



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110809474 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 11

(21) 申请号 201880041219.2

J·B·格曼 C·B·莱布拉

(22) 申请日 2018.06.19

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110809474 A

专利代理师 陶家蓉 杨昀

(43) 申请公布日 2020.02.18

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

A61K 31/715 (2006.01)

62/522,604 2017.06.20 US

C08B 37/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.19

(56) 对比文件

Guilloux等.Production of arabinoxylan oligosaccharides from flaxseed (linum ustiatiissimum).《J.Agric. Food Chem》.2009, 第57卷第11308-11313页.

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/038350 2018.06.19

Sun等.Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments.《Carbohydrate Polymers》.2000,第42卷(第2期),第111-122页.

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/236917 EN 2018.12.27

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州

审查员 黎彩云

(72) 发明人 M·J·阿米促茨 D·派克
A·G·加勒莫 D·A·迈尔斯

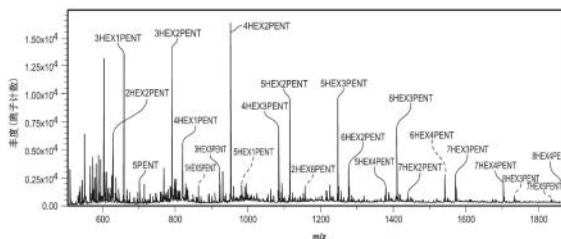
权利要求书1页 说明书12页 附图30页

(54) 发明名称

生物活性寡糖的生产

(57) 摘要

提供了产生寡糖的方法。



1. 一种从多糖产生寡糖的方法,该方法包括:

使多糖与金属催化剂和过氧化氢在pH5-6的范围内反应,其中金属催化剂选自铁、铜、锰、钴、钙或镁,形成反应混合物,其中过氧化氢浓度为至少0.02M和其中金属催化剂的浓度为至少0.65nM;然后

在反应混合物中加入碱淬灭反应,和/或切割多糖中的糖苷键,从而从多糖产生寡糖混合物,所述碱选自氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化钙,其中碱以至少0.1M加入;

其中使多糖与过氧化氢和金属催化剂反应的步骤反应20分钟或更长,所述反应在至少50°C温度下进行。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述金属催化剂选自铁、铜、锰、或钴。

3. 如权利要求1所述的方法,其中金属催化剂选自钙或镁。

4. 如权利要求1或2所述的方法,其中反应混合物中的金属催化剂浓度为0.65nM到500nM。

5. 如权利要求1所述的方法,其中反应混合物中的过氧化氢浓度为0.02M至1M。

6. 如权利要求1所述的方法,其中碱的浓度是0.1M-5.0M。

7. 如权利要求1所述的方法,其中多糖包括如下一种或多种:直链淀粉、胶淀粉、 β -葡聚糖、支链淀粉、木葡聚糖、阿拉伯半乳聚糖I和阿拉伯半乳聚糖II,聚鼠李糖半乳糖醛酸I、聚鼠李糖半乳糖醛酸II、半乳聚糖、阿拉伯聚糖、木聚糖、糖原、甘露聚糖、热凝多糖或菊糖。

8. 如权利要求1所述的方法,其中多糖包括阿拉伯木聚糖。

9. 如权利要求1所述的方法,其中多糖包括葡甘露聚糖。

10. 如权利要求1所述的方法,其中多糖来自植物或动物来源。

11. 如权利要求1所述的方法,其中多糖来自细菌、真菌或藻类来源。

12. 如权利要求1所述的方法,其中多糖是植物材料形式。

13. 如权利要求12所述的方法,其中植物材料是香蕉、鹰嘴豆或粟植物材料。

14. 如权利要求1所述的方法,还包括从寡糖混合物纯化一种或多种寡糖。

15. 如权利要求1所述的方法,其中在反应前,该方法包括使多糖与一种或多种多糖降解酶接触。

16. 如权利要求15所述的方法,其中一种或多种多糖降解酶包括淀粉酶、异淀粉酶、纤维素酶、麦芽糖酶、葡聚糖酶或其组合。

17. 如权利要求1所述的方法,其中使多糖与过氧化氢和金属催化剂反应的步骤反应20分钟至120分钟。

18. 如权利要求1所述的方法,其中使多糖与过氧化氢和金属催化剂反应的步骤中的反应混合物在pH为5的条件下进行。

19. 如权利要求1所述的方法,其中所述金属催化剂的浓度在0.65nM和65nM之间。

20. 如权利要求1所述的方法,其中所述寡糖混合物包括平均聚合度为3至20的寡糖。

21. 如权利要求2所述的方法,其中所述金属催化剂是 Fe^{3+} 或 Fe^{2+} 。

22. 如权利要求2所述的方法,其中所述金属催化剂是 Cu^{2+} 。

生物活性寡糖的生产

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2017年6月20日提交的美国临时专利申请号62/522,604的优先权,其通过引用纳入本文用于所有目的。

背景技术

[0003] 长3-20个单糖的糖分子短链称作寡糖,由于其生物活性特别令人感兴趣。这包括其作为益菌元,调节免疫系统,阻碍病原体在肠道中的粘附等能力[Hooper,L.V.;Midtvedt,T.;Gordon,J.I.,Annual review of nutrition 2002,22(1),283-307]。这些寡糖的最佳例子是人奶中产生的寡糖[LoCascio,R.G.等,Journal of agricultural and food chemistry 2007,55(22),8914-8919;Marcobal,A.等,Journal of agricultural and food chemistry 2010,58(9),5334;Wang,M.等,Journal of pediatric gastroenterology and nutrition 2015,60(6),825]。已知这些化合物具有在新生儿肠道中富集特定细菌的高度特异性。

[0004] 在从基于植物和动物产品收集寡糖上已有许多尝试。这些例子包括半乳寡糖(GOS)[Lamsal,B.P.,Journal of the Science of Food and Agriculture 2012,92(10),2020-2028]和果糖寡糖(FOS)[Yoshikawa,J.等,Biotechnology letters 2008,30(3),535-539]。这些产品目前用于营养和药物用途。

[0005] 除了人奶寡糖以外,在自然界不易找到短链未偶联寡糖链。此外,合成这些化合物非常昂贵,分离也相当困难,因为寡糖在大部分天然产品中丰度并不高。植物、细菌和酵母中天然存在非常丰富的多糖(即长度达100,000个单糖的糖分子),但它们太大,以至于没有生物活性。

[0006] 芬顿(Fenton)化学基于用铁催化剂产生羟基和过氧化氢自由基[Neyens,E.;Baeyens,J.,Journal of Hazardous materials 2003,98(1),33-50;Walling,C.,Accounts of chemical research 1975,8(4),125-131],这些自由基产物可进而氧化许多不同的底物[Kuo,W.,Water Research 1992,26(7),881-886;Lin,S.H.;Lo,C.C.,Water research 1997,31(8),2050-2056;Watts,R.J.等,Hazardous Waste and Hazardous Materials 1990,7(4),335-345;Zazo,J.等,Environmental science&technology 2005,39(23),9295-9302]。值得注意的是,芬顿氧化被用作分析工具,通过选择性切割各自的聚合物来测定核酸复合物和蛋白之间相互作用[Meares,C.F.等,Methods in enzymology 2003,371,82-106;Rana,T.M.;Meares,C.F.,Journal of the American Chemical Society 1990,112(6),2457-2458]。用或不用铁催化剂的碳水化合物氧化和氧化性降解已受到广泛关注,特别是在官能化淀粉和纤维素以及木材多糖降解上[Emery,J.A.等,Wood Science and Technology 1974,8(2),123-137;Xu,G.;Goodell,B.,Journal of Biotechnology 2001,87(1),43-57;Haskins,J.F.;Hogsed,M.J.,The Journal of Organic Chemistry 1950,15(6),1264-1274;Šelih,V.S.等,Polymer Degradation and Stability 2007,92(8),1476-1481;Parovuori,P.等,*Starch-Stärke* 1995,47(1),19-23]。

许多研究者对于单糖、二糖和寡糖的芬顿型氧化的机制和结果进行了研究。碳水化合物分子的芬顿氧化往往具有固有的特异性。已显示二糖比单糖和糖醇更易于被氧化[Morelli,R.等, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003,51(25),7418-7425],而(1→6)连接比(1→4)连接更不稳定[Uchida,K.;Kawakishi,S.,*Carbohydrate Research* 1988,173(1),89-99]。

[0007] 最近,芬顿系统被用于硫酸软骨素、肝素、和其他糖胺聚糖的解聚[Achour,O.等, *Carbohydrate Polymers* 2013,97(2),684-689;Li,J.-h.等,*Marine Drugs* 2016,14(9),170;Petit,A.C.等,*Carbohydrate Polymers* 2006,64(4),597-602;Wu,M.等, *Carbohydrate Polymers* 2010,80(4),1116-1124]。全部这些文献都使用艾杜糖醛酸或葡萄糖醛酸残基形式的含酸底物。

[0008] 发明概述

[0009] 提供了从多糖形成寡糖的方法。在一些实施方式中,该方法包括使多糖与过氧化氢以及 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 或其它本文所述的金属反应,然后用碱切开多糖中的糖苷键,从而从多糖产生寡糖。该反应在本文中称为“FITDOG”。

[0010] 我们开发了一种通过消化来自植物、细菌和酵母的多糖产生生物活性寡糖的方法。该方法使用由铁(Fe^{3+} , Fe^{2+})或其他过渡金属(包括但不限于 Cu^{1+} , Co^{2+} 等)和过氧化氢组成的芬顿试剂。在一些实施方式中,产生的寡糖在DP 3-20范围内(DP指聚合度)。在一些实施方式中,所述方法将产生寡糖用于分析和生物活性食物,如益生菌、抗癌、病原体阻断或具有其他功能的食物。

[0011] 该方法可用于将多糖(例如来自植物、细菌或酵母)转化成生物活性寡糖。该方法涉及多糖与 Fe^{3+} 和过氧化氢反应。其他金属离子,包括但不限于 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 也能以不同的效力产生相同结果。在一些实施方式中,使得反应进行30分钟(或例如10分钟至4小时,例如15分钟至2小时,或10分钟至1小时)。随后用碱(例如水性氢氧化钠、氢氧化钙、氢氧化钾等)淬灭反应。

[0012] 在一些实施方式中,可确定得到的寡糖性质。在一些实施方式中,产物混合物的高效液相层析-质谱(LC-MS)分析显示许多寡糖结构,其大小范围在聚合度3到20(或例如3-200),视多糖来源而定。寡糖结构和组成依赖于多糖来源。

[0013] 在一些实施方式中,提供了植物来源的寡糖(由聚合度(DP)为3-20(或例如3-200)组成)的生产。多糖可包括例如获自已知食物来源,例如水稻、香蕉、小果南瓜(squash)、小麦面粉的那些,以及作为食物生产副产品的多糖。在一些实施方式中,多糖可来自废食品产物和不常被认作食物的来源。在一些实施方式中,多糖来源是加工食品和植物产品。

[0014] 在一些实施方式中,该方法提供了从细菌细胞壁多糖产生寡糖(例如聚合度为DP 3-20(或例如3-200)的寡糖)。

[0015] 在一些实施方式中,该方法提供了从酵母胞壁多糖产生寡糖(例如聚合度为DP 3-20(或例如3-200)的寡糖)。

[0016] 在一些实施方式中,该方法提供了从藻类多糖产生寡糖(例如聚合度为DP 3-20(或例如3-200)的寡糖)。

[0017] 在一些实施方式中,寡糖是生物活性寡糖。在一些实施方式中,生物活性寡糖被对人类肠道有益的细菌消耗。在一些实施方式中,生物活性寡糖能调节免疫系统。寡糖能导致

免疫系统对已知或未知的刺激反应不足或过度。在一些实施方式中,生物活性寡糖的作用是阻断病原体。

[0018] 在一些实施方式中,寡糖是选择性碳底物,用于刺激土壤微生物群生长。在一些实施方式中,在土壤熏蒸或消毒后,在土壤中加入寡糖。如果不控制,可及的有机碳会驱动土壤生态学向病原体方向发展。通过提供选择性刺激有益土壤微生物群生长的特异性寡糖,能够减少土壤中的土壤病原体群落。在一些实施方式中,能在含有一种或多种微生物(例如有益土壤微生物)的土壤中加入本文所述制备的一种或多种寡糖的组合。

[0019] 在一些实施方式中,如本文所述制备的一种或多种寡糖可用于产生用于食物补剂的益生菌。在一些实施方式中,寡糖可用于过重和肥胖儿童的食欲控制和/或能量(热量)摄取。

[0020] 在一些实施方式中,提供了使用本文所述的反应条件从包含多糖的不溶性纤维产生可溶性纤维的方法。通过仅使反应运行到一定程度,能够产生具有理想特性的组合物(例如凝胶或软膏)。可溶性纤维产物可用于许多用途,包括但不限于医药产品和装置、食物产品(即增稠剂、营养改善物、风味调节剂)、土壤改良剂(用于富集特定的有益土壤微生物成分)和纤维生产(即新颖的织物、绳索、生物可降解包装等)。在一些实施方式中,例如不溶性纤维是棉。

[0021] 在一些实施方式中,提供了从多糖产生寡糖的方法。在一些实施方式中,该方法包括使反应混合物中的多糖与过氧化氢和过渡金属或碱土金属反应;然后用碱淬灭反应和/或用碱切割多糖中的糖苷键,由此产生来自多糖的寡糖混合物。在一些实施方式中,反应混合物包含过渡金属。在一些实施方式中,过渡金属选自铁(例如 Fe^{3+} , Fe^{2+})、铜(例如 Cu^{2+})、锰、钴或钼。在一些实施方式中,反应混合物包含碱土金属。在一些实施方式中,碱土金属选自钙或镁。

[0022] 在一些实施方式中,反应混合物中的过渡金属或碱土金属浓度是至少0.65nM。在一些实施方式中,反应混合物中的过渡金属或碱土金属浓度是0.65nM到500nM。在一些实施方式中,反应混合物中过氧化氢的浓度为至少0.02M。在一些实施方式中,反应混合物中过氧化氢的浓度为0.02M-1M。在一些实施方式中,碱是氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化钙。在一些实施方式中,碱浓度为至少0.1M。在一些实施方式中,碱浓度为0.1M-5.0M。在一些实施方式中,多糖包括一种或多种直链淀粉、胶淀粉(amylopectin)、 β -葡聚糖、支链淀粉(Pullulan)、木葡聚糖、阿拉伯半乳聚糖I和阿拉伯半乳聚糖II、聚鼠李糖半乳糖醛酸I、聚鼠李糖半乳糖醛酸II、半乳聚糖、阿拉伯聚糖、阿拉伯木聚糖、木聚糖(例如山毛榉木木聚糖)、糖原、甘露聚糖、葡甘露聚糖、热凝多糖(Curdlan)或菊糖。在一些实施方式中,多糖来自植物或动物来源。在一些实施方式中,多糖来自细菌或藻类来源。在一些实施方式中,多糖是植物材料(可任选冻干)形式。在一些实施方式中,植物材料是香蕉、鹰嘴豆或粟植物材料。在一些实施方式中,该方法还包括从寡糖混合物纯化一种或多种寡糖。

[0023] 在一些实施方式中,反应前,该方法包括使多糖与一种或多种多糖降解酶接触。在一些实施方式中,一种或多种多糖降解酶包括淀粉酶、异淀粉酶、纤维素酶、麦芽糖酶、聚葡萄糖酶或其组合。

[0024] 还提供了组合物,其包含上述或本文他处的方法产生的寡糖混合物或经纯化的一种或多种如上或本文他处所述的方法产生的一种或多种寡糖。

[0025] 还提供了表1中的寡糖或表1中的两种或多种寡糖的混合物。

[0026] 还提供了体内或体外刺激微生物的方法。在一些实施方式中,该方法包含使微生物(例如细菌、真菌、酵母)和包含上文或本文他处所述的方法产生的寡糖混合物(例如表1)或表中的寡糖的组合物在选择性刺激微生物生长的条件下接触。在一些实施方式中,微生物是益生元微生物。在一些实施方式中,微生物在动物肠道中,对动物施用组合物。在一些实施方式中,独立于组合物或与组合物一起,对动物施用益生元微生物。在一些实施方式中,益生元微生物是假链状双歧杆菌(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)。在一些实施方式中,微生物是土壤微生物、口腔微生物(例如细菌)或皮肤微生物(例如细菌)。

[0027] 定义

[0028] 寡糖的“聚合度”或“DP”指作为特定寡糖部分的糖单体单位总数。例如,四半乳-寡糖的DP为4,具有3个半乳糖部分和一个葡萄糖部分。

[0029] 术语“双歧杆菌”及其同义词指对人类具有益处的一个厌氧细菌属。双歧杆菌是组成肠道菌群的主要细菌菌株之一,其驻留在胃肠道内,对其宿主有健康益处。见例如 Guarner F和Malagelada JR. *Lancet* (2003) 361, 512-519中对于正常肠道菌群中的双歧杆菌的进一步描述。

[0030] “益菌元”或“益菌元营养物”通常是不可消化的食物成分,其被摄取时能通过选择性刺激胃肠道内一种或有限数量的微生物的生长和/或活性对宿主产生有益影响。本文所用的术语“益菌元”指非天然存在状态的(例如纯化后、化学或酶合成的,相对于例如在人全奶中)的上述不可消化的食物成分。

[0031] “益生元”指适量施用能够赋予宿主健康益处的活微生物。

[0032] 如本文所述的,当用于修饰数量值或范围限定的量时,术语“约”或“大约”指数值以及本领域技术人员已知的相对合理的偏差,例如 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 或 $\pm 5\%$,都在所述值的意义范围内。

