ1-4(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4Xylβ1-4Xyl, [Xylβ1-4] <sub>3</sub> (OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4Xyl, [Xylβ1-4] <sub>4</sub> (OMe-4-GlcAα1-2)Xyl
17	Xylβ1-4[Xylβ1-4] <sub>5</sub> Xyl
18, 19, 20, 21, 22 y 23	(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4 [Xylβ1-4] <sub>4</sub> Xyl, Xylβ1-4(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4[Xylβ1-4] <sub>3</sub> Xyl, Xylβ1-4Xylβ1-4(OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4 [Xylβ1-4] <sub>2</sub> Xyl, [Xylβ1-4] <sub>3</sub> (OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4Xylβ1-4Xyl, [Xylβ1-4] <sub>4</sub> (OMe-4-GlcAα1-2)Xylβ1-4Xyl, [Xylβ1-4] <sub>5</sub> (OMe-4-GlcAα1-2)Xyl
24	Xylβ1-4[Xylβ1-4] <sub>6</sub> Xyl

**Arabinoxilano.** Se esperaba que el arabinoxilano tuviera cuatro isómeros trisacáridos, basándose en su estructura polisacárida. También se encontró un isómero, TR 9,83 minutos, en el xilano, lo que confirma que la estructura comprende únicamente la cadena principal y ninguna ramificación, Xylβ1-4Xylβ1-4Xyl. Además, se observaron tres isómeros más a TR 2,00, 4,40 y 12,78 que correspondían a las tres estructuras esperadas (Araα1-3)Xylβ1-4Xyl, Xylβ1-4(Araα1-3)Xyl, ((Araα1-2)(Araα1-3))Xyl. Se utilizó una lógica similar para confirmar la producción de otros 39 oligosacáridos (**Tabla 5-11**).

10

15 En la tabla 5-11, cada subunidad marcada como "Pent" se selecciona independientemente de Xyl unida por β1 no sustituida, (Araα1-3)Xyl unida por β1 y (Araα1-2)(Araα1-3)Xyl unida por β1, cada una de las cuales está unida a la posición 4 de una Xyl vecina, (Araα1-3)Xyl o (Araα1-2)(Araα1-3)Xyl.

Tabla 5-11

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición
1	417,16	414,14	2,00	3Pent	21	813,29	810,26	14,97	6Pent
2	417,16	414,14	4,40	3Pent	22	813,29	810,26	15,36	6Pent
3	417,16	414,14	9,83	3Pent	23	813,29	810,26	16,13	6Pent
4	417,16	414,14	12,78	3Pent	24	813,29	810,26	17,21	6Pent
5	549,20	546,18	8,01	4Pent	25	813,29	810,26	21,92	6Pent
6	549,20	546,18	10,19	4Pent	26	945,33	942,31	16,61	7Pent
7	549,20	546,18	11,20	4Pent	27	945,33	942,31	18,29	7Pent
8	549,20	546,18	11,58	4Pent	28	945,33	942,31	22,54	7Pent
9	549,20	546,18	12,16	4Pent	29	945,33	942,31	22,79	7Pent
10	549,20	546,18	12,38	4Pent	30	945,33	942,31	25,73	7Pent
11	549,20	546,18	15,34	4Pent	31	1077,37	1074,35	26,33	8Pent
12	681,25	678,22	12,39	5Pent	32	1077,37	1074,35	26,83	8Pent
13	681,25	678,22	14,11	5Pent	33	1077,37	1074,35	27,10	8Pent
14	681,25	678,22	14,36	5Pent	34	1077,37	1074,35	27,49	8Pent
15	681,25	678,22	14,86	5Pent	35	1077,37	1074,35	28,15	8Pent
16	681,25	678,22	15,82	5Pent	36	1209,41	1206,39	26,37	9Pent
17	681,25	678,22	16,76	5Pent	37	1209,41	1206,39	27,10	9Pent
18	681,25	678,22	17,15	5Pent	38	1341,46	1338,43	27,10	10Pent
19	681,25	678,22	18,79	5Pent	39	1473,50	1470,48	28,63	11Pent
20	813,29	810,26	14,03	6Pent					

A continuación se muestran las identidades de los compuestos correspondientes a los picos de la tabla 5-11. Los picos se agrupan cuando un oligosacárido individual no puede asociarse a un pico específico, pero donde grupos de oligosacáridos que tienen la misma masa podrían estar ligados a grupos de picos.

1, 2 y 4	(Ara $\alpha$ 1-3)Xyl $\beta$ 1-4Xyl, Xyl $\beta$ 1-4(Ara $\alpha$ 1-3)Xyl o ((Ara $\alpha$ 1-2)(Ara $\alpha$ 1-3))Xyl
3	Xyl $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ 1-4Xyl
5, 6, 7, 8, 9 y 10	(Ara $\alpha$ 1-3)Xyl $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ 1-4Xyl, Xyl $\beta$ 1-4(Ara $\alpha$ 1-3)Xyl $\beta$ 1-4Xyl, Xyl $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ 1-4(Ara $\alpha$ 1-3)Xyl, (Ara $\alpha$ 1-3)Xyl $\beta$ 1-4(Ara $\alpha$ 1-3)Xyl, ((Ara $\alpha$ 1-2)(Ara $\alpha$ 1-3))Xyl $\beta$ 1-4Xyl o Xyl $\beta$ 1-4((Ara $\alpha$ 1-2)(Ara $\alpha$ 1-3))Xyl
11	Xyl $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ 1-4Xyl
19	Xyl $\beta$ 1-4[Xyl $\beta$ 1-4] <sub>3</sub> Xyl
25	Xyl $\beta$ 1-4[Xyl $\beta$ 1-4] <sub>4</sub> Xyl
30	Xyl $\beta$ 1-4[Xyl $\beta$ 1-4] <sub>5</sub> Xyl
35	Xyl $\beta$ 1-4[Xyl $\beta$ 1-4] <sub>6</sub> Xyl

**Arabinano.** El arabinano utilizado para la despolimerización procedía de la raíz de remolacha. Se propuso que el arabinano produce tres isómeros de trisacáridos, Ara $\alpha$ 1-5Ara $\alpha$ 1-5Ara, (Ara $\alpha$ 1-3)Ara $\alpha$ 1-5Ara y Ara $\alpha$ 1-5(Ara $\alpha$ 1-3)Ara. De hecho, se observaron tres isómeros en el cromatograma a TR 2,97, 3,94 y 4,77 minutos. Esta tendencia continuó para los cuatro isómeros tetrasacáridos esperados, Ara $\alpha$ 1-5Ara $\alpha$ 1-5Ara $\alpha$ 1-5Ara, (Ara $\alpha$ 1-3)Ara $\alpha$ 1-5Ara1-5Ara, Ara $\alpha$ 1-5(Ara $\alpha$ 1-3)Ara1-5Ara, Ara $\alpha$ 1-5Ara1-5(Ara $\alpha$ 1-3)Ara. Como era de esperar, se encontraron cuatro isómeros a TR 10,55, 11,03, 11,66 y 12,26 minutos. Se crearon un total de 34 oligosacáridos a partir del arabinano de remolacha (**Tabla 5-12**).

En la tabla 5-12, cada subunidad marcada como "Pent" se selecciona independientemente de Ara unida por  $\beta$ 1 no sustituida y (Ara $\alpha$ 1-3)Ara unida por  $\beta$ 1, cada una de las cuales está unida a la posición 5 de una Ara o (Ara $\alpha$ 1-3)Ara vecina.

Tabla 5-12

N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición	N.º	Masa (m/z)	Masa neutra	Tiempo de retención (min)	Composición
1	417,16	414,14	2,96	3Pent	18	945,33	942,31	17,26	7Pent
2	417,16	414,14	3,94	3Pent	19	945,33	942,31	17,51	7Pent
3	417,16	414,14	4,77	3Pent	20	945,33	942,31	17,78	7Pent
4	549,20	546,18	10,55	4Pent	21	945,33	942,31	18,00	7Pent
5	549,20	546,18	11,03	4Pent	22	945,33	942,31	18,20	7Pent
6	549,20	546,18	11,66	4Pent	23	1077,37	1074,35	18,42	8Pent
7	549,20	546,18	12,26	4Pent	24	1077,37	1074,35	19,13	8Pent
8	681,25	678,22	13,52	5Pent	25	1077,37	1074,35	19,53	8Pent
9	681,25	678,22	14,03	5Pent	26	1209,41	1206,39	19,75	9Pent
10	681,25	678,22	14,21	5Pent	27	1209,41	1206,39	20,20	9Pent
11	681,25	678,22	14,50	5Pent	28	1209,41	1206,39	20,50	9Pent
12	681,25	678,22	14,98	5Pent	29	1209,41	1206,39	20,75	9Pent
13	813,29	810,26	15,11	6Pent	30	1341,46	1338,43	21,37	10Pent
14	813,29	810,26	15,57	6Pent	31	1341,46	1338,43	21,62	10Pent
15	813,29	810,26	16,13	6Pent	32	1473,50	1470,48	22,32	11Pent
16	813,29	810,26	16,32	6Pent	33	1605,54	1602,52	23,54	12Pent
17	813,29	810,26	16,52	6Pent	34	1737,58	1734,56	25,02	13Pent

Se determinó que los compuestos 1 a 3 de la tabla 5-12 eran Ara $\alpha$ 1-5Ara $\alpha$ 1-5Ara, (Ara $\alpha$ 1-3)Ara $\alpha$ 1-5Ara y Ara $\alpha$ 1-5(Ara $\alpha$ 1-3)Ara, aunque aún no se ha determinado definitivamente el oligosacárido específico correspondiente a cada pico. Se determinó que los compuestos 4 a 7 eran Ara $\alpha$ 1-5Ara $\alpha$ 1-5Ara $\alpha$ 1-5Ara, (Ara $\alpha$ 1-3)Ara $\alpha$ 1-5Ara1-5Ara, Ara $\alpha$ 1-5(Ara $\alpha$ 1-3)Ara1-5Ara y Ara $\alpha$ 1-5Ara1-5(Ara $\alpha$ 1-3)Ara, aunque aún no se ha determinado definitivamente el oligosacárido específico correspondiente a cada pico.

#### Ejemplo 6. Estrategias para la caracterización estructural de oligosacáridos.

La caracterización estructural de los oligosacáridos es complicada y poco ágil; por tanto, a menudo se desarrollan nuevas estrategias a medida que se descubren nuevos tipos y clases de oligosacáridos. Los oligosacáridos preparados de acuerdo con la presente divulgación se clasifican en diferentes categorías, por ejemplo, 1) oligosacáridos procedentes de polisacáridos homopoliméricos, que contienen un único tipo de monosacárido y un único tipo de enlace glucosídico (por ejemplo, amilosa, galactano, manano, curdlano y celulosa); 2) oligosacáridos procedentes de polisacáridos poliméricos heteropoliméricos, que contienen monómeros no isoméricos de diversos pesos moleculares y diferentes enlaces glucosídicos (xilano y xiloglucano); 3) oligosacáridos procedentes de polisacáridos heteropoliméricos, que contienen diferentes tipos de monómeros isoméricos que tienen el mismo peso molecular y/o diferentes tipos de enlaces glucosídicos (glucomanano, galactomanano y arabinoxilano); y 4) oligosacáridos procedentes de polisacáridos homopoliméricos, que contienen una sola unidad de monosacárido y diferentes tipos de enlaces glucosídicos (arabinano, liquenina y  $\beta$ -glucano). Se creó un diagrama de flujo (**Figura 7**) para emparejar los componentes de oligosacáridos con la lógica respectiva que puede aplicarse para su caracterización. A continuación se describen algunos ejemplos.

#### Estrategia 1: Caracterización estructural de homopolímeros

Los homopolímeros son los oligosacáridos más sencillos de caracterizar. Los homopolímeros se identificaron por la presencia de una sola unidad monomérica, cuando se determina mediante un análisis de monosacáridos, y de sólo un tipo de enlace lineal terminal, cuando se determina mediante un análisis de enlaces glucosídicos. Una vez determinado el homopolímero, se realizó un análisis de oligosacáridos por HPLC-MS para determinar el grado de polimerización. Por ejemplo, el galactano contenía el 88 % de galactosa (**Tabla 5-1**) y sólo dos enlaces glucosídicos principales, el 58,84 % de 4 enlaces y el 30,53 % de enlaces terminales (**Tabla 5-2**), lo que indica que se trata de un homopolímero. El análisis de oligosacáridos por HPLC-MS mostró siete picos correspondientes a los GP de 3 a 9. Por tanto, los oligosacáridos se asignaron a ser polímeros de Gal $\beta$ 1-4Gal (**Tabla 5-4**).

