

ÖZET**NUTRİSYONEL KOMPOZİSYONLAR**

Mevcut buluş, maya kültüründen izole edilen yeni bir sakkarit kompozisyonuna yöneliktir. Buluş ayrıca arttırılmış su çözünürlüğü ile maya hücresi bazlı sakkarit kompozisyonuna da yöneliktir. Buluşta açıklanan sakkarit kompozisyonları, söz konusu kompozisyonun uygulandığı hayvan ya da insan deneklerin sağlığını desteklemek için besinsel ya da farmasötik katkı maddeleri olarak ya da besinsel ya da farmasötik kompozisyonun bir parçası olarak kullanılabilir. Buluş ayrıca, bahsedilen sakkarit kompozisyonların üretim yöntemlerine de yöneliktir.

İSTEMLER

1. Mide rahatsızlıklarının, bağırsak hastalıklarının önlenmesinde ve hayvanlarda ya da insanlarda büyümenin desteklenmesinde kullanım için sakkarit içeren ürünün üretimi için metot olup, özelliği:
- 5 a. maya hammaddesi, tercih edilen şekliyle bira mayası hammaddesinin sağlanması,
- b. sakkarit kompozisyonunu elde etmek için HCl, fosforik asit ya da sülfürik asit grubundan seçilen inorganik asit ile 0,5 M ila 1 M konsantrasyonda ve 75-100 °C arasında reaksiyon sıcaklığında ve 2 ila 8 saat reaksiyon süresinde optimize asit hidrolizi ile hidroliz; ya da enzim ile ve HCl, fosforik asit ya da sülfürik asit grubundan
- 10 seçilen inorganik asit ile 0.5 M ila 1 M konsantrasyonda ve 75-100 °C arasında reaksiyon sıcaklığında ve 2 ila 8 saat reaksiyon süresinde optimize asit hidrolizini içermesi, burada kompozisyonun toplam çözünürlüğünün, su içinde % 1'lik çözelti olarak % 55'in üzerinde olmasıdır.
2. İstem 1'e göre metot olup, özelliği; burada hem enzimatik hidroliz hem de
- 15 optimize asit hidrolizi kullanılmasıdır.
3. İstem 1 ya da 2'den herhangi birine göre metot olup, özelliği; burada enzimatik işlemin pronaz, savinaz, pektinaz ve/ veya endoglukanaz içermesi ya da aynı protein ya da polisakarit tipine özgü olan enzimleri içermesidir.
4. İstem 1'e göre metot olup, özelliği:
- 20 a. maya hammaddesi, tercih edilen şekliyle de bira mayası hammaddesinin sağlanması
- b. materyalin fiziksel homojenizasyonu
- c. inorganik asit ile hidrolizi adımlarını içermesidir.
5. İstem 4'e göre metot olup, özelliği; burada reaksiyon süresinin 3 ila 5 saat ya da
- 25 3.5 ila 4.5 saat olmasıdır.
6. Mide rahatsızlıklarının, bağırsak hastalıklarının önlenmesinde ve hayvanlarda ya da insanlarda büyümenin desteklenmesinde kullanım için, istem 1-5'ten herhangi birine göre işlemle elde edilebilen bir sakkarit içeren ürün olup, özelliği; burada kompozisyonun toplam çözünürlüğünün suda % 1'lik çözelti olarak % 55'in üzerinde,

% 60 ila % 80 arasında ya da % 70'in üzerinde ya da % 90'ın üzerinde olan gruptan seçilmesidir.

7. İstem 6'ya göre sakkarit içeren ürün olup, özelliği; buradaki kompozisyonun, toplam elüsyon hacmi 18 ml ve kolon uzunluğu 30 cm olan Superdex Peptide 10/300 GL kolonundan yaklaşık 6 ila 16 ml ve/ veya 6 ila 14 ml arasında elüe edilen artmış miktarda sakkarit içermesidir.

8. İstem 7'ye göre sakkarit içeren ürün olup, özelliği; buradaki kompozisyonun artmış miktarda Mana3Mana2-oligosakkaritler içermesidir.

9. İstem 1-5'ten herhangi birine göre metot olup, özelliği; burada çözünebilir sakkarit fraksiyonunun, aşağıdaki gruptan seçilen bir metot ya da bunların herhangi bir kombinasyonu ile izole edilmesi ya da saflaştırılmasıdır:

a. kromatografik metotlar örneğin

i. yüklü ve/ veya lipofilik (hidrofobik impüritelerin) absorbe edilmesi için kromatografler

ii. boyut dışlama kromatografisi, özellikle düşük moleküler ağırlıktaki impüriteleri uzaklaştırmak için jel filtrasyonu

iii. sakkaritlere ya da bunların bir kısmına bağlanan matrislerle, tercih edilen şekliyle aktif karbon üzerinde kromatografi ile afinite kromatografileri

ve/ veya

b. Solventlerle ekstraksiyon ve/ veya impüritelerin ya da sakkaritlerin çökeltilmesi gibi faz ayırma çözelti metotları

ve/ veya

c. Çözelti ve çökeltinin santrifüjlenmesi ve ayrılması

ve/ veya

d. İstenmeyen bileşenleri degrede etmek için kimyasal ya da enzimatik metotlar, tercih edilen şekliyle alkali kararsız impüriteleri degrede etmek için hafif alkali hidroliz ve/ veya Glcα içeren glikojen/ nişasta tipi sakkaritlerin enzimatik hidrolizi.

10. İstem 9'a göre metot olup, özelliği; burada impüritelerin ya da sakkaritlerin çökmesi için kullanılan organik solventin metanol ya da etanol gibi bir alkol ya da keton olması, daha tercih edilen şekliyle, tercih edilen boyuttaki sakkaritlerin çökmesi için etanol ya da aseton kullanılmasıdır.

11. İstem 8'e göre sakkarit içeren ürün olup, özelliği; burada, 12-16 dakika arasında elüe edilen toplam $\text{Man}\alpha 3\text{Man}\alpha 2$ -mannoz sakkaritlerin en az yaklaşık % 10'u olan $\text{Man}\alpha 3\text{Man}\alpha 2$ -mannoz oligosakkarit miktarı bulunmasıdır.

12. İstem 8 ya da 11'e göre sakkarit içeren ürün olup, özelliği; burada yaklaşık 4.53 ppm'de $\text{Glc}\beta$ 'nın integral H1 proton NMR sinyalinin, $\text{Man}\alpha 3\text{Man}\alpha 2$ -H1 proton NMR sinyalinin en az % 80'i olacağı şekilde bir $\text{Glc}\beta$ -sakkarit miktarı bulunmasıdır.

TARİFNAME

NUTRİSYONEL KOMPOZİSYONLAR

Mevcut buluş, maya kültüründen izole edilen yeni bir sakkarit kompozisyonuna yöneliktir. Buluş ayrıca arttırılmış su çözünürlüğü ile maya hücresi bazlı sakkarit kompozisyonuna da yöneliktir. Buluşta açıklanan sakkarit kompozisyonları, söz konusu kompozisyonun uygulandığı hayvan ya da insan deneklerin sağlığını desteklemek için besinsel ya da farmasötik katkı maddeleri olarak ya da besinsel ya da farmasötik kompozisyonun bir parçası olarak kullanılabilir. Buluş ayrıca, bahsedilen sakkarit kompozisyonların üretim yöntemlerine de yöneliktir.

10 BULUŞUN ARKA PLANI

Progut™ iyi bağırsak sağlığını korumak, büyümeyi arttırmak ve hayvanlardaki çoğu gastrointestinal problemde antibiyotiklerin yerini almak için maya bazlı hayvan gıda maddesidir (bakınız US 20020061345). Progut™, tüm bira mayasından (*Saccharomyces cerevisiae*) üretilir ve bu nedenle hem maya hücre duvarı partikülleri (çoğunlukla mannoproteinler ve β -glukanlar) hem de internal hücre nükleotidlerini içerir. Tüm bu bileşenlerin Progut™'un etkinliği için önemli olduğu gösterilmiştir.

Patent başvurusu WO 98/27829, bir gıda katkı maddesini hazırlamak için, bir bitkisel, hayvansal ve/ veya mikrobiyal ürüne dayanan ve oligosakkaritleri ve/ veya polisakkaritleri içeren bir hammaddenin hidrolitik olarak muamele edildiği ve böylece hücre duvarı yapısının açıldığı ve gastrik rahatsızlıkların ve bağırsak hastalıklarının önlenmesi için gıda katkı maddesinin kullanılmasını içeren bir prosedür açıklamaktadır.

US 2002/061345, bir gıda katkı maddesini hazırlamak için, oligosakkaritleri içeren maya hammaddesini ve/ veya polisakkaritleri filtrelediği ve hidrolitik olarak işleme tabi tutulduğu ve böylece hücre duvarı yapısının açıldığı ve gastrik rahatsızlıkların ve bağırsak hastalıklarının önlenmesi için gıda katkı maddesinin kullanılmasını içeren bir prosedür açıklamaktadır.

WO 2006/121803, maya ve bgr-glukan ve mannan preparatlarının üretilmesi için yöntemler açıklamaktadır. Metotlar, bir otolisiz prosesini, bunu takiben, bir yüksek-PH proteazı ya da bir yüksek PH proteazı kullanarak enzimatik bir muamele, ardından bir amilaz, lipaz ve bunların bir kombinasyonundan en az birini içeren bir enzimle muameleyi kullanır.

RU 2007928, maya biyokütlesinden maya ekstralarının üretimini, iki tip maya ekstralarını üretmek için, iki aşamalı hidroklorik asit çözeltileri ile muamele edilmesi, nötralizasyon ve ayırma ile açıklanmaktadır.

JP 2004 099580, mayanın bağışıklık aktive edici etkisini arttırmak için, mayayı özsindirimi ile, öz sindirim sırasında ya da özsindirimden sonra bir enzim içeren bir proteaz ve bir beta-1,3-glukanaz ekleyerek elde edilen bir bağışıklık takviye edici kompozisyonu açıklamaktadır.

Mevcut buluş, özellikle optimize edilmiş güçlü asit hidrolizi ya da enzimatik hidroliz koşulları ile üretilen yeni progut tipi ürünleri ya da yeni biyoaktif ve yüksek ölçüde çözünebilir ürünü elde etmek için bunların şaşırtıcı şekilde etkili kombinasyonlarını ortaya koymaktadır. Şaşırtıcı derecede güçlü asit muamele koşullarının, yaklaşık 0.5 M ila yaklaşık 1 M asit ve/ veya yüksek reaksiyon sıcaklığının 75-100 derece Santigrat derece dahil olmak üzere çok yüksek asit konsantrasyonlarını içermesinin daha yüksek çözünme elde etmek ve yüksek oranda biyoaktif düşük molekül ağırlıklı polisakkaritler ve oligosakkaritler elde etmek için gereklidir olduğu gözlemlenmiştir. Koşullar drastiktir ve maya materyallerinin hidrolize karşı yüksek direncini ortaya çıkarır, bununla birlikte, koşullar optimumdur, böylece yüksek sıcaklıkta asitin 2M'ye yükselmesi, hücre duvar materyallerinin daha az etkili çözündürülmesine ve/ veya hidrolizin total hidrolize kapatılmasından kaynaklanan artan miktarda serbest monosakkaritlere neden olur.

Yüksek mannoz oligosakkarit ve düşük nişasta oligosakkarit içeriği ve yüksek Glc β -sakkarit içeriği içeren eşsiz kimyasal özellik, yeni sakkarit fraksiyonlarının yüksek biyoaktivitesi ile ilgilidir. Bunlar, önceki ürünlerden ve rakip ürünlerden açıkça farklıdır. Aynı preparasyona önemli miktarda etkili mannoz oligosakkaritleri ve Glc β -sakkaritleri üretmek için optimal hidroliz koşulları yenidir ve özellikle sakkaritler aynı preparattan ve major hidrolitik ya da mayalama işleminden üretilen maya gibi fermentasyondan üretilen maya gibi ekstraksiyon kimyasal muameleleri olmaksızın doğal mayayı içeren maya hammaddesinden üretildiklerinde yenidirler.

Arka planda maya maddelerinin asit muamelelerinin esas olarak düşük pH aralıkları ve reaksiyon sıcaklıklarında düşük asit konsantrasyonları ile hafif muameleler olduğu, genellikle glukanlar diye değinilen esas olarak çözünmeyen hücre duvarı preparasyonlarını elde etmek için alkali işlemlerle birlikte kullanıldığı anlaşılmaktadır. Glukan preparasyonu asit beta6'nın kanıtı yoktur.

Bu buluşta, bir dizi eski ve yeni Progut™ numunesi ve aynı zamanda seçilmiş ilgili ürünlerden numuneler analiz edilmektedir. Analiz, esas olarak jel geçirgenlik kromatografisi ile gerçekleştirilir, ancak proses, jel geçirgenlik kromatografisi ile burada izole edilen çözünebilir bileşenlerin NMR analizini kullanır.

- 5 Bu çalışmanın bir diğer amacı, etkililiğini kaybetmeden artmış çözünürlüğe sahip yeni bir Progut™ üretmek olmuştur. Bu, mannoproteinleri ve/ veya β -glukanları hem enzimatik olarak, mekanik olarak hem de asit hidroliziyle degrade ederek gerçekleştirilebilir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

- 10 **Şekil 1. Progut tipi ürün (PG) ve ilgili numunelerde çözünebilir bileşenlerin miktarları.**

PG1-PG9, Progut tipi ürün numuneleri; ilgili numuneler: C1, Agrimos; C2, Ascogen; C3, Alphamune Alpha; C4, Bio-Mos.

- 15 **Şekil 2. 0.2% çözeltisinden PG1 ve PG2'nin karşılaştırması. A. PG1 ve B. PG2'nin** suda çözünebilir bileşenlerin % 0.2 çözeltisinden (eşit numune preparatları) jel geçirgenlik kromatogramları; Superdex Peptid kolonunda (A_{214} ölçüldü).

Şekil 3. 0.1% çözeltisinden PG1 ve PG2'nin karşılaştırması. A. PG1 ve B. PG2'nin suda çözünebilir bileşenlerin % 0.1 çözeltisinden (eşit numune preparatları) jel geçirgenlik kromatogramları; Superdex Peptid kolonunda (A_{214} ölçüldü).

- 20 **Şekil 4. Beş Dokuz PG numunesi ve ilgili numunelerin karşılaştırması. A. PG1, B. PG2, C. PG3, D. PG4, E. PG5, F. PG6, G. PG7, H. PG8, I. PG9, J. C1 K. C2, L. C3, M. C4'ün** suda çözünebilir bileşenlerin % 0.1 çözeltisinden (eşit numune preparatları) jel geçirgenlik kromatogramları; Superdex Peptid kolonunda (A_{230} ölçüldü). PG9 ile, yaklaşık % 50 daha az materyal analiz edildi. Ancak bu, sonuçları eşit olarak
25 karşılaştırabilmek için ölçeği uygun şekilde ayarlayarak telafi edilir.

Şekil 5. Beş PG numunesinin karşılaştırması. A. PG10, B. PG11, C. PG12, D. PG13, E. PG14'ün suda çözünebilir bileşenlerin % 0.1 çözeltisinden (eşit numune preparatları) jel geçirgenlik kromatogramları; Superdex Peptid kolonunda (A_{230} ölçüldü).

- 30 **Şekil 6. Bira mayası çözeltisinden üretilen PG numunelerinin ve bunların homojenleştirilmiş versiyonunun karşılaştırılması.** Asit hidrolize edilmiş **A. bira**

mayası ve **B.** homojenleştirilmiş bira mayasının % 1 çözeltiden suda çözünen bileşenlerin (eşit numune preparatları) jel geçirgenlik kromatogramları; Superdex Peptid kolonunda (A_{214} ölçüldü).

Şekil 7. Bakteriyel adezyon testleri için enzimatik ya da kimyasal

- 5 **degradasyonlarla üretilen numunelerin karşılaştırılması. A.** Bira mayası (BY) + glucanex (G), **B.** Homojenize BY (HBY) + G, **C.** BY G + savinaz (S), **D.** HBY G+S, **E.** BY 1M H_3PO_4 , **F.** HBY 1M H_3PO_4 , **G.** BY G + pektinaz (PE), **H.** HBY G+PE, **I.** PG1 PE, **J.** PG1 + PR'ün suda çözünebilir bileşenlerin % 0.1 çözeltisinden (eşit numune preparatları) jel geçirgenlik kromatogramları; Superdex Peptid kolonunda. A, B ve I, A_{230} 'un ölçüldüğü (birbiriyle karşılaştırılabilir) preparatif kromatogramlardır; diğerleri analitiktir, burada A_{214} ölçüldü (birbiriyle karşılaştırılabilir).

Şekil 8. PG1, suda çözünebilir PG (PG WS), suda çözünebilir PG ile emülgatör (PG WS + E) ve aşırı hidrolize PG'nin karşılaştırılması. A. Pug1, **B.** PG WS, **C.** PG WS+E ve **D.** PG'ün suda çözünebilir bileşenlerin % 0.1 çözeltisinden (eşit numune preparatları) 15sa jel geçirgenlik kromatogramları; Superdex Peptid kolonunda (A_{230} ölçüldü).

Şekil 9. Pronazın Progut tipi ürün numuneleri üzerine etkisi. Progut tipi ürün numuneleri 1 ve 2 (PG1 ve PG2) pronaz sindirimi olmaksızın (gri sütunlar) ve pronaz sindirimi ile (koyu gri sütunlar).

- 20 **Şekil 10. Pronazın Progut tipi ürün ve bira mayası çözeltisine etkisi.** Progut tipi ürün numuneleri 1 ve 2 (PG1 ve PG2), pronaz sindirimi (ikinci deney) olmadan (gri sütunlar) ve varken (koyu gri sütunlar). Bira mayası (BY), önce ya pronaz ve daha sonra asit hidrolizi (BY1) ile ya da önce asit hidrolizi ve daha sonra pronaz (BY2) ile işlendi, koyu gri kolonlar. Kontrol olarak BY, proses prosedürü (gri kolonlar) ile asit hidrolize edildi.

- 25 **Şekil 11. Pronazın Progut tipi ürün ve bira mayası çözeltisine etkisi.** Progut tipi ürün numuneleri 1 ve 2 (PG1 ve PG2), savinaz sindirimi olmadan (gri sütunlar) ve varken (koyu gri sütunlar). Bira mayası (BY), önce ya savinaz ve daha sonra asit hidrolizi (BY1) ile ya da önce asit hidrolizi ve daha sonra savinaz (BY2) ile işlendi, koyu gri kolonlar. Kontrol olarak BY, proses prosedürü (gri kolonlar) ile asit hidrolize edildi.

Şekil 12. Prektinatın Progut tipi ürün ve bira mayası çözeltisine etkisi. Progut tipi ürün numuneleri 1 ve 2 (PG1 ve PG2), pektinaz sindirimi olmadan (gri sütunlar) ve varken (koyu gri sütunlar). Bira mayası (BY), önce ya pektinaz ve daha sonra asit hidrolizi (BY1) ile ya da önce asit hidrolizi ve daha sonra pektinaz (BY2) ile işlendi, koyu gri kolonlar. Kontrol olarak BY, proses prosedürü (gri kolonlar) ile asit hidrolize edildi.

Şekil 13. Glucanex'in bira mayası çözeltisine etkisi. İlk deney, 30°C'de (sırasıyla, G5 30C, G20 30C, G100 30C) glucanex 5, 20, 100 mg ile bira mayası, işleminden sonra asit muamelesi, koyu gri sütunlar. İkinci deney, 37 ya da 50°C 'de (sırasıyla, G5 30C, G20 30C, G100 30C) 20 mg ile bira mayası, işleminden sonra asit muamelesi, koyu gri sütunlar. Kontrol olarak, her iki deneyde de bira mayası sadece asit muamelesi prosesi ile işlendi, gri kolonlar.

Şekil 14. Glucanex ve savinazın bira mayası çözeltisine kombine etkisi. A. Bira mayası çözeltisi önce 30°C'de glucanex 5, 20, 100 mg (sırasıyla, G 5+S, G 20+S, G 100+S) ve daha sonra 37°C'de 4 µl savinaz ile, bundan sonra asit muamele prosesi, koyu gri kolonlar. **B.** Bira mayası çözeltisi önce 37°C'de glucanex 20 mg ve daha sonra 37°C'de 4 ya da 20 µl savinaz (sırasıyla, G 37+S4, G 37+S20) ile, koyu gri kolonlar, ya da 50°C'de glucanex 20 mg ve daha sonra 37°C'de 4 ya da 20 µl savinaz (sırasıyla, G 50+S4, G 50+S20) ile, bundan sonra asit muamele prosesi, koyu gri kolonlar. Hem **A.** hem de **B.** için kontrol olarak, bira mayası çözeltisi enzimler olmadan inkübe edildi ve sadece asit muamele prosesi ile işlem gördü, gri kolonlar.

Şekil 15. Glucanex ve endoglukanaz ve/ veya savinazın bira mayası çözeltisine kombine etkisi. 37 °C ya da 50 °C'de glucanex 20 mg ve endoglukanaz 200 µg (sırasıyla, G 37+EG, G 50+EG) ile bira mayası çözeltisi ya da önce 37 °C ya da 50 °C'de glucanex 20 mg, endoglukanaz 200 µg ve daha sonra 37 °C'de savinaz 4 µl ile (sırasıyla G 37+EG+S, G 50+EG+S) asit muamele prosesi, koyu gri sütunlar. Kontrol olarak, bira mayası çözeltisi enzimler olmaksızın inkübe edildi ve sadece asit muamele prosesi, gri kolonlar, ile işlendi.

Şekil 16. Bira mayası çözeltisi üzerinde daha yüksek konsantrasyonlarda H₃PO₄ savinaz kombinasyonunun etkisi. Farklı H₃PO₄ konsantrasyonları, 0.3M, 0.5M, 1M 100°C'de (sırasıyla 0.3M, 0.5M, 1M) koyu gri kolonlar, ile bira mayası çözeltisinin asit hidrolizi. Bira mayası çözeltisinin savinaz (4 µl) ile inkübasyonu, ardından farklı H₃PO₄

konsantrasyonları, 80°C'de 0.3M, 0.5M, 1M, 2M (sırasıyla, 0.3M+S, 0.5M+S, 1M+S), koyu gri kolonlar, ile asit hidrolizi. Kontrol olarak, bira mayası çözeltisine, asit muamele işlemi ile muamele edildi, gri kolonlar.

Şekil 17. HCl'ün bira mayası çözeltisine etkisi. Farklı H₂SO₄ konsantrasyonları, 0.3M, 0.5M, 1M, 2M 80°C'de (sırasıyla 0.3M, 0.5M, 1M, 2M) koyu gri kolonlar, ile bira mayası çözeltisinin asit hidrolizi. Kontrol olarak, bira mayası çözeltisine, asit muamele işlemi ile muamele edildi, gri kolonlar.

Şekil 18. H₂SO₄'nın bira mayası çözeltisine etkisi. Farklı H₂SO₄ konsantrasyonları, 0.3M, 0.5M, 1M, 2M 80°C'de (sırasıyla 0.3M, 0.5M, 1M, 2M) koyu gri kolonlar, ile bira mayası çözeltisinin asit hidrolizi. Kontrol olarak, bira mayası çözeltisine, asit muamele işlemi ile muamele edildi, gri kolonlar.