[0033] 附图简要说明

[0034] 图1. FITDOG产生的木葡聚糖寡糖的示范性MALDI-MS。

[0035] 图2. 优化硫酸铁(III)浓度以获得最佳寡糖丰度。

[0036] 图3. 优化缓冲液pH以获得最佳寡糖丰度。

[0037] 图4. 优化NaOH和过氧化氢浓度。

[0038] 图5. 优化时间和温度条件。

[0039] 图6. 采用 CuCl_2 、 FeSO_4 和 $\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2$ 产生的来自绿豌豆(*green split pea*)的寡糖的HPLC-MS谱。

[0040] 图7. 经历FITDOG处理的食物相关单糖组成。

[0041] 图8. 经历FITDOG处理的香蕉皮、鹰嘴豆和栗的有标注的基峰色谱图。标注对应于表1中命名的化合物。

[0042] 图9. 假链状双歧杆菌MP80在芬顿氧化胡桃南瓜产生的寡糖上的生长。

[0043] 图10显示了木聚糖标注的基峰色谱图。

[0044] 图11显示了阿拉伯木聚糖标注的基峰色谱图。

[0045] 图12显示了地衣聚糖标注的基峰色谱图。

[0046] 图13显示了半乳甘露聚糖标注的基峰色谱图。

- [0047] 图14显示了胶淀粉标注的基峰色谱图。
- [0048] 图15显示了直链淀粉标注的基峰色谱图。
- [0049] 图16显示了聚鼠李糖半乳糖醛酸I标注的基峰色谱图。
- [0050] 图17显示了木葡聚糖标注的基峰色谱图。
- [0051] 图18显示了热凝聚糖标注的基峰色谱图。
- [0052] 图19显示了半乳聚糖标注的基峰色谱图。
- [0053] 图20显示了甘露聚糖标注的基峰色谱图。
- [0054] 图21显示了葡萄糖甘露聚糖标注的基峰色谱图。
- [0055] 图22显示了落叶松阿拉伯半乳聚糖标注的基峰色谱图。
- [0056] 图23显示了聚半乳糖醛酸标注的基峰色谱图。
- [0057] 图24显示了菊糖标注的基峰色谱图。
- [0058] 图25显示了直链淀粉的标注的基峰色谱图,其中在FITDOG法中使用不同的金属。
- [0059] 图26显示了直链淀粉的标注的基峰色谱图,其中在FITDOG法中使用不同的金属。
- [0060] 图27显示了直链淀粉标注的基峰色谱图。
- [0061] 图28显示了酵母细胞壁多糖的标注的基峰色谱图。
- [0062] 图29显示了经历升规模FITDOG的胡桃南瓜的标注的基峰色谱图,显示1-200+六糖的聚合度。在纳米芯片-HPLC/Q-TOF质谱仪上分析该数据。4-7的六糖聚合度显示了最大丰度。

具体实施方式

[0063] 向特定寡糖基团的芬顿式引发 (Fenton's Initiation Toward Defined Oligosaccharide Groups, FITDOG) 是多糖受控降解成寡糖的方法。在一些实施方式中,粗多糖首先经历过氧化氢和过渡金属或碱土金属(例如硫酸铁(III)) 催化剂的引发氧化处理,使得糖苷键更不稳定。然后用NaOH或其他碱进行碱诱导性切割,得到各种寡糖。立即进行中和以减少剥落反应(peeling reaction)。该方法能够从各种碳水化合物来源产生大量生物活性寡糖。

[0064] 如需要,可任选地用一种或多种多糖降解酶处理多糖,以减小多糖的平均大小或复杂度,然后用氧化性处理和金属催化剂处理得到的多糖。多糖酶的非限制性例子包括例如淀粉酶、异淀粉酶、麦芽糖酶、葡聚糖酶或其组合。

[0065] 初始氧化处理可包括过氧化氢和过渡金属或碱土金属。已测试不同氧化态、大小、周期元素表的族和配位数的金属以理解FITDOG过程的应用。在FITDOG反应中每种不同的金属显示活性。虽然这些金属对于任何多糖都可用,可用不同的金属产生具有优势聚合度的寡糖。氧化处理后用碱处理。该方法能够从具有不同程度分支和具有不同单糖组成的多糖,包括天然和改性多糖产生寡糖。该方法对任何来源的多糖有效。示范性多糖底物包括但不限于以下一种或多种:直链淀粉、胶淀粉、 β -葡聚糖、支链淀粉、木葡聚糖、阿拉伯半乳聚糖I和阿拉伯半乳聚糖II、聚鼠李糖半乳糖醛酸I、聚鼠李糖半乳糖醛酸II、半乳聚糖、阿拉伯聚糖、阿拉伯木聚糖、木聚糖(例如山毛榉木木聚糖)、糖原、甘露聚糖、葡甘露聚糖、热凝多糖或菊糖。

[0066] 在一些实施方式中,该方法产生的所得寡糖混合物可具有2-200,例如在2-100或

3-20或5-50之间的平均聚合度。

[0067] 该方法产生的所得寡糖混合物可具有多种用途。在一些实施方式中,可用寡糖混合物作为益菌元选择性刺激一种或多种益生菌的生长。在一些实施方式中,可施用寡糖组合物作为益菌元制剂(即不含细菌)或作为益生元制剂(即包含所需的细菌例如本文所述的双歧杆菌)。一般来说,可用人或动物可摄取的任何食物或饮料制备含益菌元和益生元寡糖的组合物的制剂。示范性食物包括半液体稠度的那些,其允许本文所述的益菌元和益生元组合物的简便和均匀分散。然而,其他稠度(例如粉末、液体等)也可不受限制使用。因此,这些食品包括但不限于乳基制品,例如奶酪、乡村奶酪、酸奶和冰淇淋。加工水果和蔬菜,包括那些面向婴幼儿的,例如苹果酱或脱水豆和胡萝卜也适用于与本发明的寡糖联用。婴儿米粉例如基于大米或燕麦的米粉以及成人谷物例如Musilix(慕思里)也适合与寡糖联用。除了面向人消费的食物,也可用含益菌元和益生元寡糖的组合物补充动物饲料。

[0068] 或者,含益菌元和益生元寡糖的组合物可用于补充饮料。这些饮料的例子包括但不限于婴儿制剂,较大婴儿制剂,幼儿饮料,奶,发酵乳,果汁,基于水果的饮料和运动饮料等。许多婴儿和幼儿制剂是本领域已知的,而且是商业可得的,包括例如Carnation Good Start(雀巢营养子公司,Glendale,加州)和Mayfield乳业(Athens,田纳西州)生产的Nutrish A/B。婴儿或婴幼儿制剂的其他例子包括美国专利号5,902,617中公开的那些。组合物的其它有益制剂包括动物奶例如牛奶的补剂。

[0069] 或者,含益菌元和益生元寡糖的组合物可配制成丸剂或片剂,或包封入胶囊,例如明胶胶囊。片剂形式可任选包括例如一种或多种乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、磷酸钙、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、明胶、胶体二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸和其他赋形剂、着色剂、填料、粘合剂、稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、调味剂、染料、崩解剂和药学上相容的载体。扁囊剂或糖果形式可包括除了活性成分还含有本领域已知载体的有风味,例如蔗糖的组合物,以及在惰性基质中包含组合物的软锭剂,例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶乳液,凝胶等。含益菌元或益生元寡糖的制剂还可包含常规食物补充剂填充物和增量剂例如米粉。

[0070] 在一些实施方式中,含益菌元或益生元寡糖的组合物还含有非人蛋白质,非人液体,非人碳水化合物,或其他非人组分。例如在一些实施方式中,组合物包含牛(或其他非人)奶蛋白,大豆蛋白,水稻蛋白, β -乳球蛋白,乳清,大豆油或淀粉。

[0071] 含益菌元和益生元寡糖的组合物的剂量可根据个体需求变化,并将考虑诸如年龄(婴儿相对于成人)、体重、丧失肠道有益菌的原因(例如抗生素治疗、化疗、疾病或年龄)等因素。根据本说明书,施给个体的量应足以在肠道中随时间建立有益细菌集落。剂量大小也可由伴随包含益菌元或益生元寡糖的组合物给予的任何不良副作用的存在、性质和程度来决定。在一些实施方式中,剂量范围作为食物补剂是有效的,用于在肠道内重建有益细菌。在一些实施方式中,本发明寡糖组合物的剂量范围是约1微克/L到约25克/L的寡糖。在一些实施方式中,本发明的寡糖组合物的剂量范围是约100微克/L到约15克/L的寡糖。在一些实施方式中,本发明的寡糖组合物的剂量范围是约1克/L到约10克/L的寡糖。示范性的双歧杆菌剂量包括但不限于每剂约 10^4 到 10^{12} 集落形成单位(CFU)。另一个有利剂量是约 10^6 到 10^{10} CFU。

[0072] 可对任何需要的个体施用含益菌元或益生元寡糖的制剂。在一些实施方式中,个

体是婴儿或幼儿。例如在一些实施方式中,个体小于例如3个月、6个月、9个月、1岁、2岁或3岁。在一些实施方式中,个体在3-18岁之间。在一些实施方式中,个体是成人(例如18岁或更大)。在一些实施方式中,个体超过50、55、60、65、70或75岁。在一些实施方式中,个体具有免疫缺陷(例如患有AIDS或进行化疗的个体)。

[0073] 可用于本发明的益生元组合物的示范性双歧杆菌包括但不限于:长双歧杆菌亚种婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis*)、长双歧杆菌亚种长双歧杆菌(*B. longum* subsp. *Longum*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)和假链状双歧杆菌(*B. pseudocatenulatum*)。所用的双歧杆菌部分取决于目标消费者。

[0074] 应理解对于一些应用,在本文所述的制剂中包括其他双歧因子是有利的。这些额外的成分可包括但不限于低聚果糖,例如Raftilose (Rhone-Poulenc公司,Cranbury,新泽西州)、菊糖(Imperial Holly公司,Sugar Land,德克萨斯州)和Nutraflora (Golden Technologies公司,Westminister,科罗拉多州),以及乳糖、低聚木糖、大豆寡糖、乳果糖/乳糖醇和低聚半乳糖等。在一些应用中,可在制剂中包括其他有益细菌例如乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、瘤胃球菌(*Rumminococcus*)、艾克曼菌(*Akkermansia*)、拟杆菌(*Bacteroides*)、粪杆菌(*Faecalibacterium*)。

[0075] 本文所述的寡糖可用刺激任何种类的微生物。可由寡糖刺激的微生物的例子包括如土壤微生物(例如菌根真菌和细菌以及用作土壤接种物的微生物,例如固氮螺菌属(*Azospirillum* sp.)),口腔细菌(例如变异链球菌(*Streptococcus mutans*)、戈登链球菌(*Streptococcus gordonii*)、血链球菌(*Streptococcus sanguis*)和口腔链球菌(*S. oralis*))和皮肤细菌(例如痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*))和氨氧化细菌,包括但不限于亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*),亚硝化球菌(*Nitrosococcus*),亚硝化螺旋菌(*Nitrosospira*),亚硝化胞菌(*Nitrosocvstis*),亚硝化叶菌(*Nitrosolobus*)和亚硝化弧菌。

[0076] 在一些实施方式中,对需要的人或动物施用寡糖组合物。例如,在一些实施方式中,将寡糖组合物施给具有至少一种以下症状的人或动物:炎症性肠病综合征、便秘、腹泻、结肠炎、克罗恩氏病、结肠癌、功能性肠道障碍(FBD)、肠易激综合征(IBS)、过量硫酸还原细菌、炎症性肠病(IBD)和溃疡性结肠炎。肠易激综合征(IBS)的特征是腹痛和不适、胀气、和肠道功能改变、便秘和/或腹泻。有三种IBS:便秘型IBS(C-IBS)、交替IBS(A-IBS)和腹泻型IBS(D-IBS)。寡糖组合物对于例如抑制或延长溃疡病人的复发周期是有用的。可施用寡糖组合物来治疗或预防任何形式的功能性肠病,特别是肠易激综合征(IBS),例如便秘型IBS(C-IBS)、交替型IBS(A-IBS)和腹泻型IBS(D-IBS);功能性便秘和功能性腹泻。FBD是一些慢性或半慢性胃肠道疾病的总称,其结合有肠痛,肠功能紊乱和社交混乱。

[0077] 在其他实施方式中,寡糖组合物施给需要刺激免疫系统的对象和/或用于促进对细菌或酵母(例如念珠菌病(*Candidiasis*))感染或硫酸还原菌诱导的疾病的抗性。

[0078] 实施例

[0079] 实施例1

[0080] 从多糖通过解聚建立寡糖的能力是一诱人的解决方案。目前多糖有两种解聚方式,酸水解和用糖基水解酶酶处理。两种技术都有其自身的缺点,酸水解意味着产生大量单

糖和非常少量的寡糖。另一方面,酶处理能够产生大量寡糖,但每种糖基水解酶仅能依赖于连接位置、立体化学和周围环境的单糖排列在非常特异的位点进行切割。这意味着即使能够解聚特定多糖的酶是已知和可得的,它也不能大规模降解天然产品中存在的结构多变的多糖。

[0081] 虽然报道了纤维素和含酸多糖的解聚,但仍然需要一种能用芬顿系统有效解聚中性多糖的方法。另外,还没有报道过用芬顿系统从粗天然产品以高产率制备大量寡糖。下面的实施例的目的是显示芬顿式引发寡糖基团解离(FITDOG)的分析和制备规模的方法以及应用从多糖分离物和天然产品高产率产生寡糖。

[0082] 方法

[0083] 材料

[0084] 从当地超市获得食品。乙酸钠、过氧化氢(30%w/w)、氢氧化钠、五水硫酸铁(III)和冰醋酸都购自Sigma-Aldrich公司(St.Louis,MO)。

[0085] 小规模芬顿式引发寡糖基团解离(FITDOG)

[0086] 制备了含有95%(v/v)乙酸钠缓冲液(用冰醋酸调至pH5)、5%(v/v)过氧化氢(30%w/w)和65nM硫酸铁(III)的溶液。将该混合物涡旋并加到干的多糖标准品,以实现最终溶液为1mg/ml。反应在100℃孵育20分钟。反应后,加入一半反应体积的冷2M NaOH,涡旋,然后加入0.6%最初反应体积的浓乙酸用于中和。

[0087] 小规模FITDOG产生的寡糖的纯化

[0088] 用无孔石墨化碳筒(GCC-SPE)分离寡糖。用溶于0.1%(v/v)三氟乙酸(TFA)和纳米纯水的80%乙腈洗涤筒。装载寡糖,用5个柱体积的纳米纯水洗涤。用含0.05%(v/v)TFA的40%乙腈洗脱寡糖。

[0089] 大规模的芬顿式引发寡糖基团解离(FITDOG)

[0090] 冻干食品至完全干燥,用KRUPS F203研磨机(Millville,NJ)磨成细粉。将用冰醋酸调至pH5的40mM乙酸钠缓冲液的950ml溶液在装有冷水柱冷凝器的2升圆底烧瓶中煮沸。在烧瓶中加入1.0g磨碎冻干食品、32mg硫酸铁(III)和50ml30%(w/w)过氧化氢水溶液。搅拌使溶液反应20分钟。为了诱导切割,加入500ml冰冷2M NaOH,搅拌30秒,然后加入61.5ml冰冷冰醋酸中和反应。

[0091] 大规模FITDOG产生的寡糖的纯化

[0092] 滤过0.45 μ m聚偏氟乙烯(PVDF)滤膜除去絮结的铁。对于CombiFlash Rf200(Teledyne Isco)快速液相层析,使用自包装的50g多孔石墨化碳(PGC)快速液相层析(Flash-LC)柱。以7ml/分钟对柱加样。使用二相溶剂系统,其由以下组成A:纳米纯水,和B:乙腈(HPLC级)。用100%溶剂A以10ml/分钟洗涤样品20分钟,然后开始用溶剂B梯度(0%到80%)洗涤140分钟,然后在80%溶剂B等度维持20分钟。将洗脱液直接导至废料,除了将40-100分钟时的洗脱液收集入玻璃瓶。在旋转蒸发器上干燥收集的洗脱液1小时,除去乙腈。剩余的液体在冻干机上蒸发。

[0093] 基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)的分析

[0094] 样品在纳米纯水中重建。将1 μ l样品直接铺在不锈钢MALDI盘中。在其中加入0.3 μ l 0.01M NaCl和0.7 μ l 25mg/ml 2,5-二羟基苯甲酸,并用吸管头混合。然后真空干燥样品。样品在Bruker UltraFlex extreme MALDI-TOF/TOF仪上跑样。以阳性模式操作仪器,使用95%最

大激光功率。

[0095] 芯片-HPLC-纳米/四极飞行时间质谱(芯片-HPLC-纳米/Q-TOFMS)分析

[0096] 在纳米纯水中重建样品,然后用芯片-HPLC-纳米/Q-TOF MS分析。系统包括两个泵:一个毛细管泵用于上样,和一个纳米泵,用于分析分离。在该系统中,一台Agilent 1200系列HPLC和Agilent 6520Q-TOF质谱仪通过芯片数据集接口(chip cube interface)偶联。芯片含有40nl富集柱和75 μm ×43mm的分析柱,两根柱都用PGC装填。用3% (v/v) 乙腈/水+0.1%甲酸以4 μl /分钟的流速装样。色谱分离用以下的二相梯度进行:溶剂A:(3% (v/v) 乙腈/水+0.1%甲酸)和溶剂B:(90%乙腈/水+0.1%甲酸),流速为0.4 μl /分钟。梯度运行60分钟:1%B到5%B运行2分钟,然后5%到30%运行33分钟,然后30%到99%运行5分钟,然后在99%维持10分钟,然后从99%到1%运行1分钟,然后在1%维持9分钟,再进行下一次跑样。

[0097] 以阳性模式收集数据,并在m/z 118.086到2721.895范围内以内部校准离子校准。干燥气体设定为325 $^{\circ}\text{C}$,流速为5l/分钟。片段、分离器和Octapole 1RF电压分别设定为175、60和750伏。以0.63光谱/秒进行片段化。碰撞能量基于化合物质量,表达成(碰撞能量) = $1.8*(m/z) - 2.4$ 。