#### Estrategia 2: Caracterización estructural de heteropolímeros con monómeros heteromasa

Los heteropolímeros con monómeros heteromasa pueden ser los oligosacáridos estructuralmente más complicados, sin embargo, la heterogeneidad de la masa da lugar a oligosacáridos que pueden diferenciarse por fragmentación en

un espectrómetro de masas. El xiloglucano es un ejemplo de heteropolímero con monómeros heteromasa porque contiene glucosa y galactosa (180,16 Da) y xilosa (150,13 Da). Una descripción completa de la caracterización con flujos lógicos basados en la fragmentación se muestra en el **ejemplo 4** y la **figura 6**.

### 5 Estrategia 3: Caracterización estructural de heteropolímeros con monómeros homomasa

Los heteropolímeros con monómeros homomasa son los oligosacáridos más complicados de dilucidar estructuralmente debido al elevado número de estructuras posibles, pero también a la falta de información que puede obtenerse mediante la fragmentación por MS. Una estrategia que se puede utilizar para caracterizar los oligosacáridos es la estrategia de agrupación, en la que los grupos de isómeros de oligosacáridos se asignan a grupos de picos cromatográficos con la misma masa. Esta estrategia es particularmente útil cuando el número de isómeros por GP es coherente con el número de isómeros posibles dictado por los perfiles monoméricos y de enlace glucosídico. Por ejemplo, esta estrategia se utilizó con el  $\beta$ -glucano, que contiene mezclas de polímeros de glucosa  $\beta$ 1-3 y  $\beta$ 1-4 (**Ejemplo 5, tablas 5-2 y 5-3**). Cuando la agrupación de oligosacáridos no es suficiente, se pueden utilizar los métodos de caracterización *de novo* para la caracterización estructural como se describe a continuación en el **ejemplo 6, estrategia 4**.

### Estrategia 4: Caracterización *de novo* y no sesgada de polímeros

Las estructuras de los productos de oligosacáridos producidos en el presente documento que no pueden describirse mediante las estrategias lógicas 1 a 3, estaban y/o están caracterizados, de acuerdo con el siguiente enfoque *de novo*.

#### *Fraccionamiento de oligosacáridos*

El fraccionamiento y la detección de oligosacáridos se realizaron en un HPLC Agilent 1260 serie Infinity II acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6530 Q-TOF y un colector de fracciones Teledyne Isco Foxy 200. Los oligosacáridos se separaron primero en una columna Hypercarb de 150 mm  $\times$  4,6 mm de Thermo Scientific con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m. Se empleó un gradiente binario que consistía en el disolvente A: acetonitrilo/agua (3 % (v/v) + ácido fórmico al 0,1 %)

y el disolvente B: acetonitrilo/agua al 90 % + ácido fórmico al 0,1 %). Para la separación cromatográfica se utilizó un gradiente de 90 minutos con un caudal de 1 ml/min: 5-12 % de B, 0-90 min; 12-99 % de B, 90-90,01 minutos; 99-99 % de B, 90,01-110 min; 99-5 % de B, 110-110,01 min; 5-5 % de B, 110,01-120 min. Después de la columna, un divisor de flujo 90:10 repartió la corriente mayor hacia el colector de fracciones y la menor hacia el espectrómetro de masas Q-TOF. Los datos del QTOF se recogieron en el modo positivo y se calibraron con iones de calibración internos que estaban en el intervalo de  $m/z$  118,086-2721,895. El gas de secado se ajustó a 150 °C y con un caudal de 11 l/min. Los voltajes de RF del fragmento, *skimmer* y Octupole 1 se ajustaron a 75, 60 y 750 V, respectivamente. La fragmentación se realizó a una velocidad de 1 espectros/segundo. La energía de colisión se basó en la masa del compuesto y se expresó mediante la función lineal (Energía de colisión) =  $1,3^*(m/z)-3,5$ . Las fracciones se recogieron en placas de 96 pocillos a razón de 30 segundos por fracción. Las fracciones recogidas se secaron hasta su finalización mediante centrifugación al vacío y se reconstituyeron en 100  $\mu$ l de agua nanopura. Se transfirió una alícuota de 10  $\mu$ l a otra placa de 96 pocillos para analizar la composición de monosacáridos, mientras que los 90  $\mu$ l restantes se sometieron al análisis de enlace glucosídico.

#### *Análisis de la composición de monosacáridos de oligosacáridos fraccionados*

En resumen, los oligosacáridos fraccionados se sometieron a hidrólisis ácida con TFA 4 M durante 2 horas a 100 °C. Las muestras se secaron hasta su finalización mediante centrifugación al vacío. Las muestras y los patrones de monosacáridos (0,001 a 100  $\mu$ g/ml) se derivatizaron con PMP 0,2 M en metanol y  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28 % a 70 °C durante 30 minutos. Los productos derivados se secaron hasta su finalización mediante centrifugación al vacío y se reconstituyeron en agua nanopura. El exceso de PMP se eliminó mediante extracción con cloroformo. La capa acuosa se analizó mediante un UHPLC Agilent 1290 infinity II acoplado a un MS Agilent 6495A QqQ empleando el modo de monitorización dinámica de reacciones múltiples (dMRM). Una curva patrón externa comprendida por patrones de monosacáridos (fructosa, manosa, alosa, glucosa, galactosa, ramnosa, fucosa, ribosa, xilosa, arabinosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina) que variaban de 0,001 a 100  $\mu$ g/ml se utilizaron para la cuantificación absoluta de cada monosacárido en las fracciones. Se pueden encontrar descripciones detalladas del método en Xu *et al.*<sup>25</sup> y Amicucci *et al.*<sup>24</sup>

#### *Análisis de enlaces de oligosacáridos fraccionados*

El análisis de enlaces glucosídicos se analizó a la manera de Galermo *et al.*<sup>26</sup> En resumen, los oligosacáridos fraccionados y un grupo de patrones de oligosacáridos (2-O-( $\alpha$ -D-manosa-piranosil)-D-manopiranososa, 1,4-D-xilobiosa, 1,5- $\alpha$ -L-arabinotriosa, 1,3- $\alpha$ -1,6- $\alpha$ -D-manotriosa, isomaltotriosa, 4-O-( $\beta$ -D-galactopiranosil)-D-galactopiranososa, lactosa, 2'-fucosilactosa, nigerosa, 3-O-( $\beta$ -D-galactopiranosil)-D-galactopiranososa, 3-O-( $\alpha$ -D-manopiranosil)-D-manopiranososa, 1,4- $\beta$ -D-manotriosa, maltohexaosa, 1,6- $\alpha$ -D-manotriosa y amilopectina obtenida de Carbosynth (Compton, Reino Unido), galactano (Lupin), 3'3- $\alpha$ -L-arabinofuranosilxilotetraosa, soforosa, galactano, xiloglucano,

manano, galactomanano, xilano de haya, arabinoxilano, arabinano, glucomanano, obtenido de Megazyme (Chicago, IL); los monosacáridos parcialmente permetilados restantes sintetizados como se describe en Galermo et al.<sup>55</sup> se hicieron reaccionar con NaOH saturado y yodometano en DMSO. Los residuos de NaOH y DMSO se eliminaron mediante extracción con DCM y agua. La capa de DCM se secó hasta su finalización mediante centrifugación al vacío.  
5 Las muestras se hidrolizaron y derivatizaron del mismo modo que el análisis de monosacáridos.

Las muestras no se sometieron a extracción con cloroformo y se reconstituyeron en metanol/agua al 70 % (v/v). Las fracciones se analizaron en un UHPLC Agilent 1290 infinity II acoplado a un MS Agilent 6495A QqQ en modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM). El conjunto de patrones de oligosacáridos mencionado anteriormente se utilizó para asignar los enlaces glucosídicos presentes basándose en su *m/z*, espectros de fragmentación y tiempo de retención.  
10 de retención.

#### *Análisis RMN de oligosacáridos fraccionados*

Los espectros de RMN se registraron a 303 K en un espectrómetro Bruker AVANCE III de 800 MHz equipado con una criosonda Bruker CPTCI de 5 mm. Las muestras se obtuvieron mediante la combinación de diez colecciones de oligosacáridos fraccionados de los mismos componentes verificados con datos de MS HPLC-QTOF y MS/MS. En función de la información sobre monosacáridos y enlaces, se seleccionaron los oligosacáridos más abundantes para el análisis por RMN. Cada una de estas fracciones agrupadas seleccionadas se secó mediante centrifugación al vacío antes de ser reconstituida en 0,4 ml de D<sub>2</sub>O, y se midió utilizando 1D 1H (retardo de relajación (D1) 2 s; número de exploraciones (NS, del inglés *number of scans*) 128), 13C RMN (D1 1,5 s; NS 6000-15000) y 2D 1H-1H COSY (D1 1,5 s; NS 8), 1H-13C HSQC (D1 2 s; NS 4), HMBC (D1 1,5 s; NS 16) y H2BC (D1 1,5 s; NS 16). A continuación, los espectros se procesaron con Bruker TopSpin 3.2 y se analizaron con MestReNova. Los desplazamientos químicos experimentales, junto con los datos necesarios de monosacáridos y enlaces, se calcularon con el programa CASPER, donde las estructuras de oligosacáridos, incluidos los caracteres anoméricos de los enlaces, se predijeron con puntuaciones de clasificación.<sup>56</sup>  
15  
20  
25

#### *Visión general del método*

Para el análisis estructural de oligosacáridos que no eran caracterizables por los métodos fáciles presentados en el **ejemplo 6**, las estrategias 1 a 3, se describió en el presente documento un método utilizado con éxito para su elucidación *de novo*. Esta estrategia también puede emplearse para caracterizar totalmente la estructura de cualquiera de los restantes oligosacáridos no caracterizados presentados en el presente documento. En esta estrategia, los productos oligosacáridos se separan cromatográficamente en grupos de menor número de compuestos, conteniendo muchos estructuras únicas. El eluyente de LC se reparte entre el QTOF para MS y MS/MS y una placa de recogida de 96 pocillos. Los espectros de masas QTOF MS y MS/MS proporcionan la información estructural relativa a las composiciones de monosacáridos y al grado de polimerización de oligosacáridos de los compuestos recogidos en tiempos de retención únicos. Sin embargo, el uso exclusivo de los datos de los espectros de masas de QTOF MS y MS/MS puede no identificar los constituyentes monosacáridos, los enlaces o el carácter anomérico del enlace (alfa frente a beta). En dichos casos, las fracciones recogidas (por ejemplo, aproximadamente 200) se analizan posteriormente mediante un análisis rápido de monosacáridos y enlaces para obtener estructuras casi completas de cada componente oligosacárido.  
30  
35  
40

En uno de estos ejemplos se utilizó el polisacárido galactomanano para ilustrar las capacidades de estos procedimientos de trabajo. El cromatograma LC-MS arrojó principalmente polímeros de hexosas con composiciones de monosacáridos desconocidas (combinaciones de galactosa y manosa), enlaces o ramificaciones (**Figura 8A**). Las fracciones de la LC-MS se recogieron en incrementos de 30 segundos, obteniéndose un total de 192 fracciones. Se analizó cada fracción en busca de composiciones de monosacáridos como se ha descrito anteriormente en "*análisis de composición de monosacáridos de oligosacáridos fraccionados*", y los resultados se muestran en la **figura 8B**. La información de enlace se obtuvo de forma similar utilizando un procedimiento de trabajo independiente para el análisis de enlace exhaustivo como se ha descrito anteriormente en "*análisis de enlace de oligosacáridos fraccionados*". Cuando los tres procedimientos de trabajo (monosacárido, enlace glucosídico y análisis de oligosacáridos) se integraron, proporcionaron información estructural que describía oligosacáridos con composiciones de monosacáridos e información sobre enlaces glucosídicos.  
45  
50  
55

Para obtener la característica estructural final y el carácter anomérico de los enlaces, las fracciones de oligosacáridos aisladas se seleccionaron para su análisis por RMN utilizando 1H, 13C RMN y una combinación de técnicas que incluye COSY, HSQC, HMBC y H2BC descritas anteriormente en "*Análisis por RMN de oligosacáridos fraccionados*", y los resultados se muestran en la **figura 8C**. Los enlaces obtenidos por MS y las composiciones de monosacáridos facilitaron enormemente la interpretación por RMN al limitar la resolución necesaria para determinar las estructuras exactas. Este enfoque de procedimientos de trabajo múltiple produjo estructuras absolutas de oligosacáridos, que también se utilizaron para recapitular la estructura polimérica parental (**Figura 8D**).  
60

En consecuencia, las estructuras de cualquiera de los picos de oligosacáridos descritos en las tablas (**Tablas 4, 5-3, 5-4, 5-5, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10 y 5-11**) pueden dilucidarse mediante las estrategias presentadas en las estrategias 1 a 4. Específicamente, los oligosacáridos 1 a 24 de la **tabla 4** se caracterizaron mediante la estrategia 2, mientras que  
65

los oligosacáridos 25 a 35 de la misma tabla se caracterizaron mediante la estrategia 3 y podrían caracterizarse también mediante la estrategia 4. Todos los oligosacáridos de las **tablas 5-3, 5-4 y 5-5** se caracterizaron mediante la estrategia 2. Los oligosacáridos de la **tabla 5-6** se caracterizaron mediante la estrategia 3 y se pueden caracterizar también mediante la estrategia 4. Las estructuras de los oligosacáridos 2, 5, 10 y 18 se caracterizaron como compuestos homólogos a los compuestos identificados en el curdlano porque tenían la misma masa y tiempo de retención. Los oligosacáridos de la **tabla 5-7** se caracterizaron mediante la estrategia 3, y se pueden caracterizar también mediante la estrategia 4.