Şekil 19. Homojenizasyonun etkisi. Bira mayası çözeltisi, asit hidroliz prosesi ya da 1 M H₃PO₄ ile işlendi ve homojenleştirilmiş bira maya çözeltisi, 80°C'de 1 M H₃PO₄ ile işlendi (sırasıyla BY, BY 1M, HBY 1M).

Şekil 20. Glukanex, savinase ve pektinaz ile homojenizasyonun etkisi. Bira mayası çözeltisine (gri) ve homojenleştirilmiş versiyonu (koyu gri), glukanex, glukanex ve savinaz ve glukanex ve pektinaz (sırasıyla, BY G, BY G+S, BY G+P) ile muamele edilir, bunu asit hidroliz prosesi takip etmiştir.

Şekil 21. PG 1, PG 2, PG WS ve PG WS+E'nin çözünürlüklerinin karşılaştırması.

Şekil 22. PG1, PG-WS, Agrimos, Ascogen, Alphamune Alpha, ve Bio-Mos'un jel geçirgenlik kromatografisi ile karşılaştırması. % 1'lik çözeltiden alınan numuneler Superdex Peptid kolonunda (A²³⁰ ölçüldü) yürütüldü.

Şekil 23. % 1'lik çözeltilerden ölçülen, sudaki maya ürünlerinin çözünürlüğü. PG Av, Progut™ ortalama (n=9); PG S, Progut tip çözünebilir ürün; Ag, Agrimos; Al, Alphamune™; BM, Bio-Mos®

Şekil 24, beş Progut tipi numunenin analitik GPC analizini göstermektedir. Bu analiz, çözünebilir materyalin GPC profilinde çok az varyasyon olduğunu ve bu nedenle üretim sürecinin iyi standardize olduğunu göstermektedir.

Şekil 25. PG, Progut™'ın analitik GPC analizi; PG S, Progut tipi Çözünebilir ürün; ve PG WS, Progut tipi Suda Çözünebilir (tamamen (su) çözünebilir ürün, Progut S'den daha fazla işlendi).

Şekil 26. Çözünebilir poli ve oligosakkaritlerin yanı sıra peptitlerin karşılaştırılması. Göreceli miktarlarda materyal, 214 nm'de 6-14 ml elüsyon hacminde jel geçirgenlik kromatogramlarından alanlar olarak ölçülmüştür. PG_{Av}, beş farklı PG serisinin ortalama alanını ifade eder ve 1'e ayarlanır.

Şekil 27. PG'nin GPC analizi; PG S; Agrimos; Alphamune™; ve Bio-Mos®.

Şekil 28. Progut tipi materyallerde ve üç rakip üründe poli- ve oligosakkaritlerin ve peptidlerin miktarının karşılaştırılması. PG Av, ortalama (beş farklı PG grubunun ortalama alanını ifade eder ve 1'e ayarlanır); PG S; PG WS; Ag, Agrimos; Al, Alphamune™; BM, Bio-Mos®. Sonuçlar, jel geçirgenlik kromatogramlarından, 230 nm'de 6-14 ml'den ölçülen bağıl miktarlar olarak gösterilmiştir.

Şekil. 29. Beş Progut tipi ürün serisinin bakteriyel adezyon analizi sonuçları ile çözünebilir orta büyüklükteki materyalin miktarının korelasyonu. Panel A. Çözünebilir poli- ve oligosakkarit- boyutlu materyalin bağıl miktarı. (Kısmen saflaştırılmış preperatif GPC analizinden veriler, yani 400 mg % 1 PG çözeltilerden neredeyse amino asit/ peptid serbest çözünebilir bileşenler, 230 nm'de 6-14 ml'den ölçüldü. Burada, beş PG numunesinin ortalama alanı 27800 mAu idi, bu 1 değerini verdi). Panel B. *E. coli* bakteriyel adezyon analizi sonuçları.

Şekil. 30. Progut tipi ürün ve rakip numunelerin bakteriyel adezyon analizi sonuçları ile çözünebilir materyal miktarının korelasyonu. Panel A. Çözünebilir poli- ve oligosakkarit- boyutlu materyalin bağıl miktarı. (% 1'lik numuneden analitik datalar, kısmen saflaştırılmış GPC analizi, yani 400 mg % 1 PG çözeltilerden neredeyse amino asit/ peptid serbest çözünebilir bileşenler, 230 nm'de 6-14 ml'den ölçüldü. Burada, beş PG numunesinin ortalama alanı 205 mAu idi, bu 1 değerini verdi). Panel B. *E. coli* bakteriyel adezyon analizi sonuçları.

Şekil. 31. Çözünebilir poli- ve oligosakkarit- boyutlu materyalin mannoz içeriği. (yani % 1 PG ya da ilgili çözeltilerden GPC, Superdex Peptide 10/30 kolon ile 6-16 ml'de izole edilen çözünebilir bileşenler) PG Av, ortalama (n=5) ; PG WS; Ag, Agrimos; Al, Alphamune™; BM, Bio-Mos®

Şekil. 32. Mannoz içeriğinin, beş Progut tipi ürün serisinin bakteriyel adezyon analizi sonuçları ile karşılaştırılması. Panel A. Çözünebilir poli- ve oligosakkarit- boyutlu materyalin mannoz içeriği. (yani, % 1 PG çözeltilerinden GPC, Superdex Peptide 10/30

kolon ile 6-16 ml'de izole edilen çözünebilir bileşenler). Panel B. *E. coli* bakteriyel adezyon analizi sonuçları.

Şekil 33. Progut tip üründen çözünebilir poli- ve oligosakkaritlerin ¹H NMR'ı. Manno-oligosakkaritlerin bazı yapısal özellikleri NMR spektrumundan gösterilmiştir.

5 **Şekil 34.** PG ve rakiplerinin ¹H NMR karşılaştırılması.

MEVCUT BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Yeni çözünebilir bira mayasından türetilmiş ürünün üretimi

Buluş, mayadan, tercih edilen şekliyle bira mayası tipi materyallerden çözünebilir terapötik ya da nutrasötik ürünler (gıda ya da yem ürünleri ya da bunların katkı maddeleri) üretmek için yeni yöntemler ortaya koymuştur. Buluş, spesifik hidrolitik ve/veya degradatif yöntemler dahil olmak üzere materyallerin üretimi için çeşitli yöntemler ortaya koymuştur.

- 1) spesifik glikozidaz, özellikle de endoglikozidazlar,
- 2) proteazlar pronaz ve savinaz gibi protein parçalama enzimleri,
- 15 3) gelişmiş kimyasal hidroliz özellikle de güçlü asit hidrolizi ve
- 4) hammaddenin fiziksel homojenizasyonu.

Buluş ayrıca, çözünme etkinliğinin artırılması ile yöntemlerin kombinasyonunu da yöneliktir.

Yeni çözünebilir ürünü üretmek için kullanılan hammadde

- 20 Mevcut buluş, tercih edilen şekliyle uygun maya materyallerinin, özellikle fermantasyon işleminden mayaların, en çok tercih edilen şekliyle de maya mayalama işleminden türetildiğinde hammadde olarak bira mayasının kullanılmasına yöneliktir. Bu tür maya materyalinin, bitkisel kaynaklı çözünür olmayan materyalleri, özellikle de hemiselüloz sakkaritler (pektinaz ile bölünme ile gösterildiği gibi) gibi bitki polisakkaritlerini ve tahıl
- 25 kaynaklı beta glukanlar gibi bitkisel kaynaklı β-glukan materyallerini içeren bitki kaynaklı çözünmeyen materyalleri içereceği anlaşılmaktadır, tercih edilen şekliyle tahıl, mayalama işleminde kullanılan tahıldır, en çok tercih edilen şekliyle de arpadır. Yeni enzimatik reaksiyonlar, yeni ürüne ek miktarlarda tahıl tipi çözünebilir sakaritlerin üretimi için faydalı olduğu anlaşılmaktadır.

Belirli enzimatik reaksiyonlarla ya da alternatif olarak kimyasal yöntemlerle üretilen yeni sakkaritlerin ek yararlı sağlık etkilerine sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Ayrıca, tercih edilen çözünebilir kombinasyonların, hammaddeler için kombinlenerek üretilbileceği anlaşılmaktadır

5 1) mayalamada kullanılmayan mayalar ve

2) bitkisel kaynaklı polisakaritler tercih edilen şekliyle hemiselüloz polisakaritler ve/veya bitki glukanları, özellikle tahıl ve özellikle tercih edilen şekliyle arpadan türetilmiş polisakaritler ya da tahıl glukanlar, en çok tercih edilen şekliyle de arpa glukan gibi bitkisel polisakkaritleridir.

10 *Tercih edilen proses*

Tercih edilen optimize proses en azından aşağıdaki adımları içerir

1. Bira mayası hammaddesi sağlanması

2. Optimize asit hidrolizi ile hidroliz ya da enzim ve optimize edilmiş asit hidrolizi ile hidroliz.

15 Buluş ayrıca aşağıdaki adımları içeren proseslere yöneliktir:

1. Bira mayası hammaddesi sağlanması

2. Materyalin fiziksel homojenizasyonu

3. Asitle hidroliz

Buluş ayrıca aşağıdaki adımları içeren proseslere yöneliktir:

20 1. Bira mayası hammaddesi sağlanması

2. Materyalin fiziksel homojenizasyonu

3. Asitle ve enzimle hidroliz

Yeni oligosakkaritler ve düşük molekül ağırlıklı polisakkarit kompozisyonları

25 Yeni degradatif üretim süreçleri, çözünürlüğü arttıran ya da daha az çözünmeyen materyale sahip ürün vermiştir. Artan çözünürlüğün yanı sıra, materyaller enfeksiyonlar nedeniyle meydana gelen diyareye karşı artmış biyolojik etkinliğe ve hayvanların büyümesini arttırmaya yönelik etkinliğe sahiptir.

Yeni üründen çözünebilir bileşenin izolasyonu

Buluş özellikle bira mayası materyallerinden üretilen yeni çözünebilir fraksiyonun ayrılmasına yöneliktir.

Ürün içinde tercih edilen Oligosakkarit kompozisyonları

5 Buluş sahipleri, yeni çözünebilir ürünlerin biyolojik etkinliklerini Superdex Peptid kromatogram (% 1 su çözeltileri) profillerinden analiz etti. Absorbans, çözünebilir farklı boyuttaki bileşenlerin nispi miktarlarını gösterir.

10 Progut tipi ürünün biyolojik modellerde ve ilgili materyallerdeki nispi etkinliği, elüsyon alanlarının hesaplanmasıyla sayılar halinde sunulabilir (örneğin Tablo 1). Buluş, *E. coli* etkinliğine neden olan diyare gibi zararlı bakteriyel aktivitenin girmesi için yararlı olan "Çözünebilir" ve "Suda çözünür" materyaller olarak adlandırılan yeni çözünebilir sakkarit preparasyonlarını ortaya çıkarmıştır. Bu tür preparatların insan ve hayvanların büyümesi ve sağlığı için faydalı olduğu anlaşılmaktadır.

Tercih edilen ürün tipleri

15 Yeni hidroliz işleminin, mayadan türetilmiş fraksiyone olmayan kompozisyon gibi kullanılabilecek yeni çözünebilir sakkaritler ürettiği anlaşılmaktadır. Tercih edilen uygulamada preparasyon, tercih edilen şekliyle sodyum hidroksit gibi güçlü alkaline nötralize edilmiş ya da kısmen nötralize edilmiştir. Tercih edilen bir uygulamada ürün, örneğin sprey boya, tambur kurutma ya da diğer bilinen kurutma yöntemleri ile kurutulur.

20 Buluş ayrıca, kısmen fraksiyone olmuş ve saflaştırılmış sakkarit ürünleri dahil olmak üzere fraksiyone olmuş ürünlere yöneliktir. Tercih edilen kısmi saflaştırma metotları, 1) tuzsuzlaştırma, tercih edilen uygulamada, fosfatın Kalsiyum ya da başka iyonlarla çökeltilmesi gibi tuzun çökeltilmesiyle tuzdan arındırılması, 2) iyonik moleküllerin ya da hidrofobik moleküllerin, hidrofobik ya da iyon değiştirici matrisler gibi spesifik katkı maddeler ile uzaklaştırılması ve/ veya 3) çözünür olmayan materyalin ya da bunun bir parçasının uzaklaştırılması gibi başlıca sakkarit olmayan bileşenlerin bir kısmının uzaklaştırılmasını içerir. Kısmi saflaştırmanın, preparatın yeni sakkarit içeriğini tipik olarak % 10-30 veya hatta % 50 oranında arttırdığı anlaşılmaktadır. Kuvvetli fosforik asit hidrolizinden sonra tuzdan arındırma, preparasyondaki sakkarit miktarını % 30-60 oranında bile artıracaktır, böylece tercih edilen Man α 3Man- mannoz sakkaritlerin tercih edilen miktarlarını yaklaşık 15, daha fazla tercih edilen şekliyle 20 g/ kg ile yaklaşık 20 g/ke ve daha tercih edilen şekliyle 30 g/kg arasında arttırmaktadır.

Tercih edilen saflaştırma yöntemleri, sakkarit fraksiyonunun ya da bir kısmının izolasyonunu içerir. Saflaştırılmış kısımdaki sakkaritlerin içeriği tercih edilen şekliyle en az % 10, daha tercih edilen şekliyle en az % 25, daha tercih edilen şekliyle en az yaklaşık % 50'dir. NMR'da ölçülen jel filtrasyon fraksiyonlarının, en az % 60, hatta daha

5 tercih edilen şekliyle en az % 70 olan sakkarit saflıklarını içereceği tahmin edilmektedir. Benzer saflıkların diğer standart saflaştırma ve fraksiyonasyon yöntemleri ile elde edilebileceği anlaşılmaktadır.

Sakkarit materyallerinin tercih edilen boyutları

Buluş tercih edilen başlıca büyüklük aralıklarını ortaya çıkarmıştır, bunlar Superdex

10 Peptid kolonundan 6 ila 12 dakika arasında elüsyon yapan büyük boyutlu ürünlerin ve yaklaşık 12 dakika ila yaklaşık 16 dakika arasında elüsyon yapan ara boyutlu üründür.

Buluş özellikle, yeni kullanışlı sakkaritler içeren ve ürünün geliştirilmiş biyolojik etkinliği ile ilişkili olan açıklanan sakkarit fraksiyonlarına yöneliktir.

Tercih edilen çözünebilir polisakkarit boyutları ve fraksiyonları

15 Ürün, yaklaşık 20 ila yaklaşık 30 Heksoz (Heks) birim jel filtrasyon büyüklüğüne ve olası daha büyük çözünebilir polisakaritlere sahip sakkaritlere karşılık gelen boşlukta bir pike sahiptir. Daha tercih edilen şekliyle, yaklaşık 7.7 dakikalık boşluk, yaklaşık 25 heksoz birim sakkarit ve daha büyük olan çözünebilir polisakaritlere karşılık gelir. Buluş, yeni ürünler için bir karakteristik olan yüksek miktarda çözünebilir polisakarit

20 materyalleri içeren yeni ürünlere yöneliktir. Tercih edilen polisakkarit fraksiyonları, yaklaşık 20 heksoz birimlik sakkaritlere karşılık gelen ve Superdex Peptid kolonundan ve 6-12 dakikadan daha büyük olan 6-9 dakikadan elüe edilen fraksiyonu içerir.

12 dakikalık elüsyon pozisyonunun, 10'dan fazla monosakkarit kalıntısı içeren oligosakkaritlerin (DP10) ve polisakkaritlerin sınırında olduğu anlaşılmaktadır.

25 Buluş böylece aşağıdaki polisakkarit fraksiyonlarına yönlendirilmiştir

a) 10 ila 30 mer ya da jel filtrasyon boyutu 10 ila en az 30 Hex birime kadar olan ve daha büyük çözünebilir polisakkaritler

b) 20 ila 30 mer ya da buluşa göre işlemlerle üretilen jel filtrasyon boyutu 20 ila en az 30 Hex birim

Bahsedilen ara büyüklükteki ürün

Buluş ayrıca yaklaşık 12 dakika ila yaklaşık 16 dakika arasında elüe edilen tercih edilen ara ürün ürününe yöneliktir. Bu aralık, yaklaşık di/ trisakkaritlerden yaklaşık dekasakkaritlere ya da 3 ila en az yaklaşık 10-Heks birim jel filtrasyon boyutuna sahip sakkaritlerden oligosakkaritlere karşılık gelir.

Tercih edilen daha büyük oligosakkaritler ve polisakkarit fraksiyonu

Buluş ayrıca, yaklaşık 6 dakika ila 14 dakika arasında elüe edilen daha büyük oligosakkaritlerin ve polisakaritlerin kombinasyon fraksiyonuna yöneliktir. Bu tercih edilen fraksiyon yaklaşık 4-6 mer oligosakkaritleri, daha tercih edilen şekliyle yaklaşık 5-6-mer'den en az yaklaşık 20-30 mer polisakkaritleri ya da 5 ila en az yaklaşık 30-Hex birim jel filtrasyon boyutu ve daha büyük çözünebilir polisakkaritleri içerir.

Jel filtrasyonunda iki heksoz (glikoz, mannoz ya da galaktoz gibi) birimi, tipik olarak oligosakkarit ya da polisakarit içindeki bir HexNAc'ye (örneğin, GlcNAc ya da GalNAc) karşılık gelir ve bir sakkaritin beklenen elüsyon büyüklüğü tipik olarak Heks birim miktarından hesaplanabilir.

Hammaddenin homojenizasyonu ve hidroliz ile kombinasyonu

Asit hidroliz işleminden önce bira mayası çözeltisinin homojenizasyonunun, Progut tipi ürün çözünürlüğünü, bira mayası hammaddesi ve daha fazla asitle % 15 oranında arttırdığı ortaya çıkmıştır.

Buluş özellikle tercih edilen bir uygulamada asit hidrolizinde, hidrolizden önce homojenizasyon içeren işlemlere yöneliktir.

Enzimatik muamele asit hidroliz ürününün (PG) çözünürlüğünü artırır

Buluş, asit ile hidrolize edilen ürünün, proteaz ya da polisakkarit parçalama enzimleri ile enzimatik işlemle daha da çözülebileceğini ortaya çıkarmıştır. Tercih edilen enzimatik işlem, Pronaz, Savinaz, Pektinaz, Glucanex ve aynı protein ya da polisakarit tipi için spesifisiteye sahip olan savinaz ya da enzimlerle kombine edilmiş Glucanex'i içerir.

Asit hidrolizinden önce enzimatik muamele

Buluş, asit hidrolizinden önce enzimatik olarak proteaz ya da polisakkarit parçalama enzimleri ile muamele edildiğinde asit tarafından hidrolize edilen ürünün daha

çözünebilir olduğunu ortaya koymuştur. Tercih edilen enzimatik işlem, Pronaz, Savinaz, Pektinaz, Glucanex ve aynı protein ya da polisakarit tipi için spesifisiteye sahip olan savinaz ya da enzimler ile isteğe bağlı olarak kombine edilmiş savinaz ve englukanaz enzimiyle kombine edilmiş Glucanex'i içerir.

5 *Optimize asit hidroliz koşulları*

Buluş, yeni çözünebilir ürünün üretilmesi için optimize edilmiş asit hidroliz koşullarına yöneliktir. Buluş, artan asit miktarlarıyla asit muamelelerinin, bira mayasının çözünürlüğünü arttırdığını ortaya koymuştur.

Buluş özellikle optimize hidroliz işlemlerine yöneliktir, burada kuru ağırlık olarak hesaplanan ham maya maddesinin miktarı, reaksiyon toplam hacminin % 5-35'i ağırlık/hacim (w/v) arasındadır, daha fazla tercih edilen şekliyle, reaksiyon toplam hacminin % 10-30'u (w/v), daha da tercih edilen şekliyle % 15-25'i (w/v) ve en çok tercih edilen şekliyle yaklaşık % 20'si (w/v) arasındadır.

Bu buluş, zamana, sıcaklığa, asit konsantrasyonuna (numune miktarı başına asit miktarı) ve asit tipine göre optimize edilmiş hidroliz koşullarına yöneliktir. Tercih edilen asit, inorganik asitler fosforik asit (H_3PO_4), hidroklorik asit ve sülfürik asiti içerir. En çok tercih edilen asit fosforik asittir (H_3PO_4).

Mevcut buluş, özellikle geliştirilmiş güçlü asit hidrolizi ya da enzimatik hidroliz koşulları ile üretilen yeni progut tipi ürünleri ya da yeni biyoaktif ve çözünebilir ürünü elde etmek için bunların şaşırtıcı şekilde etkili kombinasyonlarını ortaya koymaktadır. Yaklaşık 0.5 M ila yaklaşık 1 M asit ve/ veya 75-100 derece Santigrat yüksek reaksiyon sıcaklığı dahil üzere çok yüksek asit konsantrasyonları gibi, şaşırtıcı derecede güçlü asit muamele koşullarının daha yüksek çözünürlük elde etmek ve yüksek oranda biyoaktif düşük molekül ağırlıklı polisakkaritler ve oligosakkaritler elde etmek için gerekli olduğu gözlenmiştir. Koşullar drastiktir ve maya materyallerinin hidrolize karşı yüksek direncini ortaya çıkarır, bununla birlikte, yüksek sıcaklıkta asitin 2 M'ye yükseltilmesi, hücre duvar materyallerinin daha az etkili çözünürlüğe ve/ veya hidrolizin tamamen hidrolize kapatılmasının neden olduğu serbest monosakkaritlerin artan miktarına neden olacak şekilde koşullar ile optimumdur.

30 *H_3PO_4 ile optimize hidroliz*

Buluş tercih edilen şekliyle 0.5 M'nin üzerinde, daha tercih edilen şekliyle yaklaşık 0,75 M'nin üzerinde ya da en çok tercih edilen şekliyle yaklaşık 1 M'nin üzerinde konsantrasyonlara sahip fosforik asit (H_3PO_4) kullanımına yöneliktir.

5 Çözünürlüğün etkisi 2 M fosforik asit ile 0,5 M etkisinin altında bile azalmış, aşırı asit yoğunluğu şaşırtıcı şekilde hidrolizi artırmamış, fakat materyalin çökmesine neden olmuştur. Bu, etkin çözünürlük için optimum asit konsantrasyonunun yaklaşık 0.5 M ile yaklaşık 1 M olduğunu gösterir.

10 Tercih edilen bir uygulamada yaklaşık 1 M H_3PO_4 optimal konsantrasyon olarak kullanılır, bir örnekte, reaksiyon yaklaşık 80 santigrat derece sıcaklıkta gerçekleştirildiğinde (tercih edilen şekliyle 70-100 derece Santigrat arasında, daha da tercih edilen şekliyle 70 ila 95 derece Santigrat arasında) yaklaşık 0.75 M ile yaklaşık 1.25 M arasında ve hatta yaklaşık 0.8 M ile yaklaşık 1.2 M arasında ve en çok yaklaşık 0.9 M ile yaklaşık 1.1 M arasındadır. Tercih edilen reaksiyon süresi yaklaşık 4 saat, tercih edilen şekliyle 2 ila 8 saat, daha tercih edilen şekliyle 3 ila 5 saat, daha da tercih edilen şekliyle 3.5 ila 4.5 saattir.