[0098] 单糖组成

[0099] 对干燥的胡桃南瓜和FITDOG寡糖如下进行单糖组成测试。简单说,用138 μl 纳米纯水重建10mg样品。加入大约100mg 1.4mm的不锈钢珠,在Next Advance Storm 24子弹混合器(Averill Park,NY)中剧烈撞击融解样品,并在100 $^{\circ}\text{C}$ 煮1小时。接着,加入68 μl 浓TFA形成4M溶液,100 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2小时。为了淬灭反应,加入800 μl 冰冷的纳米纯水,将溶液稀释1000倍。真空干燥50 μl 稀释的溶液。然后用3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮衍生干燥的样品,并干燥。然后在纳米纯水中重建样品,用氯仿提取两次,将水层用于分析。将样品注射入配有Agilent 6495QqQ MS的Agilent 1290Infinity II UHPLC。在Agilent Zorbax Eclipse Plus C18柱(2.1mm×150mm内径,1.8 μm 粒径)上进行分离。溶剂系统由以下组成:A:25mM乙酸铵,使用NH₄OH的5%乙腈/水溶液调节到pH 8.2。遵循所有其他的仪器参数。

[0100] 细菌摄取

[0101] 筛选几种细菌,大部分为双歧杆菌菌株的代谢FITDOG寡糖库的能力。为了实现该目的,在对数期晚期收集纯培养物,用于接种基础MRS,其含有下列不同的碳源:2%葡萄糖(阳性对照),2%和5%w/v的胡桃南瓜寡糖(BSL)以及无碳源(阴性对照)。培养物在37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧条件下孵育96小时,用Biotek读板计EON 120928C型(Biotek Instruments公司,Winooski,VT,USA)每30分钟监测其生长。振摇30秒后,在600nm测定吸光度,以监测生长。

[0102] 结果

[0103] FITDOG反应条件的优化

[0104] 在各种条件下用商业木聚糖(多糖)标准优化芬顿反应。用分析级FITDOG法依次优化硫酸铁(III)和过氧化氢的浓度、反应时间、温度、反应pH和淬灭NaOH浓度。用MALDI-TOF MS监测寡糖产物。用MS丰度直接获得相对寡糖浓度。用MALDI TOF-MS谱(图1)获得各产物的相对丰度。

[0105] 1. Fe₂(SO₄)₃浓度的优化

[0106] 浓度从0.0065nM到65nM变化,以优化硫酸铁(III)。小于0.65nM时未观察到寡糖丰度。图2显示随浓度提高了总体OS丰度。在约10nM Fe₂(SO₄)₃浓度时,信号达到最大,在65nM

稍有增加。因此,用后者浓度进行制备。

[0107] 2. 缓冲液pH的优化

[0108] 用乙酸钠缓冲液,加入对应于pH 2-12、以1pH单位递增的适当量的酸和碱(乙酸和NaOH(水溶液))优化pH条件。小于5的pH不产生可观察的量。pH5得到寡糖最大丰度,而超过6得到的丰度又非常小(图3)。因此我们选择pH5为最佳值。

[0109] 3. 过氧化氢和NaOH浓度。

[0110] 该方法的一个重要特征是使用碱性NaOH溶液终止反应。这一步对于产生丰富的寡糖产物是关键。为了优化条件,通过改变NaOH浓度、 H_2O_2 浓度和寡糖丰度使用全因素设计。NaOH的浓度为0、0.1、1.0、2.0和3.0M。 H_2O_2 的浓度是0.02、0.12、0.24和0.48M的过氧化氢。当没有NaOH加入时(0.0M,图4),在反应混合物中几乎没有或没有可检测的寡糖。类似的,当 H_2O_2 浓度低于0.02M时,也观察不到可检测的寡糖。当在溶液中没有加入 H_2O_2 ,则没有可检测的寡糖信号。基于该研究,我们发现2.0M NaOH和0.12M H_2O_2 能良好运行。

[0111] 4. 反应时间和温度

[0112] 也用全因素设计分析时间和温度。检测了0、20、40、60和120分钟的时间点。使用25、50、75和100°C的温度。在75°C以下观察到最小寡糖信号。在100°C观察到最大丰度,反应时间为20分钟。(图5)。

[0113] 5. 其他过渡金属的效果

[0114] 已显示芬顿型反应可用含Fe(III)、Fe(II)和Cu(II)的化合物进行。使硫酸铁(III)、硫酸亚铁(II)和氯化铜(II)与绿豌豆在先前优化的条件下反应。全部三种过渡金属产生寡糖(图6)。氯化铜(II)产生高丰度的长3-7个己糖的寡糖,而Hex4是丰度最高的寡糖。硫酸亚铁(II)也产生长3-7个己糖的寡糖,但丰度比起氯化铜(II)样品要低10倍。硫酸铁(III)产生长度为3-10个己糖的寡糖,丰度与氯化铜(II)相当或更高。该样品还产生了几种己糖异构体,包括三种Hex3异构体和两种Hex4异构体。我们从该数据发现不同的过渡金属和氧化态可从多糖产生寡糖。我们还发现不同的过渡金属可产生不同的寡糖分布,提示每种金属具有不同的特异性。

[0115] 芬顿反应在食物多糖上的应用

[0116] 用FITDOG处理粟、鹰嘴豆和香蕉皮,以显示不同的起始多糖产生的寡糖类型。图7显示的是用先前所述的方法测定的单糖组成。葡萄糖在所有食品中是最丰富的组分,然而对于香蕉皮,木糖和果糖更加丰富。对于鹰嘴豆,阿拉伯糖和半乳糖的丰度更高。粟主要含葡萄糖(95.17%) (图7)。这表明从FITDOG释放的己糖寡糖是由葡萄糖组成的。

[0117] 液相色谱-质谱色谱总结了三种多糖的结果(图8)。表1列出了峰及其寡糖组成。每个色谱图获得因其各自单糖组成不同而不同的峰。

[0118] 香蕉皮(上图)主要获得短寡聚物,包括三种Hex3异构体(己糖三糖A、B和S)。Hex或己糖可以是葡萄糖或果糖,但更可能是葡萄糖。最丰富的寡糖对应于Hex5(J)。还观察到Hex4异构体(F和H)。发现鹰嘴豆具有Hex2HexA1类别(D),HexA对应于己糖醛酸。观察到其他丰富的化合物Hex4(C、E、G)、Hex5(I)、Hex6(K)、和Hex7(N和P)。粟(下图)得到Hex4(C、E和G),低丰度Hex3。存在Hex5,对应于最大丰度的I,而K对应于Hex6。在L中观察到混合组合,其由Hex5PentA1组成,其中PentA代表戊糖醛酸。

[0119] 胡桃南瓜寡糖的益菌元活性

[0120] 检测了来自各种食物多糖FITDOG的几种寡糖的益菌元活性。以来自胡桃南瓜的寡糖为例。寡糖的概况与上面获得的相似。在这个例子中,假链状双歧杆菌MP80在芬顿氧化胡桃南瓜产生的寡糖上生长。与其他测试的菌株相反,假链状双歧杆菌MP80在胡桃南瓜寡糖2%和5%溶液上都能够生长。生长最终在5%溶液中的最大OD 0.962。胡桃南瓜寡糖中的生长显著比阴性对照(最大OD 0.378)要高,但比阳性对照低(图9)。由于其他测试的菌株没有在胡桃南瓜寡糖上生长,该结果显示这些寡糖选择性地使某些细菌生长。

[0121] 表1:对几种食物的FITDOG处理发现的丰度最高的化合物文库“X”代表发现化合物的食物。

化合物命名	保留时间	m/z	组成	香蕉皮	鹰嘴豆	粟
A	1.89	505.17	3Hex	X	X	X
B	2.3	505.17	3Hex	X		
C	2.8	667.26	4Hex		X	X
D	4.56	519.19	2Hex+1HexA		X	
E	5.05	667.23	4Hex		X	X
F	5.47	667.23	4Hex	X		
G	5.76	667.23	4Hex		X	X
H	6.18	667.23	4Hex	X		
I	8.54	829.28	5Hex		X	X
[0122] J	9.46	829.28	5Hex	X		
K	11.32	991.34	6Hex		X	X
L	12.92	959.31	5Hex +(1 戊糖醛酸)			X
M	13.83	887.29	5Hex+(76.02)			X
N	14.39	1153.39	7Hex		X	X
O	15.12	887.29	5Hex+(76.02)	X		
P	17.11	1049.34	6Hex+(76.02)		X	X
Q	17.41	521.17	2Hex+ (1HexA-2H)	X		
R	18.93	1301.43	7Hex +(1 戊糖醛酸)		X	
S	19.44	505.17	3Hex	X		
T	19.89	1211.39	7hex +(76.02)		X	

[0123] 实施例2

[0124] 下文结果显示FITDOG法在多糖的复杂混合物和纯多糖上的利用。多糖的复杂混合物包括胡桃南瓜(注意产生3-200的寡糖(图29))。该方法可用于酵母细胞壁(图28)。该方法也可用于纯化的多糖包括:木聚糖、黑麦阿拉伯木聚糖、地衣聚糖、半乳甘露聚糖、胶淀粉、直链淀粉、聚鼠李糖半乳糖醛酸I、木葡聚糖、热凝多糖、半乳聚糖、甘露聚糖、葡萄糖甘露聚糖、落叶松阿拉伯葡聚糖、聚半乳糖醛酸、菊糖(图10-24和27)。

[0125] 不同的金属被用于FITDOG法。它们包括Fe、Ni、Ca、Cu和Mg。它们产生具有不同DP分布的寡糖(图25-26)。

[0126] 材料:

[0127] 木聚糖、黑麦阿拉伯木聚糖、地衣聚糖、半乳甘露聚糖、直链淀粉、聚鼠李糖半乳糖醛酸I、木葡聚糖、热凝多糖、半乳聚糖、甘露聚糖、葡甘露聚糖、落叶松阿拉伯半乳聚糖、聚半乳糖醛酸和菊糖购自Megazyme (UK)。胶淀粉购自西格玛-奥德里奇公司(美国密苏里州圣路易斯)。

[0128] 乙酸钠、过氧化氢(30%w/w)、氢氧化钠、五水硫酸铁(III)、七水硫酸亚铁(II)、七水硫酸铜(II)、氯化亚铜(I)、硫酸锰(II)、七水硫酸钴(II)、硫酸镁、氯化钙、氯化镍(II)和

冰醋酸都购自西格玛-奥德里奇公司(美国密苏里州圣路易斯)。

[0129] 方法:

[0130] 寡糖生产

[0131] 制备了含有95% (v/v) 乙酸钠缓冲液(用冰醋酸调至pH5)、5% (v/v) 过氧化氢(30% w/w) 和65nM要研究的金属络合物的溶液。涡旋该混合物, 加到干的多糖标准品, 以实现最终溶液为1mg/ml。反应在100°C 孵育60分钟。反应后, 加入一半反应体积的冷2M NaOH, 涡旋, 然后加入0.6% 最初反应体积的冰醋酸用于中和。

[0132] 寡糖纯化

[0133] 用无孔石墨化碳芯(GCC-SPE) 分离寡糖。用溶于0.1% (v/v) 三氟乙酸(TFA) 和纳米纯水的80% 乙腈洗涤筒。装载寡糖, 用5个柱体积的纳米纯水洗涤。用含0.05% (v/v) TFA的40% 乙腈洗脱寡糖。

[0134] 应理解, 本文所述的实施例和实施方式仅用于说明目的, 本领域技术人员应了解据此作出的各种修饰或改变, 且它们包括在本申请的主旨和权益以及所附权利要求书的范围内。本文引用的所有发表物、专利和专利申请通过引用全文纳入本文以用于所有目的。