Los oligosacáridos 1, 9, 27, 47 y 79 de la **tabla 5-8** se caracterizaron por su homología con estructuras encontradas en el manano; los oligosacáridos 2 a 7 y 10 a 23 se caracterizaron mediante la estrategia 3 y se pueden caracterizar también mediante la estrategia 4; los oligosacáridos 8, 24 a 26, 28 a 46, 48 a 78 y 80 a 164 se pueden caracterizar mediante la estrategia 4.

Los oligosacáridos 1, 4, 17, 26, 36 y 43 de la **tabla 5-9** se caracterizaron por su homología con las mismas estructuras del manano; los oligosacáridos 2, 3, 5 a 7, 10 a 16, 18 a 22 y 27 a 32 se caracterizaron mediante la estrategia 3 y se pueden caracterizar también mediante la estrategia 4; los oligosacáridos 23 a 25, 27 a 35, 37 a 42 y 44 a 47 se pueden caracterizar mediante la estrategia 4.

Los oligosacáridos 1, 2, 6, 11, 17 y 24 de la **tabla 5-10**, se caracterizaron mediante la estrategia 2; los oligosacáridos 3 a 5, 7 a 10, 12 a 16 y 18 a 23 se caracterizaron mediante la estrategia 3 y se pueden caracterizar también mediante la estrategia 4; los oligosacáridos 25 a 27 se pueden caracterizar mediante la estrategia 4.

Los oligosacáridos 3, 11, 19, 25, 30 y 35 de la **tabla 5-11** se caracterizaron por homología con estructuras encontradas en el xilano; los oligosacáridos 1, 2, 4 y 5 a 10 se caracterizaron mediante la estrategia 3 y se pueden caracterizar también mediante la estrategia 4; los oligosacáridos 12 a 18, 20 a 24, 26 a 29, 31 a 34 se pueden caracterizar mediante la estrategia 4.

Los oligosacáridos 1 a 3 y 4 a 7 de la **tabla 5-12** se caracterizaron mediante la estrategia 3 y se pueden caracterizar también mediante la estrategia 4; los oligosacáridos 8 a 34 se pueden caracterizar mediante la estrategia 4.

### III. Bibliografía

1. Meredith-Dennis, L.; Xu, G.; Goonatilleke, E.; Lebrilla, C. B.; Underwood, M. A.; Smilowitz, J. T., Composition and variation of macronutrients, immune proteins, and human milk oligosaccharides in human milk from nonprofit and commercial milk banks. *Journal of Human Lactation* **2018**, *34* (1), 120-129.

2. Wang, M.; Li, M.; Wu, S.; Lebrilla, C. B.; Chapkin, R. S.; Ivanov, L.; Donovan, S. M., Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **2015**, *60* (6), 825.

3. Barile, D.; Rastall, R. A., Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current opinion in biotechnology* **2013**, *24* (2), 214-219.

4. Coppa, G. V.; Zampini, L.; Galeazzi, T.; Facinelli, B.; Ferrante, L.; Capretti, R.; Orazio, G., Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: Escherichia coli, Vibrio cholerae, and Salmonella typhi. *Pediatric Research* **2006**, *59* (3), 377.

5. Zivkovic, A. M.; Barile, D., Bovine milk as a source of functional oligosaccharides for improving human health. *Advances in Nutrition* **2011**, *2* (3), 284-289.

6. Lamsal, B. P., Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2012**, *92* (10), 2020-2028.

7. Yamaguchi, M.; Kainuma, K.; French, D., Electron microscopic observations of waxy maize starch. *Journal of ultrastructure research* **1979**, *69* (2), 249-261.

8. Keegstra, K., Plant cell walls. *Plant physiology* **2010**, *154* (2), 483-486.

9. Preston, R. D., *The physical biology of plant cell walls*. Londres: Chapman & Hall: 1974.

10. Zhou, L. B.; Chen, B., Bioactivities of water-soluble polysaccharides from Jisongrong mushroom: anti-breast carcinoma cell and antioxidant potential. *International journal of biological macromolecules* **2011**, *48* (1), 1-4.

11. Martens, E. C.; Kelly, A. G.; Tauzin, A. S.; Brumer, H., The devil lies in the details: how variations in polysaccharide fine-structure impact the physiology and evolution of gut microbes. *Journal of molecular biology* **2014**, *426* (23), 3851-3865.

12. Martens, E. C.; Lowe, E. C.; Chiang, H.; Pudlo, N. A.; Wu, M.; McNulty, N. P.; Abbott, D. W.; Henrissat, B.; Gilbert, H. J.; Bolam, D. N., Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS biology* **2011**, *9* (12), e1001221.
- 5 13. Lerouxel, O.; Cavalier, D. M.; Liepman, A. H.; Keegstra, K., Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides—a complex process. *Current opinion in plant biology* **2006**, *9* (6), 621-630.
- 10 14. Robbins, P.; Wright, A.; Dankert, M., Polysaccharide biosynthesis. *The Journal of general physiology* **1966**, *49* (6), 331-346.
- 15 15. Morris, E.; Powell, D.; Gidley, M.; Rees, D., Conformations and interactions of pectins: I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *Journal of molecular biology* **1982**, *155* (4), 507-516.
- 16 16. Darvill, J. E.; McNeil, M.; Darvill, A. G.; Albersheim, P., Structure of Plant Cell Walls: XL Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology* **1980**, *66* (6), 1135-1139.
- 20 17. Bauer, W. D.; Talmadge, K. W.; Keegstra, K.; Albersheim, P., The structure of plant cell walls: II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant physiology* **1973**, *51* (1), 174-187.
- 25 18. Xu, Y.; Masuko, S.; Takeddin, M.; Xu, H.; Liu, R.; Jing, J.; Mousa, S. A.; Linhardt, R. J.; Liu, J., Chemoenzymatic synthesis of homogeneous ultralow molecular weight heparins. *Science* **2011**, *334* (6055), 498-501.
- 30 19. Zhang, Z.; Ollmann, I. R.; Ye, X. S.; Wischnat, R.; Baasov, T.; Wong, C. H., Programmable one-pot oligosaccharide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (4), 734-753.
- 35 20. Bucke, C., Review Oligosaccharide Synthesis Using Glycosidases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology* **1996**, *67* (3), 217-220.
- 40 21. Karav, S.; Le Parc, A.; de Moura, J. M. L. N.; Frese, S. A.; Kirmiz, N.; Block, D. E.; Barile, D.; Mills, D. A., Oligosaccharides released from milk glycoproteins are selective growth substrates for infant-associated bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82* (12), 3622-3630.
- 45 22. Pullicin, A. J.; Ferreira, A. J.; Beaudry, C. M.; Lim, J.; Penner, M. H., Preparation and characterization of isolated low degree of polymerization food-grade maltooligosaccharides. *Food Chemistry* **2018**, *246*, 115-120.
- 50 23. Amicucci, M. J.; Park, D.; Galermo, A. G.; Mills, D. A.; German, J. B.; Lebrilla, C. B., Production of bioactive oligosaccharides. Patentes de Google: 2018.
- 55 24. Amicucci, M. J.; Galermo, A. G.; Nandita, E.; Vo, T. T. T.; Liu, Y.; Lee, M.; Xu, G.; Lebrilla, C. B., A rapid-throughput adaptable method for determining the monosaccharide composition of polysaccharides. *International Journal of Mass Spectrometry* **2019**, *438*, 22-28.
- 60 25. Xu, G.; Amicucci, M. J.; Cheng, Z.; Galermo, A. G.; Lebrilla, C. B., Revisiting monosaccharide analysis-quantitation of a comprehensive set of monosaccharides using dynamic multiple reaction monitoring. *Analyst* **2018**, *143* (1), 200-207.
- 65 26. Galermo, A. G.; Nandita, E.; Barboza, M.; Amicucci, M. J.; Vo, T. T. T.; Lebrilla, C. B., An LC-MS/MS Approach for Determining Glycosidic Linkages. *Analytical chemistry* **2018**
27. FRY, S. C., The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany* **1989**, *40* (1), 1-11.
28. Saito, Hiroshi, Akira Misaki y Tokuya Harada. A comparison of the structure of curdlan and pachyman. *Agricultural and Biological Chemistry* **32.10** (1968): 1261-1269.
29. Michalak, Malwina, *et al.* Expression and characterization of an endo-1, 4- $\beta$ -galactanase from *Emericella nidulans* in *Pichia pastoris* for enzymatic design of potentially prebiotic oligosaccharides from potato galactans. *Enzyme and microbial technology* **50.2** (2012): 121-129.
30. Meier, Hans. On the structure of cell walls and cell wall mannans from ivory nuts and from dates. *Biochimica et biophysica acta* **28** (1958): 229-240.
31. Cui, Steve W. y Qi Wang. Cell wall polysaccharides in cereals: chemical structures and functional properties. *Structural Chemistry* **20.2** (2009): 291-297.

32. Olafsdottir, Elin S. y Kristín Ingólfssdóttir. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. *Planta medica* 67.03 (2001): 199-208.
- 5 33. Katsuraya, Kaname, *et al.* Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Carbohydrate polymers* 53.2 (2003): 183-189.
34. Bardalaye, PROMODE C. y JOHN H. Nordin. Chemical structure of the galactomannan from the cell wall of *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry* 252.8 (1977): 2584-2591.
- 10 35. Kačuraková, M., *et al.* Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. *Food Hydrocolloids* 13.1 (1999): 35-41.
36. Izydorczyk, Marta S. y Costas G. Biliaderis. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 28.1 (1995): 33-48.
- 15 37. Kim, Yeong-Su, Yu-Ri Lim y Deok-Kun Oh. L-Arabinose production from sugar beet arabinan by immobilized endo- and exo-arabinanases from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* in a packed-bed reactor. *Journal of bioscience and bioengineering* 113.2 (2012): 239-241.
- 20 38. Katsuraya, Kaname, *et al.* Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Carbohydrate polymers* 53.2 (2003): 183-189.
39. Larsbrink *et al.* A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes. *Nature* 2014, 506:489
- 25 40. Salyers *et al.* Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of Bacteroides from the human colon. *App Environm Microbiol* 1977, 33:319
41. Tamura *et al.*, Molecular Mechanism by which Prominent Human Gut Bacteroidetes Utilize Mixed-Linkage  $\beta$ -Glucans, Major Health-Promoting Cereal Polysaccharides. *Cell Reports* 2017, 21: 2030
- 30 42. Beckmann *et al.* Isolation and identification of mixed linked beta -glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1,3-1,4-beta-glucanase activities. *J. Basic Microbiol* 2006, 46: 175
- 35 43. Sheridan *et al.* Polysaccharide utilization loci and nutrition specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic Firmicutes. *Microbial Genomics*, 2016, 2:1
44. Lammerts van Bueren *et al.* Prebiotic galactoligosaccharides activate mucin and pectin galactan utilization pathways in the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Scientific Reports* 2017, 7:40478.
- 40 45. Luis *et al.* Dietary pectin glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic *Bacteroides*. *Nat Microbiol* 2018, 3:210.
- 45 46. Hinz *et al.* *Bifidobacterium longum* endogalactanase liberate galactotriose from Type galactans. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71:5501
47. Desai *et al.* A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell* 2016, 17:1339
- 50 48. Kawaguchi *et al.* The manno-1,6-biosylating exo-mannanase involved in a new mannan catabolic pathway in *Bacteroides fragilis*. *Arch Microbiol* 2014, 196:17
- 55 49. Leanti la Rosa *et al.* The human gut Firmicute *Roseburia intestinalis* is a primary degrader of dietary  $\beta$ -mannans. *Nat Commun* 2019, 10:905
50. Kulcinskaja *et al.* Expression and characterization of a *Bifidobacterium adolescentis* beta-mannanase carrying mannan-binding and cell association motifs. *Appl Environ Microbiol* 2013,79:133
- 60 51. Reddy *et al.* A  $\beta$ -mannan utilization locus in *Bacteroides ovatus* involves a GH36  $\alpha$ -galactosidase active on galactomannans. *FEBS Lett* 2016, 590:2106
52. Martens *et al.* Recognition and Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides by Two Human Gut Symbionts. *PLoS Biol.* 2011, 9
- 65