Buluş özellikle güçlü hidroliz koşullarına ya da güçlü asit hidroliz koşullarına ve buluşa göre artan miktarda yüksek ölçüde çözünebilir ve biyoaktif sakkaritlerin elde edilmesi için enzimatik hidrolize yöneliktir, tercih edilen bir uygulamada, mevcut buluşa uygun hidroliz koşulu kullanılır.

20 Tercih edilen bir uygulamada, koşullar yaklaşık 4 saat boyunca yaklaşık 1 M H_3PO_4 ve yaklaşık 75 ila 90 derece Santigrat derecedir. Sıcaklık arttığında, asit miktarı ve/veya reaksiyon süresi azaltılabilir ve bunun tersi yapılabilir. Tercih edilen başka bir uygulamada, sıcaklık yaklaşık 90 ila 100 derece Santigrat derece artar ve asit miktarı yaklaşık 0.5 M ile yaklaşık 1 M arasındadır ve reaksiyon süresi yaklaşık 4 saattir. Şekil 25 16, 0,5 ve 1 M asit ile 100 derecede yüksek çözünürlük gösterir.

Ayrıca, yüksek derecede çözünür ve biyoaktif ürünün, savinaz enzimi için Şekil 16'da gösterildiği gibi bir enzim ya da asit hidroliziyle kombinasyon halinde bir enzim kullanılarak elde edilebileceği de anlaşılmaktadır. Enzimin kullanımı çözünürlük işlemini geliştirir, bu nedenle daha düşük asit konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı ya da reaksiyon süresi gereklidir. Tercih edilen bir uygulamada buluş, buluşa uygun bir enzimin 0.3 - 1 M asit ile kombinasyon halinde kullanımına yöneliktir.

Hidroklorik asit HCl ile optimize hidroliz

Buluş tercih edilen şekliyle 0.5 M'nin üzerinde, daha tercih edilen şekliyle yaklaşık 0,75 M'nin üzerinde ya da en çok tercih edilen şekliyle yaklaşık 1 M'nin üzerinde konsantrasyonlara sahip HCl kullanımına yöneliktir. 2 M asit daha yüksek çözünürlük sağlar, ancak aynı zamanda asit hidroliz koşulları olarak monosakkaritlerin miktarının artması, çok kuvvetli mineral asidin toplam hidroliz koşullarına yaklaşmasına neden olur.

Tercih edilen bir uygulamada yaklaşık HCl optimal konsantrasyon olarak kullanılır, bir örnekte, reaksiyon yaklaşık 80 santigrat derece sıcaklıkta gerçekleştirildiğinde (tercih edilen şekliyle 70-90 derece Santigrat arasında, daha da tercih edilen şekliyle 75 ila 85 derece Santigrat arasında) yaklaşık 0.75 M ila yaklaşık 1.25 M arasında ve hatta yaklaşık 0.8 M ila yaklaşık 1.2 M arasında ve en çok yaklaşık 0.9 M ila yaklaşık 1.1 M arasındadır. Tercih edilen reaksiyon süresi yaklaşık 4 saat, tercih edilen şekliyle 2 ila 8 saat, daha tercih edilen şekliyle 3 ila 5 saat, daha da tercih edilen şekliyle 3.5 ila 4.5 saat arasındadır.

Buluş ayrıca, diğer asit muameleleri için yukarıda tarif edildiği gibi, 0.5 M'nin üzerinde ve yaklaşık 1 M'de yüksek konsantrasyonlarda H_2SO_4 'ün kullanımına yöneliktir. Veriler, 2 M asidin artmış çözündürme meydana getirmedeğini ve muhtemelen artan çöktürmeye işaret ettiğini göstermektedir.

Dahası

Çözünme yöntemlerinin kombinasyonları

Buluş ayrıca deney bölümünde tarif edilen metotların çoklu yararlı kombinasyonlarını ortaya çıkarmıştır. Tercih edilen kombinasyonlar, enzimatik ya da kimyasal hidroliz ile homojenizasyonu içerir.

Tercih edilen bir uygulamada buluş, homojenizasyon ve geliştirilmiş kimyasal hidroliz gibi yöntemlerin kombinasyonlarına yöneliktir. Bu yöntem, ürünün çözündürülmesinde yüksek verimlilik ve yöntem ve reaktiflerin düşük maliyetleri nedeniyle tercih edilir.

Buluş ayrıca, proteinlerin enzimatik parçalanmasının ve glikozidaz parçalanmasının tercih edilen kombinasyonlarını ortaya çıkarmıştır. Metot tercih edilen şekliyle homojenizasyon ile kombine edilir.

Buluş, enzimatik protein parçalanması ile kimyasal parçalanma yöntemlerinin ve/ veya yüksek ürün verimi üreten glikozidaz parçalanmasının kombinasyonlarını ortaya çıkarmıştır. Metot tercih edilen şekliyle homojenizasyon ile kombine edilir.

Çözünebilir karbonhidratların geliştirilmiş etkinlikleri

- 5 Buluş, tercih edilen çözündürme yöntemlerinin, yararlı biyolojik etkinliklere sahip, artan miktarlarda çözünür moleküler materyal ürettiğini ortaya çıkarmıştır. Buluş özellikle, diyareye neden olan mikroplar, özellikle de *E. coli* içeren bakteriler gibi patojenik mikroplara karşı artan etkinliğe yöneliktir.

Tercih edilen enzimatik işlemler

10 **Tercih edilen endoglikozidazlar**

Glikoz polisakkaritlerinin parçalanması

Buluş, glikoz polisakkarit parçalama enzimlerinin, yeni çözünebilir ürünün üretiminde faydalı olduğunu ortaya çıkarmıştır.

- 15 Tercih edilen bir uygulamada, endo-glukosidaz ve selülaz aktiviteleri içeren glukaneX gibi β -bağlı glikoz polisakkarit parçalama endo- β -glukosidaz enzimleri, yeni üretim prosesinde çözünmeyen materyalin azaltılmasında yararlı etkinliklere sahiptir. Buluş özellikle selüloz tipi ve beta-glukan polisakkaritleri parçalamakla ilgilidir. Tercih edilen şekliyle parçalanacak β -glukanlar, selüloz gibi β -glukanları, glikoz kalıntıları arasında β 4 ve β 3-bağları dahil tahıl β -glukanları içeren Glc β 4Glc yapısıdır. Tercih edilen endo-
- 20 β -glukosidaz, endo-glukosidazlar ve selülazlardır.

Buluş özellikle daha yüksek çözünürlük üretmek ve/ veya çözünebilir biyoaktif glukan oligosakkaritleri üretmek için tercih edilen bir uygulamada, bira mayası materyalinde maya hücre duvarı glukani, tahıl glukani ve/ veya selüloz malzemesi gibi kalıntı çözünmeyen β -glukanların parçalanmasıyla ilgilidir.

- 25 Buluş özellikle, aşağıdaki formüle göre yapıları içeren selüloz ve/ veya tahıl β -glukan oligosakkaritlerinin üretilmesine yöneliktir:

[Glc β 4]_nGlc-yapıları,

Burada n, 2-20, daha tercih edilen şekliyle 2-10 arasında bir tamsayıdır,

Buluş daha çok tercih edilen şekliyle ürün için tahıl tipi glukan oligosakkarit üretimine yöneliktir. Tercih edilen şekliyle ürün, aşağıdaki formüle göre glikoz kalıntıları arasında $\beta 4$ ve $\beta 3$ -bağlantılarını içerir:

$[Glc\beta 4]_{n1}[Glc\beta 3]_{n2}[Glc\beta 4]_{n3}Glc\beta 3[Glc\beta 4]_{n4}Glc$ -yapılar,

- 5 Burada, $n1$, $n3$ ve $n4$, 0 ila yaklaşık 5, tercih edilen şekliyle 1 ila 4, daha da tercih edilen şekliyle 1 ila 3 arasında bağımsız tamsayılardır

ve

$n2$, 0 ya da 1'dir

- 10 Bir örnek özellikle glukan oligosakkaritlerin, endo- β -glukozidaz katalize üretimine yöneliktir.

- Buluş, buluşa göre tercih edilen fraksiyonlarda α -bağlı glikoz materyallerinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Buluş ayrıca, yeni çözünebilir ürünün üretiminde endo- α -glukosidazların kullanımına yöneliktir. α -glikoz polisakkarit parçalama enzimleri özellikle yeni ürün kompozisyonunun tercih edilen ayarlanması ve optimizasyonudur
- 15 ve endo- α -glukosidaz aktivitesi, özellikle de nişasta ya da amiloz parçalama enzimi, özellikle de endo- $\alpha 4$ -glukosidaz aktivitesi olan ek enzimler olarak tercih edilir.

Pektin ve ilgili hemiselüloz materyallerinin parçalanması

- Buluş ayrıca, bira mayası materyalinin bir pektinaz enzim preparatı ile işlenmesine de yöneliktir. Pektinazların çoklu etkinlik içerdiği bildirilmiştir. Bu buluş, pektinaz enzimi
- 20 içeren pektin ve/ veya diğer hemiselüloz tipi materyallerin, pektinaz enzimi içeren preparatları içeren hemiselüloz materyalleri ile parçalanmasına yöneliktir.

Tercih edilen bir uygulamada, buluş ürüne, pektin ve/ veya hemiselüloz türevli oligosakkaritlerin ya da düşük molekül ağırlıklı çözünebilir polisakkaritlerin üretilmesine yöneliktir.

- 25 Tercih edilen proteaz işlemi

Bir örnek, protein materyallerini hammaddeden ya da asitle hidrolize edilmiş malteriyalden ayırmak için proteazın kullanımına yöneliktir. Tercih edilen proteazlar savinaz ya da pronazdır.

Arttırılmış çözünürlüğe sahip materyaller içeren yeni glikan,

- 30 Progut tipi ürün Çözünebilir ve Progut tipi ürün Suda çözünebilir

- Mevcut buluş, buluşa göre optimize edilmiş yöntemler ile artmış su çözünürlüğü olan bir asit hidrolize maya preparasyonu üretmenin mümkün olduğunu ortaya koymuştur. Yüksek derecede çözünür olan materyalin, yem ve gıdaların daha etkili formülasyonu için faydalı olduğu anlaşılmaktadır. Çözünebilir kısım özellikle sıvı yem ve sıvı gıda veya gıda katkı maddeleri, özellikle de içecekler ve meşrubatlar için tercih edilir.
- Çözünebilir materyalin % 50'sinden daha azına sahip olan materyalin sıvı gıdalar ya da içecekler için sıvı maddelerin şişelenmesi ve üretim sırasında aktarılması gibi pratik nedenlerden dolayı yararlı olmadığı ve pratik malzemenin tercih edilen şekliyle % 50'nin üzerinde çözünürlüğe sahip olması gerektiği anlaşılmaktadır. Bazı uygulamaların kısmen çözünmeyen materyalleri tolere edebileceği ve çözünmeyen materyalin küçük bir kısmının, gıda bileşimlerinde, beslenme ve sağlığı desteklemek için lif olarak tercih edilen bir uygulamada kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Progot tipi ürünün toplam çözünürlüğü ve hayvan yeminde kullanılan bazı referans ürünlere kıyasla Çözünebilir versiyonu Şekil 23'te gösterilmiştir.
- Yeni çözünebilir ürünler, arttırılmış biyolojik etkinliğe sahip daha yüksek miktarda çözünür sakarit materyalleri (oligosakkaritler ve polisakaritler) içerir. Çözünebilir poli ve oligosakkarit materyallerinin (Şekil 25'de gösterildiği gibi Superdex Peptid kolonundan 6-14 dakika arasında elüe edilerek) miktarı Şekil 26 ve 28'de gösterilmektedir. Progot tipi ürün Çözünebilir ve Progot tipi ürün Suda Çözünürlerde bulunan oligosakkaritlerin miktarı, daha az optimize edilmiş Progot tipi ürüne göre yaklaşık 2 kat daha yüksek ve hatta 3 kat daha yüksek olmuştur.

Yeni çözünebilir materyallerin tercih edilen çözünürlük aralıkları

- Buluş özellikle yeni Progot tipi Çözünebilir ürüne yöneliktir, burada toplam çözünürlük % 1 su çözeltisi olarak % 55'in üzerindedir, daha tercih edilen şekliyle % 60'ın üzerindedir, daha da tercih edilen şekliyle % 65'in üzerinde, daha da tercih edilen şekliyle % 63'ün üzerinde, daha da tercih edilen şekliyle % 66'nın üzerinde, daha da tercih edilen şekliyle % 67'nin üzerinde ve en çok tercih edilen şekliyle % 68'in üzerindedir. Tercih edilen bir uygulamada, suda çözünürlük % 70, tercih edilen şekliyle % 55 ila % 85 aralığında, daha tercih edilen şekliyle % 60 ila % 80 aralığında, daha tercih edilen şekliyle % 63 ila % 77 aralığında, daha tercih edilen şekliyle % 65 ila % 75 aralığında, daha da tercih edilen şekliyle % 66 ila % 74 aralığında, daha da tercih edilen şekliyle % 67 ila % 73 aralığındadır.

Buluş ayrıca, pratik olarak tamamen suda çözünür sakkarit içeren ürünlere yöneliktir, burada suda çözünür ürün, oda sıcaklığında (tercih edilen şekliyle 20-25 derece Celsius arasında) hemen hemen % 1 su çözeltisi olarak suda çözünürlüğü tamamlar. Tercih edilen suda çözünür fraksiyon, Progut tipi üründen, tercih edilen şekliyle Progut tipi ürün Çözülebilir'den izole edilir. Tercih edilen tam su çözünürlüğü en az % 90 ya da % 90 üzeri, daha tercih edilen şekliyle % 93 üzeri, daha da tercih edilen şekliyle % 95'in üzeri, daha da tercih edilen şekliyle % 96'nın üzeri, daha da tercih edilen şekliyle % 97 üzeri ve en çok tercih edilen şekliyle % 98 üzerindedir.

Buluş ayrıca, çözünür olmayan materyallerin kısmen uzaklaştırıldığı Progut tipi ürün Suda Yarı Çözülebilir'e yöneliktir. Düşük kısmi uzaklaştırma işleminin Çözünebilir ürüne ve yüksek bir uzaklaştırmanın Suda Çözünebilir ürüne benzer materyal sağladığı anlaşılmaktadır. Tercih edilen bir uygulamada, çözünmeyen bileşenler Suda Yarı Çözünür ürün elde etmek için yaklaşık % 10 ila yaklaşık % 80 arasında, daha tercih edilen şekliyle yaklaşık % 20 ila yaklaşık % 75, daha tercih edilen şekliyle yaklaşık % 25 ila yaklaşık % 66 arasında, daha çok tercih edilen şekliyle yaklaşık % 33 ila yaklaşık % 66 arasında değişen bir oranda çıkarılabilir. Suda Yarı Çözünür ürünün toplam çözünürlüğü tercih edilen şekliyle yaklaşık % 73 ila yaklaşık % 94, daha tercih edilen şekliyle yaklaşık % 76 ila yaklaşık % 92.5, daha da tercih edilen şekliyle yaklaşık % 80 ila yaklaşık % 90 ve hatta daha tercih edilen şekliyle yaklaşık % 81 ila yaklaşık % 89 aralığındadır. Tercih edilen bir uygulamada, çözünürlük yaklaşık % 80'e yakın, tercih edilen şekliyle yaklaşık % 75 ila yaklaşık % 85'e yakın ya da yaklaşık % 85 ila yaklaşık % 95 aralığında, yaklaşık % 90'a yakındır. Suda Yarı çözünebilir fraksiyonun toplam çözünürlüğü, tercih edilen şekliyle Çözünebilir ve Suda Çözünebilir fraksiyon / materyaller arasındaki çözünürlükleri kapsayacak şekilde ayarlanır.

Yaklaşık olarak kelimesi tercih edilen şekliyle, tercih edilen uygulamada, tam değer % 2 birimi içinde ve daha tercih edilen şekliyle % 1 ya da daha tercih edilen şekliyle % 0.5 birim içinde ya da ayrı bir uygulamada tam olarak değere işaret etmektedir.

Biyolojik olarak aktif karbonhidrat bileşenleri

Buluş ayrıca, geliştirilmiş çözünürlüğe sahip yeni materyalin, diyareye neden olan bakterilere karşı biyolojik etkinliğini geliştirdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu, Şekil 29, Şekil 30 panel B'deki ilgili materyallerle karşılaştırıldığında görülmektedir. Biyolojik etkinlik, UV absorbe edici materyallerin varlığı ile ilişkilidir. Materyaller deproteinize edilmiş ve

hidrofobik impüriteler çıkarılmıştır ve NMR ile gözlemlenebilen oligosakkarit aralığında önemli impürite içermiyordu. Bu nedenle absorbansın karbonhidrat materyallerine, suda çözünabilir oligo ve polisakkaritleri içeren sakkaritlere, kısmen de aldehit absorbansının azaltılmasına ve işlemde oluşan uç türevlerinin azaltılmasına ve sakkaritlere bağlı az miktarda GlcNAc kalıntısına bağlı olduğu görülmektedir. Minör miktardaki peptit materyalleri muhtemelen şekil lejantlarında belirtildiği gibi dahil edilir, ancak NMR'ye dayanarak bunların nicel önemi sınırlıdır.

Aktif karbonhidrat bileşenleri

Mannoz sakkaritler

- Şekil 31'de gösterilen analiz, yüksek derecede aktif, çözünabilir Progut tipi yeni ürünlerin artan miktarlarda mannoz oligosakkaritleri içerdiğini ortaya koymaktadır. Şekil 32, fraksiyonların biyolojik aktivitelerinin kısmen mannoz içeriği ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Buluş sahipleri, Progut tipi ürünlerdeki yeni yüksek aktif mannoz oligosakkaritleri ve polisakkaritleri NMR analiz ile tanımlayabilmiştir. Bu tip oligosakkaritlerin artışı özellikle yeni nutrasötik moleküller için yararlıdır. Yeni çözünabilir ürünlerdeki mannoz içeriği yaklaşık % 50 oranında artmıştır.

Tercih edilen terminal Man α 3 yapıları

- Buluş, mannoz içeriğinin yanında, Progut tipi ürünlerin daha yüksek etkinliğinin (örneğin, Şekil 30'da gösterildiği gibi) mannoz oligosakkaritlerinin spesifik yapıları ile açıklandığını ortaya koymuştur. Buluş özellikle şekil 33-34'te gösterildiği gibi artmış miktarda Man α 3 yapıları içeren oligosakkarit sekanslarına yöneliktir. Buluş ayrıca, mayadan elde edilen mannoz sakkaritlerin önemli parçaları olan lineer Man α 2-yapılarında, indirgeyici olmayan uç terminal ve 3-sübstitüeli Man α 2-epitoplar ve orta zincirli Man α 2-epitoplarının ayrı miktarını ortaya çıkarmıştır.
- Buluş, tercih edilen şekliyle, bu buluşa uygun işlemle üretilen oligosakkaritleri içeren ve bira mayasından üretilen tercih edilen bir uygulamada, artırılmış terminal Man α 3 yapılarına, daha tercih edilen şekliyle indirgeyici olmayan uç Man α 3Man α 3'ye yöneliktir. Tercih edilen bir uygulamada terminal Man α 3 yapılarının miktarı NMR sinyalinin verir, bu indirgemeyen uç terminal ve 3-sübstitüeli Man α 2-epitopların NMR sinyalinden daha büyük ya da Şekil 33-34'te gösterildiği gibi lineer Man α 2-yapılarında orta zincirli Man α 2-epitopların NMR sinyalinden daha büyüktür. Tercih edilen bir uygulamada Man α 3 sinyali, Şekil 33 ve 34'te gösterildiği gibi proton NMR

spektroskopisinde Şekil 33'te işaretlenen Man α 2-epitop sinyallerinden birine göre daha yüksektir. Buluş özellikle Man α 3-glikanlara yöneliktir, burada Man α 3 pozisyonundaki proton NMR sinyali, Şekil 33'te gösterilen karşılaştırmalı Man α 2-sinyalinden en az % 5 daha yüksek, daha tercih edilen şekliyle en az % 7 daha, daha da tercih edilen şekliyle 9 ve en çok tercih edilen şekliyle en az % 10 daha yüksektir.

Terminal indirgemeyen uç Man α 3Man α 2 yapılarının, patojenlerin, özellikle *E. coli* gibi diyarejenik bakterilerin inhibisyonu için yönlendirilecek yeni etken maddeler olduğu anlaşılmaktadır. İndirgeyici uç Man α 2 yapısı, glikan yeni konformasyonunu verir. Bu glikanın etkinliği, Man α 3Man β 4GlcNAc yapıları ya da disakkarit epitoplarının azaltılması gibi diğer glikanlara dayalı olarak bilinemez.

Mevcut buluş ayrıca, tercih edilen mannoz oligosakkaritlerinin kg'ı başına en az yaklaşık 10 gram, daha da tercih edilen şekliyle en az 15 gram/kg, daha da tercih edilen şekliyle en az 16 gram, daha da tercih edilen şekliyle en az 17 gram, daha da tercih edilen şekliyle en az 18 gram, daha da tercih edilen şekliyle en az 19 gram, daha da tercih edilen şekliyle en az 20 gram, daha da tercih edilen şekliyle en az 21 gram, daha da tercih edilen şekliyle en az 22 gram ve en çok tercih edilen şekliyle en az 23 ya da 24 gram içeren terminal Man α 3 ile zenginleştirilmiş sakkarit fraksiyonlarına yöneliktir. Tercih edilen mannoz oligosakkarit, tercih edilen şekliyle esas olarak mannoz olmak üzere mannoz içeren oligosakkaritleri içerir, fakat ayrıca diğer monosakkarit kalıntıları tercih edilen şekliyle Glc ya da GlcNAc ya da GlcN, tercih edilen şekliyle küçük bileşenler olarak içerebilir.

Diğer aktif karbonhidrat bileşenleri, özel β -glukosakkarit sinyalleri

Buluş sahibi, proton NMR spektrumunda yaklaşık 4.51-4.53 ppm'lik bölgede özel β -glukoz oligosakkarit sinyallerini gözlemlemiştir. Bunlar, alışılmadık düşük moleküler ağırlıklı glikoz oligosakkarit ve polisakkarit sinyalleri ile ilişkilidir. Buluş özellikle, bölgedeki karakteristik sinyallere sahip β 6- bağlı glikoz sakkariti ile zenginleştirilmiş oligosakkaritlere yöneliktir. (Glc6'nın gentiobiose H1'si yaklaşık 4.51 ppm'dir, orta zincir Glc6 kalıntılarının sinyalleri yaklaşık 4,519; 4,529 ve 4.523 ppm'dir; Lo V.M. et al. Carbohydr Res. (1993) 245, 333-345).

Buluş bundan başka, materyalin ayrıca az miktarda GlcN/GlcNAc içerdiği, tercih edilen şekliyle materyallerin mayadan elde edilen Glc β - materyalleri olduğu ve daha çok

tercih edilen şekliyle Glc β 6 kalıntıları içerdiği, buluşa göre sakarit materyallerine yöneliktir.