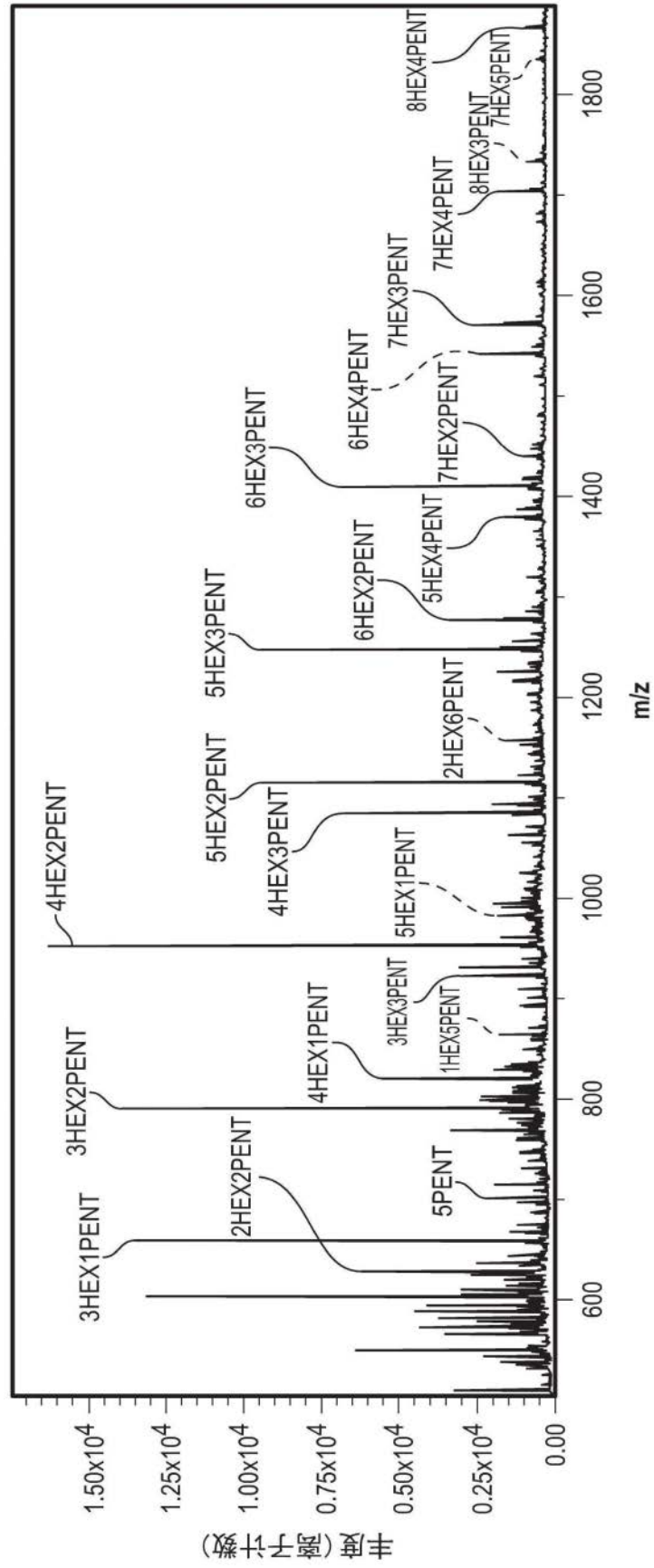


图1

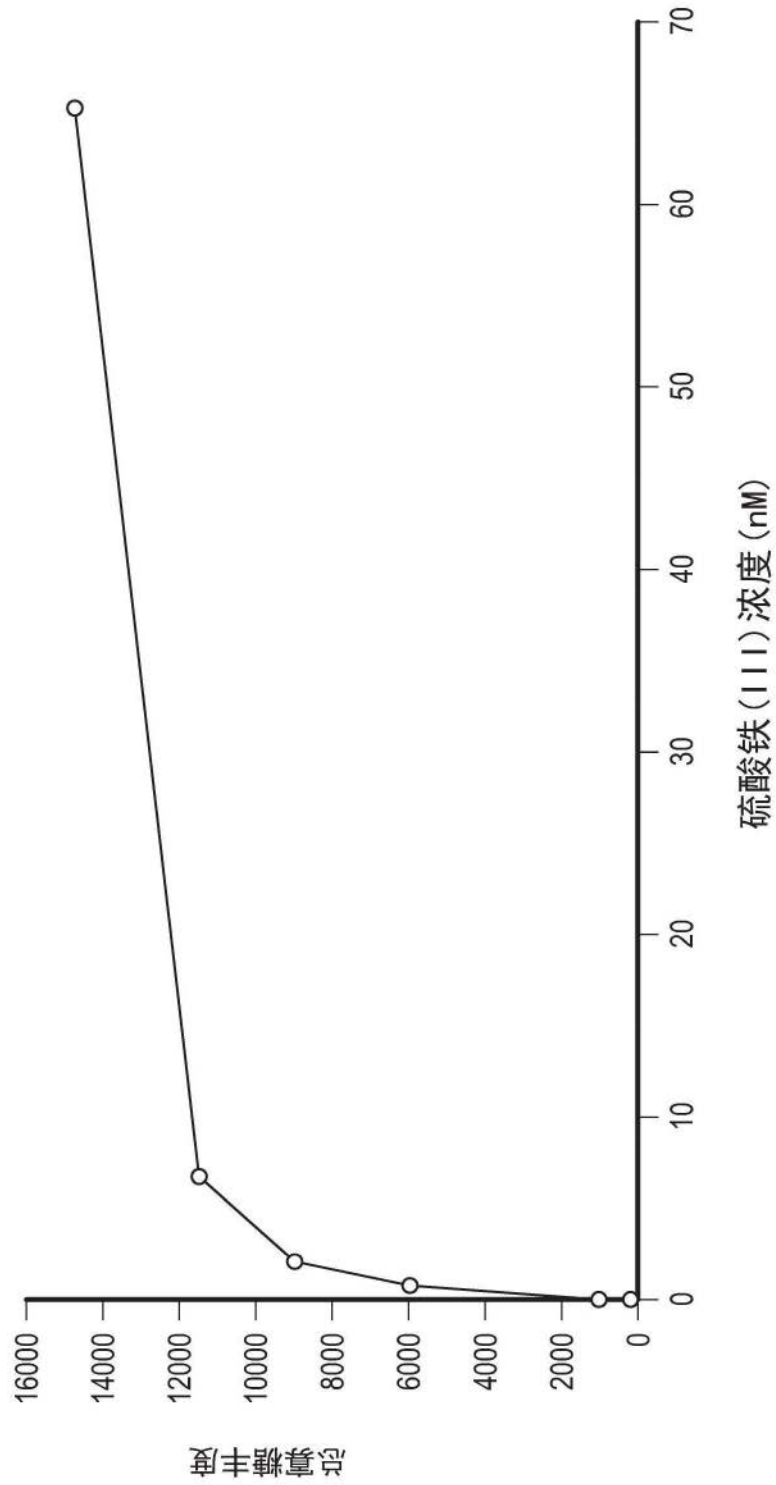


图2

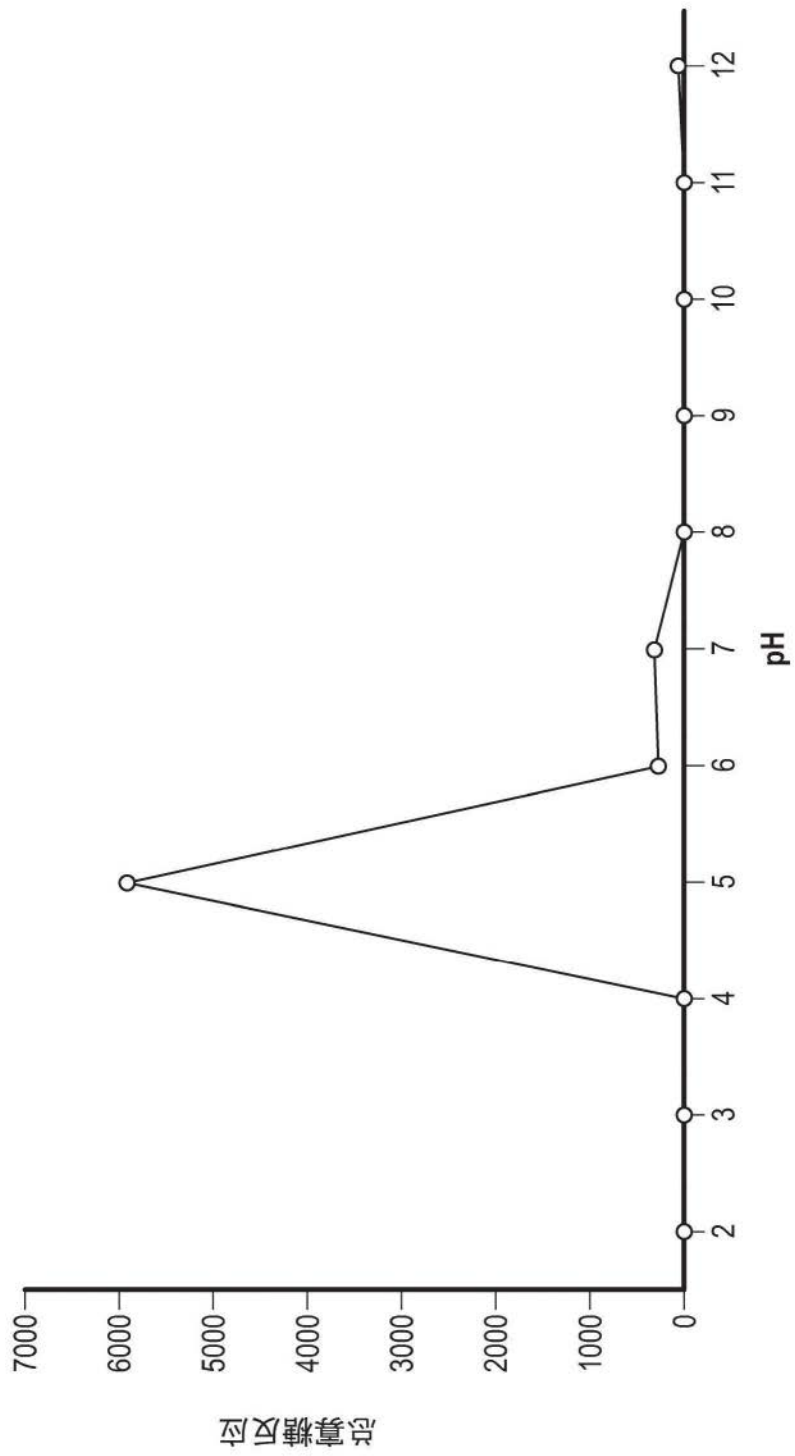


图3

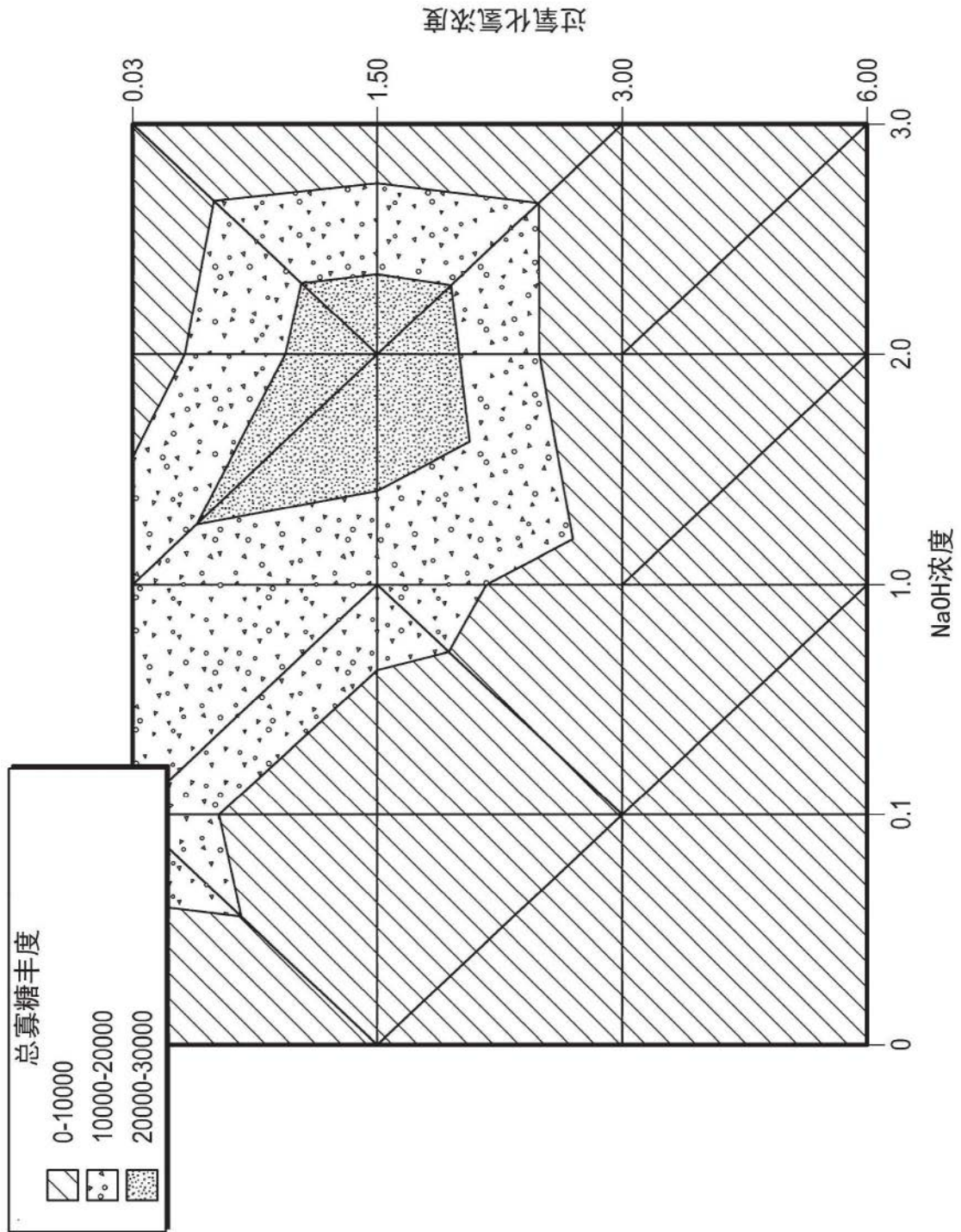


图4

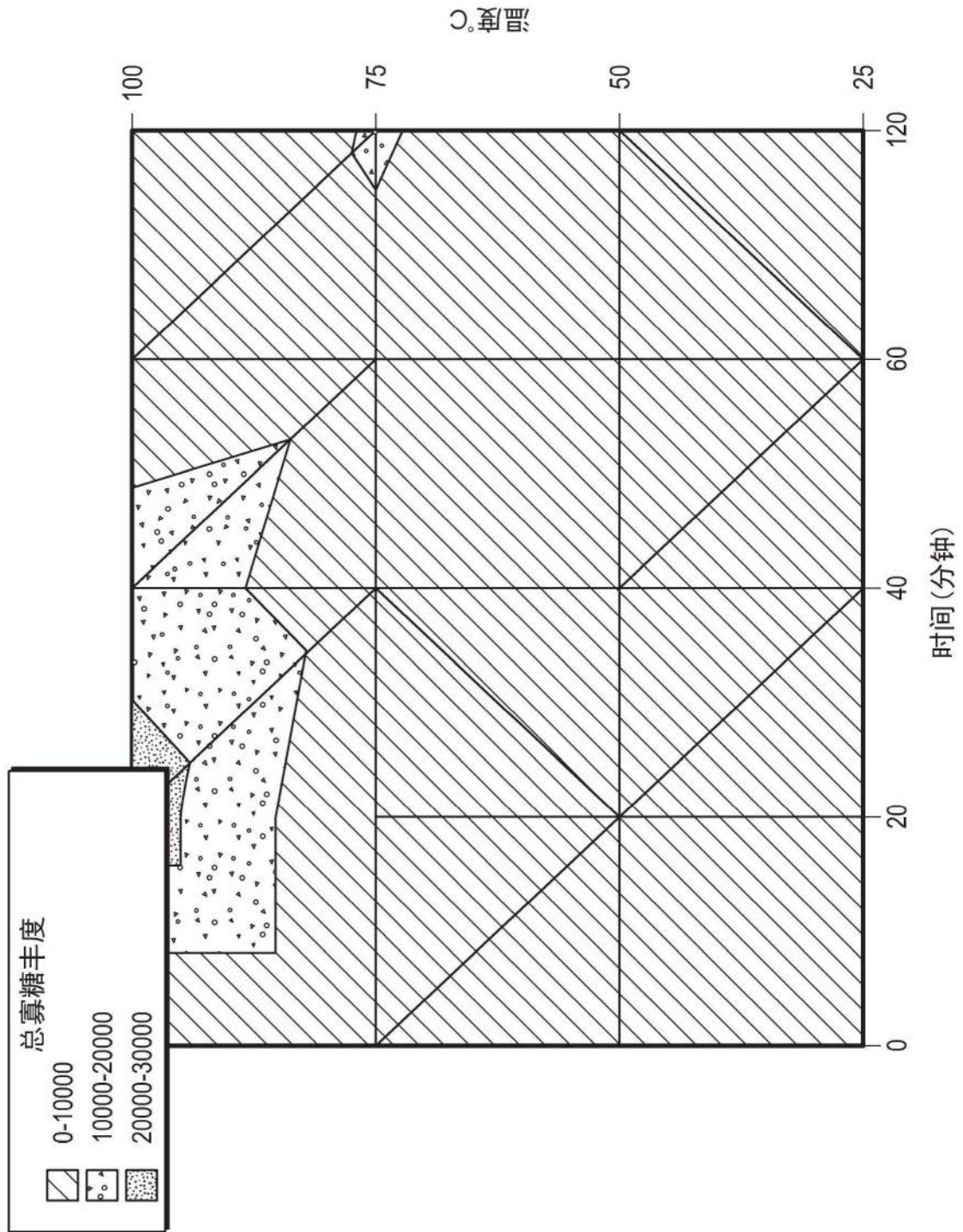


图5

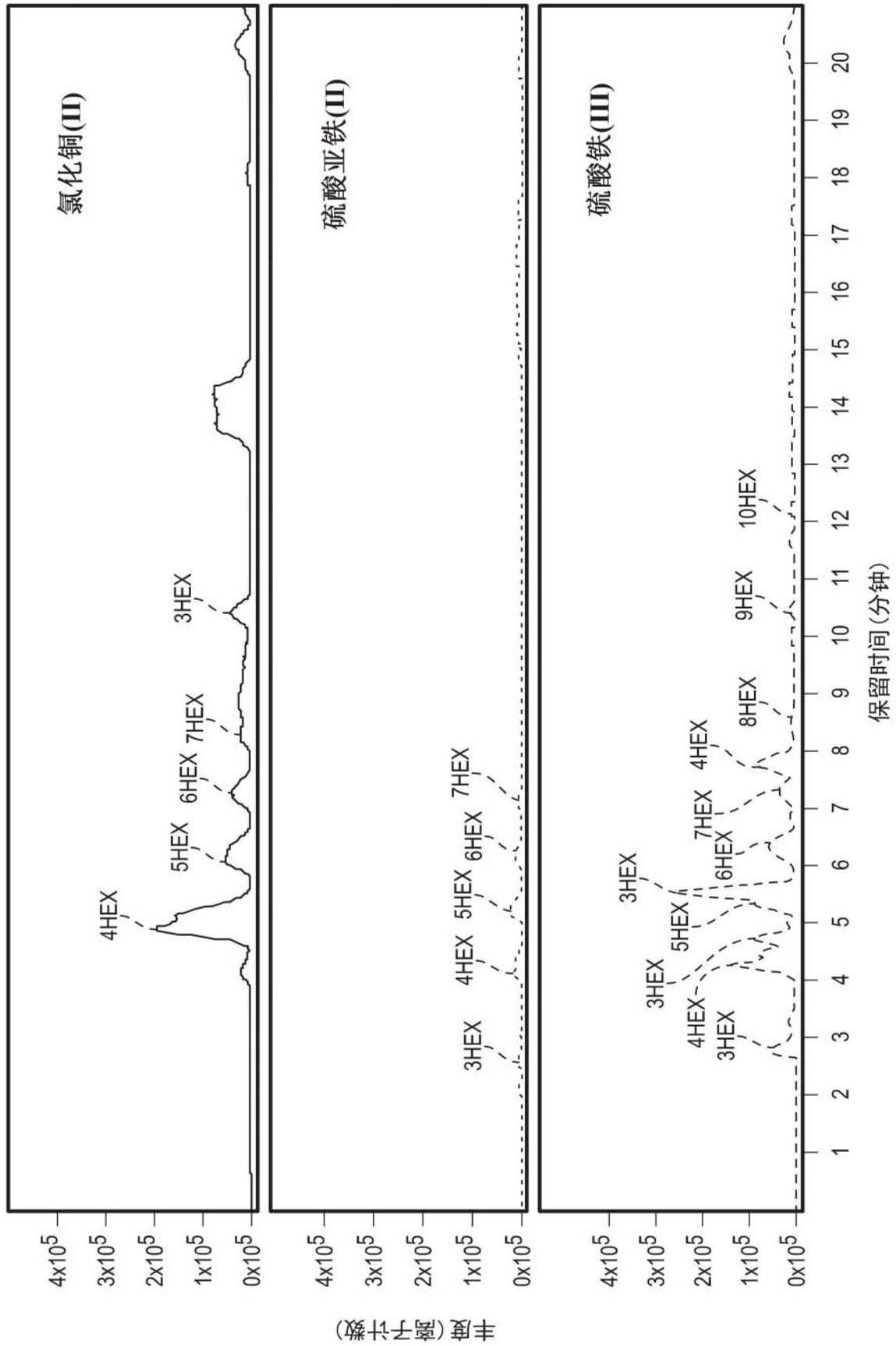


图6

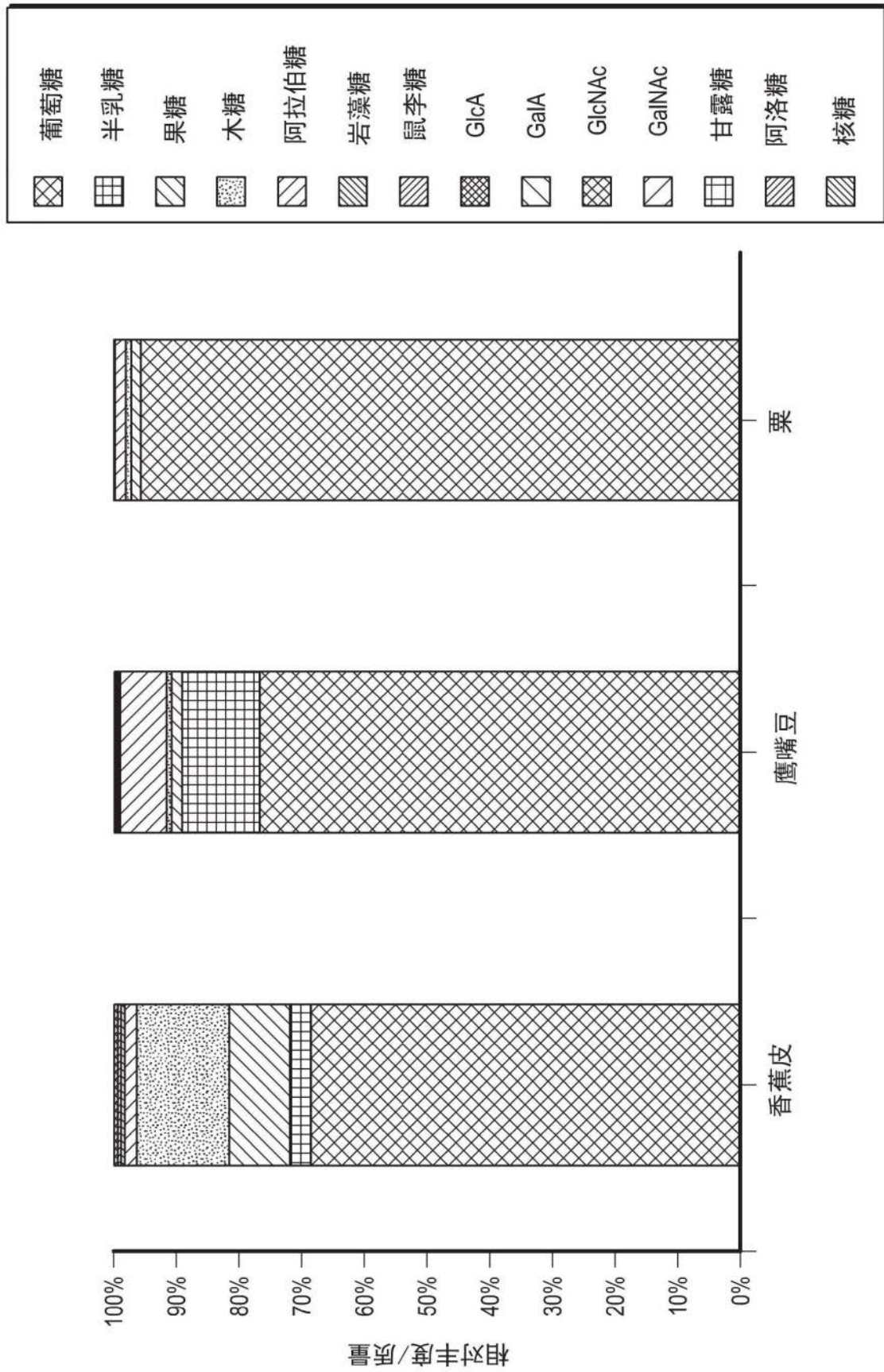


图7

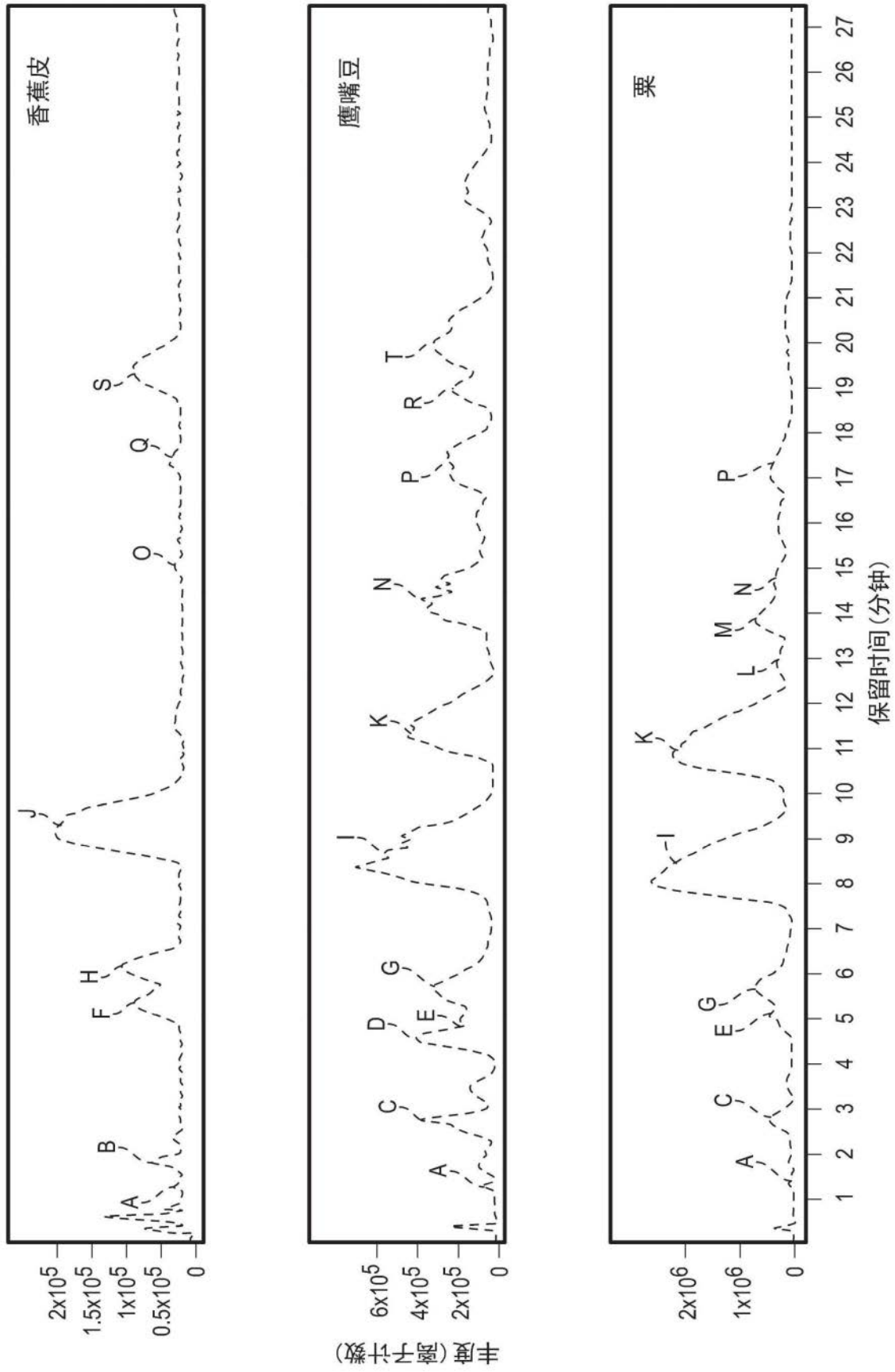