53. Van Laere *et al.* Transglycosidew activity of *Bifidobacterium adolescents* DSM 20083 alpha-galactosidase. *Appl Microbial Biotechnol* 1999,52:681
54. Margolles *et al.* Purification and functional characterization of a novel alpha-L-arabinofuranosidase from  
5 *Bifidobacterium longum* B667. *Appl Environm Microbiol* 2003, 69:5-59.
55. Galermo, A. G., *et al.* Development of an Extensive Linkage Library for Characterization of Carbohydrates. *Analytical Chemistry* 91 (2019): 13022-13031.
- 10 56. Jansson, P, *et al.* Sequence determination of oligosaccharides and regular polysaccharides using NMR spectroscopy and a novel Web-based version of the computer program CASPER. *Carbohydrate research* 341 (2006): 1003-1010.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende oligosacáridos sintéticos, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de 1 cualquiera de los compuestos:

- 5  
 10  
 15  
 20
- Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-3Glc,
  - Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc,
  - Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc,
  - Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-3Glc1-4Glc,
  - Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc,
  - Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc,
  - Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-4Glc,
  - Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-3Glc1-4Glc1-4Glc,
  - Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc1-4Glc,
  - Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-3Glc,
  - Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc,
  - Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-3Glc1-4Glc1-4Glc1-4Glc,
  - Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-3Glc1-4Glc1-4Glc,
  - Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-3Glc1-4Glc,
  - Glc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc o
  - Glc $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-4Glc1-4Glc1-4Glc1-3Glc.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de 2 cualquiera de los compuestos.

25  
 3. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de 3 cualquiera de los compuestos.

30  
 4. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de 4 cualquiera de los compuestos.

5. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de 5 cualquiera de los compuestos.

35  
 6. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de 6 cualquiera de los compuestos.

7. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de 7 cualquiera de los compuestos.

40  
 8. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de 9 cualquiera de los compuestos.

45  
 9. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de 11 cualquiera de los compuestos.

10. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de 14 cualquiera de los compuestos.

50  
 11. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos sintéticos se seleccionan de los 16 compuestos.

12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde los oligosacáridos sintéticos proceden de la despolimerización de  $\beta$ -glucano o liquenano, opcionalmente, en donde el  $\beta$ -glucano se encuentra en un cereal.

55  
 13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la despolimerización comprende un tratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno y un metal de transición o metal alcalinotérreo, seguido de escisión inducida por base.

60  
 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde los oligosacáridos sintéticos están presentes en una cantidad del 90 % en peso al 99 % en peso, en función el peso total de los oligosacáridos en la composición.

65  
 15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la composición está en forma de un producto alimenticio, un suplemento, un simbiótico, un excipiente farmacéutico o un producto farmacéutico, opcionalmente, en donde el suplemento es un suplemento geriátrico.

FIG. 1A

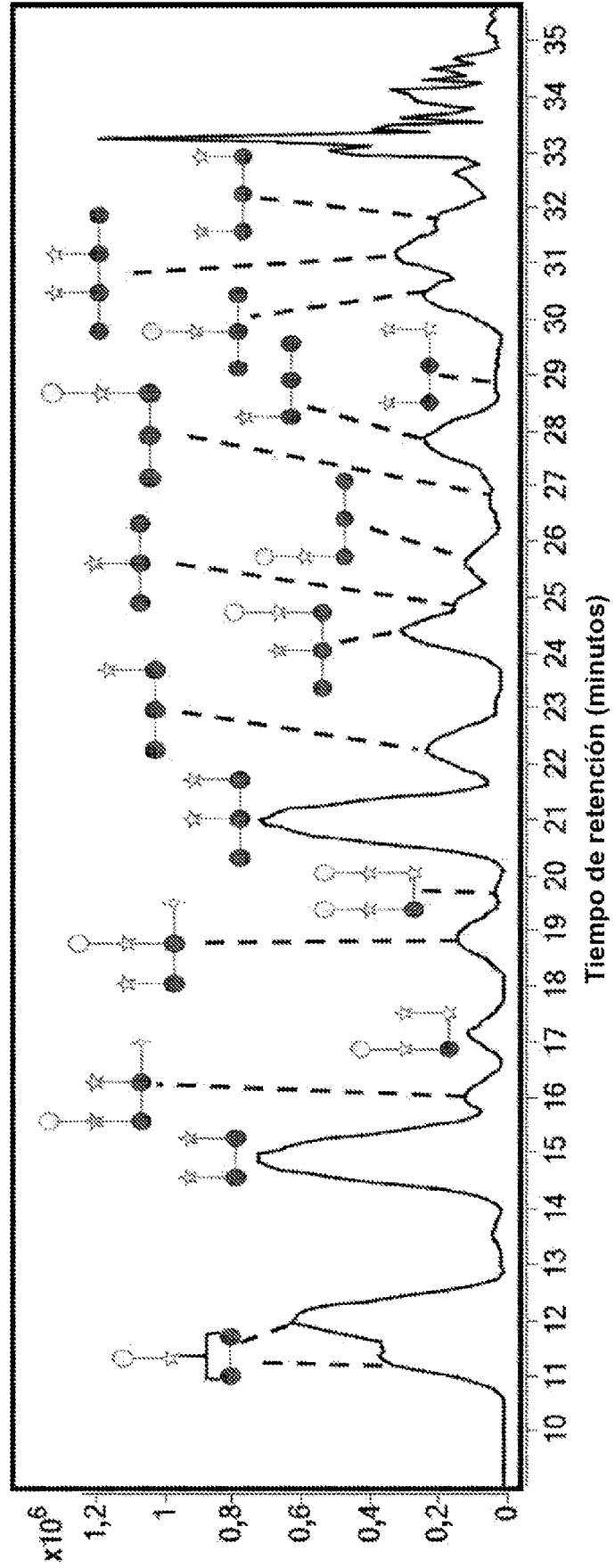
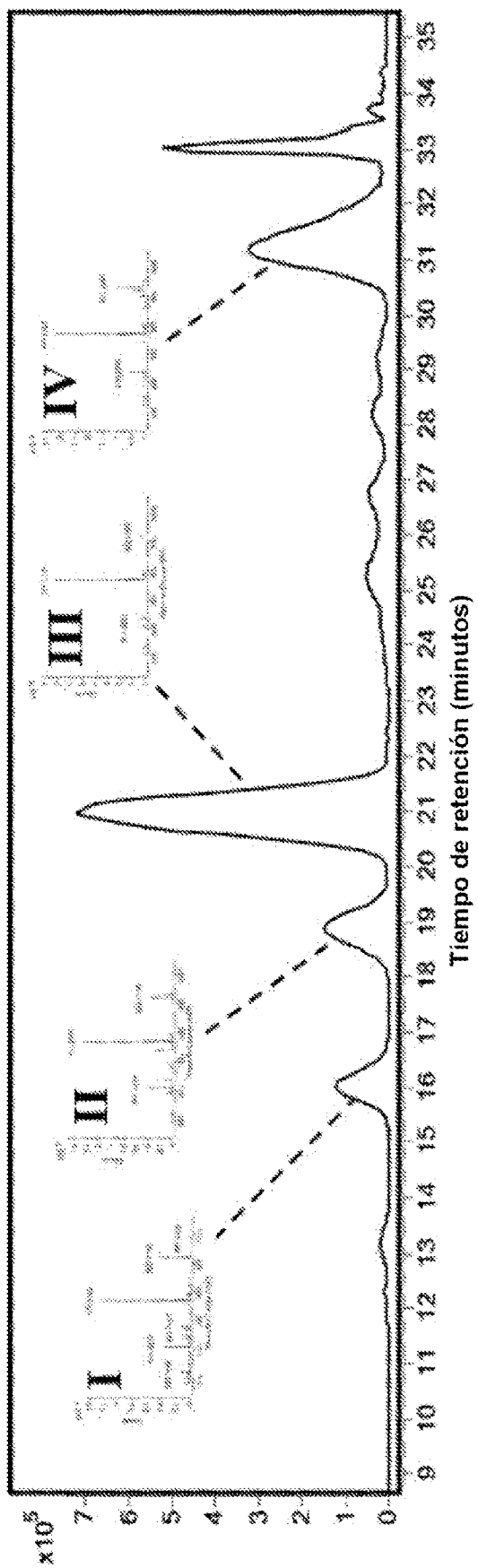