Buluş, β 4-bağlı glukoz oligosakaritlerine yönelik olarak ayrı bir uygulamada, maya ham materyali (tahıl) β 3/4glukan ya da selüloz içeren materyallerde yetiştirildiğinde, tercih edilen β (3/4)glukoz sakkarit sinyalleri tercih edilen bölgede yer almaktadır (ör. β 3/4glukan oligosakkaritler, yaklaşık 4.53 ppm'de β 4-bağlı Glc H1 sinyallerine sahiptir). Glikoz materyallerinin miktarı, monosakkarit analizine dayanan numunedeki mannoz materyalleri ile karşılaştırılabilir, Glc materyallerinin bir kısmı Glc α -materyallerini içermektedir, ancak hem alfa hem de beta sinyalleri, önemli miktarda sakkaritlere karşılık gelmektedir.

Buluşa göre tercih edilen zenginleştirilmiş oligosakkaritler

Buluş, buluşa göre tercih edilen sakkaritlere yönelik olup, burada sinyaller özellikle Progut tipi ürünlerin NMR sinyallerinin keskinliğinden dolayı oligosakkaritlerden elde edilir. Buluşa göre oligosakaritler 2-10 arasında oligomerizasyon derecesine sahiptir. Arka planın çoğunun, çözünmeyen glukanlar ve büyük polisakaritler gibi polisakarit maddelere yönelik olduğu anlaşılmaktadır.

Toplam sakarit içeriği ve daha büyük sakarit içeriği

UV absorbansı ile oligosakkaritler ve polisakkaritlerin miktar tayini

Buluş, spesifik büyük oligosakkarit ve polisakkarit içeriğine sahip yeni Progut tipi ürünlere yöneliktir.

0.4 gram kuru Progut tipi ürün ya da nispi ürün numunesi % 1'lik çözelti (ağırlık / hacim) olarak su içinde seyreltilmiştir. Numune santrifüj edilmiş ve suda çözünebilir fraksiyon kurutulmuş ve daha fazla analiz için alınmıştır. Oligosakkarit ve polisakkarit fraksiyonu, 1.4 ml Dowex H + -resin ve bond elut kolonu (analiz, deney bölümü) ile inkübe edilerek proteinler ve peptitler ve lipofilik impüritelerin uzaklaştırılması ile daha da saflaştırılmıştır.

Saflaştırılmış numune vakum santrifüjünde kurutulmuş ve 1000 mikrolitre su içinde çözülmüştür. 1000 mikro litrenin 15 mikrolitre numunesi, Superdex peptit kolonunda gerçekleştirilmiş ve 6 ila 14 dakika arasında absorbans alanı, 214 nm'de toplanmıştır. Standardize edilmiş Progut tipi ürün, kolondan 6-14 dakika (daha büyük

oligosakkaritler ve polisakkaritler içeren) arasında elüe edilerek daha büyük sakkaritler aralığında 614 mAU (absorbans birimleri) vermiştir.

Buluş, spesifik olarak, sakkarit fraksiyonu gerekli olarak kirletici peptitlerden ve proteinlerden sakkarit fraksiyonundan saflaştırıldığında, 1.0 ml/ dak akış hızı ile
 5 Superdex peptit kolonunda (Amersham Pharmacia, Analiz Örnekleri) çalıştırıldığında, 6 mg orijinal kuru numune başına 6-14 dakika arasında absorbans integrali olarak 680 mAU'dan (Abs birimleri, absorbans birimleri) daha yüksek değer veren, yeni Progut tipi ürünlere, özellikle çözünebilir ve suda çözünebilir ürüne yöneliktir. Buluş, aynı zamanda, jel filtrasyonunda karşılık gelen materyal boyut aralığı ile eşdeğer
 10 oligosakarit fraksiyonlarına ve buluşa göre proses ile üretilen materyale de yöneliktir. Absorbans integrali için tercih edilen değerler 1.3 kat, daha fazla tercih edilen şekliyle 1.5 kat, daha da fazla tercih edilen şekliyle 1.7 kat, daha da fazla tercih edilen şekliyle 1.8 kat, daha da fazla tercih edilen şekliyle 2.0 kat, daha da fazla tercih edilen şekliyle 2.3 kat, daha da fazla tercih edilen şekliyle 2.5 kat, daha da fazla tercih edilen şekliyle
 15 2.7 kat, daha da fazla tercih edilen şekliyle 2.8 kat ve en çok tercih edilen haliyle 2.9 kat, 3.0 kat ya da 3.2 kat 680 mAU'dur.

Oligosakkaritler ve polisakkaritlerin Mannoze kütlesi ile miktar tayini

Buluş, spesifik total oligosakkarit ve polisakkarit içeriğine sahip yeni Progut tipi ürünlere yöneliktir. Bu, Superdex peptit kolonundan 6 ila 16 dakika arasında elüe edilen
 20 oligosakarit ve/ veya polisakkarit fraksiyonundaki toplam mannoze içeriğinin analiz edilmesiyle gerçekleştirildi.

Çözünebilir sakkarit materyallerin saflaştırılması ya da izolasyonu

Mevcut buluş, özellikle, buluşa göre tercih edilen sakkarit tiplerinden bir ya da daha fazlasını içeren saflaştırılmış ya da zenginleştirilmiş fraksiyonlara yöneliktir.
 25 Zenginleştirilmiş veya da saflaştırılmış fraksiyonların, nutrasötik fonksiyonel gıdalar ya da yem veya nutrasötik (gıda ya da yem) katkı maddeleri olarak özellikle yüksek spesifik etkinliğe sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Tercih edilen saflaştırma metotları aşağıdakileri ve bunların kombinasyonlarını içermektedir

30 a) kromatografik metotlar örneğin

i. yüklü ve/ veya lipofilik (hidrofobik impüritelerin) absorbe edilmesi için kromatografiler.

ii. boyut dışlama kromatografisi, özellikle düşük moleküler ağırlıktaki impüriteleri uzaklaştırmak için jel filtrasyonu

iii. sakkaritlere ya da bunların bir kısmına bağlanan matrislerle, tercih edilen şekliyle aktif karbon üzerinde kromatografi ile afinite kromatografileri

5 ve/ veya

b) Solventlerle ekstraksiyon ve/ veya impüritelerin ya da sakkaritlerin çökeltilmesi gibi faz ayırma çözelti yöntemleri. Tercih edilen bir uygulamada, çökeltme için organik çözücü, tercih edilen şekliyle metanol ya da etanol gibi bir alkol ya da keton, daha tercih edilen şekliyle etanoldür; ya da tercih edilen boyutta sakkaritlerin çökeltilmesi için aseton kullanılır.

ve/ veya

c) Çözelti ve çökeltinin santrifüjlenmesi ve ayrılması

ve/ veya

d) İstenmeyen bileşenleri degrade etmek için kimyasal ya da enzimatik metotlar, tercih edilen şekliyle alkali kararsız impüriteleri degrade etmek için hafif alkali hidroliz ve/ veya Glcα içeren glikojen/ nişasta tipi sakkaritlerin enzimatik hidrolizidir.

Buluş, özellikle, yeni sakkarit fraksiyonunun saflaştırılması için impüritelerin ve/ veya boyut dışlama kromatografilerinin uzaklaştırılması için iyon değişimi ve/ veya hidrofobik kromatografilere yöneliktir. Tercih edilen bir uygulamada katyon değişim reçinesi materyalindeki iyon değişiminin aynı zamanda lipofilik bileşikler de absorbe ettiği ya da her iki matrisin aynı kolona dahil edilebileceği anlaşılmaktadır.

Çözünürlük deneyleri

Şekil 9-21, asit ve/ veya enzim işlemlerinden sonra çözünebilir ürün fraksiyonunu göstermektedir. % 0,2 su çözeltilerinde kalan çözünmeyen materyal ölçüldü. Gösterilen miktarlar, 50 ml'de 100 mg orijinal kuru ürüne karşılık gelir. Belirtilen mg miktarları, bu nedenle çözünmeyen maddelerin % 'sine karşılık gelir. Şekil 23'te çözünür materyal miktarı % olarak belirtilmiştir.

DENEYSEL BÖLÜM

Kısaltmalar

30 BY Bira mayası

HBY	Homojenleştirilmiş bira mayası
G	Glucanex
PG	Progut tipi ürün
PG S	Çözünebilir Progut tipi ürün
5 PG WS	Suda çözünebilir Progut tipi ürün
PG WS+E	Emülgatör ile suda çözünebilir Progut tipi ürün
PE	Pektinaz
PR	Pronaz
S	Savinaz

10 ÖRNEK 1

Materyal ve Metotlar

Materyaller

Suomen Rehu'dan Progut™ (PG) numuneleri

15 Farklı üretim serilerinden on dört Progut™ tipi ürün numunesi: PG1-PG14. Farklı üretim işlemlerinden üç Progut tipi ürün numunesi: PG 15 saat, 15 saat boyunca hidrolize edilmiş; PG WS, suda çözünebilir PG; PG WS E +, emülgatör ile suda çözünebilir PG.

PG1'in iyi çalıştığı gösterilmiştir, PG2 ise, bakteriyel adezyon analizlerinde gösterildiği kadar etkili değildi. PG4 keçilerle test edildiğinde sahada iyi sonuçlar vermiştir.

20 Diğer üreticilerin ticari numuneleri

Agrimos (C1), ve Ascogen (C2), Alphamune alpharma (C3), ve Bio-Mos (C4).

Tüm bira mayası numuneleri

Bira mayası, BY ve homojenize edilmiş bira mayası, HBY.

Analiz prosedürü

25 *Numunenin hazırlanması*

Progut tipi ürün ve ilgili numunelerden ya % 0.2'lik su çözeltileri ya da % 1'lik su çözeltileri hazırlanmıştır. Bunlar, hafifçe karıştırılarak 2-5 saat boyunca oda

sıcaklığında inkübe edilmiştir. Karışımlar daha sonra santrifüj edilmiş (20 dakika boyunca 4000 rpm), süpernatant liyofilize edilmiş ve kuru ağırlık ölçülmüştür.

Çözünebilir bileşenlerin analizi

Numunelerin çözünebilir bileşenleri, jel geçirgenlik kromatografisinden önce iki saflaştırma aşaması ile saflaştırılmıştır: İlk olarak, kuru materyal, H⁺-boncuklarının bir bulamaç çözeltisi (0.4 g numune için 1.4 ml, AG 50W-X8 reçine, Bio-Rad,) içine seyreltilmiştir ve 2 saat boyunca oda sıcaklığında hafifçe karıştırılarak inkübe edilmiştir. İkincisi, H⁺-boncuk çözeltisinden gelen süpernatant, BondElut C-18-kolon (500 mg / 6 ml, Varian) aracılığıyla elüe edilmiştir. Konsantrasyondan sonra numuneler, Äkta Purifier 10'da (Pompa P-903, UV-900, Amersham Biosciences), 214 ya da 230 nm'de absorpsiyonu ölçerek, 1 ml / dak akış hızında, 50 mM amonyumbikarbonat ile, Superdex Peptide 10/300 GL (Amersham Biosciences) kolonunda jel geçirgenlik kromatografisinde gerçekleştirilmiştir. Superdex Peptid kolonu: Boş hacim, 6.7 ml; toplam elüsyon hacmi, 18.0 ml; poli/ oligo/ monosakkaritlerin elüsyonu: Boş hacim 30 Hex biriminde; 7.7 ml 25 Hex biriminde; 14.4 ml beş Hex biriminde; 16.7 ml iki Hex biriminde ve 17.3 ml bir Hex biriminde.

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

NMR analizi için numuneler, aşağıdaki gibi Superdex Peptide kromatografisinden toplanmıştır: Büyük boyutlu bileşenler (6 ila 12 ml arasında elüsyon) ve ara boyutlu bileşenler (12 ila 16 ml arasında elüsyon). Bir boyutlu ¹H NMR deneylerinden önce, numuneler ilk önce D₂O (% 99,9)'den liyofilize edilmiş ve sonra D₂O (% 99,9) içerisinde çözündürülmüştür. NMR spektrumları, 23 °C'de Varian Unity 500 spektrometresi (Varian Inc.) tarafından kaydedilmiştir.

Bira mayasının asit hidrolizi

H₃PO₄ ile bütün bira mayası-çözeltisinin asit hidrolizi, Progut tipi ürün üretim işleminde kullanılan hidrolize benzerdir: pH, H₃PO₄ (2.4%) ile 2.4'e ayarlanmakta ve dört saat boyunca 80 °C'de inkübe edilmektedir. Bu asit hidrolizi bundan sonra metinde "asit hidrolizi prosesi" olarak anılacaktır.

Sonuçlar

Çözünebilir bileşenlerin miktarlarının karşılaştırılması

Dokuz Progut tipi ürün numunesinin % 1'lik çözeltileri ve ilgili dört numune hazırlanmış ve suda çözünebilir bileşenlerin kuru ağırlıkları ölçülmüştür (Şekil 1). Şekil 1'de gösterilen sonuçlardan, çözünürlüğün seriye bağlı olarak değişmesine rağmen, Progut tipi ürün materyalinin yaklaşık % 50'sinin suda çözünebilir olduğu sonucuna varılabilir.

- 5 Alphamune alpharma (C3), Bio-Mos (C4) ve Agrimos (C1) Progut tipi ürünlere göre daha az çözünebilir bileşenlere sahiptir. Bunun yanısıra, Ascogen (C2) iyi bir çözünürlüğe sahip gibi görünmektedir.

Bununla birlikte, bu liyofilize numunelerde, değişken miktarlarda su bırakılabileceğine dikkat edilmelidir. Bu nedenle, kuru ağırlıklardaki hata, ortalamadan daha yüksek
10 olabilmektedir.

Jel geçirgenlik kromatografisi ile çözünebilir materyallerin karşılaştırılması

% 0.2'lik çözeltilerden elde edilen kromatogramlar

PG 1 ve 2'nin Karşılaştırılması

- PG1 ve PG2'nin % 0.2'lik çözeltileri Materyal ve Metotlar bölümünde tarif edildiği gibi
15 hazırlanmıştır ve çözünebilir materyalin kromatogramları Şekil 2'de gösterilmektedir. PG1 ve 2'nin çözünebilir materyallerinin karşılaştırılması, PG1'in PG2'den nispeten daha fazla ara boyutlu bir materyale sahip olduğu (12-16 ml arasında elüsyon) ve aksine, PG2'nin PG1'den daha büyük boyutlu bir materyale (6-12 ml arasında elüsyon) sahip olduğu görülebilir. Çözünebilir materyalin genel miktarı, PG1'de daha yüksek
20 emilimin gösterdiği gibi PG1'de PG2'den daha yüksek gibi görünmektedir. Aynı fenomen, Şekil 1'den de işaret edilebilmektedir.

Çözünürlük ve kromatografik davranıştaki bu farklılıklar, PG1 ve PG2'nin etkinliğini dolaylı olarak göstermektedir: PG1 ve PG2, bakteriyel adezyon testleri ile test edilmiştir ve PG1'nin etkili olduğu, PG2'nin ise etkisiz olduğu gösterilmiştir.

- 25 **% 1'lik çözeltilerden elde edilen kromatogramlar**

PG1 ve 2'nin karşılaştırılması

- Çözünebilir bileşenlerin NMR analizi, büyük miktarda materyale ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle, yarı-preparatif jel geçirgenlik kromatogramları için % 1'lik çözeltiler üretilmiştir. Şekil 3'teki % 0.2'lik çözeltilerden elde edilen kromatogramlarla
30 karşılaştırıldığında, % 1'lik PG1 ve 2 çözeltilerinden çözünebilir materyallerin kromatogramları gösterilmektedir. Dedektör biraz aşırı yüklü olsa da, belki de PG2'de,

PG1'de olduğu kadar çok fazla ara boyutlu çözünebilir bileşenlerin olmadığını daha da net olarak görülmektedir.

Dokuz Progut tipi ürün ve ilgili dört numunenin karşılaştırılması

Dokuz Progut tipi ürün (PG1-9) ve ilgili dört numune (C1-4) eş zamanlı olarak hazırlanmış ve eşit olarak analiz edilmiştir. Bu nedenle, jel geçirgenlik kromatogramları karşılaştırılabilir. Burada, numuneler A_{230} 'da tespit edilmiş ve uygun karşılaştırma için, PG1 ve 2 yeniden analiz edilmiştir. Absorbans ekseninin ölçeği, numunelerin karşılaştırılmasını kolaylaştırmak amacı ile tüm kromatogramlarda eşdeğer olacak şekilde ayarlanmaktadır.

PG1, 3, 4 ve 6'nın kromatogramları, hem materyalin şekli hem de miktarı açısından oldukça benzer (Şekil 4, A, C, D, F) görünmektedir. Hem PG1 (bakteriyel adezyon analizinde) hem de PG4'ün (keçilerle yapılan saha deneylerinde) etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, PG2, 5, 7 ve 8 diğer PG numunelerinden daha az materyale sahiptir (Şekil 4, B, E, G, H). Bu PG2'den bakteriyel adezyon analizinde etkisiz olduğu bilinmektedir. Veriler, tercih edilen bir uygulamada, etkili Progut tipi ürünün, kromatogramın şekli ve özellikle de ara boyutlu çözünür materyal miktarı ile tahmin edilebileceğini göstermektedir. Ara boyutlu materyalin nispi miktarları (12-16 ml'de elüe edilerek), kromatogramdan (mAbs birimleri ml ile çarpılarak) alan olarak hesaplanabilir ve bu değerlerin karşılaştırılması (Tablo 1), Progut tipi ürün numuneleri arasındaki farklılıkların tahminlerini doğrular. Büyük boyutlu (6-12 ml'de elüe edilerek) ve ara boyutlu (12-16 ml'de elüe edilerek) materyal NMR analizi için toplanmıştır.

İlgili numunelerde, ara boyutlu ve hatta büyük boyutlu materyalin miktarları, Progut tipi ürün numunelerinde çok daha azdır (Şekil 4, J, K, L, M). Alphamune alphi (C3) ve Bio-Mos'de (C4) (Şekil 4, L, M, sırasıyla) toplam çözünebilir materyal miktarı, Şekil 1'de de görülebilen, Progut tipi ürün numuneleri ile karşılaştırıldığında küçük gözükmemektedir. Agrimos'da (C1) ve özellikle Ascogen'de (C2) çözünebilir materyalin toplam miktarı Progut tipi ürün ile karşılaştırılabilir, ancak çoğu, molekül ağırlığı düşük materyaldir (Şekil 4, J, K). Düşük moleküler ağırlıktaki materyal, diğer bazı yararlı özelliklere sahip olmasına rağmen, bakteriyel adezyonu inhibe etmede iyi değildir.

Tablo 1. Şekil 4'teki kromatogramlardan elde edilen bileşenlerin nispi miktarları.

Alan, ml ile çarpılan mAbs birimleri olarak hesaplanmıştır (burada, alanlar üç yarı preparatif kromatogramdan birleştirilmiştir).

Numune	Şekil 4	Alan (12-16 ml)	Alan (6-14 ml)
PG1	A	17600	22805
PG2	B	6400	7189
PG3	C	14900	21685
PG4	D	12400	22300
PG5	E	7700	11899
PG6	F	10000	16429
PG7	G	5600	9573
PG8	H	2800	6474
Agrimos	J	7100	2445
Ascogen	K	14500	6724
Alphamune	L	1100	1593
Bio-Mos	M	2400	1384

Beş Progut tipi ürün numunelerinin karşılaştırılması

- 5 Progut tipi ürün numuneleri PG10-14, Şekil 4'ün numuneleri olarak jel geçirgenlik kromatografisi için benzer şekilde hazırlanmıştır. Bu nedenle, Şekil 4 ve 5'in kromatogramları karşılaştırılabilir. PG10-14'ün biyoaktivitelerinin hiçbir bilgisi bulunmamakla birlikte, bu kromatogramlar, bu (PG10-14) Progut tipi ürün serilerinin iyi çalışması gerektiğini dolaylı olarak göstermektedir, çünkü tüm numunelerde, büyük
- 10 ölçüde ara ila yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerden oluşan önemli miktarlarda çözünabilir materyal bulunmaktadır. NMR analizi için büyük boyutlu (6-12 ml'de elüe edilerek) ve ara boyutlu (12-16 ml'de elüe edilerek) materyal toplanmıştır.

Asit hidrolize edilmiş bira mayası ve homojenleştirilmiş versiyonu

Bira mayası çözeltisi, bir endüstriyel basınçlı homojenizatör ile homojenleştirilmiş ve hem bira mayası çözeltisinin hem de homojenleştirilmiş versiyonunun numuneleri, Materyal ve Metotlarda tarif edildiği gibi Progut tipi ürün asit hidroliz prosesi ile hidrolize edilmiştir. Yarı preparatif jel geçirgenlik kromatografisi ile NMR için numunelerin izole edilmesi amacıyla, detektör aşırı yüklenmiştir ve Şekil 4 ve 5 ile karşılaştırılabilir kromatogramlar mevcut değildir. Bununla birlikte, analitik jel geçirgenlik kromatogramları (Şekil 6) çalıştırılmış ve kromatogramların profilleri, PGI'inkini (Şekil 2A) taklit etmektedir. Şekil 6A ve B'nin kromatogramlarındaki alanların karşılaştırılması, homojenizasyonun çözünürlüğü % 15 arttırdığını göstermektedir.