图8

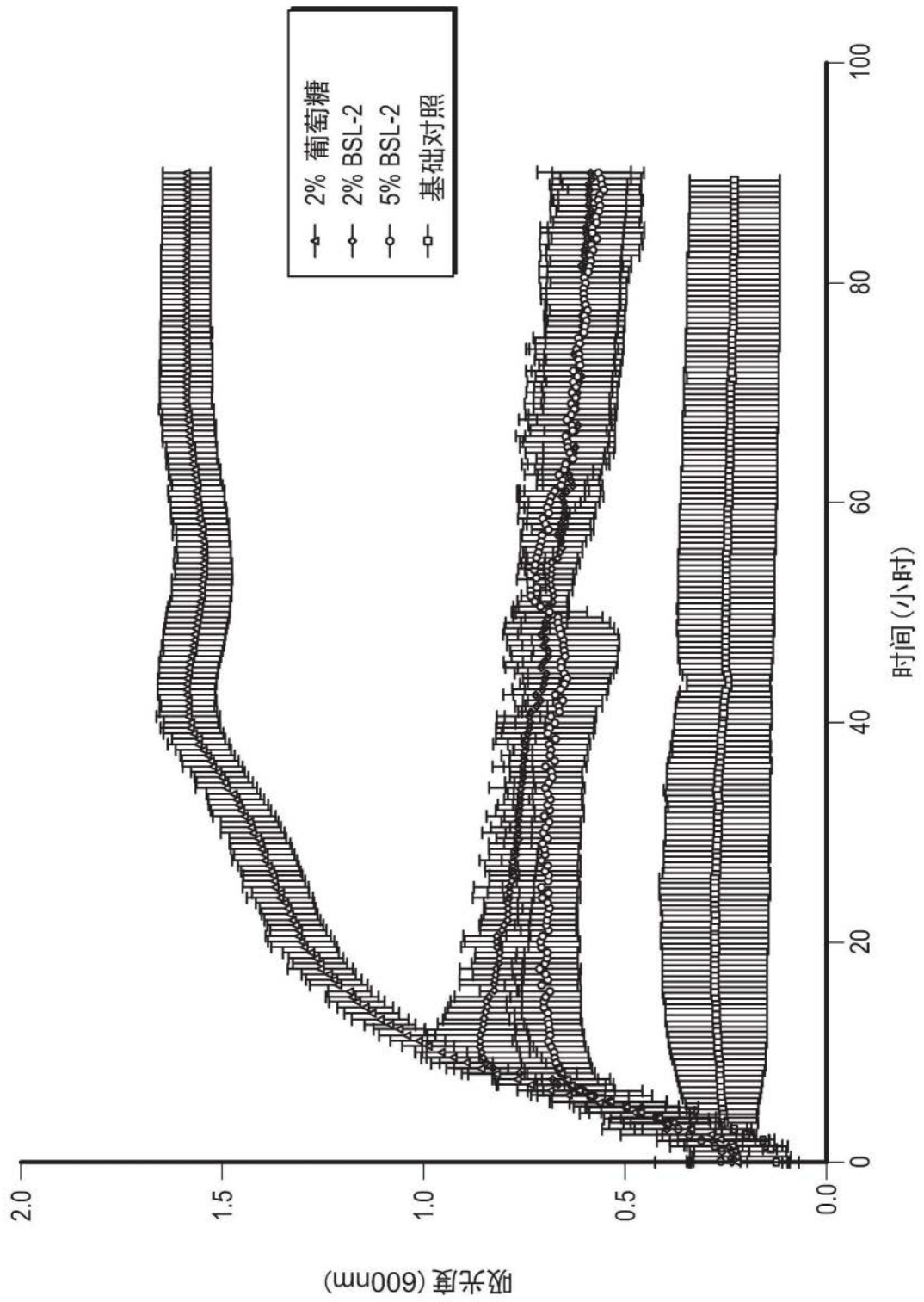


图9

多糖标准：木聚糖
>4-连接的木糖骨架，具有潜在甲基化GlcA分支

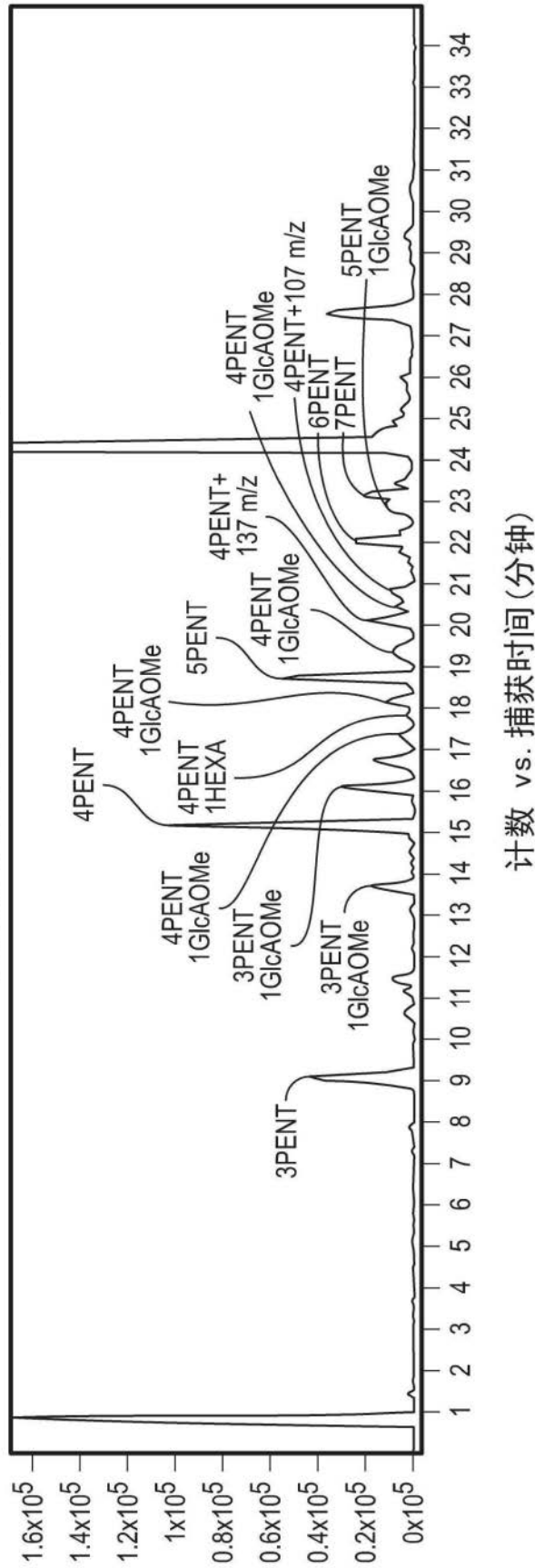


图10

多糖标准：黑麦阿拉伯木聚糖
>4-连接的木糖骨架，在2位和3位具有阿拉伯糖分支

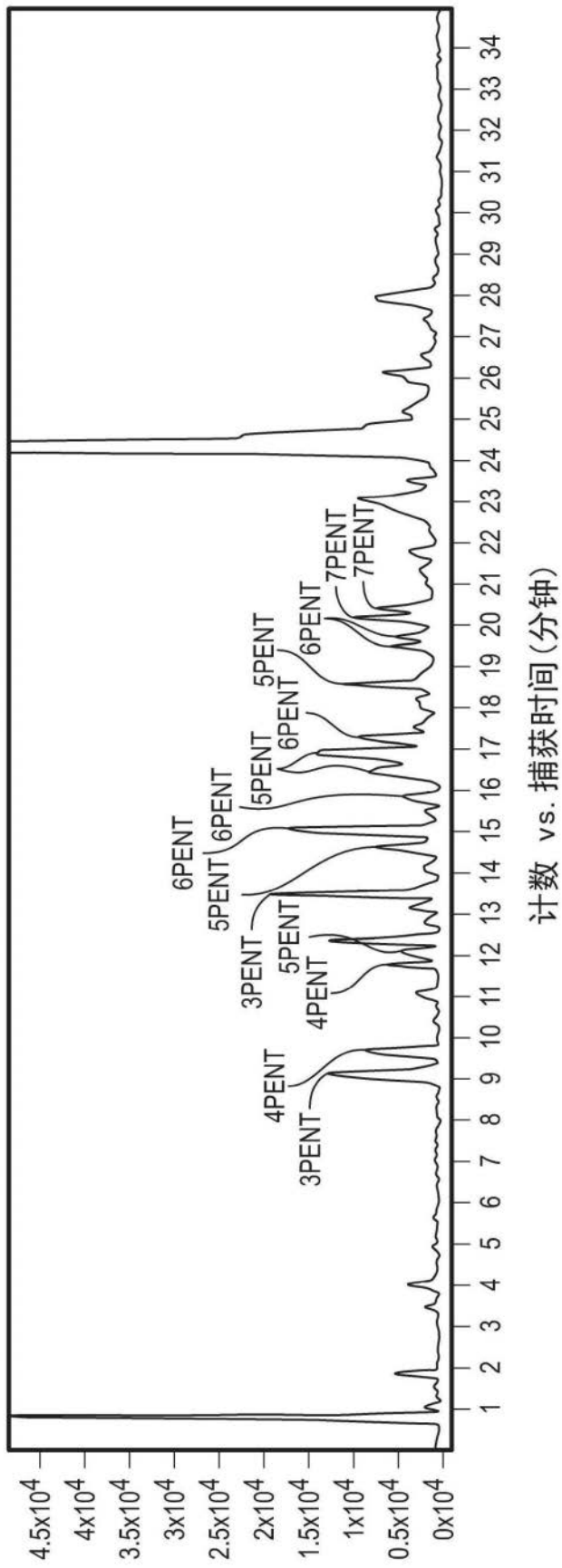


图11

多糖标准：地衣聚糖
>在3位和4位的交替葡萄糖单体连接

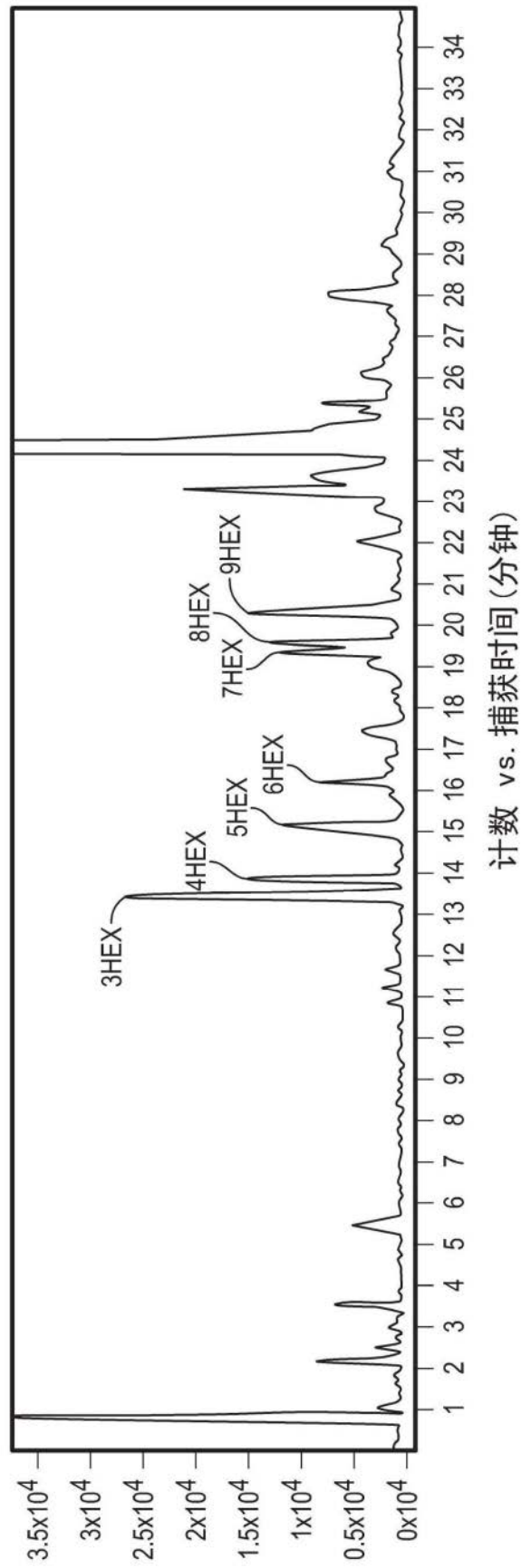


图12

多糖标准：半乳甘露聚糖

>在6位具有半乳糖分支的4-位连接的甘露糖骨架

>半乳糖：甘露糖=22:78 [视其衍生来源而定]