FIG. 1B



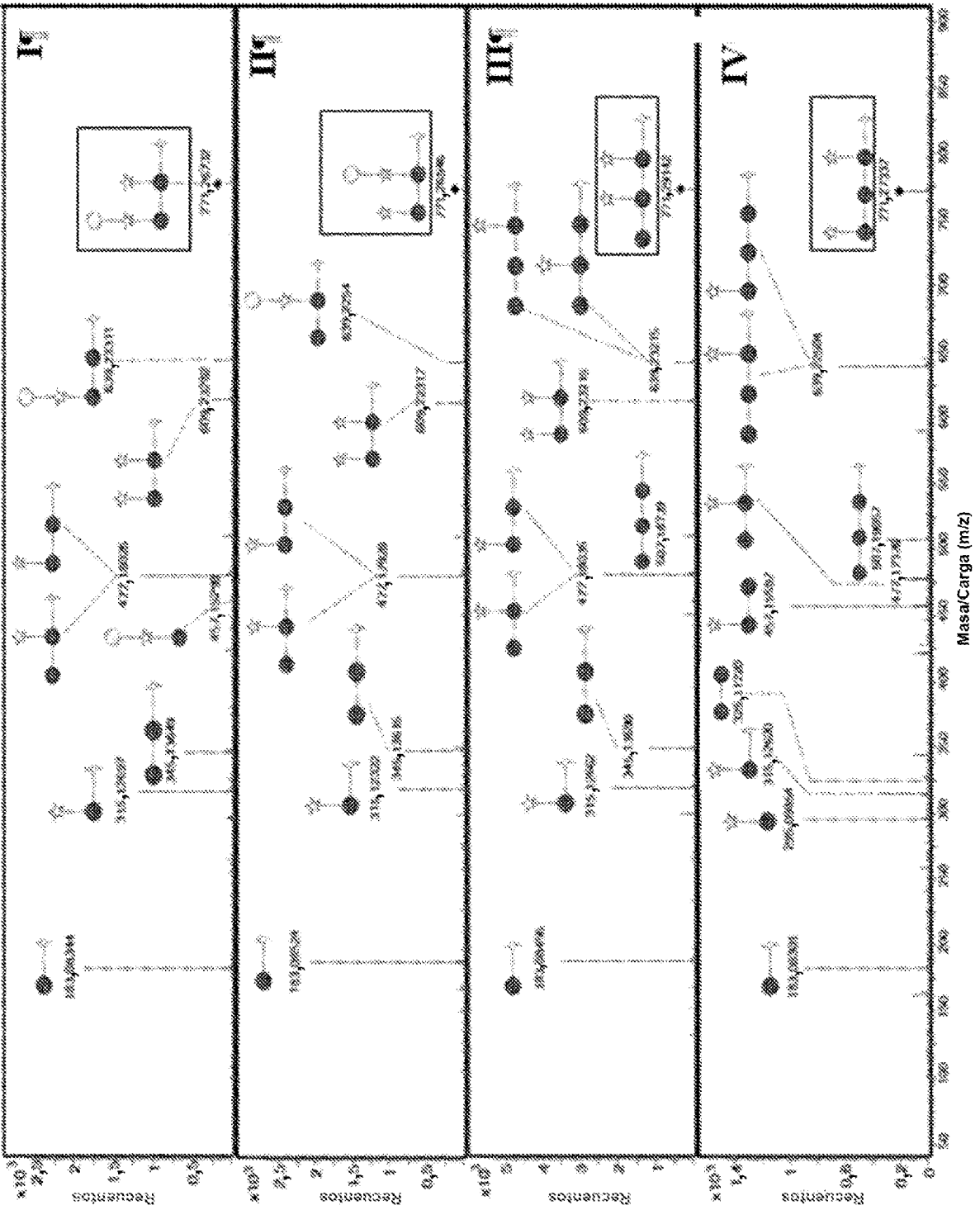
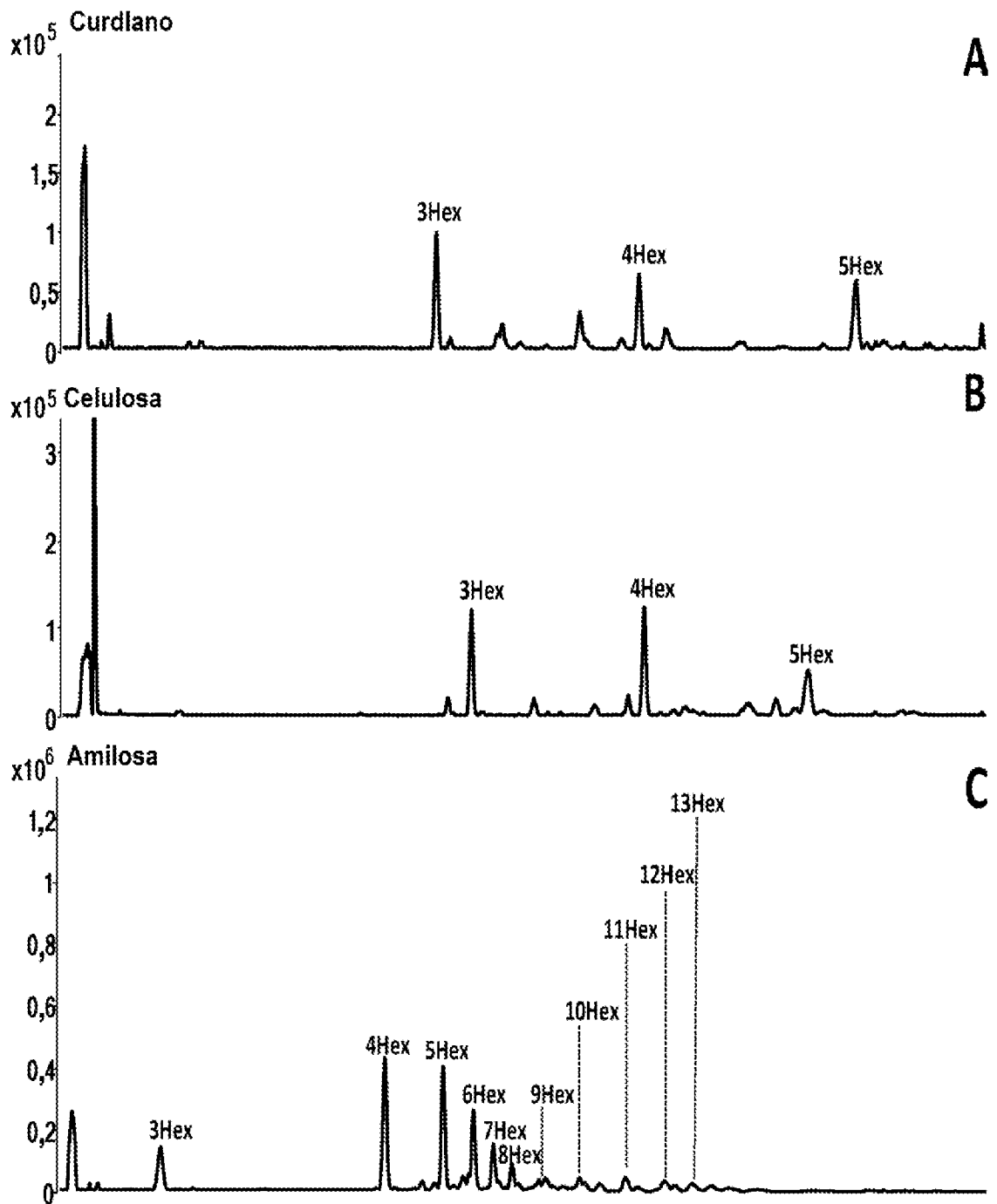
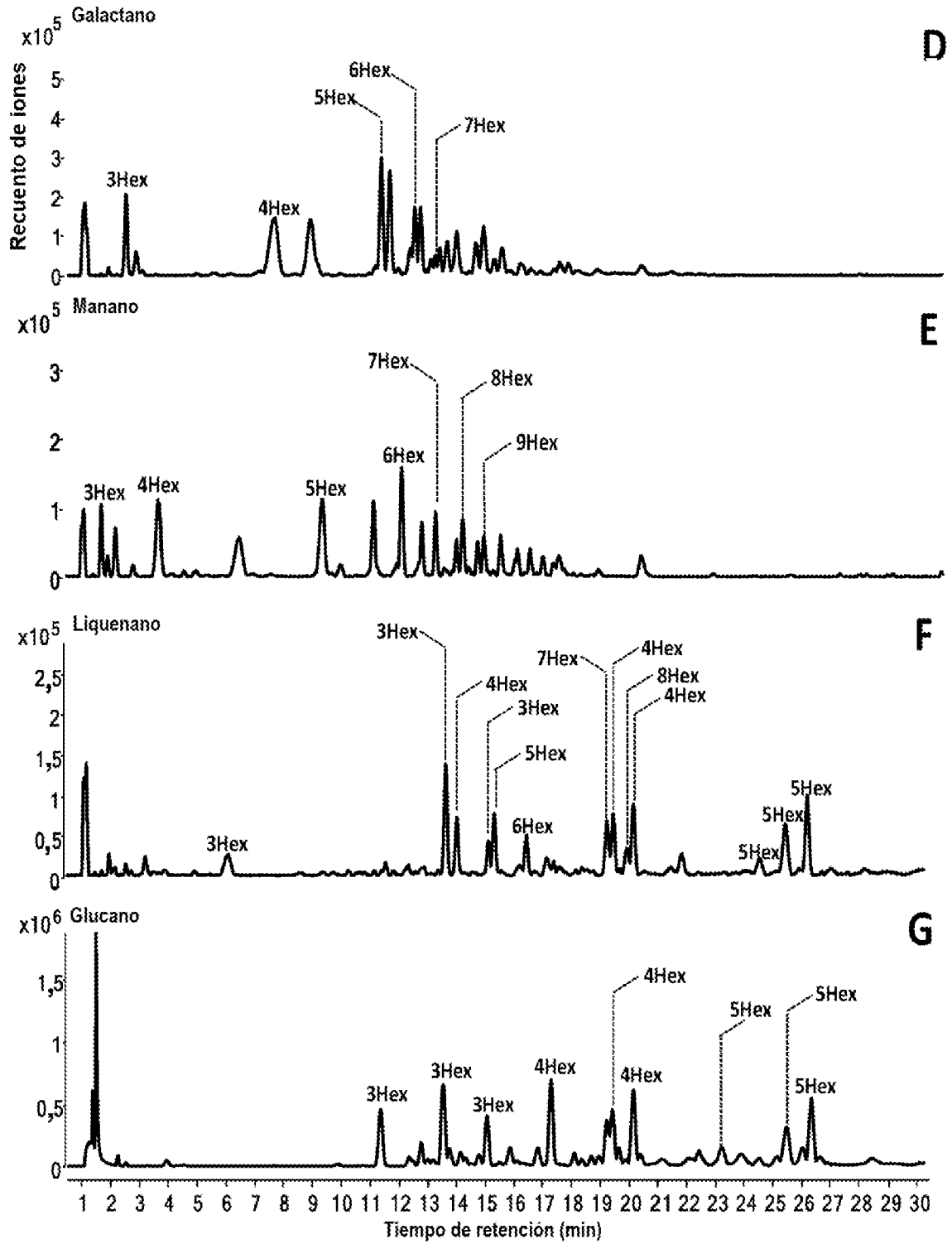