Bakteriyel adezyon testleri için hazırlanan numuneler

Progut tipi ürünün daha yüksek çözünürlüğü, sıvı beslenme arasında, en çok tercih edilen haliyle de içme suyunda dozlanması için gereklidir. On numune adayı yeni suda çözünebilir Progut tipi ürüne yönelik seçilmiştir. Bu numuneler, bakteriyel adezyon testleri için yeterli miktarlarda hazırlanmış, jel geçirgenlik kromatogramları Şekil 7'de sunulmaktadır. (Deneysel prosesler, Örnek 2'nin Materyal ve Metotlar'nda sunulmaktadır.) Numuneler:

1. Bira mayası glucanex ve asit hidroliz prosesi ile muamele edilmiştir, BY G (Şekil 7 A)
2. Homojenleştirilmiş bira mayası glucanex ve asit hidroliz prosesi ile muamele edilmiştir, HBY G (Şekil 7 B)
3. Bira mayası glucanex ve savinaz ile muamele edilmiş, bunu asit hidroliz prosesi takip etmiştir, BY G + S (Şekil 7 C)
4. Homojenleştirilmiş bira mayası glucanex ve savinaz ile muamele edilmiş, bunu asit hidroliz prosesi takip etmiştir, HBY G + S (Şekil 7 D).
5. Bira mayası 1 M H_3PO_4 ile muamele edilmiş, BY 1M (Şekil 7 E)
6. Homojenleştirilmiş bira mayası 1 M H_3PO_4 ile muamele edilmiş, HBY 1M (Şekil 7 F)
7. Bira mayası glucanex ve pektinaz ile muamele edilmiş, bunu asit hidroliz prosesi takip etmiştir, BY G+PE (Şekil 7 G)

8. Homojenleştirilmiş bira mayası glucanex ve pektinaz ile muamele edilmiş, bunu asit hidroliz prosesi takip etmiştir, HBY G+PE (Şekil 7 H)
 9. PG1 pektinaz ile muamele edilmiş, PG1 PE (Şekil 7 I)
 10. PG1 pronaz ile muamele edilmiş, PG1 PR (Şekil 7 J)
- 5 Yeni suda çözünabilir Progut tipi ürün için adayların beşi (numune 1, 2, 5, 6 ve 9) son olarak bakteriyel adezyon testleri için seçilmiştir. Bira mayasının glucanex ile ve 1 M H_3PO_4 ile muamele edilmesi, eski Progut tipi ürün test prosesine benzer şekilde gerçekleştirilen bakteriyel adezyon analizinde en iyi aktiviteye sahip materyali vermiştir.
- 10 İlginç bir şekilde, bira mayası ve enzimatik muameleden sonra homojenleştirilmiş versiyonunun kromatogramları oldukça benzerdir. Buna karşılık, 1 M H_3PO_4 ile muamele edilen homojenleştirilmiş bira mayası içinde, homojenize olmayan numunelerden daha fazla çözünür, ara boyutta materyal bulunmaktadır (Şekil 7, F'ye karşı E).
- 15 *Suda çözünabilir Progut tipi ürün*
- 1 M H_3PO_4 ile muamele edilmiş bira mayasının sahada etkinliğini test etmek için, bu endüstriyel ölçekte üretilmiş ve ürün, suda çözünabilir Progut tipi ürün (PG WS) olarak adlandırılmıştır. PG WS'nin bir başka versiyonu da emulgator tanıtılarak üretilmiş ve buna PG WS + E adı verilmiştir. Çözünürlükleri jel geçirgenlik kromatografisi ile analiz
- 20 edilmiş ve kolay karşılaştırma için, PG1 aynı deney grubunda analiz edilmiştir (Şekil 8). PG (Şekil 8 A) ve PG WS' nin (Şekil 8 B) kromatogramları ve bunlardan hesaplanan materyalin nispi miktarları (Tablo 2) karşılaştırılırken, PG WS'de % 30'un üzerinde daha fazla çözünabilir materyal olduğu sonucuna varılabilir. Spesifik olarak, çok büyük boyutlu materyalin nispi miktarı (6-9 ml'de elüe edilerek) önemli ölçüde, % 60, artmıştır.
- 25 Bununla birlikte, ara boyutlu materyalin nispi miktarı (12-16 ml) yaklaşık olarak eşittir. Bu nedenle, PG WS üretiminde daha yüksek H_3PO_4 konsantrasyonu, çözünmeyen kısmın su ile çözülmesini sağlayacak kadar kırdığı görülmektedir. Ürün tamamen çözünabilir olmasa da, değişim PG WS'nin içme suyu arasında sıvı besleme olarak teslim edilmesine izin verecek kadar yüksektir.
- 30 Bir başka numune, farklı normal üretim prosesinde daha uzun (15 saat) hidroliz (PG 15s) ile hazırlanmıştır. PG 15 saat'in jel geçirgenlik kromatogramı (Şekil 8 D), ürünün

PG1'e benzer olduğunu dolaylı olarak göstermektedir. NMR analizi, bileşenlerin yapılarında değişiklik olup olmadığını ortaya koyacaktır.

Tablo 2. Şekil 8A ve B'deki kromatogramlardan gelen nispi miktarlarda materyal.

Materyal miktarı, ml ile çarpılarak hesaplanan mAb birimleri olarak kromatogramlardan alan olarak belirtilir.

Elüsyon hacmi	PG1 (alan)	PG-WS (alan)	PG1 (nispi miktar)	PG-WS (nispi miktar)
6-16 ml	2454	3226	1.00	1.32
6-12 ml	1846	2515	1.00	1.36
12-16 ml	607	711	1.00	1.32
6-9 ml	1071	1727	1.00	1.61
9-16 ml	1383	3225	1.00	1.31

Progut tipi ürün numunelerinde ara boyutlu bileşenlerin NMR analizi. Ara boyut fraksiyon NMR analizindeki en belirgin sinyaller, α -glikozidik karbonhidrat zincirlerinin H-1'ine bağlanabilir. Analiz edilen materyalin biyolojik kökeni dikkate alındığında, α -glukan zincirleri ve α -mannosidik zincirler, sinyallerin beklenen kaynağıdır.

- 10 Spektrumlar ayrıca β -glikozidik birimlerin H-1'inden kaynaklanan sinyalleri de göstermektedir. Bu sinyallerin çeşitli β -glikoz kalıntılarından kaynaklanması beklenmektedir. Bu gibi birimleri içeren karbonhidrat oligomerlerinin, mevcut buluşun prosesinde, örneğin maya ve arpanın beta-glukanlarından üretilmesi beklenmektedir.

Sonuç

- 15 Progut tipi ürün numuneleri ve ana üreticilerden ilgili numuneler, çözünürlükleri açısından analiz edilmiş ve jel geçirgenlik kromatografisi profilleri üretilmiştir. Bu sonuçlardan, eşit olarak işlenmiş numunelerin çözünebilir materyalinin nispi miktarının, söz konusu Progut tipi ürünün söz konusu hayvan besini olarak etkililiğini dolaylı olarak gösterdiği görülmektedir. Hem büyük hem ara boyutlu materyalin miktarı, özellikle
- 20 önemli gibi görünmektedir. İlgili tüm numunelerde, büyük ve ara boyutlu materyal miktarı, Progut tipi ürün numunelerinden açıkça daha düşüktür. İlgili numunelerin

bazılarında, çözünebilir materyalin çoğu, bakteriyel adezyonu inhibe etmede etkili olması muhtemel olmayan, düşük molekül ağırlıklı bir boyuta sahiptir.

Buluş, bu jel geçirgenlik kromatogramlarında gösterilen çözünebilir bileşenlerin izolasyonuna ve materyallerin isteğe bağlı olarak daha fazla kısımlara ayrılmasına ve 5 örneğin izole edilmiş ve/ veya parçalara ayrılmış materyaller için NMR ile daha ayrıntılı kimyasal analizlerine yöneliktir.

Buluş, özellikle, ara boyutlu materyale ve etkinliği için önemli bileşen olarak nispi miktarına yöneliktir. Buluş, ayrıca büyük boyutlu materyale ve etkinliği için önemli bileşen olarak nispi miktarına yöneliktir.

10 ÖRNEK 2

Materyal ve Metotlar

Materyaller

Suomen Rehu'dan Progut™ (PG)-tip ürün numuneleri

PG1; PG2; PG 15 saat, 15 saat boyunca hidrolize edilmiş PG; PG WS, suda 15 çözünebilir PG; PG WS E+, emülgatör ile suda çözünebilir PG.

PG1'in iyi çalıştığı gösterilmiştir, oysa PG2 bakteriyel adezyon analizleri üzerinde çok etkili değildi.

Tüm bira mayası numuneleri

Mevcut deneylerde kullanılan bira mayası numuneleri, ortalama olarak, % 20 oranında 20 kuru maddeye sahiptir.

Asit ile hidroliz

Fosforik asit

H₃PO₄ ile tüm bira mayası-çözeltisine yönelik ana asit hidrolizi, Progut tipi ürün üretim 25 prosesinde kullanılan hidrolize benzerdir: pH, H₃PO₄ (konsantre, % 87) ile 2.4'e ayarlanmakta ve dört saat boyunca 80 °C'de inkübe edilmektedir. Bu asit hidrolizi bundan sonra metinde "asit hidrolizi prosesi" olarak anılacaktır.

Daha yüksek H₃PO₄ konsantrasyonlarına sahip asit hidrolizi, ya 80 °C'de ya da 100 °C'de dört saat boyunca, 0.3 M, 0.5 M, 1 M ve 2 M H₃PO₄ ile gerçekleştirilmiştir.

Hidroklorik asit

HCl ile asit hidrolizi, dört saat boyunca 80 °C'de 0.3 M, 0.5 M, 1M ve 2 M HCl ile gerçekleştirilmiştir.

Sülfürik asit

- 5 H₂SO₄ ile asit hidrolizi, 4 saat boyunca 80 °C'de 0.3 M, 0.5 M, 1 M ve 2 M H₂SO₄ ile gerçekleştirilmiştir.

Çözünürlük deneyi

- 10 % 0.2'lik su çözeltisi ya Progut tipi ürün numunelerinden ya da bira mayası-çözeltisinden (örneğin 100 mg kuru ağırlık materyali içeren reaksiyon karışımının 500 µl'si, H₂O ile 50 ml'ye kadar seyreltilmiş) hazırlanmıştır. Bu, hafifçe karıştırılarak 2-5 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin çözünürlük için uygun olmadığı gösterilmiştir. Karışım santrifüje edilmiştir (20 dakika boyunca 4000 rpm) ve liyofilizasyondan sonra çökeltinin ağırlığı ölçülmüştür.

Enzimatik muameleler

- 15 *Pronaz*

5 ml bira mayası-çözeltisi / % 20 Progut tipi ürün çözeltisi, 5 mM CaCl₂ için 20 mg pronaz (*Streptomyces griseus*, 48 U / mg, Sigma), beş saat boyunca 37 °C'de inkübasyon. Asit hidroliz prosesi, ya enzimatik muameleden önce ya da sonra gerçekleştirilmiştir. Pronazın etkisi, çözünürlük deneyi ile analiz edilmiştir.

- 20 *Savinaz*

5 ml bira mayası-çözeltisi / % 20 Progut tipi ürün çözeltisi, NaOH ile 10'a ayarlanmış pH, 4 ya da 20 µl savinaz (*Bacillus sp*'den proteaz, 16 mU / µl, Sigma), beş saat boyunca 37 °C'de inkübasyon. Asit hidroliz prosesi, ya enzimatik muameleden önce ya da sonra gerçekleştirilmiştir. Savinazın etkisi, çözünürlük deneyi ile gösterilmiştir.

- 25 *Glucanex*

Glucanex'in (*Trichoderma harzianum*'dan gelen parçalayıcı enzimler, 1.18 U / g, Sigma), bira mayası-çözeltisinin çözünürlüğüne etkisi, glukane miktarını ya da reaksiyondaki sıcaklığın değiştirilmesi ile çalışılmıştır. 5 ml bira mayası-çözeltisi için 5-100 mg glucanex ilave edilmiş ve beş saat boyunca 30, 37 ya da 50 °C'de inkübe

edilmiştir. Asit hidroliz prosesi, enzimatik muameleden sonra gerçekleştirilmiştir. Glukanex'in etkisi çözünürlük deneyi ile gösterilmiştir.

Pektinaz

20 mg pektinaz (*Aspergillus niger*, 1 U / mg, Calbiochem) 5 ml bira mayası-çözeltisi ya da % 20 Progut tipi ürün çözeltisi için ilave edilmiş ve beş saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Asit hidroliz prosesi, ya enzimatik muameleden önce ya da sonra gerçekleştirilmiştir. Pektinazın etkisi, çözünürlük deneyi ile gösterilmiştir.

Endoglukanaz

5 ml bira mayası-çözeltisi için 200 µg endoglukanaz (*T. reesei*'den, VTT'den endoglukanaz I), beş saat boyunca 37 °C ya da 50 °C'de inkübasyon. Bu reaksiyon, ya sadece glukanex ya da hem glukanex hem de savinaz ile birlikte gerçekleştirilmiştir (aşağıya bakınız).

Kombine edilmiş enzimatik muameleler

Glukanex ve savinazın kombine etkisi: Tarif edildiği gibi glukanex ile ilk reaksiyon ve daha sonra tarif edildiği gibi pH 10'da savinaz. Asit hidroliz prosesi, enzimatik muamelelerden sonra gerçekleştirilmiş, daha sonra enzimlerin etkisi, çözünürlük deneyi ile gösterilmiştir.

Glukanex ve endoglukanazın kombine etkisi: Glukanex ve endoglukanaz ile eşzamanlı reaksiyonlar, 37 ya da 50 °C'de, tarif edildiği gibi. Asit hidroliz prosesi, enzimatik muamelelerden sonra gerçekleştirilmiş, daha sonra enzimlerin etkisi, çözünürlük deneyi ile gösterilmiştir.

Glukanex, endoglukanaz, ve savinazın kombine etkisi: Tarif edildiği gibi 37 ya da 50 °C'de, glukanex ve endoglukanaz ile ilk reaksiyon, ve daha sonra tarif edildiği gibi pH 10'daki savinaz. Asit hidroliz prosesi, enzimatik muamelelerden sonra gerçekleştirilmiş, daha sonra enzimlerin etkisi, çözünürlük deneyi ile gösterilmiştir.

Sonuçlar

Her deney serisi, orijinal Progut tipi ürünün üretim prosesini taklit eden bir kontrol reaksiyonunu içermiştir, diğer bir deyişle bira mayası-çözeltisi, Materyal ve Metotlar bölümünde tarif edildiği gibi asit hidroliz prosesi ile muamele edilmiştir.

Enzimatik ve/ veya asit hidroliz deneylerinden sonra bileşenlerin çözünürlüğündeki artış ters biçimde ölçülmüştür: Çözünen bileşenlerin kuru ağırlığının ölçülmesi oldukça imkansız olduğundan, çözünmeyen bileşenlerin azalması yerine ölçülmüştür.

Pronazın etkisi

- 5 Progut tipi ürün numuneleri, Materyal ve Metotlarda tarif edildiği gibi pronaz ile muamele edilmiştir. PG1, bakteriyel adezyon inhibisyon testlerine göre, hayvan besini olarak etkilidir ve PG2'den daha iyi çözünürlüğe sahip gibi görünmektedir. Her iki Progut tipi ürün numunelerinin çözünürlüğü, çözünmeyen materyalin miktarlarının sunulduğu Şekil 9'da görüldüğü gibi, pronaz muamelesi ile önemli ölçüde artmaktadır
10 (bu numunelerdeki orijinal kuru ağırlık materyali 100 mg olmuştur).

Bir sonraki deney serisinde PG1 ve PG2 ile pronaz sindirimleri tekrarlanmış ve Şekil 10'da gösterildiği gibi, sonuçlar oldukça benzerdir.

- Bu deney serisinde ayrıca, bira mayası ile pronaz sindiriminde pH'ın etkisi incelenmiştir. Sindirimler pH 5'te (dokunulmamış bira mayası çözeltisinin pH'ı) ve pH
15 8'de gerçekleştirilmiş ve ardından asit hidrolizi yapılmıştır. İnkübasyon sırasında pH'daki değişim, çözünürlükte anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır (veriler gösterilmemiştir).

- Ya asit hidrolizinden önce ya da sonra inkübe edilen pronaz etkinliği de çalışılmıştır. Şekil 10'daki sonuçlar, pronazın asit hidrolizinden sonra öncekisinden daha etkili
20 olduğunu, muhtemelen asit hidrolizinden sonra proteinlerin denatüre edildiğini ve proteaz için daha erişilebilir olduğunu dolaylı olarak göstermektedir.

- Bu nedenle, pronaz, asit hidrolizinden önce kullanılsa dahi Progut tipi ürünün çözünürlüğünü artıracaktır. Progut tipi ürün üretim prosesi dikkate alındığında, bu yararlıdır, çünkü asit hidrolizi pronazı yok edecekti ve ürünün kendisi, hayvan besini
25 olarak kullanıldığında kalan enzimatik etkinliğe sahip olmayacaktı.

- Progut tipi ürünün ya da bira mayasının çözünürlük sonuçlarının karşılaştırılması (Şekil 10), orijinal, endüstriyel Progut tipi ürün üretim prosesinin (1) daha fazla çözünebilir ürünün üretilmesinde daha etkili olduğu ve (2) bu ürünün pronazın etkisine karşı bozulmamış bira mayası için laboratuvar ölçekli asit hidroliz işleminden daha
30 savunmasız olduğu görülmektedir.

Savinazın etkisi

Progut tipi bir ürün ile başka bir proteazın reaktivitesini incelemek için, endüstriyel üretimde temel bir proteaz olan savinaz (*Bacillus sp.*'den Proteaz) seçilmiştir. Progut tipi ürün ile test edildiğinde, savinaz çözünmeyen materyalin miktarını neredeyse yarıya düşürmüştür (Şekil 11). Bununla birlikte, pronazın etkinliği (Şekil 10) daha iyi

- 5 görünmektedir: Pronaz, çözünmeyen materyalin miktarını % 22'ye (PG1) kadar azaltırken, savinaz ile muamele edilen PG1'de % 53 oranında kalmıştır. Pronazın hareketinin aksine, çözünmeyen materyalin miktarı, savinazın asit hidroliz prosesinden önce ya da sonra (karşılaştırınız Şekil 10 ve 11, bira mayası ile deneyler) kullanılıp kullanılmamasından bağımsızdır.
- 10 Savinaz bir endüstriyel enzim olduğundan, makul maliyetlerde kullanılabilir. Bununla birlikte, savinaz kullanımı, pronazın kullanımı kadar pratik değildir: Savinaz, temel bir proteaz olduğundan, etkili bir reaksiyon elde etmek için pH'ın 10'a ayarlanması gerekmektedir. Bu, nötralizasyondan sonra (savinazın asit hidroliz prosesinden önce ya da sonra gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğine bakılmaksızın) ürünün sodyum
- 15 fosfat konsantrasyonunun önemli olduğu anlamına gelmektedir.

Pektinazın etkisi

Pektinler büyük, heterojen ve negatif yüklü hücre duvarı polisakkaritlerdir. Endüstriyel pektinaz, pektini parçalayan bir enzimdir ve buna ek olarak, diğer birkaç enzimatik etkinliği de içermektedir. Bu nedenle pektinaz muamelesinin Progut tipi ürün

- 20 çözeltisinde etkili olabileceği düşünülmüştür. Aslında, pektinazın, daha fazla suda çözünebilir Progut tipi ürün üretiminde pronaz kadar etkili olmadığı, ancak savinazdan daha etkili olduğu gösterilmiştir (Şekil 10, 11 ve 12). Örnek olarak, PG1'de çözünmeyen materyalin kuru ağırlığı, % 22'ye kadar pronaz ile ve % 34'e kadar pektinaz ile azalmıştır ve sırasıyla 8.5 ya da 15 mg'lık çözünmeyen materyal kalmıştır.
- 25 Proteazlar pronaz ve savinazın aksine, pektinaz muamelesi, sadece asit hidroliz prosesinden sonra bira mayası çözeltisi ile etkilidir (Şekil 12).

Glucanex etkisi

β -glukanların Progut tipi ürünün çözünürlüğüne olan etkisini analiz etmek için, β -glukanaz muameleleri gerçekleştirilmiştir. Glucanex (*Trichoderma harzianum*'dan

- 30 gelen parçalayıcı enzimler) seçilmiştir çünkü uygun maliyetli maya hücre duvarı glukanı hidrolize edici enzim olarak biliniyordu. Glucanex'in ayrıca selülaz, proteaz ve kitinaz aktiviteleri içerdiği bilinmektedir. İlk olarak, çeşitli miktarlarda glucanexin etkisi

30 °C'de çalışılmıştır. Az miktarlarda glucanex'in bira mayasının çözünürlüğünü önemli ölçüde arttırmadığı açıkça gösterilmiştir. Bununla birlikte, 100 mg / 5 ml'lik bira çözeltisi ile, çözünmeyen materyal miktarı Şekil 13'te gösterildiği gibi % 46'ya kadar azalmıştır. İkinci reaksiyon serisinde, sıcaklığın etkisi incelenmiştir ve bir ay boyunca + 4 °C'de olan, biraz daha sıvı hale getirilen bira mayası ile gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sıcaklığını 7 °C'ye (30 ° C ila 37 °C arasında) yükseltmek, çözünürlüğü açıkça arttırmıştır (çözünmeyen materyal % 64 ila % 54 arasında). Buna karşılık, sıcaklık 50 °C'ye yükseltildiğinde, çözünmeyen materyal miktarı sadece % 26 azalmış, bu da enzimin böyle yüksek sıcaklıkları tolere etmediğini dolaylı olarak göstermiştir. 37 ° C'de glucanex, pronaz ve pektinaz olarak çözünmeyen materyal miktarında yaklaşık olarak aynı indirgemeyi üretmektedir (karşılaştırınız Şekil 10, 12 ve 13).

Kombine enzim muamelelerinin etkisi

Protein ve polisakkarit degrades edici enzimler, Progut tipi ürün ya da bira mayası çözeltilerinde çözünmeyen materyalin miktarının yukarıda gösterildiği gibi azaltılmasında oldukça etkili olmuştur. Bununla birlikte, bu enzim tiplerinden hiçbiri tek başına suda çözünebilir ürün üretememiştir. Daha sonra, proteazların reaktivite olup olmadığı incelenmiştir ve örn. glukanaazlar kombine edicidir, yani bu enzimlerin kombine etkisi ile üretilebilen çözünebilir bir üründür.

Glucanex ve savinaz

Glucanex ve savinaz her ikisi de uygun maliyetli endüstriyel enzimlerdir ve bu nedenle kombine reaktivite açısından test edilmek üzere seçilmiştir. Tek başına glucanex (Şekil 13) ya da tek başına savinaz (Şekil 11) etkisi onların kombine etkisi ile karşılaştırırken, birlikte daha etkili bir şekilde çalıştıkları açıkça görülmektedir (Şekil 14): Çözünmeyen materyal, tek başına glucanex (20 mg, 37 °C) muamelesi ile % 47 oranında ve tek başına tek başına savinaz (4 µl, 37 ° C) muamelesi ile % 32 oranında azaltılmış, kombine reaksiyon sırasında azalma ise % 77 olmuştur (yani sadece orijinal kuru ağırlık materyalin 12 mg'ı çözünmeden kalmıştır). Bununla birlikte, yapılan en iyi reaksiyonda bile (30 °C'de 100 mg glucanex ve 37 °C'de 4 µl savinaz), başlangıçta bira mayası çözeltisi içinde kalan 100 mg kuru ağırlık materyalinden hala 8.5 mg vardır. Savinazın, pronaz ya da pektinazdan daha az etkili olduğu ve glucanex'in pronaz ve pektinaz kadar yaklaşık olarak eşit derecede etkili olduğu gösterilmiştir (yukarıya bakınız). Glucanex ve savinazın bira mayası çözeltisi ile kombine etkisi, pronaz ve

pektinazdan çok daha iyi sonuçlar vermektedir ve aslında Progut tipi ürün ile pronaz ve pektinazın etkinliğine benzerlik göstermektedir.

Glucanex ve/ veya savinaz ile kombine endoglukanaz

Polisakkarit degradasyonunu iyileştirmek için, glucanex ve savinaz ile kombinasyon halindeki endoglukanaz (*T. reesei*'den endoglukanaz I) etkinliği incelenmiştir. Tek başına glucanex (Şekil 13) ve endoglukanaz muamelesinin (Şekil 15) ve glucanex deneylerinin hiçbir ilave etki göstermez; kontrol ile karşılaştırıldığında çözünmeyen materyalin miktarları sırasıyla % 54 ve % 53'dür. Benzer şekilde, glucanex ve savinaz ile, bu deneylerde endoglukanaz, çözünürlüğü geliştirmez (% 22 EG ile ve kontrole karşı çözünmeyen materyalin % 23'ü olmadan).

Asitlerin etkisi

H_3PO_4 'ün diğer asitlere kıyasla çözünürlüştirici etkisi arasındaki farkı belirlemek için, iki güçlü asit, HCl ve H_2SO_4 asit hidroliz deneyleri için seçilmiştir. Daha yüksek asit konsantrasyonlarının bira mayası çözeltisinin çözünürlüğüne etkisi de incelenmiştir.