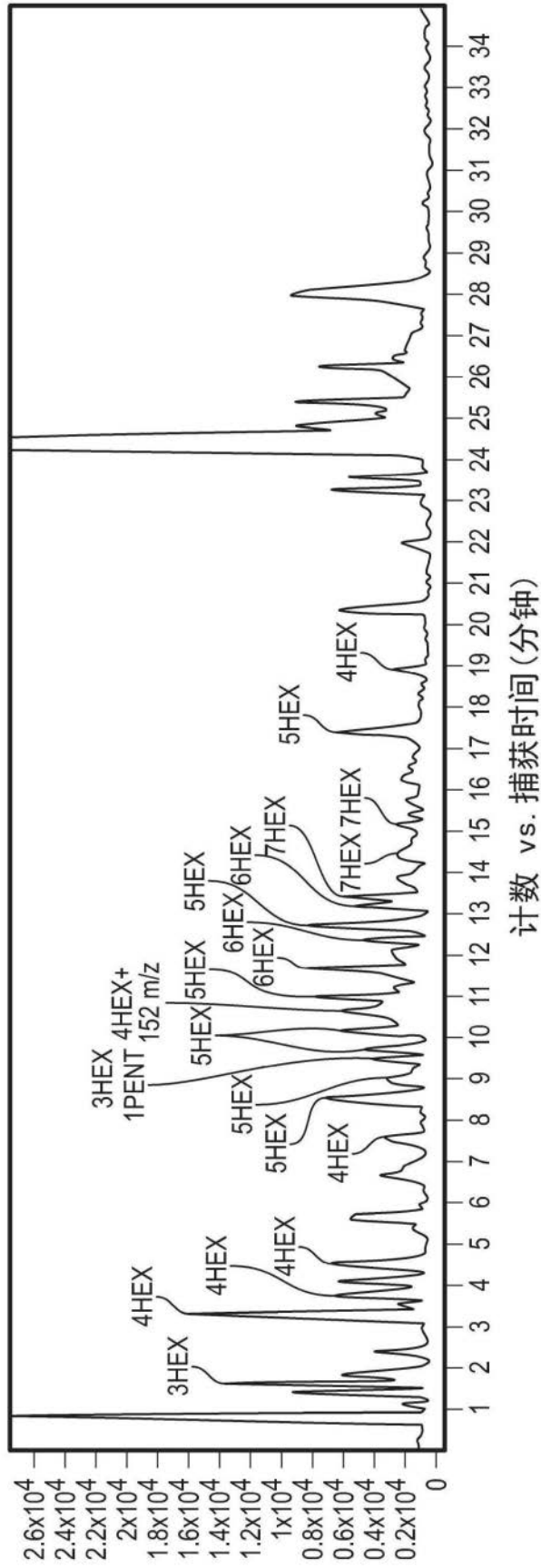


图13

多糖标准：胶淀粉
>4-位连接的葡萄糖骨架，在6位有分支

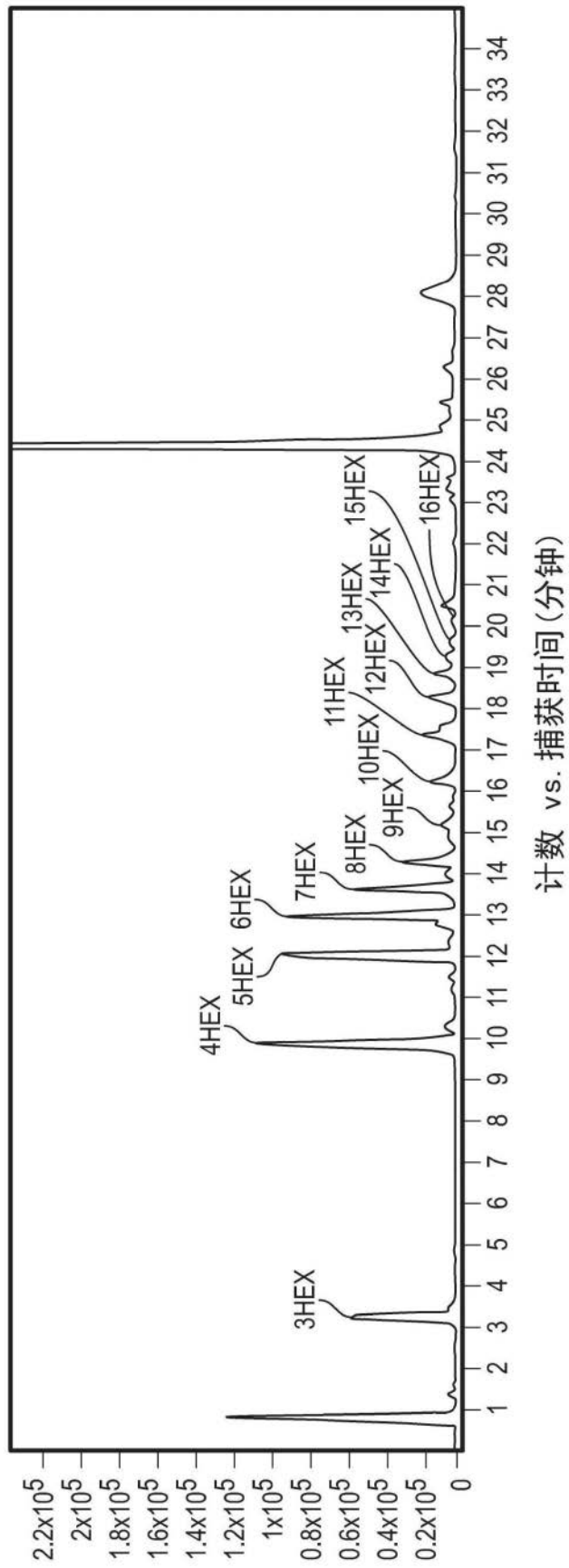


图14

多糖标准：直链淀粉
>4-位连接的葡萄糖线性聚合物

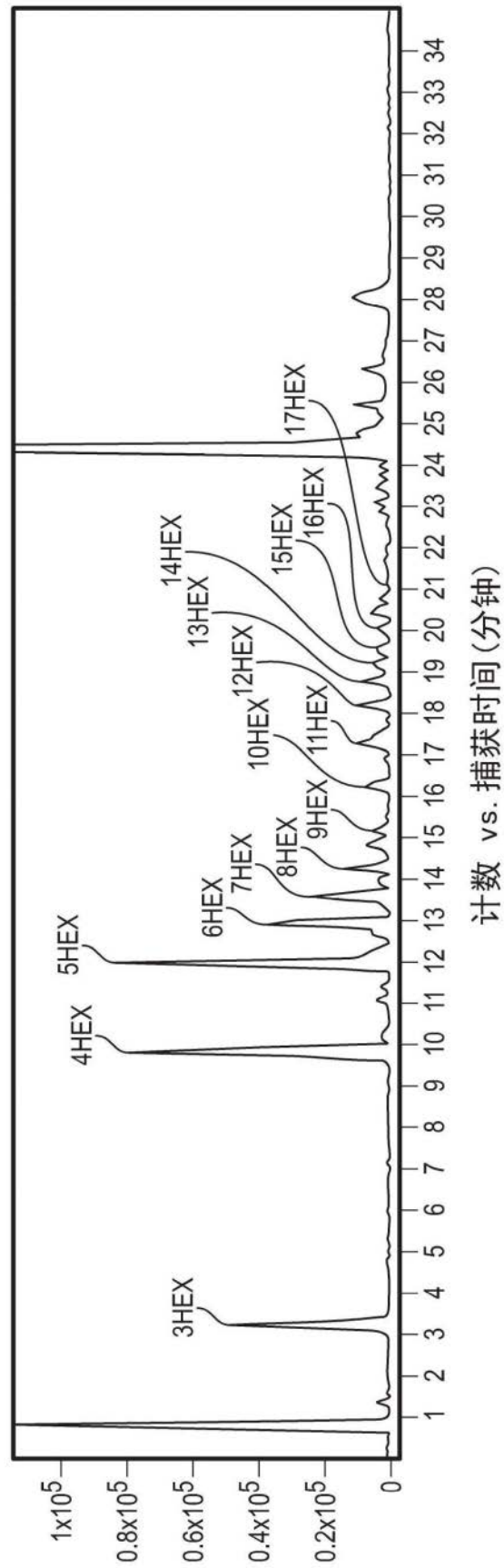


图15

多糖标准：聚鼠李糖半乳糖醛酸 I
>交替的鼠李糖和GalA骨架，具有阿拉伯聚糖、半乳糖和阿拉伯半乳糖分支链

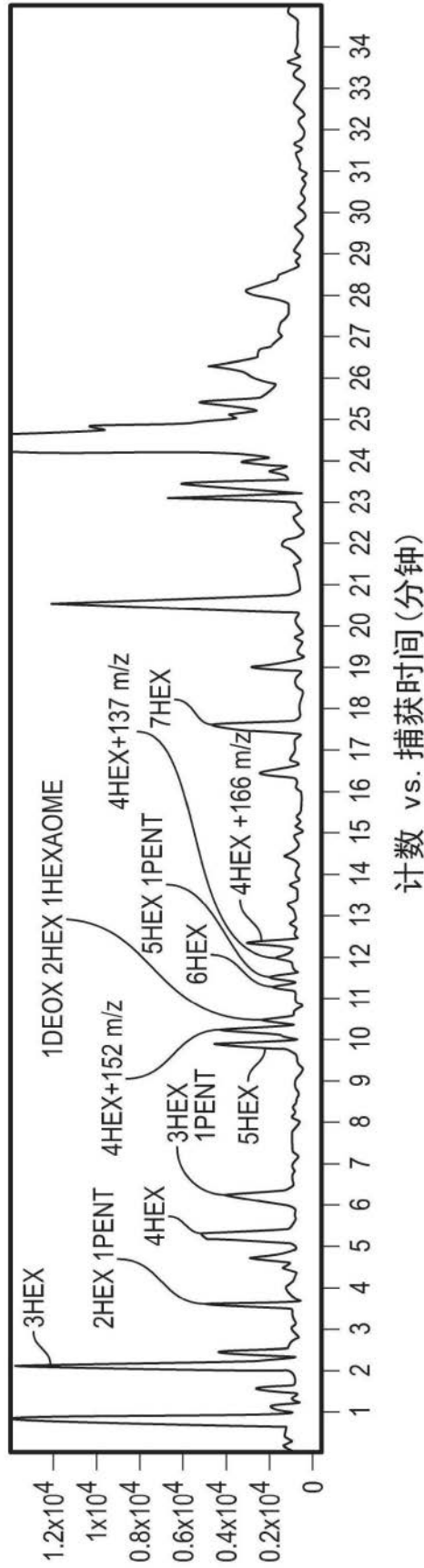


图16

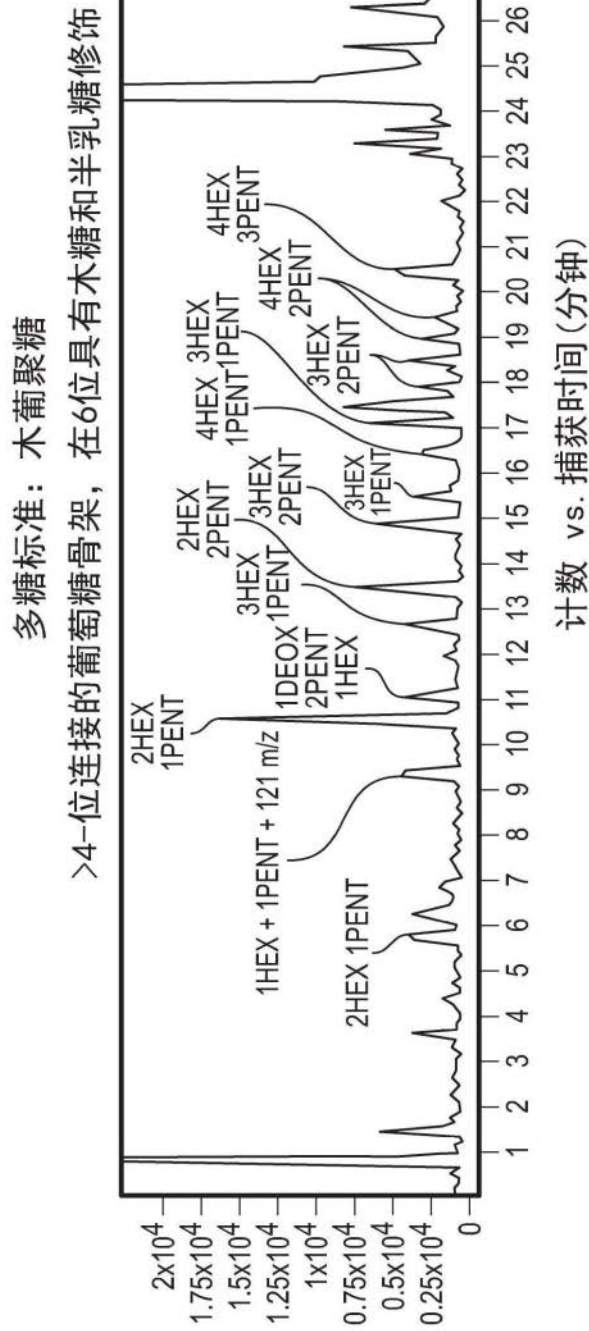


图17

多糖标准：热凝多糖
>3-位连接的葡萄糖线性骨架

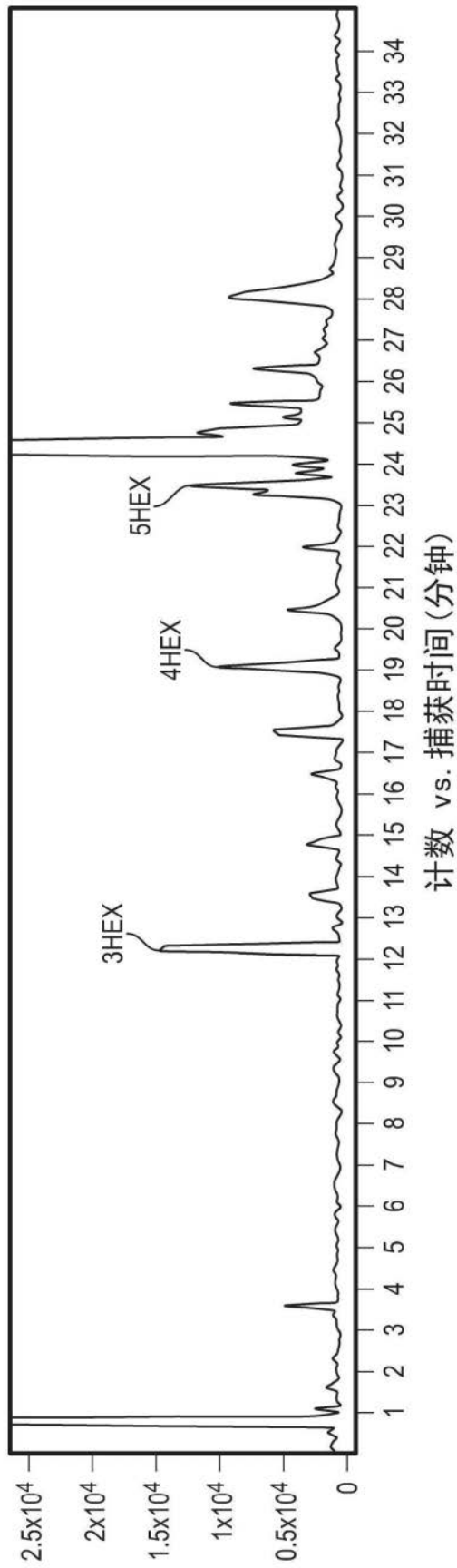