FIG. 1C

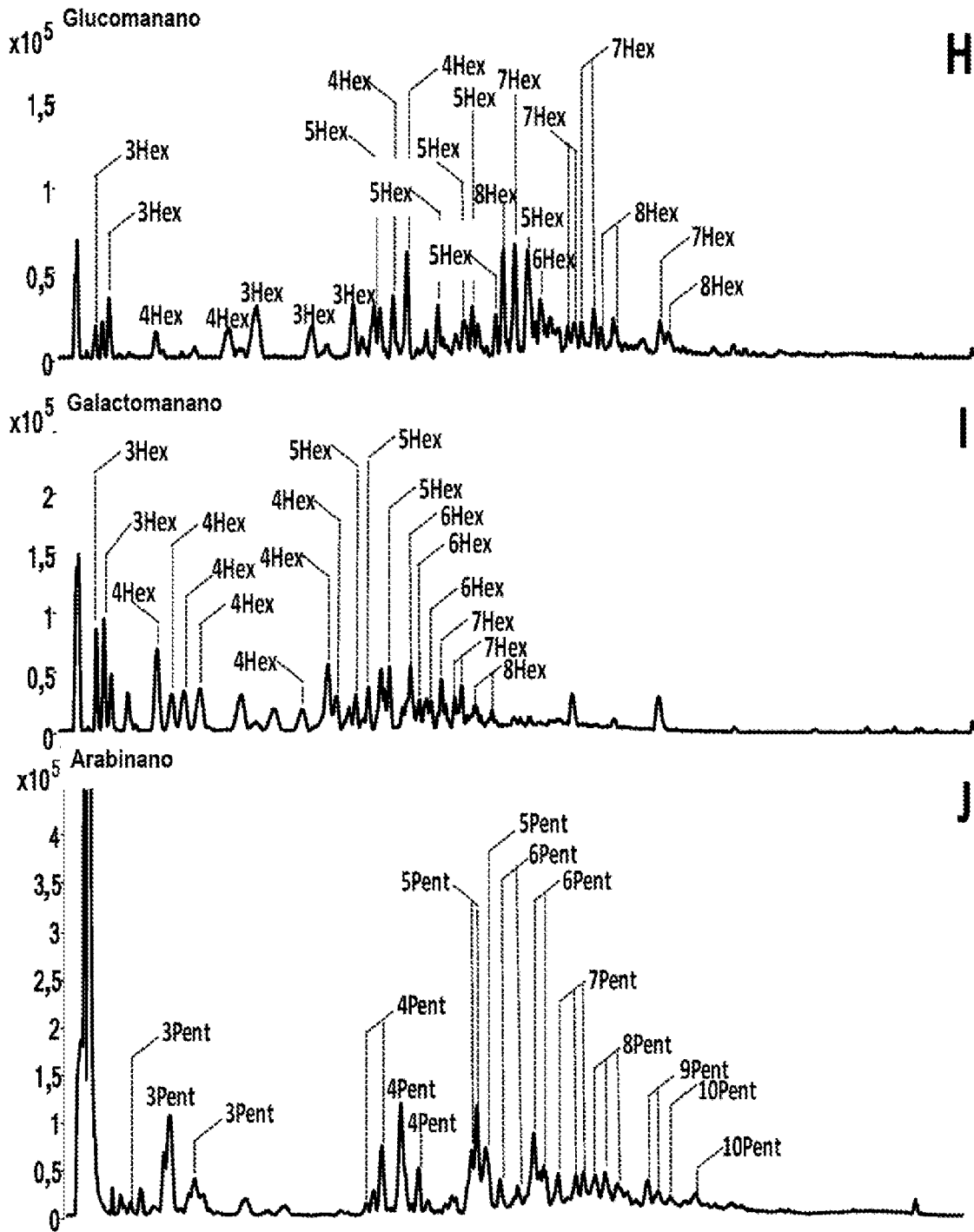
FIGS. 2A-2C



FIGS. 2D-2G



FIGS. 2H-2J



FIGS. 2K-2N

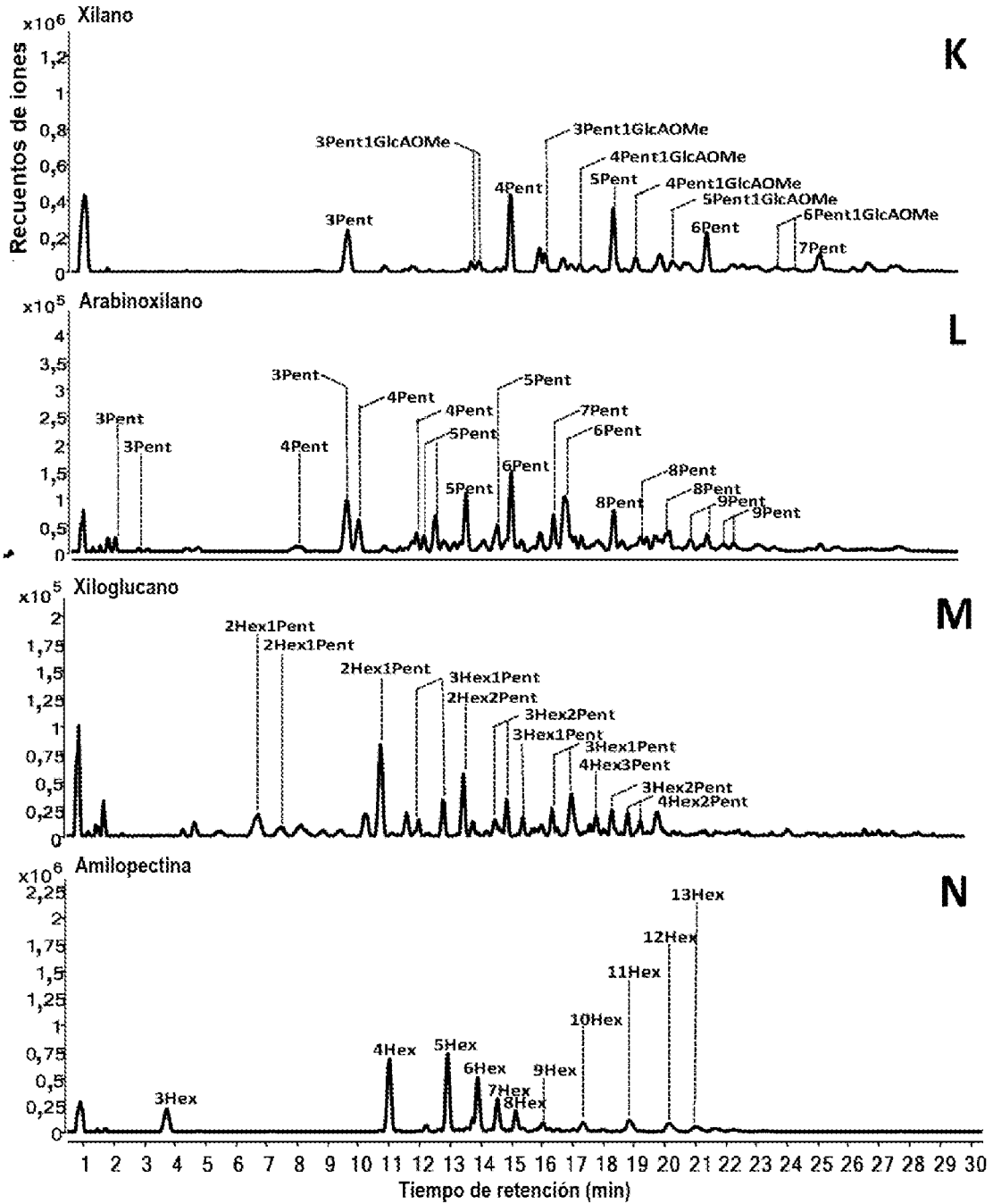


FIG. 3

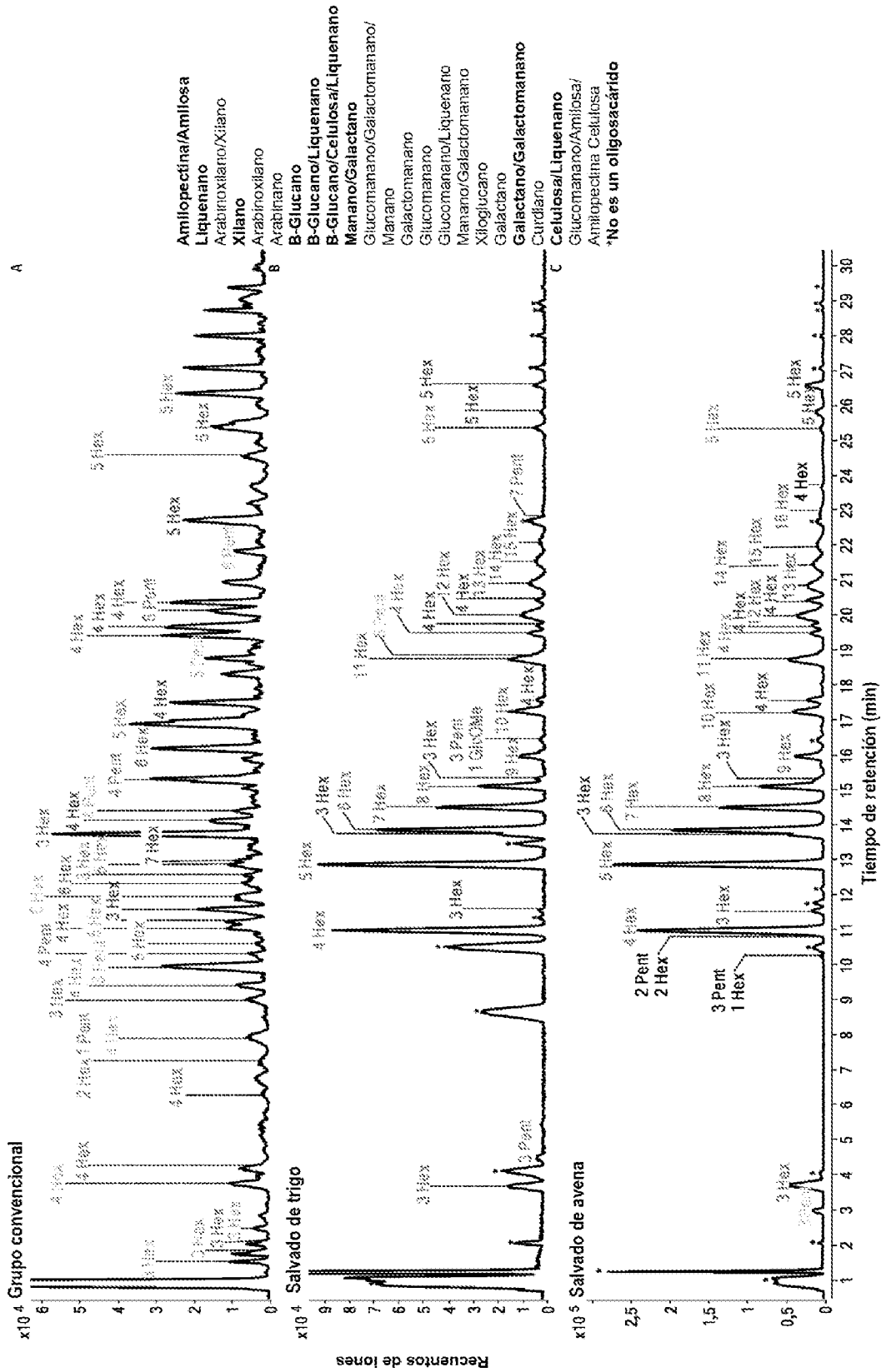


FIG. 4

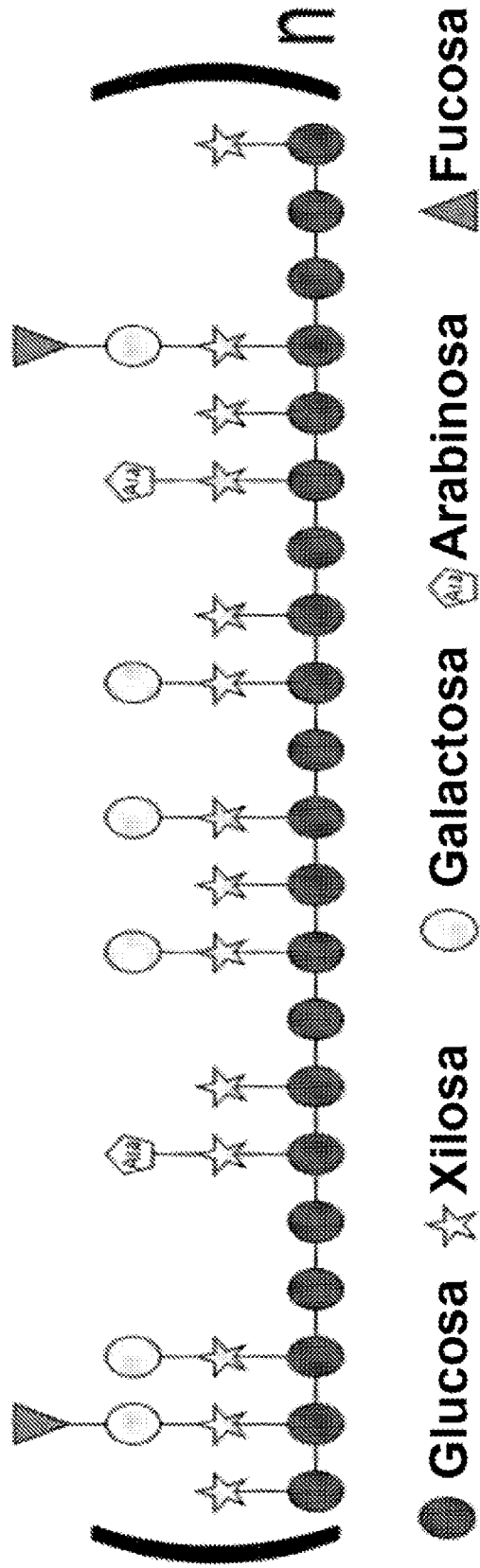