15 H_3PO_4 - savinaz ile ya da onsuz artan konsantrasyonun etkisi

Şekil 16, bira mayası çözeltisi ile iki deney setinin sonuçlarını göstermektedir. Açıkça, daha yüksek H_3PO_4 konsantrasyonları (0.3 M, 0.5 M ve 1 M, 100 °C'de) ürünün çözünürlüğünü arttırmaktadır (Şekil 16, ilk üç kolon çifti). 80 °C'de asit hidrolizi ile kombine edilen bira mayası çözeltisi ile Savinaz muamelesi, daha yüksek H_3PO_4 (0.3 M, 0.5 M, 1 M ve 2M) konsantrasyonlarında, 100 °C'de asit hidrolizi gibi oldukça benzer bir çözünürlüğe yol açmaktadır.

HCl

Değişken HCl konsantrasyonları ile bira mayası çözeltisinin asit hidrolizi (Şekil 17), H_3PO_4 ile hidrolizde olduğu gibi oldukça benzer bir etkinlik göstermektedir.

25 H_2SO_4

H_3PO_4 (Şekil 16) ile hidrolize kıyasla, H_2SO_4 konsantrasyonlarının artması ile bira mayası çözeltisinin asit hidrolizi (Şekil 18), asitlerin oldukça benzer çözünürlükler verdiğini göstermektedir. İlginç bir şekilde, asit hidroliz ürününün çözünürlüğü, 1 M ile karşılaştırıldığında 2 M asit ile azalmaktadır. 2 M H_2SO_4 , bira mayası çözeltisinden bileşenleri çöktürebilir, çünkü böyle güçlü bir asittir.

Homojenizasyonun etkisi

Bira mayası çözeltisinin mekanik muamelesinin asit hidrolizinin etkisini artırabileceğini analiz etmek için, bir bira mayası numunesi, bir endüstriyel homojenizatör ile homojenleştirilmiştir. Homojenleştirilmiş ve normal bira mayası 1 M asit hidroliz sonuçları ile karşılaştırıldığında çözünürlükte % 10'luk bir artış vardır (Şekil 19, bira mayası çözünmeyen materyal % 75 kaldı ve hidroliz prosesi ile karşılaştırıldığında homojenleştirilmiş bira mayası % 65 kaldı). Aksine, Şekil 20'de gösterildiği gibi homojenizasyon, glukanex, savinaz ve pektinaz enzimlerinin degrade edici etkinliğine sadece küçük bir etkisi vardır.

10 PG, PG WS ve PG WS E+ 'nin Karşılaştırması

Burada sunulan bu çözünürlük sonuçlarına göre, bakteriyel adezyon inhibisyon deneyleri için beş numune hazırlanmıştır. Bu numuneler:

1. Glucanex muamelesi ve asit hidroliz prosesi ile bira mayası çözeltisi,
2. Glucanex muamelesi ve asit hidroliz prosesi ile homojenleştirilmiş bira mayası çözeltisi,
3. Bira mayası çözeltisine 1 M H_3PO_4 asit hidrolizi,
4. Homojenleştirilmiş bira mayası çözeltisine 1 M H_3PO_4 asit hidrolizi, ve
5. Pektinaz ile muamele edilen PG1.

Bunların hepsi, bakteriyel adezyon analizlerinde (eski Progut tipi ürün test prosesinde olduğu gibi benzer şekilde gerçekleştirilmiştir) iyi sonuçlar vermiştir, glucanex ile muamele edilen numune en etkili olanıdır. Bununla birlikte, 1 M H_3PO_4 asit hidroliz-ürünü neredeyse etkili olduğu için saha deneyleri için üretilmek üzere seçilmiştir.

Bu suda çözünebilir Progut tipi ürün (PG WS) ve emülgatör (PG WS + E) ile suda çözünebilir Progut tipi ürün, endüstriyel süreçte üretilmiştir ve bunlardan alınan numuneler, çözünürlükleri için incelenmiştir. Şekil 21, PG1 ve 2 ile karşılaştırıldığında, emülgatörlü ve emülgatörsüz suda çözünebilir Progut tipi ürünün çözünürlüklerini göstermektedir. Çözünmeyen materyal miktarı, PG1 ve PG WS ile karşılaştırıldığında % 40 azalmıştır. Diğer bir taraftan, emülgatörün PG WS'nin çözünürlüğü ile karşılaştırıldığında çözünürlüğü arttırmadığı görülmektedir.

Ek olarak, aşırı hidrolize Progut tipi ürünün bir numunesi analizi için getirilmiştir. Bu 15 saatlik hidrolize Progut tipi ürünün çözünürlük deneyini, PG1 ile karşılaştırıldığında neredeyse eşit miktarda çözünmeyen materyalin kaldığını göstermiştir. Daha fazla analiz, örneğin, aşırı degradasyon olup olmadığını dikkate alabilmek için yapılmalıdır.

5 Sonuçlar

Proses üretiminde bira mayası çözeltisinin 1 M H_3PO_4 hidrolizi, içme suyunun bir bileşeni olarak hayvanlara verilebilen bir ürün üretmektedir. Bu, suda çözünebilir Progut tipi üründe (% 26) bırakılan çözünmeyen materyalin miktarının, hayvanlara verilme prosesi sırasında sıvı içinde kalacak kadar küçük olduğu anlamına gelmektedir. PG-WS'yi üreten bu prosedür, mevcut Progut tipi ürününün çözünmeyen materyalin % 42'sinden PG-WS'nin % 26'sına kadar, çözünürlüğü önemli biçimde arttırmıştır.

Ya Progut tipi ürün ya da bira mayası çözeltisinin asit hidroliz prosesi ile kombine enzimatik muameleler, yukarıda belirtilen tek başına 1 M H_3PO_4 hidrolizinden daha fazla çözünebilir ürün üretmiştir. En iyi ihtimalle, çözünmeyen materyalin miktarı, pronaz ya da glucanex ve savinazın kombine etkisi ile muamele edildiğinde % 10'a azaltılmıştır.

ÖRNEK 3

Progut tipi ürünün, yeni çözülebilir ürünün ve suda rakiplerinin çözülebilirliği

Hidroliz prosesi, Progut tip Çözünebilir ürün olarak adlandırılan, Progut tipi çözünebilir ürün üretmek için daha da geliştirilmiştir, bu da besleme sorunları olmadan otomatik besleyicilerdeki sıvı karışımları olarak hayvan beslenmesinde kullanılabilir. Progut tipi ürünün çözünürlüğü yaklaşık % 50 ($n = 9$) iken Progut tipi Çözünebilir ürün % 70'in üzerinde bir çözünürlüğe sahiptir. Rakip ürünlerin hepsinde çözünürlüklerin % 40'tan az olduğu görülmektedir (Şekil 23).

Progut tipi Çözünebilir ürünün özellikleri

Hayvanların sağlığı ve refahı ile ilgili olarak, Progut tipi ürün ve diğer maya ürünlerindeki biyolojik olarak uygun materyallerin, çözünebilir poli- ve oligosakkaritler olduğu düşünülmektedir. Burada, % 1 ya da daha fazla seyreltilmiş çözeltielerde, tüm oligosakkaritler, çözünebilir. Çözünmeyen kısım, hücre duvarı bileşenlerinden, yani esas olarak çözünmeyen polisakkaritler ve proteinlerden oluşmaktadır. Jel- geçirgenlik

kromatografisinde (GPC), çözünebilir poli-ve oligosakkaritlerin yanı sıra peptitler (bu raporda "orta büyüklükte materyal" olarak anılacaktır) 6-14 ml'de elüe edilmekte ve bunların nispi miktarları 214 nm'de ölçülmektedir.

5 Progut tipi Çözünebilir ürününün modifiye hidroliz prosesi, orta büyüklükteki materyalde neredeyse 2 kat artışa neden olur ve daha fazla işlenmiş yeni Progut tipi Çözünebilir üründe tespit edilen miktar neredeyse üç kat daha yüksektir (Şekil 25 ve 26). Buluş ayrıca, Suda Çözünebilir Progut tipi ürün olarak adlandırılan izole edilmiş, pratik bir şekilde tamamen çözünebilir ürünü ortaya çıkarmıştır.

10 Poli- ve oligosakkaritlerin ve peptitlerin miktarı, üç rakip üründe önemli ölçüde daha düşüktür (Şekil 27 ve 28).

Çözünebilir materyalin bakteriyel adezyon analizi ile korelasyonu

15 Progut tipi ürünün biyolojik etkinliği, orta büyüklükteki materyal miktarı ile orantılıdır. Şekil 29, daha yüksek miktarlarda poli- ve oligosakkaritlerin ve peptitlerin, bakteriyel adezyonda daha yüksek bir aktiviteye yol açtığını göstermektedir. Ayrıca, düşük miktarlarda orta büyüklükte materyal taşıyan rakip ürünlerin, çok daha düşük *E. coli* bakteriyel adezyon gösterdikleri de açıktır (Şekil 30).

Monosakkarit analizi - mannoz içeriğinin karşılaştırılması

20 Maya ürünlerinde mannoz ve mannooligosakkaritlerin biyoaktif bileşenler olduğuna inanılmaktadır. Çözünebilir poli- ve oligosakkarit fraksiyonunun mannoz içeriği ölçülmüştür ve Şekil 31'de gösterildiği gibi, Progut tipi ürün ürünleri, rakip ürünlere kıyasla açıkça daha fazla çözünebilir mannooligosakkaritlere sahiptir.

25 Mannoz içeriği ayrıca *E. coli* bakteriyel adezyon etkinliği ile karşılaştırılmıştır. Mannoz miktarı ile bakteriyel adezyon etkinliği arasındaki korelasyonun basit olmadığı bulunmuştur (Şekil 32). Bu nedenle, tüm mannoz poli- ve oligosakkaritlerin benzer bakteriyel adezyon etkinliği göstermediği, ancak bazı yapıların daha yüksek biyoaktivite gösterdiği varsayılmaktadır.

Çözünebilir bileşenlerin NMR analizi

30 ¹H NMR analizi, Progut tipi ürün ve diğer maya ürünlerinde mannooligosakkaritlerin yapısal özelliklerini ortaya koyabilmektedir. Şekil 33, Progut tipi ürün numunesinin NMR analizini göstermektedir. Tipik bir maya mannan sakkaritinin yapısal özellikleri ve bunların karakteristik NMR pikleri, ekte gösterilmektedir.

Progut tipi ürün ve üç rakip ürünün NMR spektrumlarını karşılaştırarak (Şekil 34), terminal Man α 1-3 birimlerinin nispi miktarının (Şekil 33 ve 34'teki mavi işaretler) Progut tipi üründe açıkça daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir. Bazı *E.coli* suşlarının (bağırsak sağlığına zararlı) memelilerde Man α 1-3 yapılarına tercih edilen şekliyle

5 bağlandığı gösterilmiştir. Terminal Man α 1-3 birimleri ile oligosakkaritlerin artışı, Progut tipi ürün hidroliz prosesi adımının bir sonucudur.

1H NMR analizinin detayları

NMR numuneleri, sakkarit kompozisyonlarına göre iki kategoriye ayrılmıştır.

Düşük moleküler ağırlıklı Mannopolisakkarit/ mannoz oligosakkarit içeren numuneler.

- 10 Sakkarit sinyallerinin çizgi şekilleri / genişlikleri sakkaritlerin oldukça büyük olduğunu göstermektedir. Yapıtaşı mannoz birimlerinin anomerik 1H sinyalleri, daha yüksek mannan oligosakkaritleri için yayınlanan verilere dayanarak belirlenmiştir. Aşağıdaki manno-oligosakkarit fragmentleri tespit edilmiştir. Büyük harflere karşılık gelen mannoz birimi kalındır. Her numunede farklı mannoz kalıntılarının nispi
- 15 konsantrasyonu Tablo 1'de verilmiştir. Entegrasyon pik yükseklikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve A için sinyal değeri 1 olarak verilmiştir. Entegrasyona göre, bir α -D-Manp-(1-3)- α -D-Manp-(1-2) terminalinin ve diğer yaygın mannoz epitoplarının konsantrasyonu, PG numunelerinde, rakiplerinden alınan numuneler ile karşılaştırıldığında daha yüksektir, ayrıca α -D-Manp-(1-3)- α -D-Manp-(1-2) epitopu
- 20 B'nin, internal α -D-Manp-(1-2) epitopu A'ya olan nispi oranı daha yüksektir. Bu numunelerin hepsinde aynı zamanda Tablo 3'te belirtildiği gibi nişasta (+) bulunmaktadır. Anahtar mannoz sinyalinin entegrasyonu, nişasta içeriğinin PG tipi numunelerde daha küçük olduğunu göstermektedir.

Mannoz NMR sinyalleri A-E'ye karşılık gelen spesifik monosakkarit yapılarının listesi.

- 25 A) α -D-Manp-(1-2)- α -**D-Manp**-(1-2)- α -D-Manp-

B) α -**D-Manp**-(1-3)- α -D-Manp-(1-2)- α -D-Manp-

C)

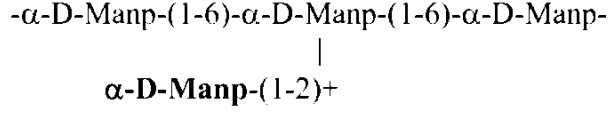
α -D-Manp-(1-6)- α -**D-Manp**-(1-6)- α -D-Manp-

|
 α -D-Manp-(1-2)+

D) - α -D-Manp-(1-2)- α -**D-Manp**-(1-6)- α -D-Manp-

E) - α -D-Manp-(1-6)- α -**D-Manp**-(1-2)- α -D-Manp-

ve



5 ve

α -D-Manp-(1-3)- α -**D-Manp**-(1-2)- α -D-Manp-

Tablo 3. Mannooligosakkarit fragmentlerinin ^1H - NMR sinyalleri ve farklı mannoz kalıntılarının nispi konsantrasyonları. Numune adındaki 'büyük', 6-12 ml'de elüe edilerek, jel geçirgenlik kromatografisinden büyük boyutlu bileşenleri göstermektedir.

NMR numunesi	Nişasta	Manno-oligosakkarit fragmentleri				
		A 5.302 ppm	B 5.144 ppm	C 5.118 ppm	D 5.096 ppm	E 5.048 ppm
PG1 büyük	+	1	1.5	0.9	0.8	1.3
PG2 büyük	+	1	1.4	0.8	0.7	1.3
PG4 büyük	+	1	1.3	1	0.8	1.3
PG 15 saat büyük	+	1	1.5	1	1	1.5
PG S büyük	+	1	1.3	1	1	1.4
PG WS büyük	+	1	1.4	1.1	1.1	1.6
PG S +E büyük	+	1	1.4	0.8	0.8	1.4
PG10 büyük	+	1	1.4	1	1	1.5
PG11 büyük	+	1	1.3	0.9	0.8	1.3

PG12 büyük	+	1	1.4	0.9	0.8	1.4
PG13 büyük	+	1	1.6	0.8	0.8	1.5
PG14 büyük	+	1	1.7	0.9	0.9	1.5
Agrimos büyük	+	1	>1 ^x	1.3	1.4	2.1
Ascogen büyük	+	1	1.1	1	1	1.2
Alphamune büyük	+	1	1.1	0.8	0.8	1.1
Bio-Mos büyük	+	1	0.9	0.9	0.8	1
^x arka plana göre belirlemesi zor ama açıkça 5.302'den daha küçük						

Nişasta oligosakkarit içeren numuneler

Aşağıdaki numuneler, sadece tanımlanabilir sakkarit bileşeni olarak nişasta oligosakkaritleri içermektedir: PG1 ara ürünü (12-16 ml'de GPC'den elüe edilir), PG2 ara ürünü, PG3 ara ürünü, PG4 ara ürünü, PG6 ara ürünü, PG7 ara ürünü, PG8 ara ürünü, PG9 ara ürünü, PG 15saat ara ürünü PG10 ara ürünü, PG11 ara ürünü, PG12 ara ürünü, PG13 ara ürünü, PG14 ara ürünü, Ag ara ürünü, As ara ürünü, Al ara ürünü ve BM ara ürünü.

Belirleme, sırasıyla, $[\alpha-(1-4)\text{Glc}]_n$ –zincirinin anomerik H1'lerine, $\alpha-(1-6)\text{-Glc}$ dallanma noktasına ve indirgeyici ucun $\alpha\text{-D-Glc}$ ve $\beta\text{-D-Glc}$ 'ye karşılık gelen, 5.409 ppm, 4.972 ppm, 5.231 ppm ve 4.645 ppm'de sinyallerin varlığına dayanmaktadır.

Ayrıca, nişasta oligosakkarit ana bileşenine ek olarak muhtemelen manooligosakkarit fragmentlerini içeren birkaç örnek bulunmaktadır. Bu moleküllerin tanımlanması daha fazla araştırma gerektirmektedir.

NMR spektrumlarında PG1 ara ürünü PG S ara ürünü PG S+E ara ürünü ve PG WS ara ürünü numunelerinin sinyallerine karşılık gelen $\alpha\text{-D-Manp-(1-3)-}\alpha\text{-D-Manp-(1-2)-}\alpha\text{-D-Manp-}$ ve $\alpha\text{-D-Manp-(1-2)-}\alpha\text{-D-Manp-(1-2)-}\alpha\text{-D-Manp-terminal}$ fragmentleri bulunmaktadır.

Düşük nişasta miktarları

Tablo 4, NMR ile büyük sakkarit fraksiyonundaki nişastanın miktarını içermektedir. Tercih edilen bir uygulamada buluş, sakkarit fraksiyonlarına (6-12 dakika ve isteğe bağlı olarak ayrıca oligosakkaritler) ve buluşa göre olan materyale yöneliktir, burada nişasta Glc α 4 epitoplarının miktarı Manp-(1-3)- α -D-Manp-(1-2 'den 3,5 kat daha az, daha da tercih edilen şekliyle 3 kattan daha azdır. Buluş ayrıca, düşük molekül ağırlıklı nişasta zincirlerini gösteren mevcut numunelerde nişasta uç sinyallerini azaltarak varlığını ortaya çıkarmıştır. Buna ek olarak buluşa göre tercih edilen nişasta, mütevazı miktarlarda Glc α 6-dal yapıları içermektedir. Buluş, tercih edilen mannoz sakkaritlerin yüksek miktarları bağlamında düşük miktarlarda nişastaya yönlendirilir. Nişasta fragmentlerinin amilaz tipi enzimler tarafından degrede edilebileceği anlaşılmaktadır. Tercih edilen bir düzenlemede, kalıntı nişasta materyali, daha saf mannoz/ glikoz sakkaritleri elde etmek için amilaz gibi nişasta degrede edici enzimler tarafından degrede edilmektedir. Ara ürün Superdex peptid jel filtrasyon fraksiyonunun analizi, yeni çözünebilir fraksiyonlarda (PG Suda çözünür ve Çözünebilir) nişasta oligosakkaritlerinin miktarının özellikle düşük olduğunu ortaya çıkarmaktadır.

Yeni çözünebilir preparasyonlarda daha yüksek miktarlarda mannoz oligosakkaritlerin varlığı

Mannoz oligosakkaritlerinin sinyalleri, çözünebilir (Çözünebilir ve Suda Çözünebilir) sakkarit preparasyonlarında daha belirgindi. α -D-Manp-(1-3)- α -D-Manp-(1-2)- α -D-Manp-sinyalini, çözünebilir preparasyonlar arasındaki nişasta oligosakkarit sinyali ile karşılaştırırken, bu sinyaller, nişasta Glc β 4 sinyalinin en az yaklaşık % 20'si, bazı preparasyonlarda nişasta sinyalinin yaklaşık % 30-60'ı ve yaklaşık olarak aynı miktarda toplam belirlenebilir oligosakkarit idi. Eski proses preparasyonlarında sadece çok küçük α -D-Manp-(1-3)- α -D-Manp sinyalleri gözlemlenmiş ve bunlar sadece birkaç % , tipik olarak nişasta sinyalinin yaklaşık % 5'inden daha az olmuştur. 12-16 dakika arasında elüe edilerek daha büyük oligosakkaritler içeren ara fraksiyon, oligosakkaritlerin çoğunu en küçük olanlar (disakkaritler ve muhtemelen kısım ya da trisakkaritler) hariç içermektedir, ancak monosakkaritleri içermemektedir. Numunelerde daha küçük mannoz oligosakkaritlerinin bulunmasının mümkün olmadığı anlaşılmıştır. Ara fraksiyon miktarı (superdex peptid 12-16), toplam sakkaritlerin yaklaşık % 20-50'si olduğu tahmin edilen jel filtrasyon profilleri ile gösterilen toplam sakkarit tipi materyalin önemli bir parçasıdır. Bu nedenle, numuneler toplam

sakkaritlerin en az yaklaşık % 4 ila % 30, daha tercih edilen şekliyle en az yaklaşık % 5-30, daha da tercih edilen şekliyle en az yaklaşık % 10-30 mannoz oligosakkaritlerini içermektedir. Sakkaritleri içeren toplam mannozun mannoz oligosakkaritlerinin miktarı, numunenin mannoz ve glukoz içeriğine göre yaklaşık % 10-60, daha tercih edilen şekliyle % 20-60'dır.

Preparasyonlardaki mannoz oligosakkaritleri, mannoz bağlayıcı patojenlerini inhibe eden yeni biyoaktif mannoz sakkaritin zenginleştiğini gösteren, preparasyonlarda majör mannoz sinyali olan terminal Man α 3-epitopu ile oldukça zenginleştirilmiştir

Veriler, 12-16 dakika arasında elüe edilerek düşük moleküler ağırlığa sahip gerçek majör mannoz oligosakkaritlerinin, önceki progut metotları ya da rakip metot dahil olmak üzere, çözünebilir fakat diğer metotları üretmek için mevcut optimize metot ile etkili bir şekilde üretildiğini ortaya koymaktadır.

Rakip materyallerin önemli miktarlarda mannoz oligosakkarit içermediği anlaşılmaktadır, yine de bunlardan bazıları manno-oligosakkaritler olarak tanıtılmaktadır. Manno-oligosakkaritlerinin mayadan etkin üretiminin, birçok şirketin çabalarına rağmen kolay bir iş olmadığı anlaşılmaktadır.

Rakiplerin kalıntı mannoz materyalleri, mevcut buluşa göre materyallerin daha dar ve düzgün sinyalleri ile karşılaştırıldığında çok geniş ve zayıf NMR sinyallerinin de gösterdiği gibi yüksek moleküler ağırlıklı zayıf çözünür materyaller olarak görünmektedir. Buluş, tercih edilen şekliyle benzer pik genişliği ve/ veya benzer pik integralleri ve yükseklikleri ve benzer düşük miktarlarda nişasta sinyalleri ve / veya karbonhidrat olmayan muhtemel materyal de dahil olmak üzere, yaklaşık 4.7 ppm'de safsızlık sinyali gibi diğer safsızlıkları içeren buluşa göre mannoz sinyalleri A-E ve Glcbeta sinyalleri açısından esas olarak benzer olan NMR spektrumunu üreten buluşa göre yeni sakkarit materyaline yönelik tercih edilen bir uygulamadır.