图18

多糖标准：半乳糖
>4-位连接的半乳糖线性聚合物

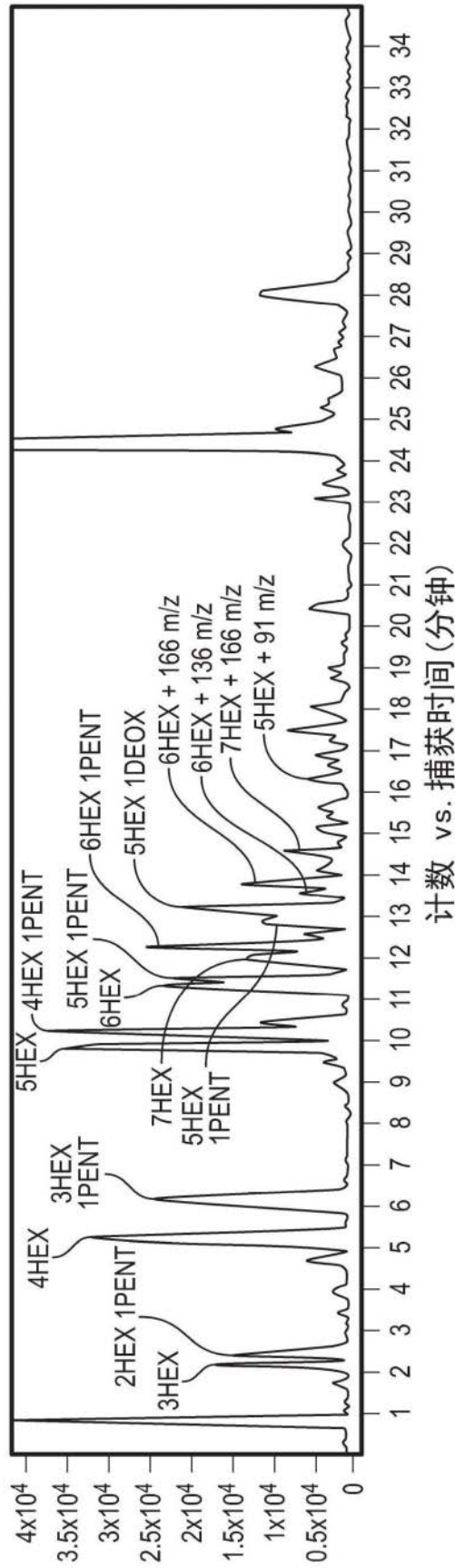


图19

多糖标准：甘露聚糖
>4-位连接的甘露糖线性聚合物

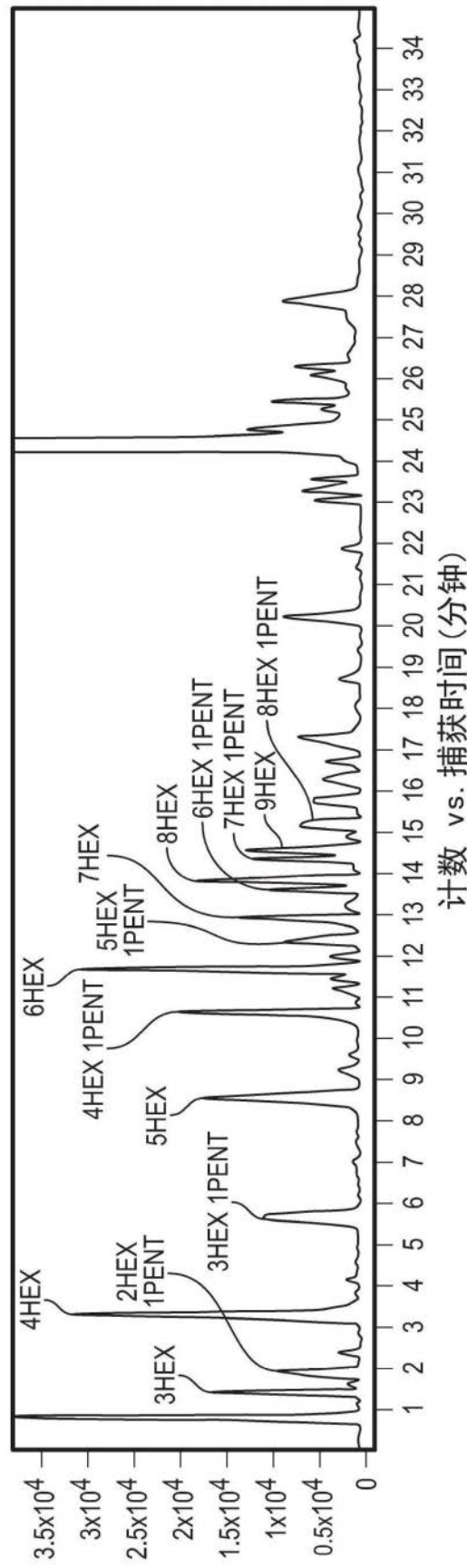


图20

多糖标准：葡萄糖甘露聚糖
>4-位连接的甘露糖和葡萄糖，形成线性聚合物
>可能存在乙酰化基团

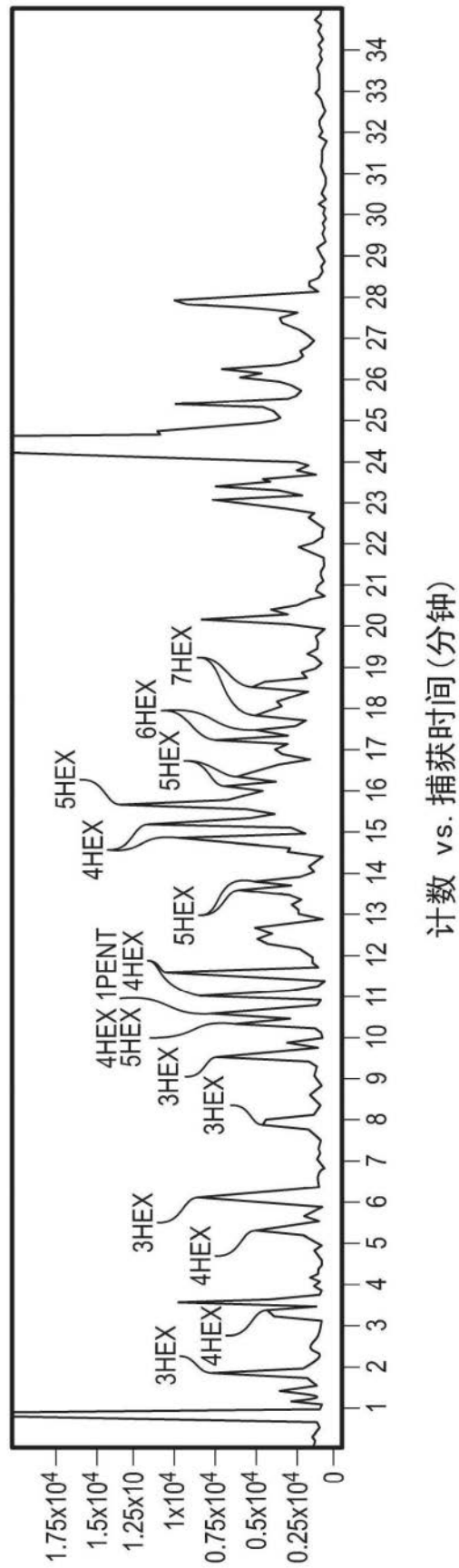


图21

多糖标准：落叶松阿拉伯半乳糖
>3-位连接的半乳糖骨架，在4位和6位具有阿拉伯糖和半乳糖分支

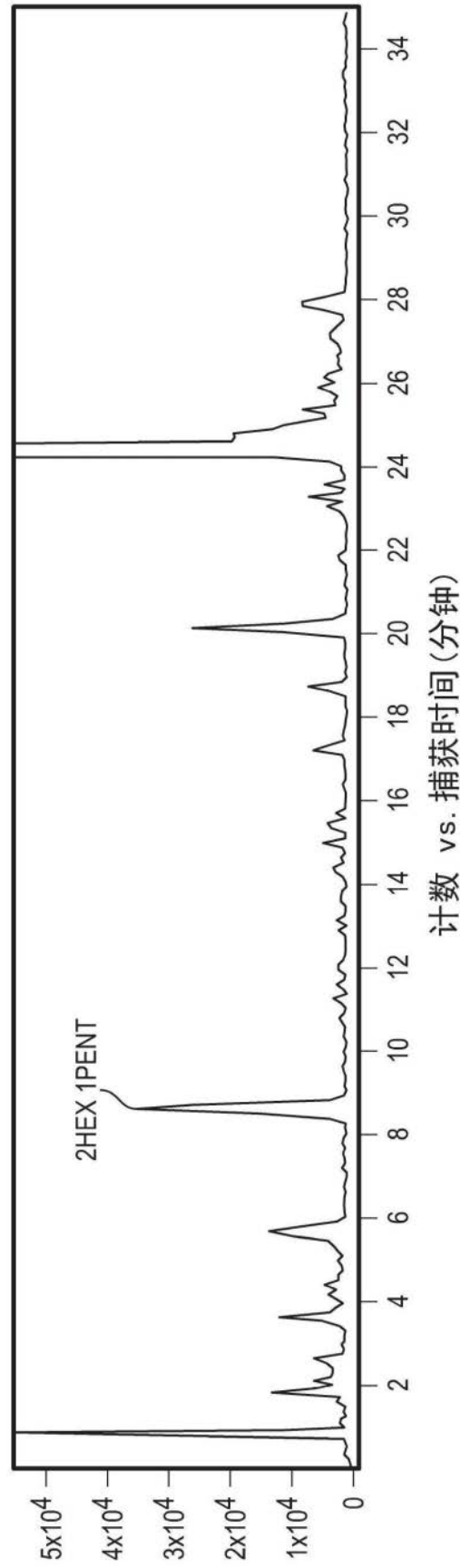


图22

多糖标准：聚半乳糖醛酸
>4-位连接的GalA线性聚合物