FIG. 5

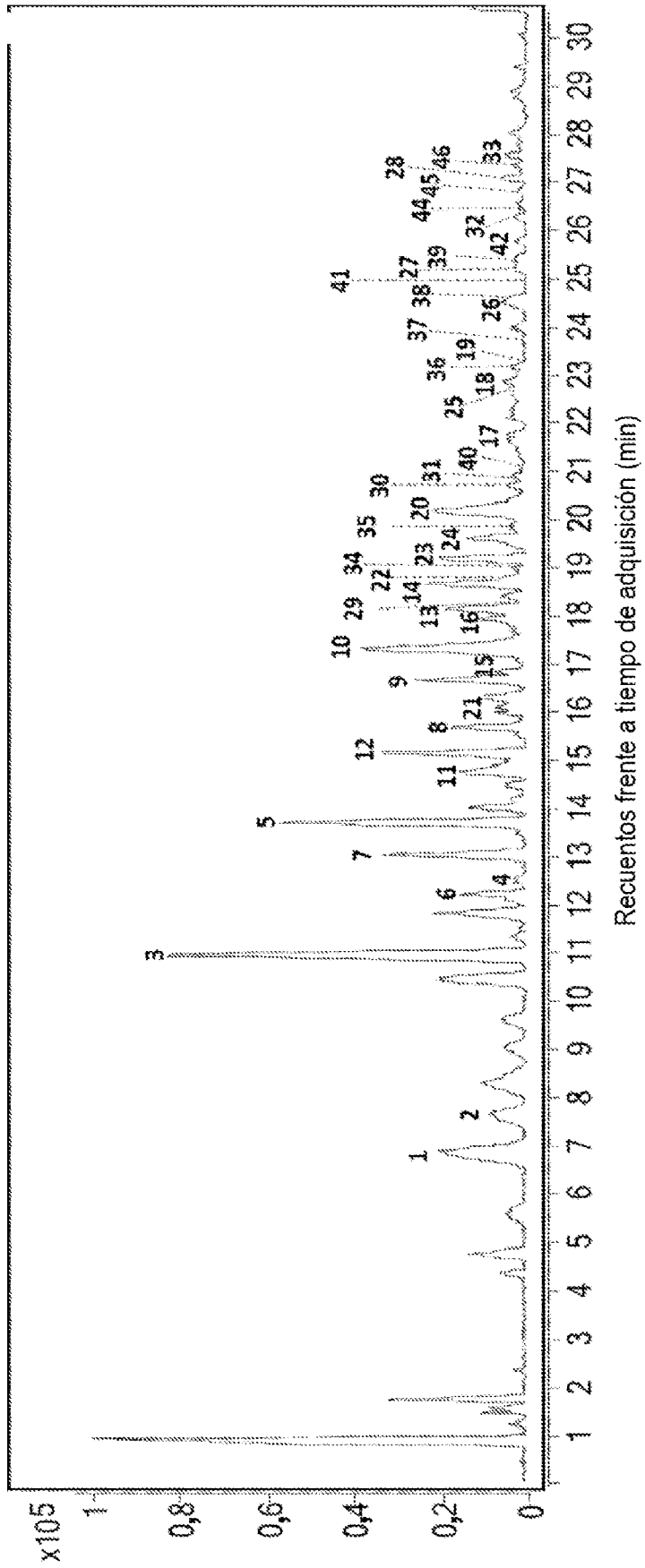


FIG. 6A

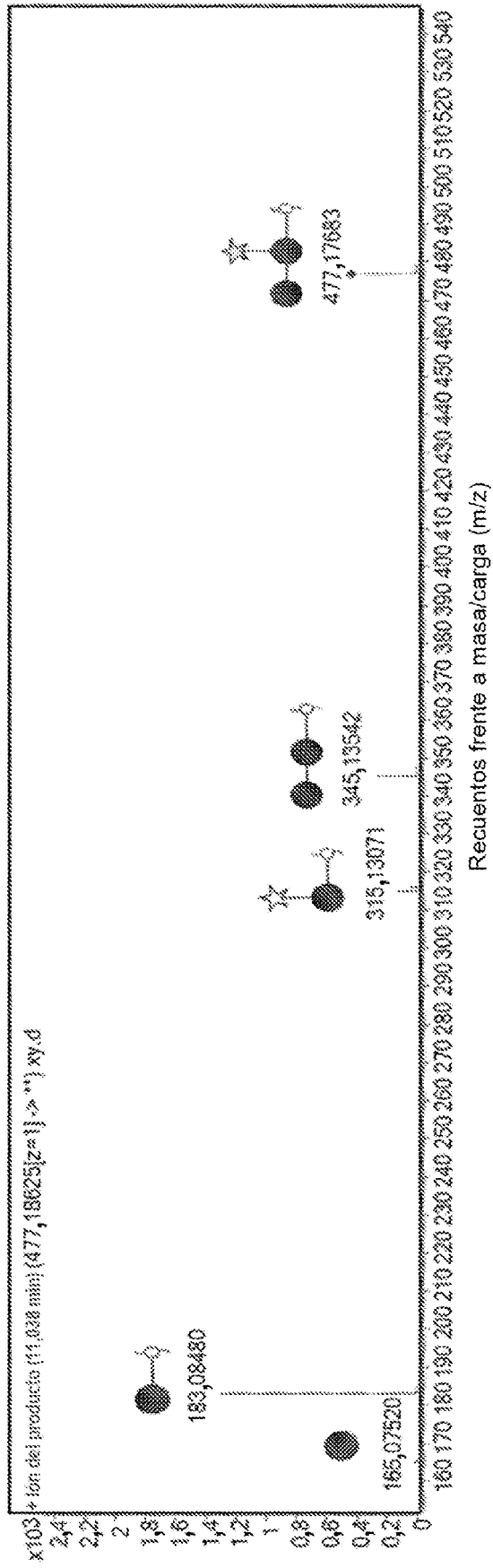


FIG. 6B

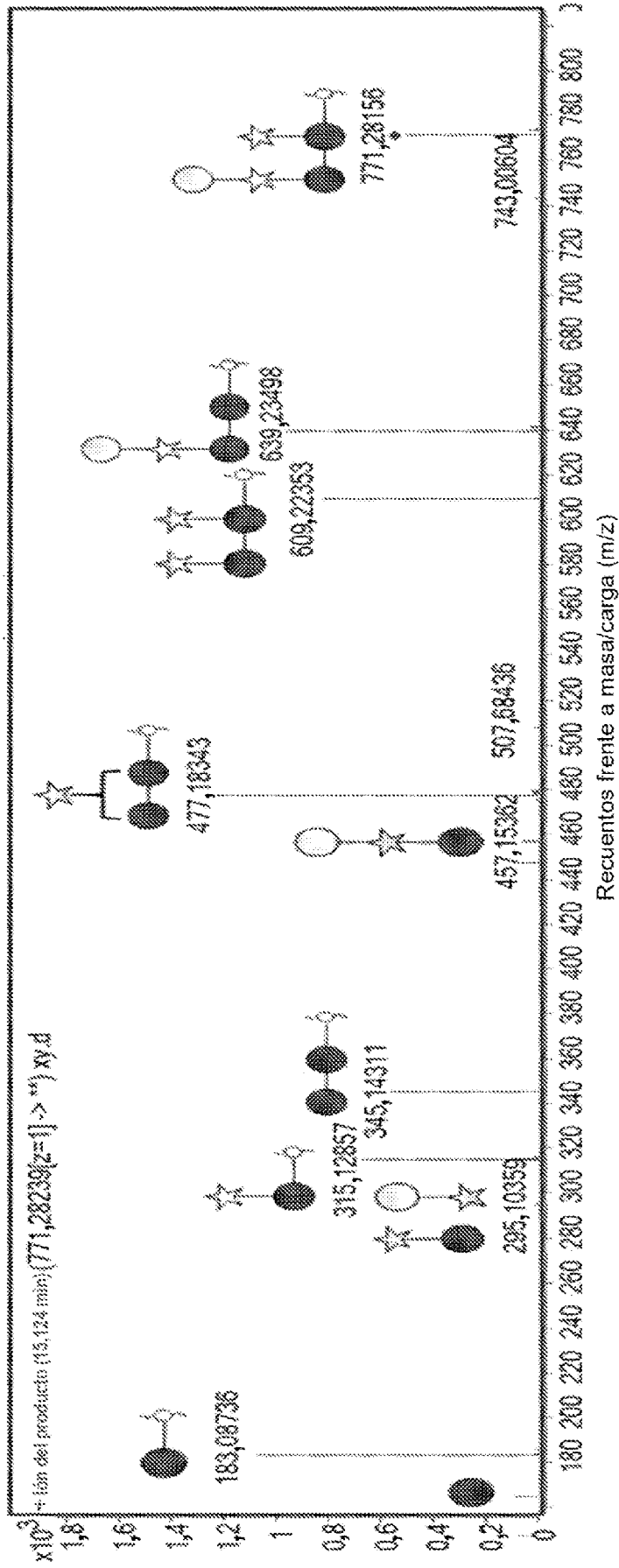


FIG. 6C

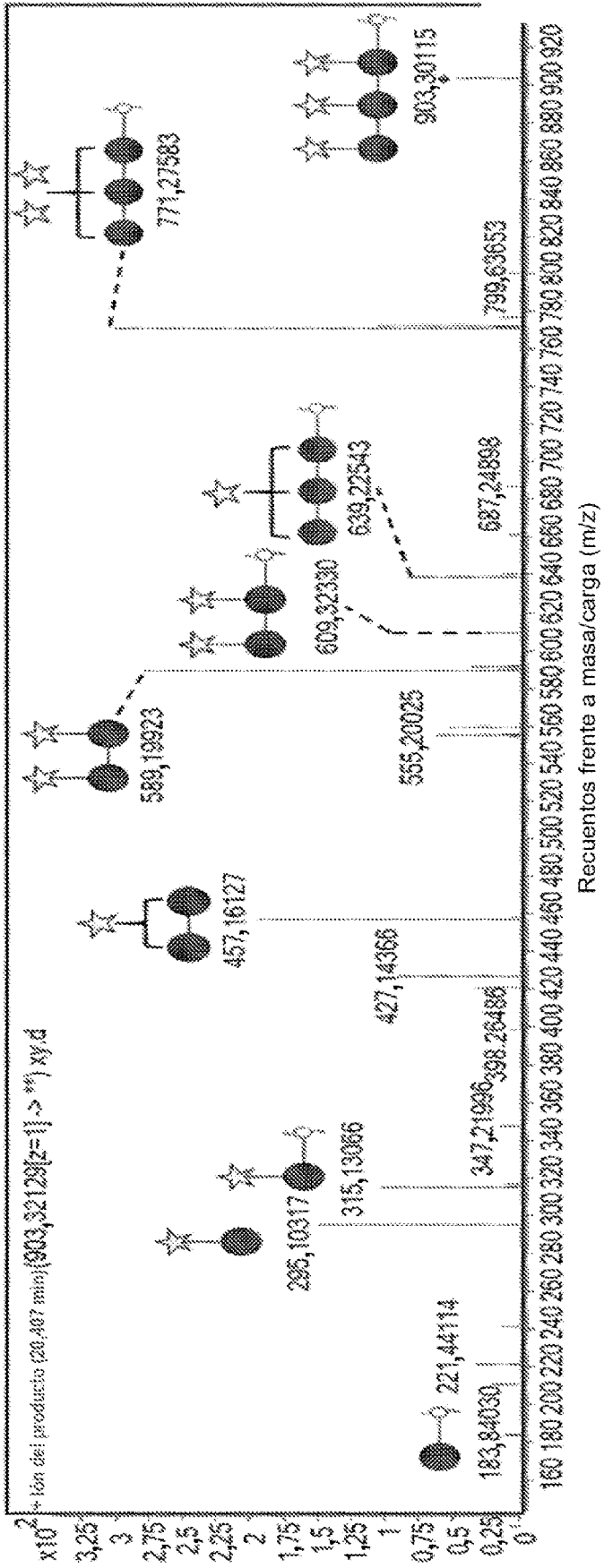


FIG. 6D