NMR analizi için referanslar:

Kath, F., and Kulicke, W-M (1999) Die Angewandte Makromolekulare Chemie 268, 69-80 Shibata, N., Kojima, C., Satoh, Y., Satoh, R., Suzuki, A., Kobayashi, H., and Suzuki, S. (1993) Eur. J. Biochem 217, 1-12 Ikuta, K., Shibata, N., Blake J.S., Dahl M.V., Nelson, R.D., Hisamichi, K., Kobayashi, H., Suzuki, S., and Okawa Y. (1997) Biochem J. 323, 297-305

Sonuç olarak, Progut tipi ürün, ^1H NMR ile gösterildiği gibi daha fazla terminal $\text{Man}\alpha 1-3$ birimi içermektedir (Şekil 33 ve 34) ve manooligosakkarit içeriği, çözünebilir materyalin rakip ürünlerden daha fazla çözünebilir materyalin monosakkarit analizi ile gösterildiği (Şekil 31) gibi daha yüksektir. Bu sonuçlara göre, Progut tipi ürünlerde aktif manooligosakkaritlerin miktarının, rekabetçi ürünlere göre açıkça daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir.

Alfa- ve beta-Glc içeren materyallerin belirlenmesi

Tablo 4, Progut tipi numunelerde spesifik Glc β materyallerinin varlığını göstermektedir. En yüksek miktarda Glc β materyali, yaklaşık 4.53 ppm'de NMR sinyali ile gösterilen Çözülebilir üründen bulunmuştur. Buluş, özellikle yaklaşık 4.53 ppm'de Glc β NMR sinyali miktarı, yaklaşık 5.14 ppm'de $\text{Man}\alpha 3$ sinyalinin en az yaklaşık % 80'i (Tablo 4'te 0.8 kez), daha tercih edilen şekliyle $\text{Man}\alpha 3$ sinyalinin % 90'ı (Tabloda 0.9 kez) olduğunda, yeni Çözünebilir ürünlere yöneliktir. Buluş eşit mol miktarlarında terminal Glc β ve $\text{Man}\alpha 3$ materyallerine bile yöneliktir.

Rakip materyallerin hiçbirinin Glc β sinyalini içermediği dikkate değerdir. Glc β -sinyalinin büyük miktarda Glc $\beta 6$ - materyalini içerdiği düşünülmektedir, bu ayrıca 3.31 ppm'de Glc $\beta 6$ -H2 sinyaline atfedilebilen sinyalin varlığıyla desteklenmektedir. Glc β sinyali aynı zamanda, tercih edilen sakkarit materyalinde, tahıl glukandan elde edilmiş sakkaritlerin Glc $\beta 4$ epitopunun kısmi varlığını işaret ettiği düşünülen tahıl glukana sinyali ve sinyal şekilleri için bölgeyle çakışmaktadır.

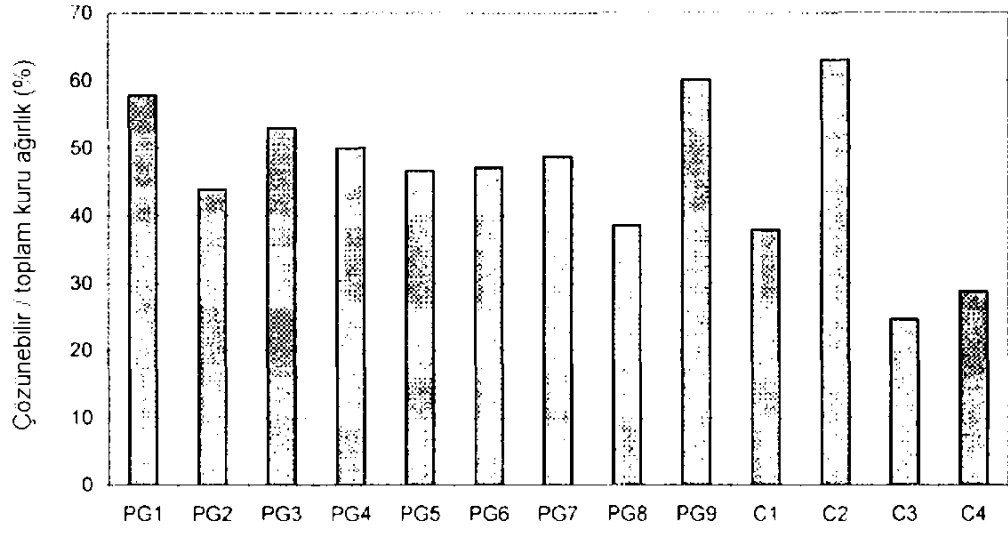
Tablo 4. Oligosakkarit fragmentlerinin ^1H - NMR sinyalleri ve farklı monosakkarit kalıntıların nispi konsantrasyonları. Numune adındaki 'büyük', 6-12 ml'de elüe edilerek, jel geçirgenlik kromatografisinden büyük boyutlu bileşenleri göstermektedir.

NMR numunesi	Oligosakkarit fragmentleri					
	$\text{Man}\alpha 1-3$ H1 5.144	Glc $\beta 1-6^a$ H1 4.53 ^d	Glc $\beta 1-3^b$ H1 4.76	Glc $\alpha 1-4$ H1 5.409	Glc $\alpha 1-6$ H1 4.972	Glc $\beta 1-6$ H2 3.31
PG1 büyük	1	0.7	+	1.7	0.3	evet
PG S büyük	1	0.9	+	3.0	0.6	evet

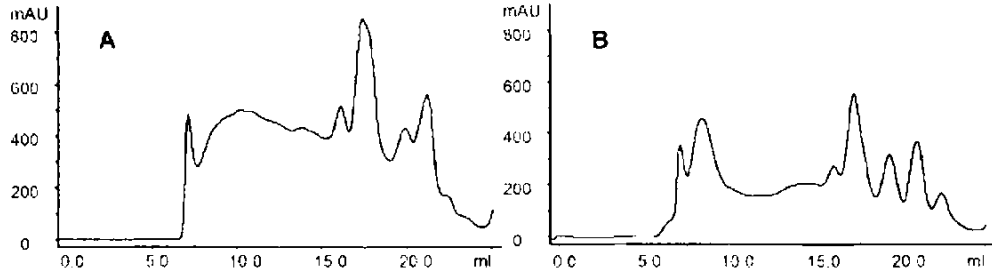
PG10 büyük	1	0.6	+	2.7	0.6	evet
PG11 büyük	1	0.4	n.d.	1.7	0.6	evet
PG12 büyük	1	0.3	-	1.2	0.3	evet
PG13 büyük	1	0.3	n.d.	1.9	0.5	evet
PG14 büyük	1	0.4	-	1.0	-	evet
Agrimos büyük	1	-	-	0.5	0.6	hayır
Ascogen büyük	1	-	-	3.6	1.5	hayır
Alphamune büyük	1	-	-	8.0	0.1	hayır
Bio-Mos büyük	1	-	-	4.0	-	hayır
^a Not: Glcβ1-6 ve Glcβ1-4'ün H1 sinyalleri aynı değere sahiptir. ^b Glcβ1-6 glukanda Glcβ1-3 dalının H1'i ^c Bu sinyalin yoğunluğu ölçülmüş, bunun yerine (evet) ya da değil (hayır) olup olmadığı belirtilmektedir ^d Not. 4,53 ppm'de oldukça büyük bir arka plan vardır; bu nedenle, yoğunluklar biraz fazla tahmin edilebilmektedir + küçük sinyal, açıkça tespit edilebilen küçük çaplı, entegre edilemeyecek kadar küçük - tespit edilebilen sinyal yok n.d. belirlenemedi, H₂O 'dan kaynaklanan sinyal, bu sinyalin tespit etme olasılığını çakıştırır.						

ÖRNEK 4. Hayvan deneyleri

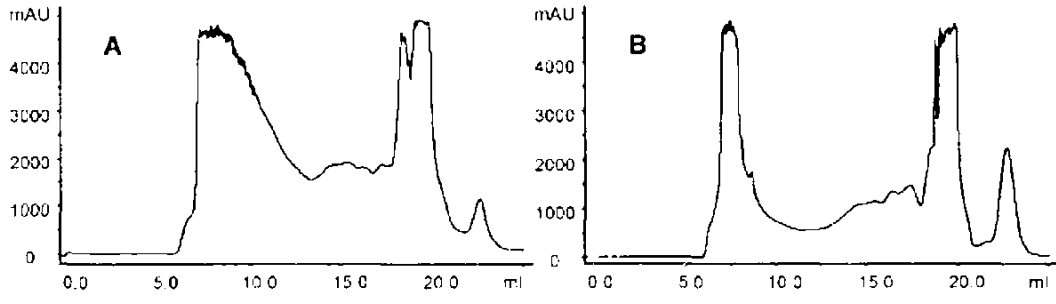
Yeni sakkarit preparasyonu PG Suda Çözünebilir, Progut'un (Suomen Rehu tarafından yayınlanmıştır) test edilmesinde kullanılan standart metotlar kullanılarak besin ya da içme suyunun % 0.3 ila % 3'ü miktarında gıda takviyesi olarak hayvanları test etmek için beslenmektedir. Düzenli Progut preparasyonları ya da rakip ürünlerden daha yüksek kilo artışları ve/veya daha az diyare gözlenmektedir.