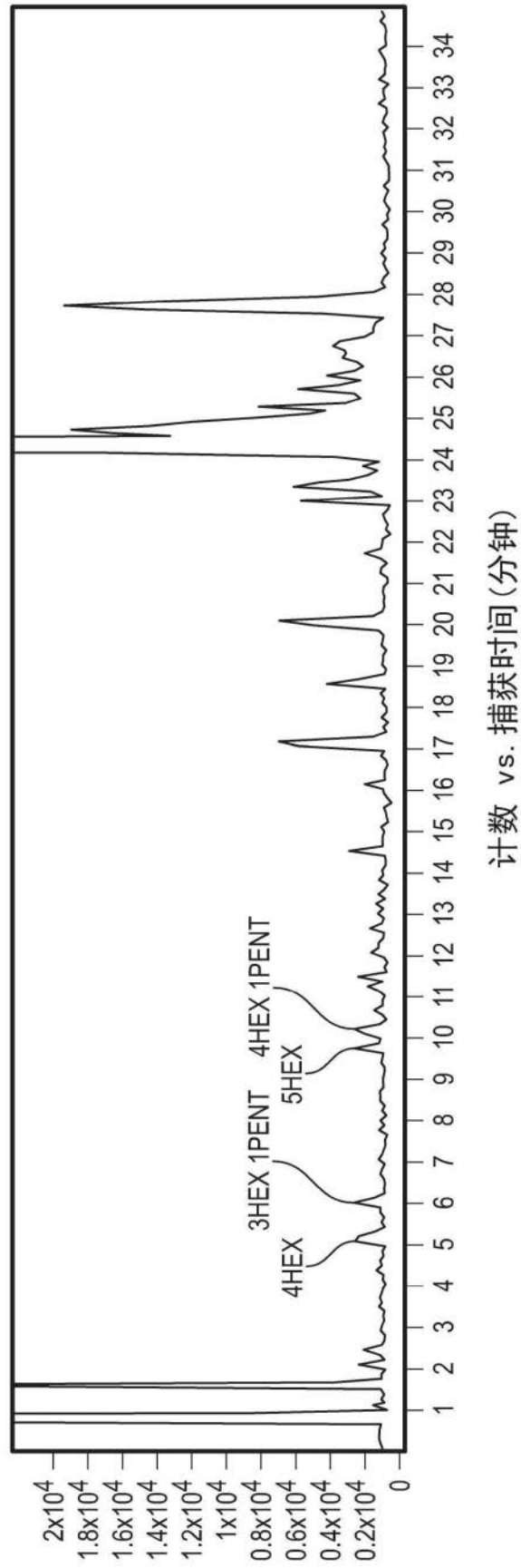


图23

多糖标准：菊糖
>葡萄糖末端，具有连接的果糖链
> β (2, 1) 连接

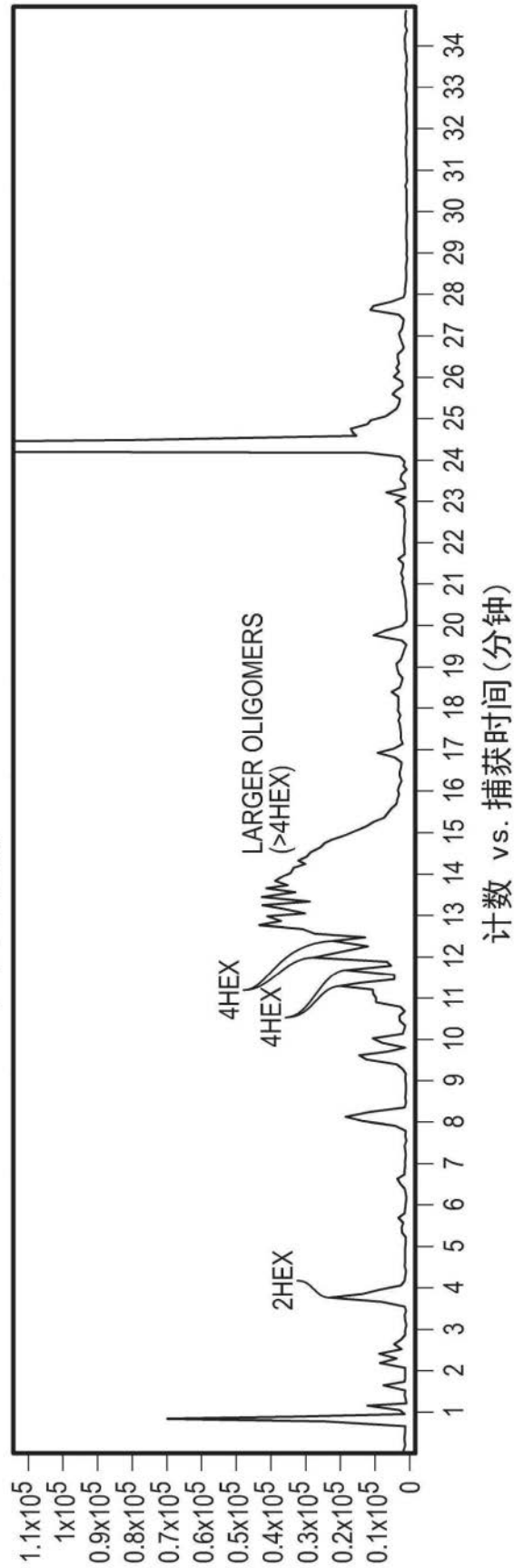


图24

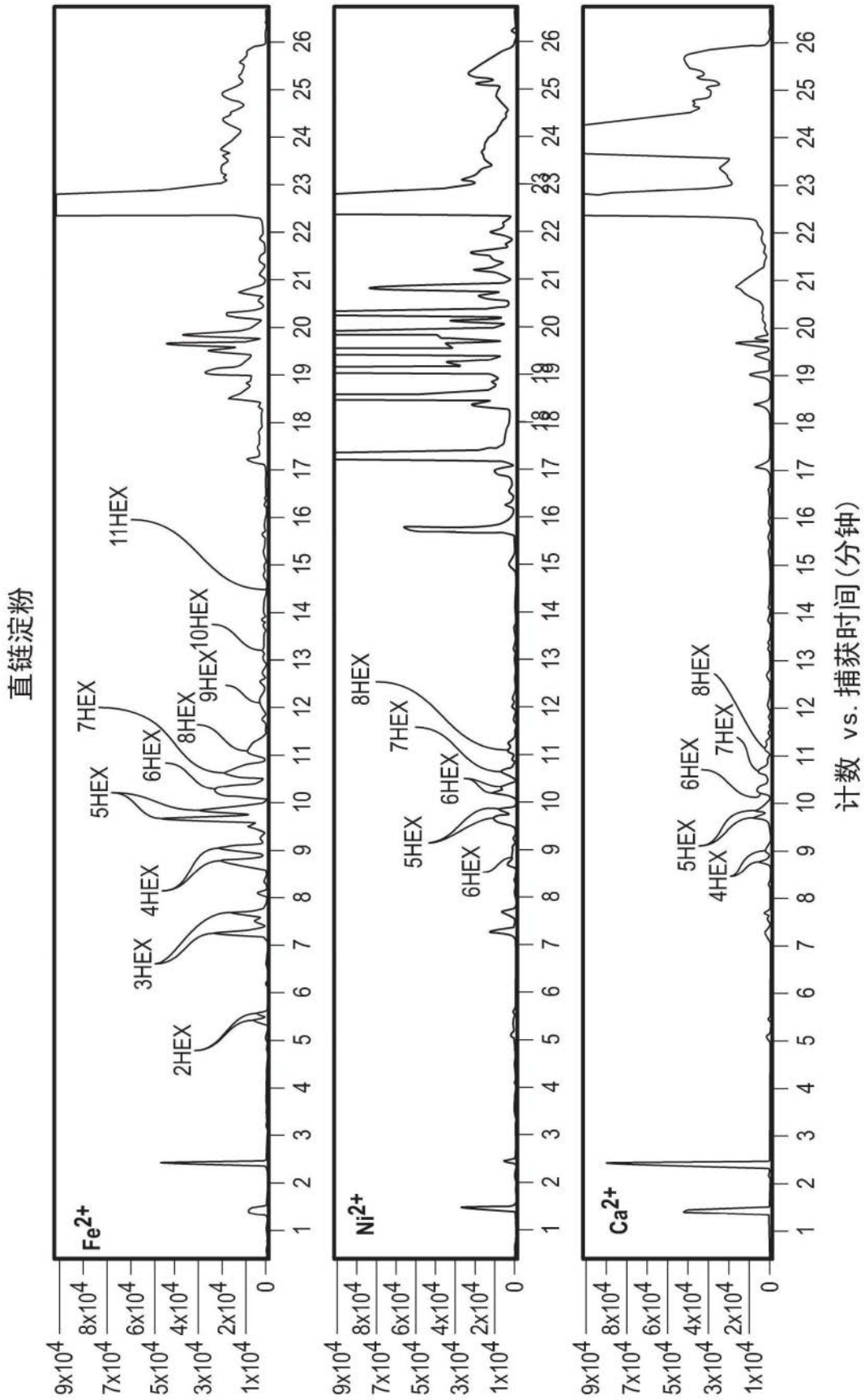


图25

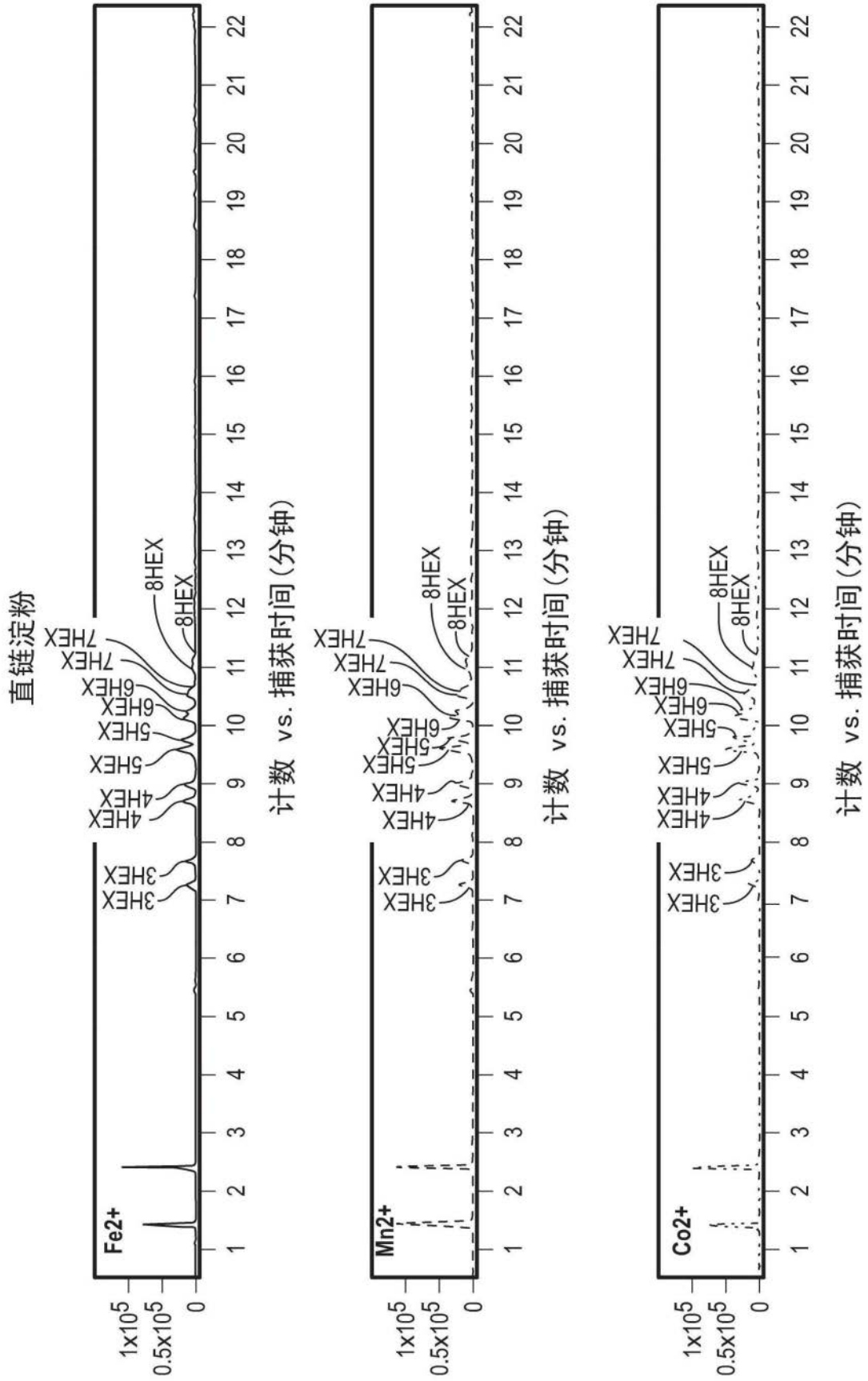


图26

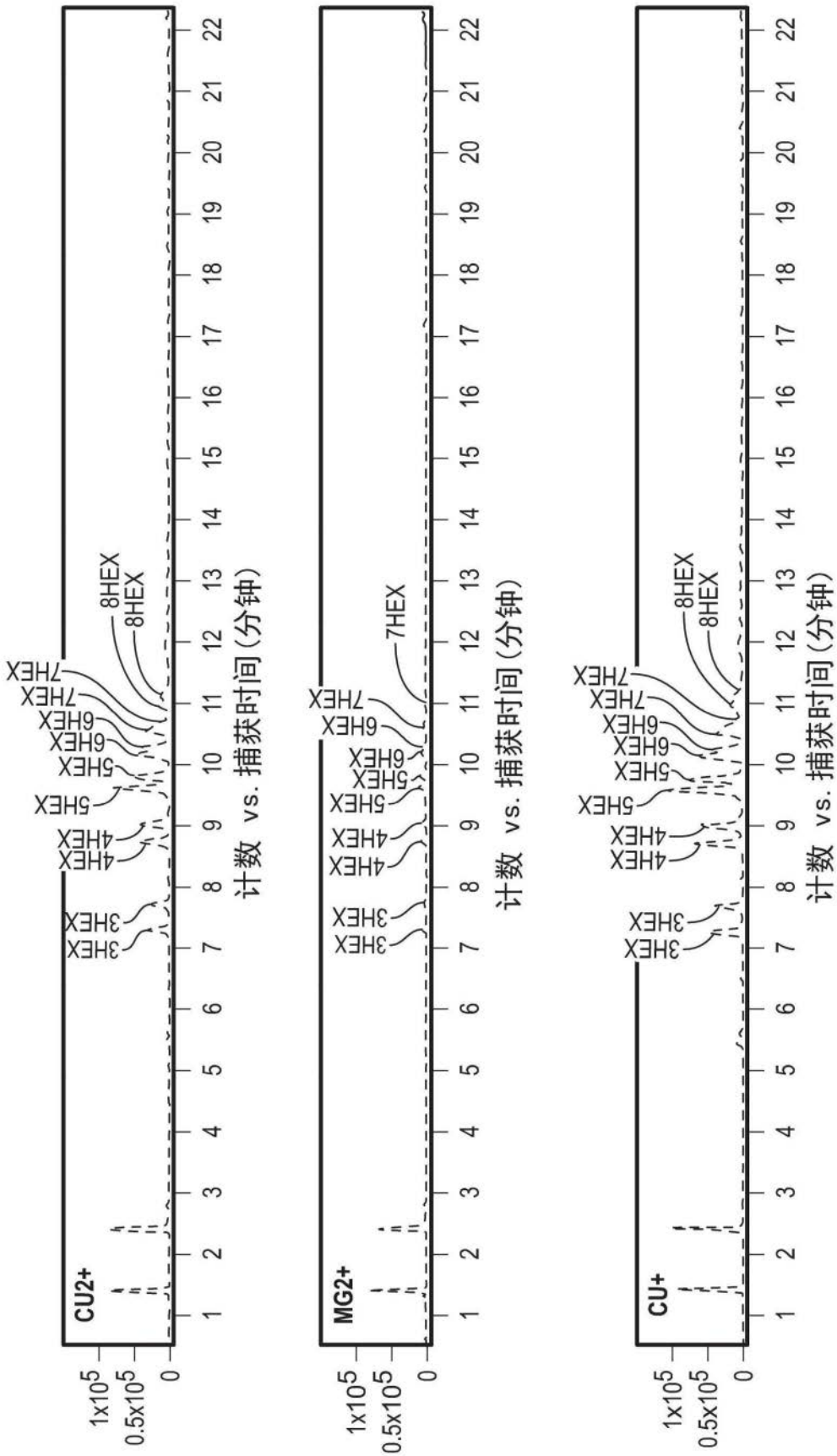


图26(续)

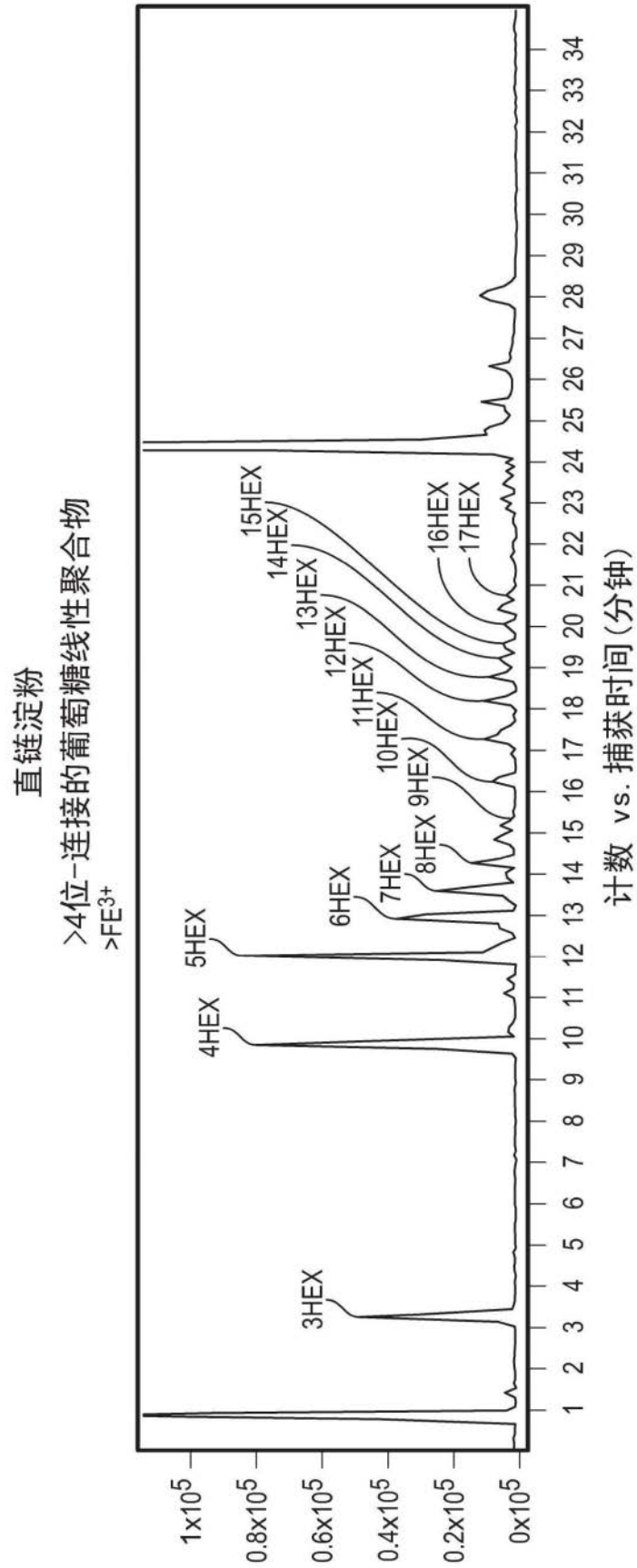


图27

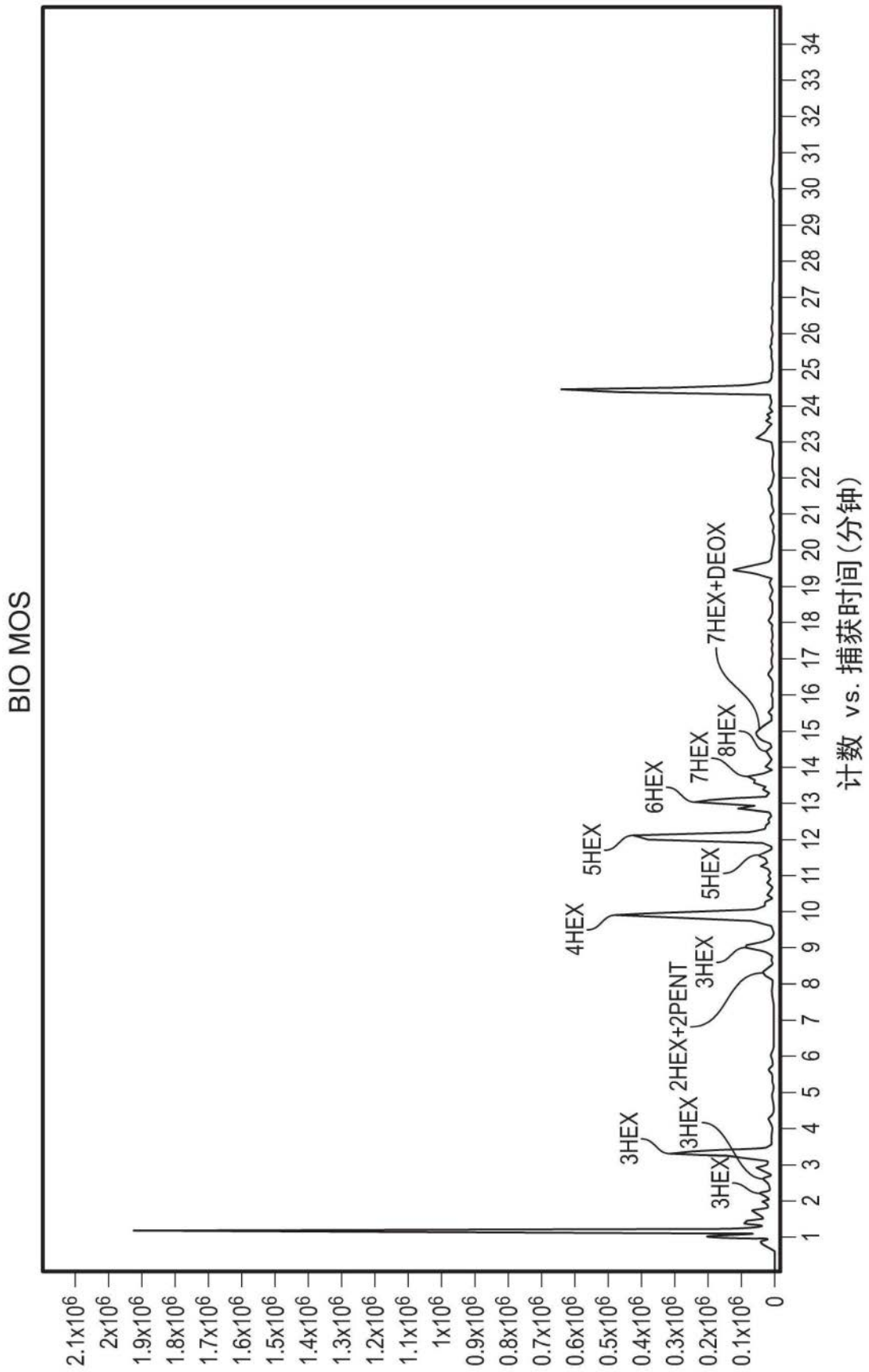


图28

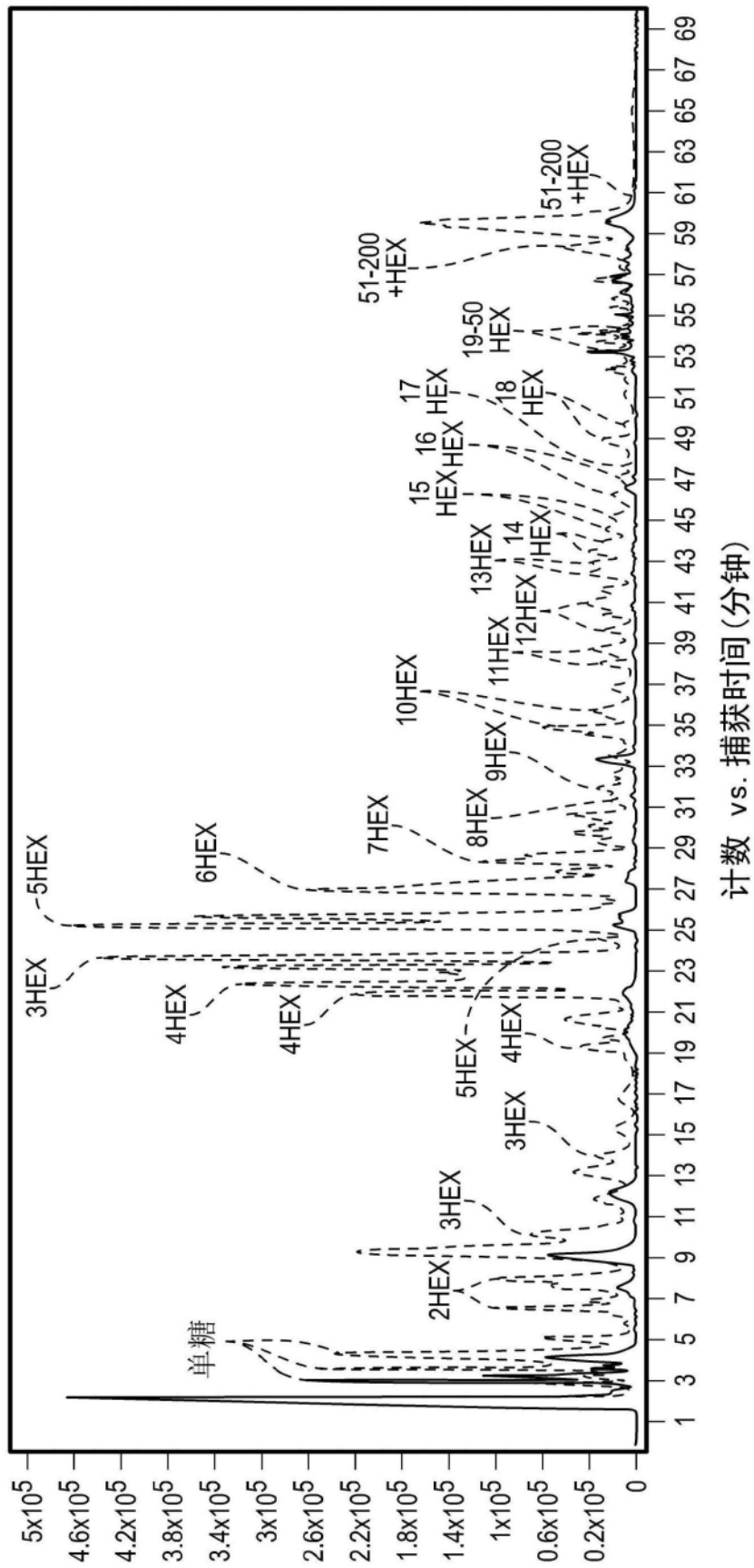


图29