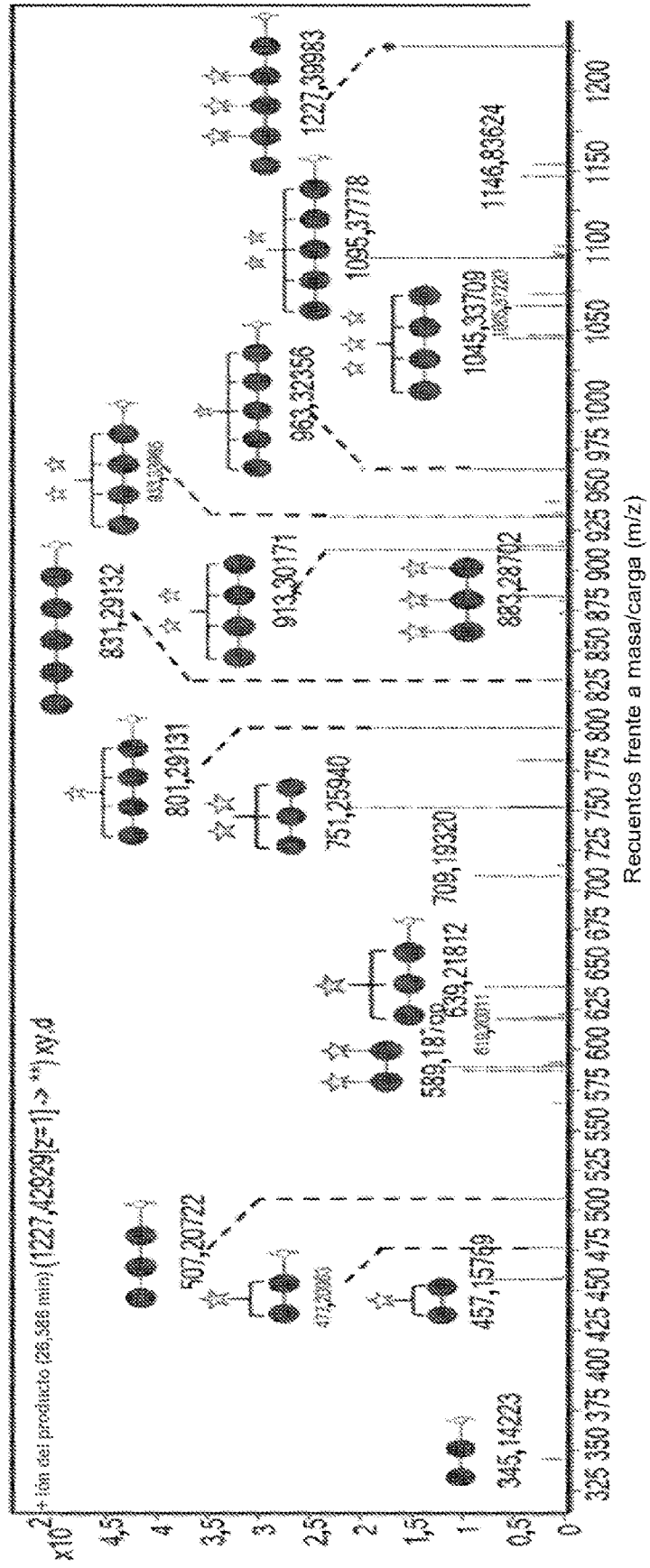


FIG. 7

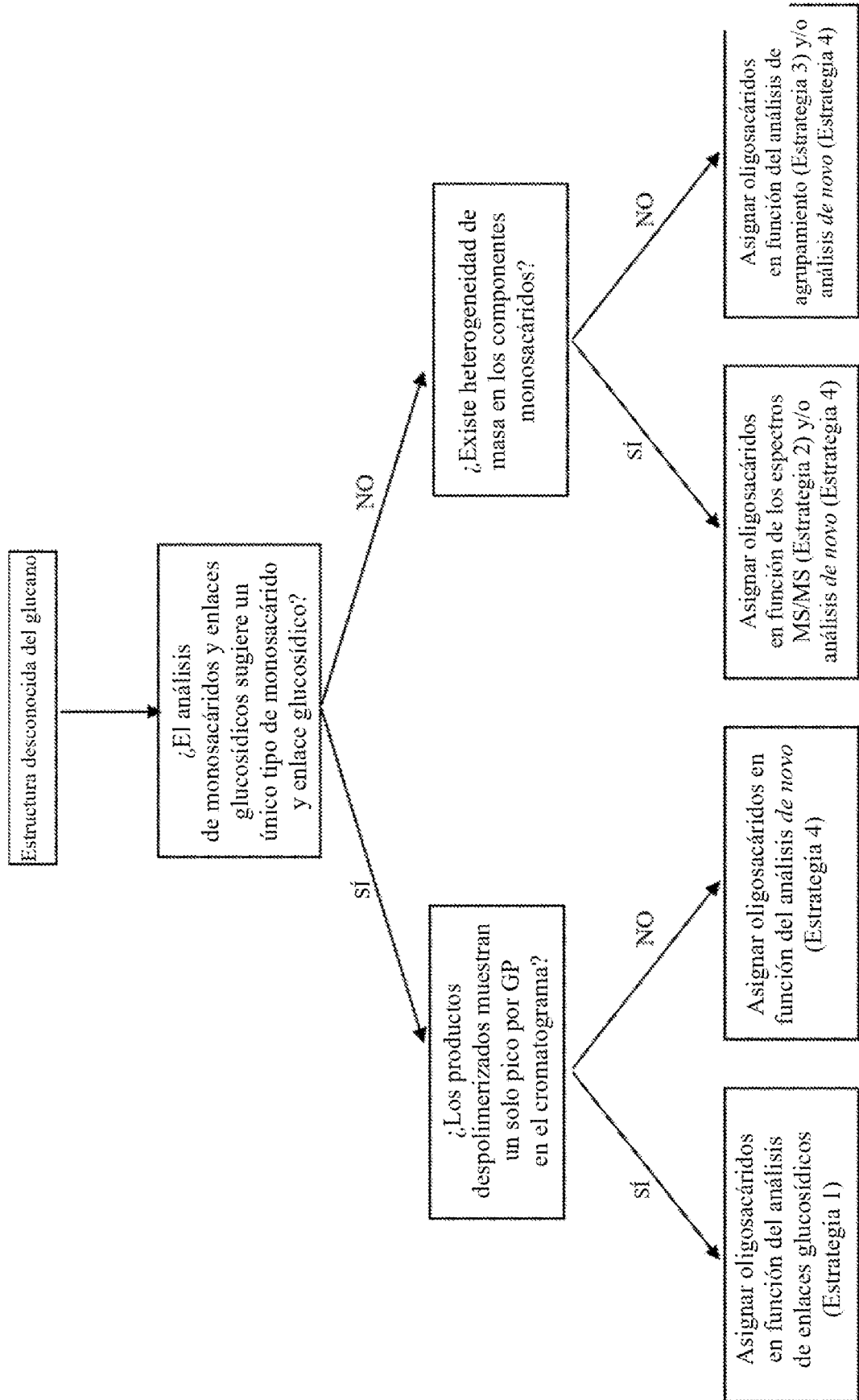


FIG. 8A

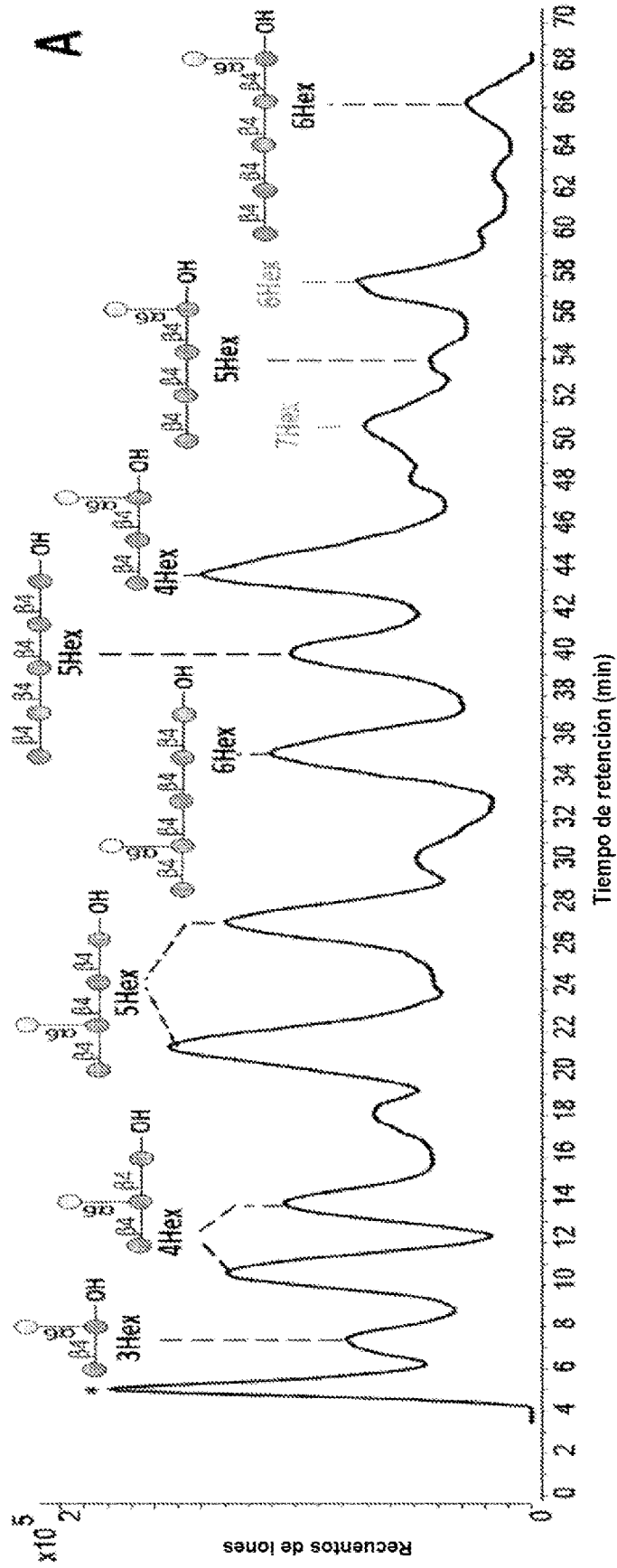


FIG. 8B

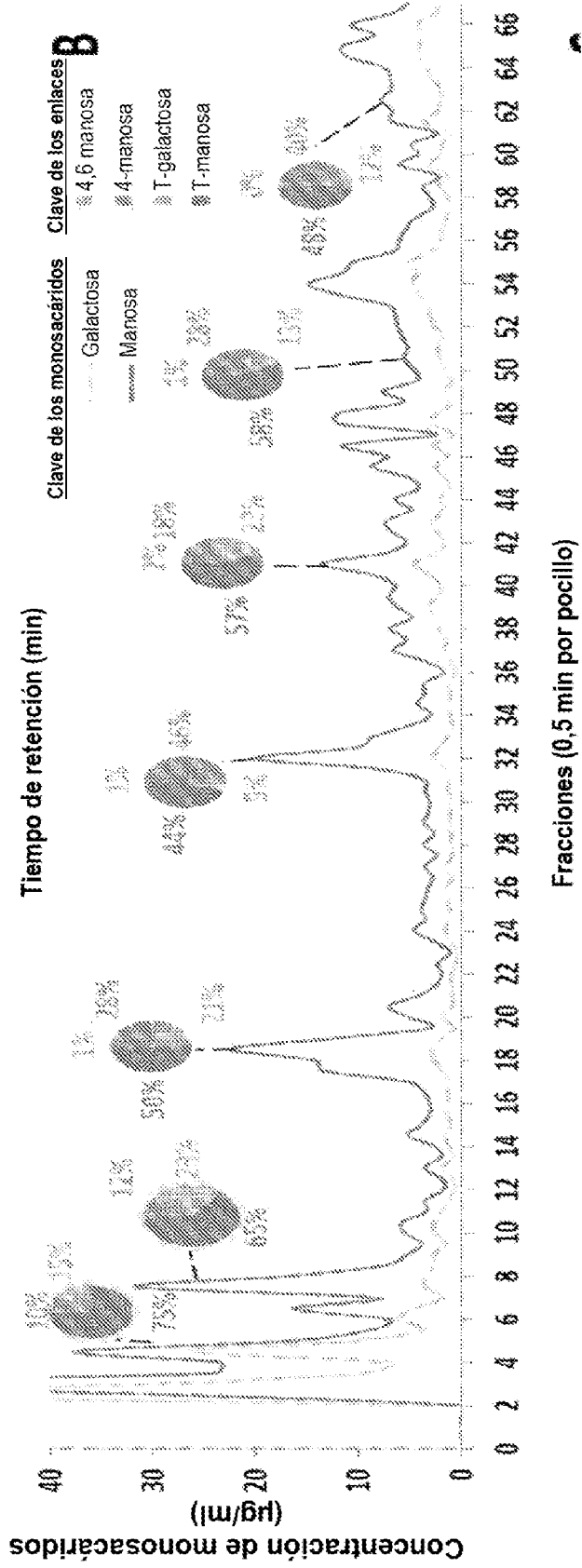


FIG. 8C

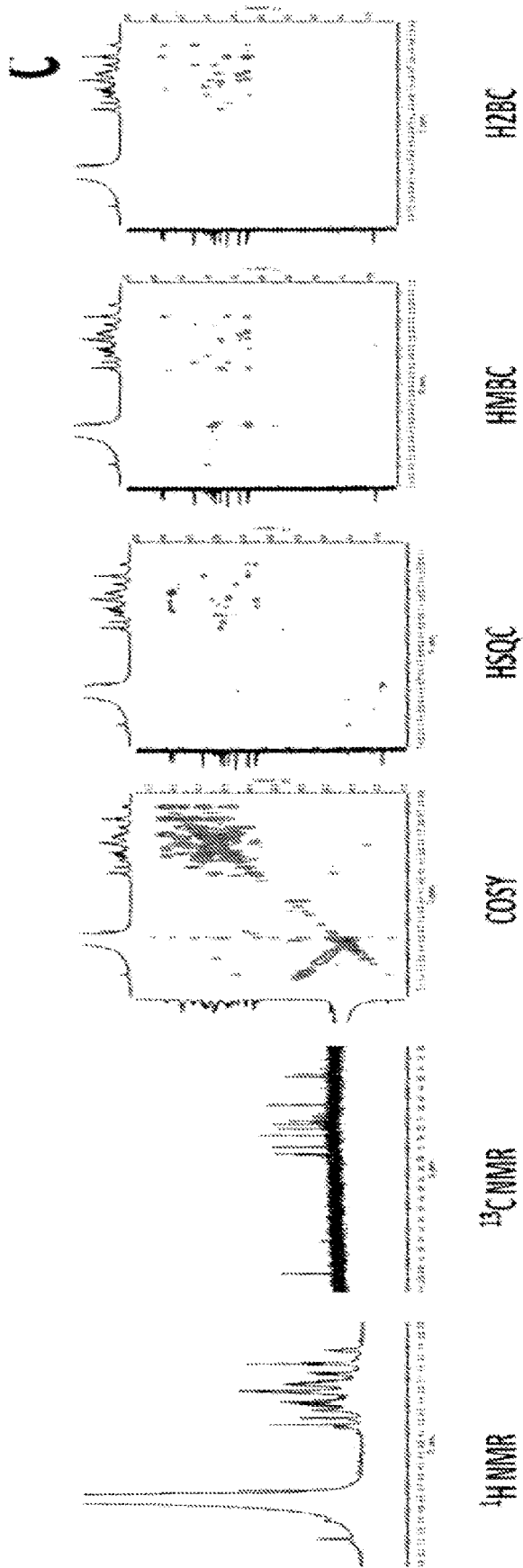


FIG. 8D