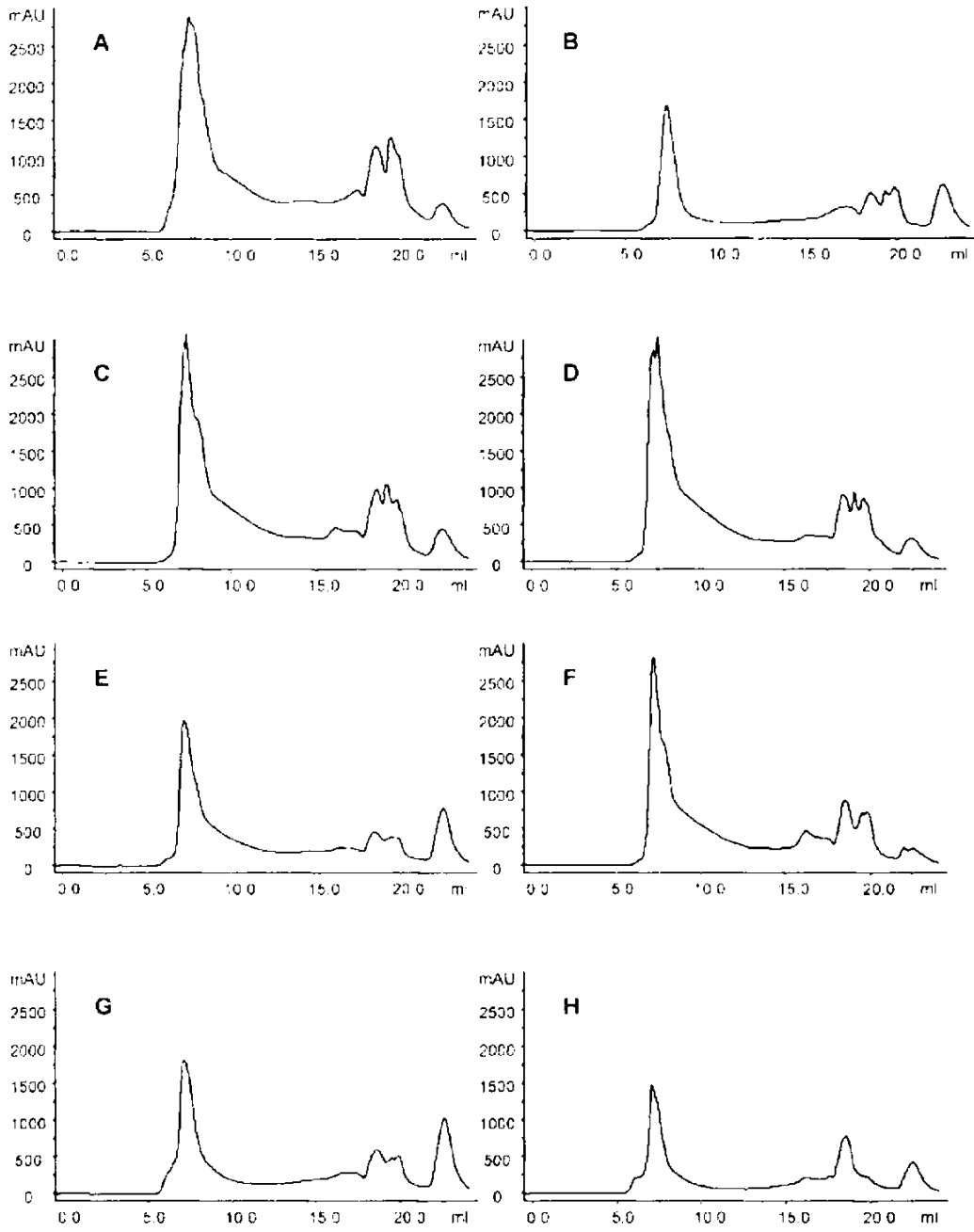
Şekil 1

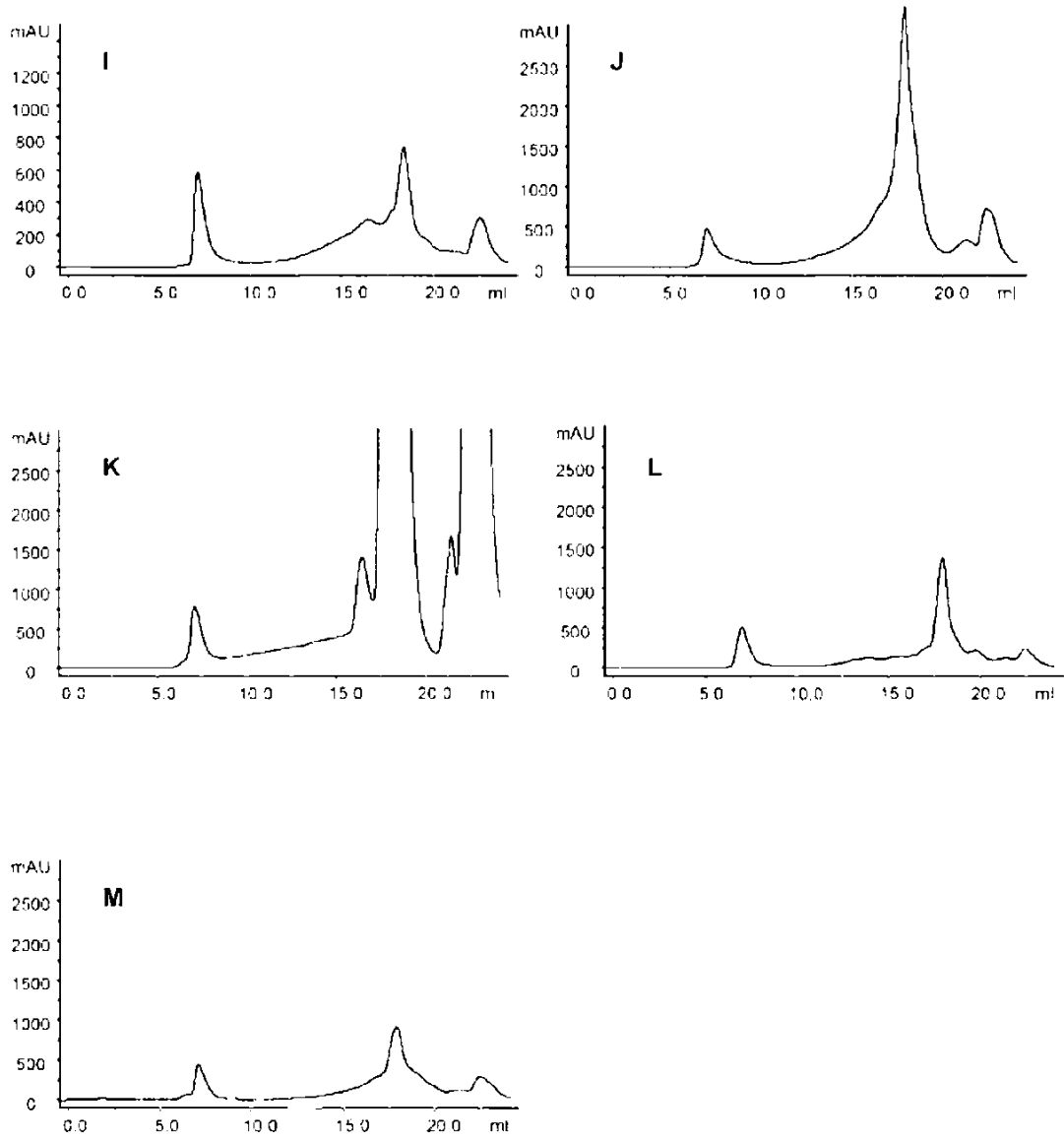


Şekil 2A ve 2B

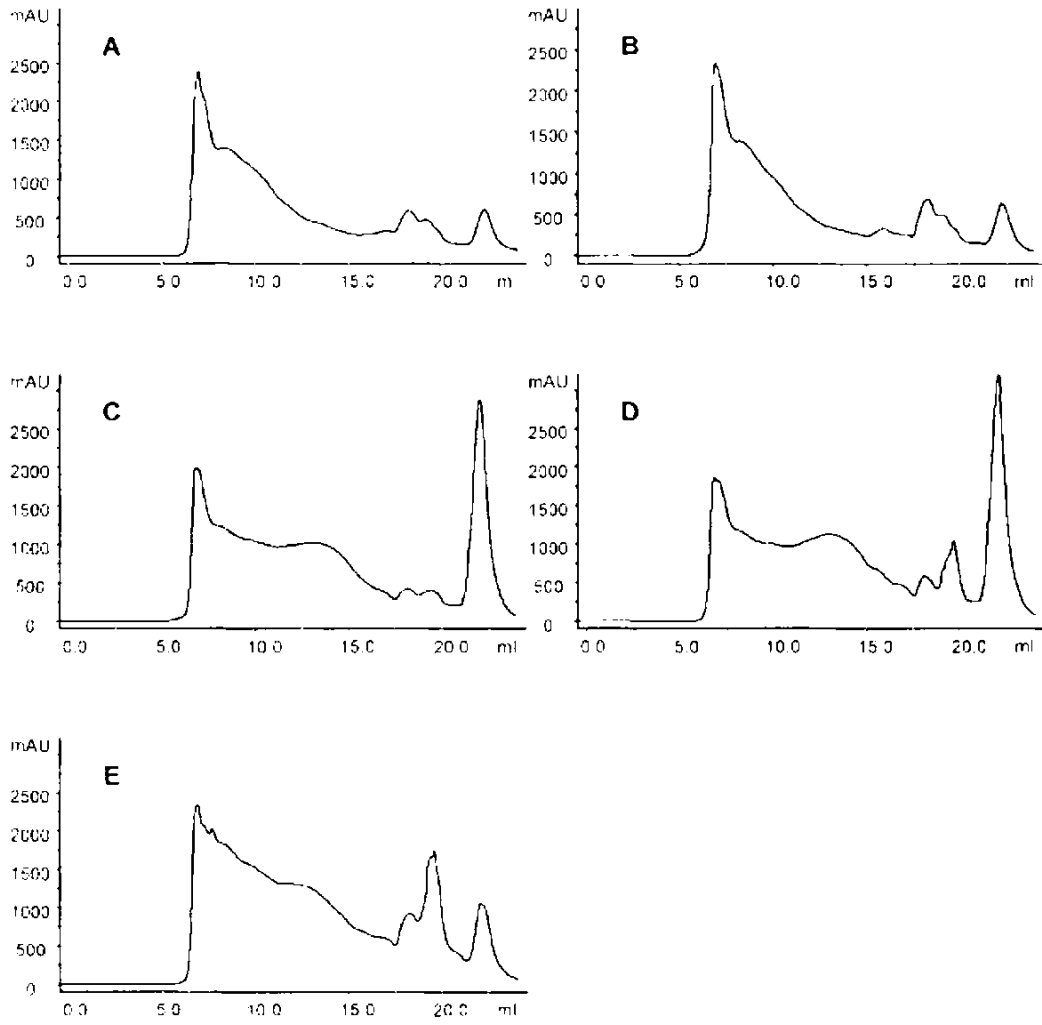


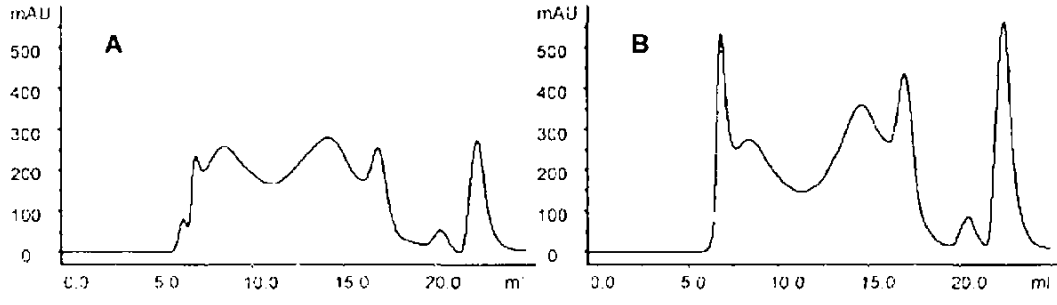
Şekil 3A ve 3B

**Şekil 4A-4H**

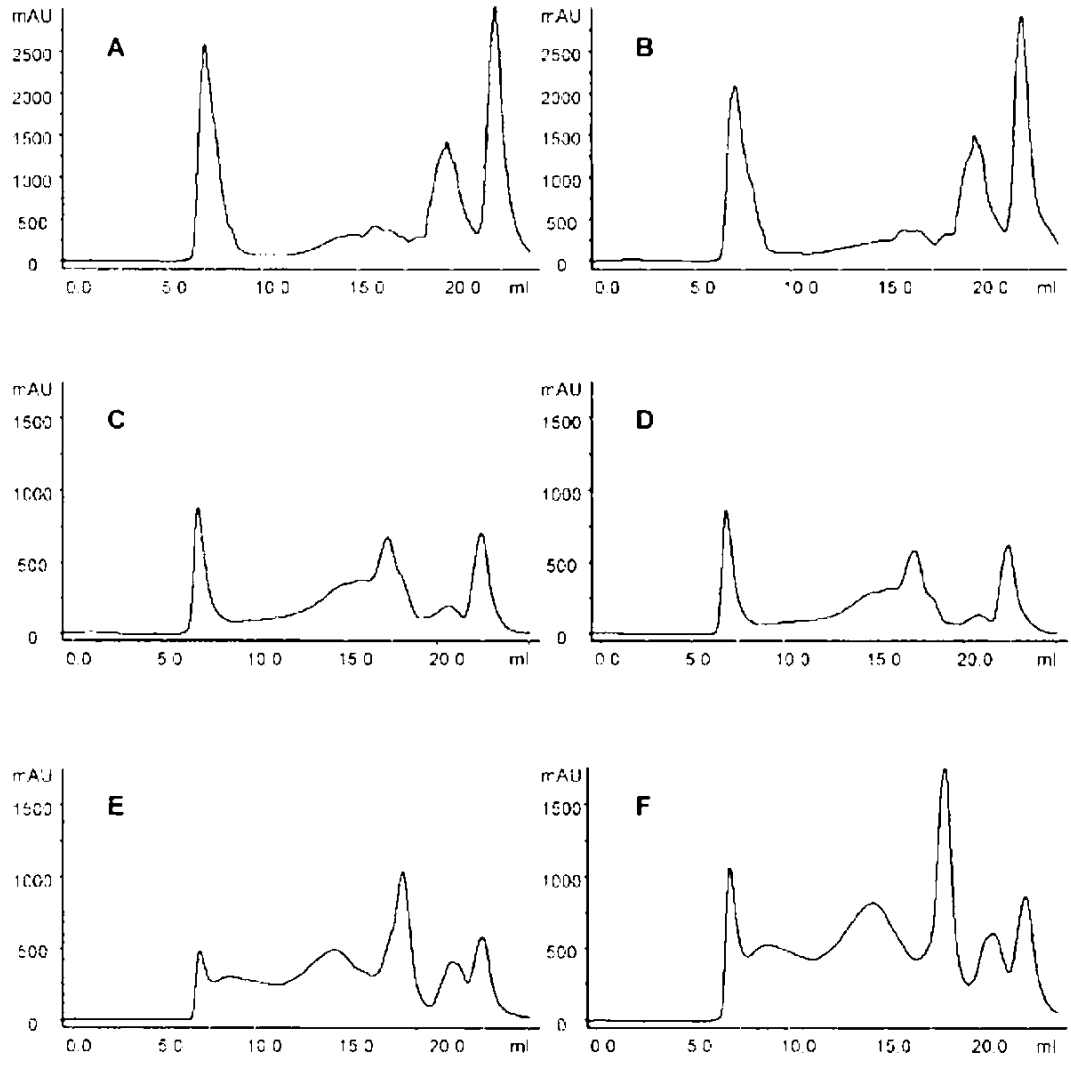


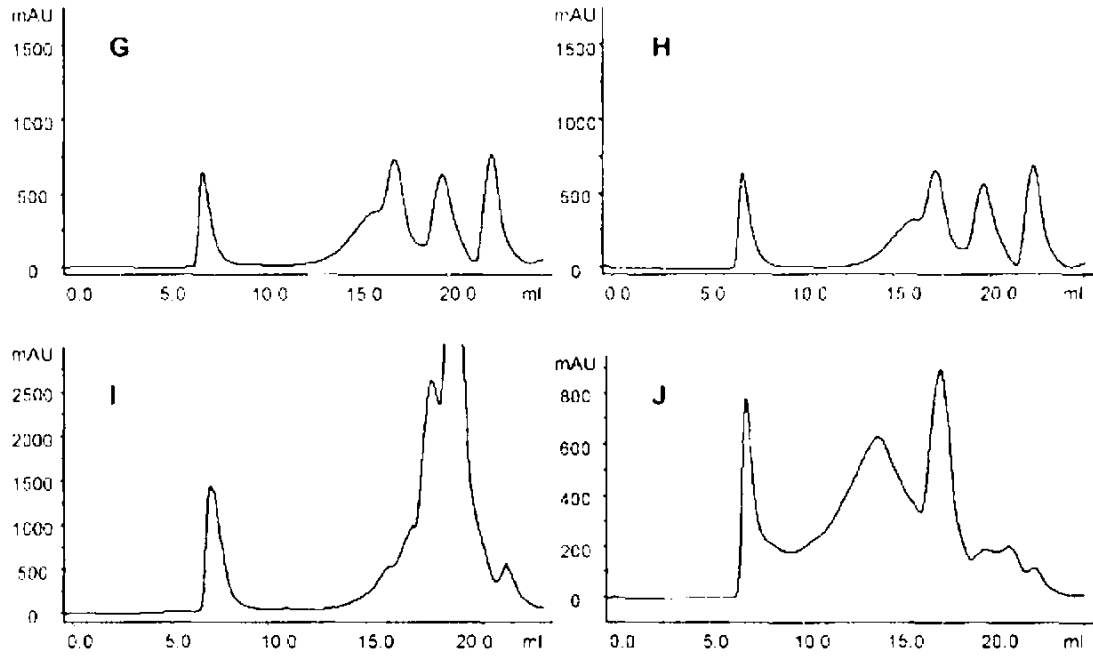
Şekil 4I-4M

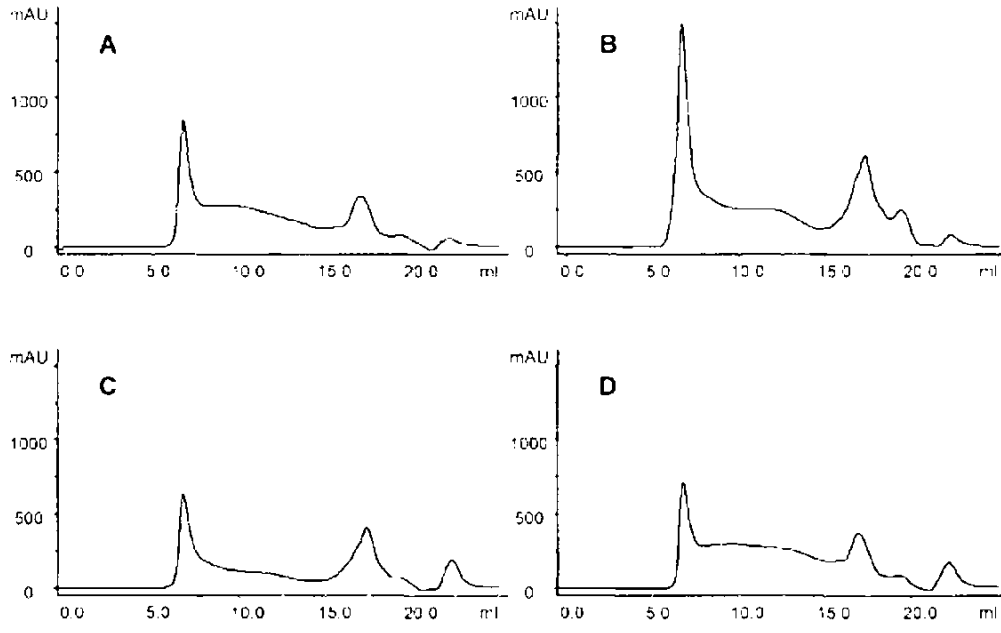
**Şekil 5A-5E**

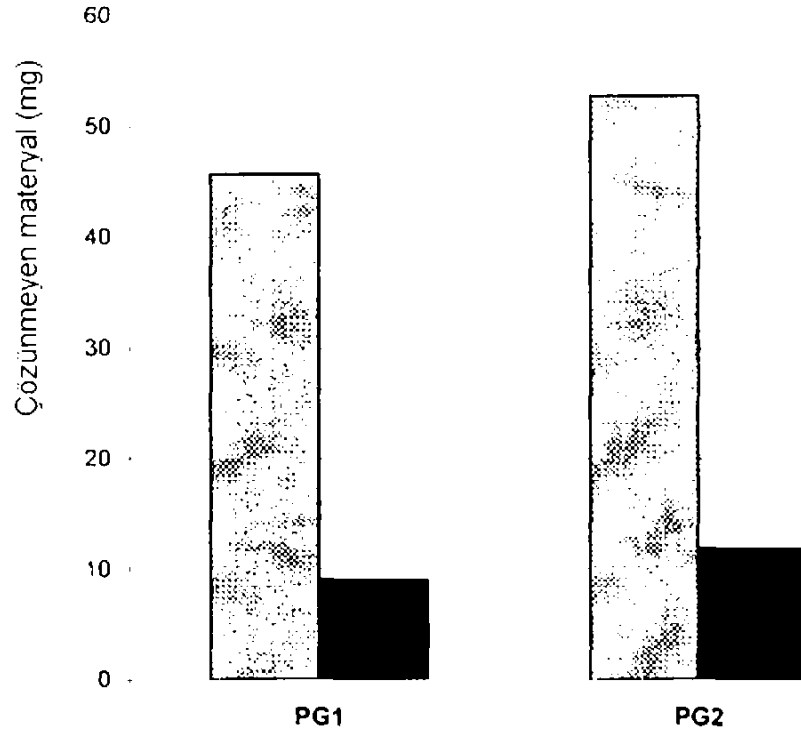


Şekil 6A ve 6B

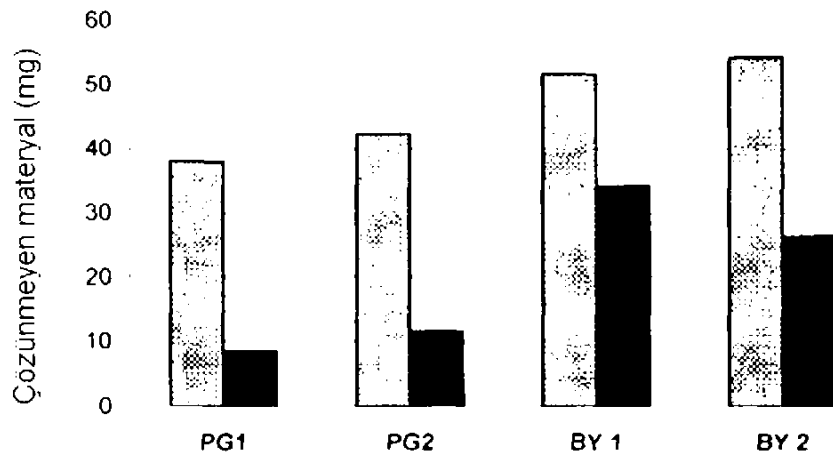
**Şekil 7A-7F**

**Şekil 7G-7J**

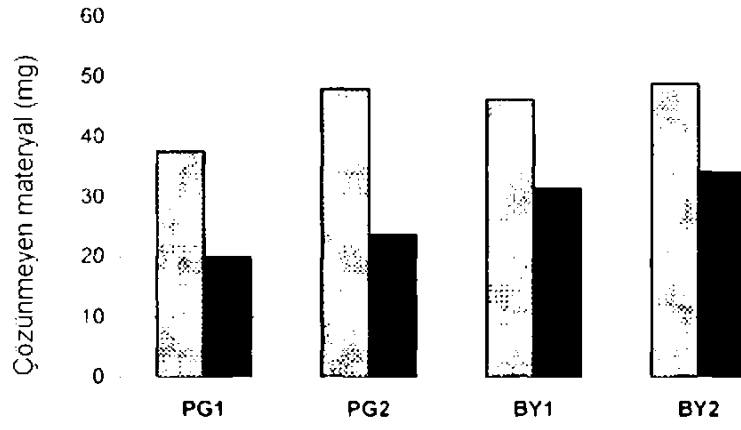
**Şekil 8A-8D**



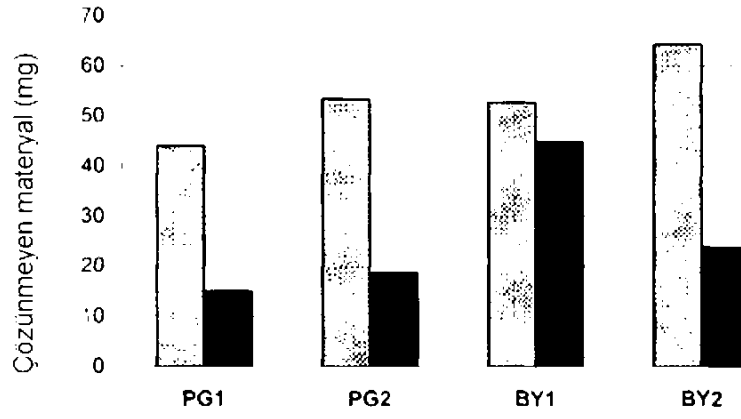
Şekil 9



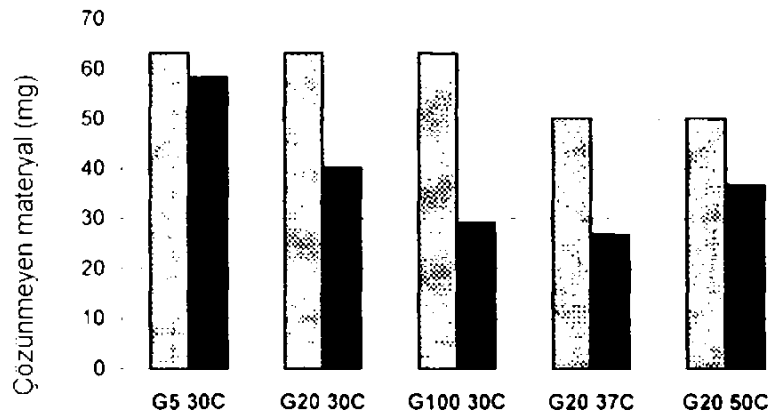
Şekil 10



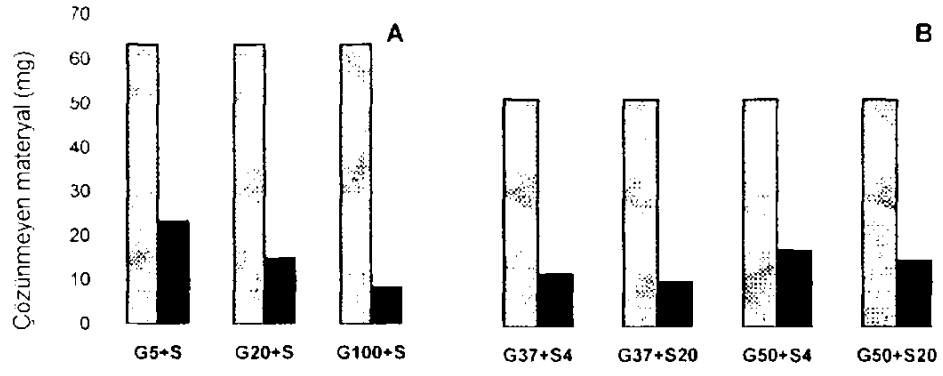
Şekil 11



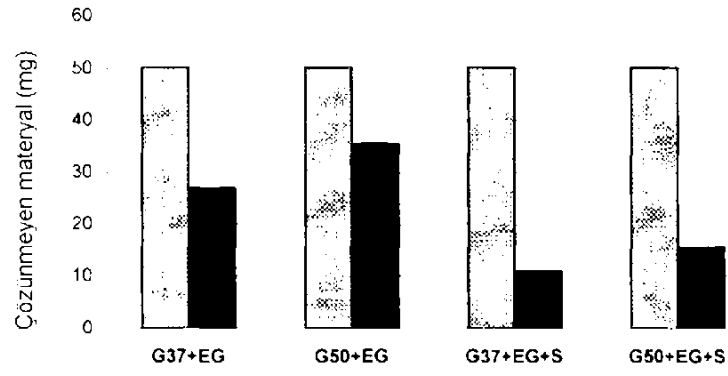
Şekil 12



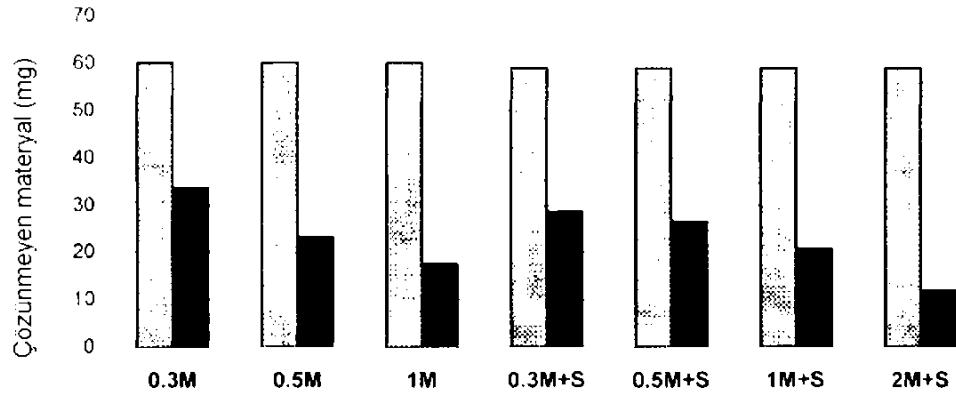
Şekil 13



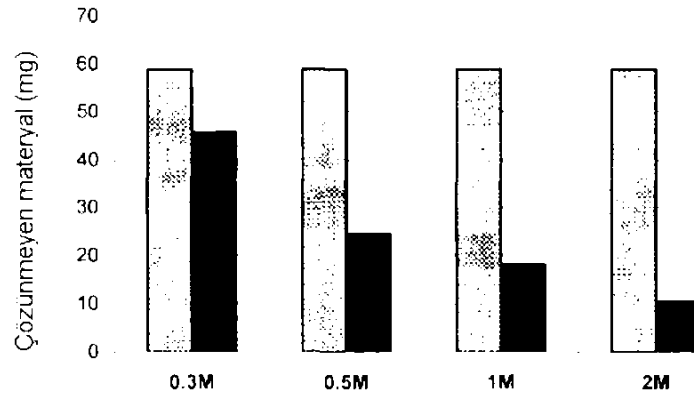
Şekil 14A ve 14B



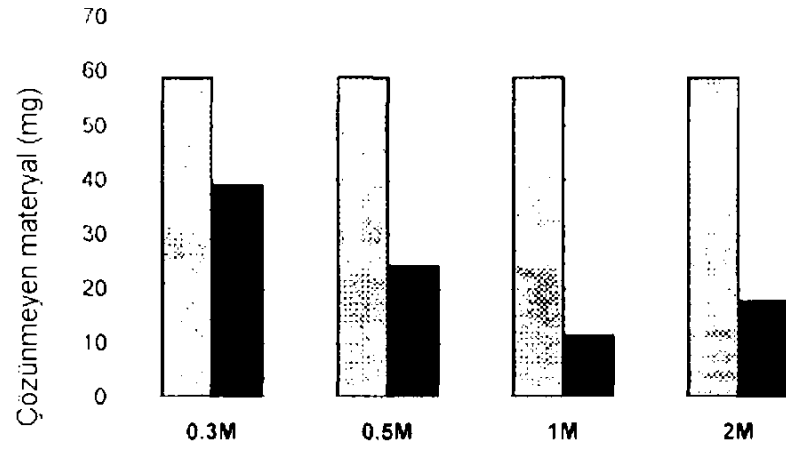
Şekil 15



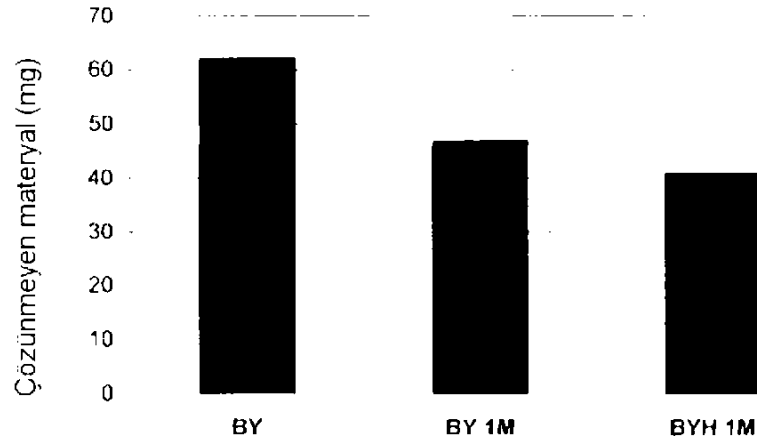
Şekil 16



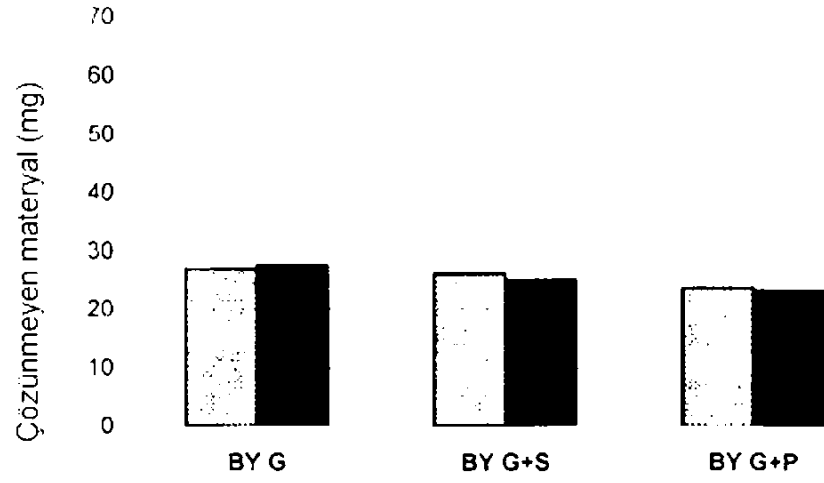
Şekil 17



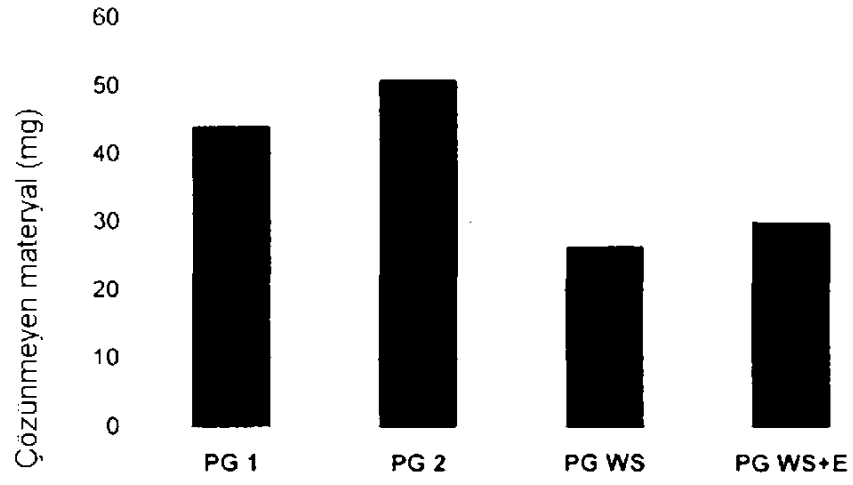
Şekil 18



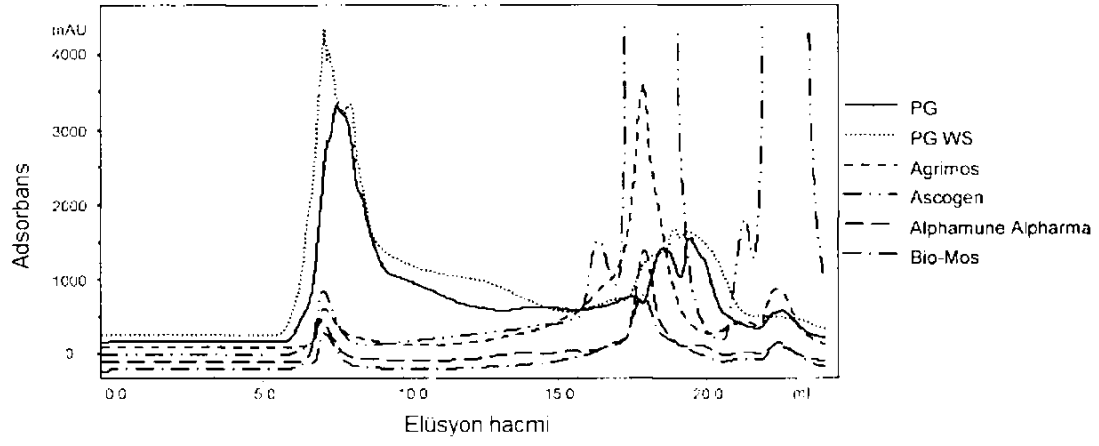
Şekil 19



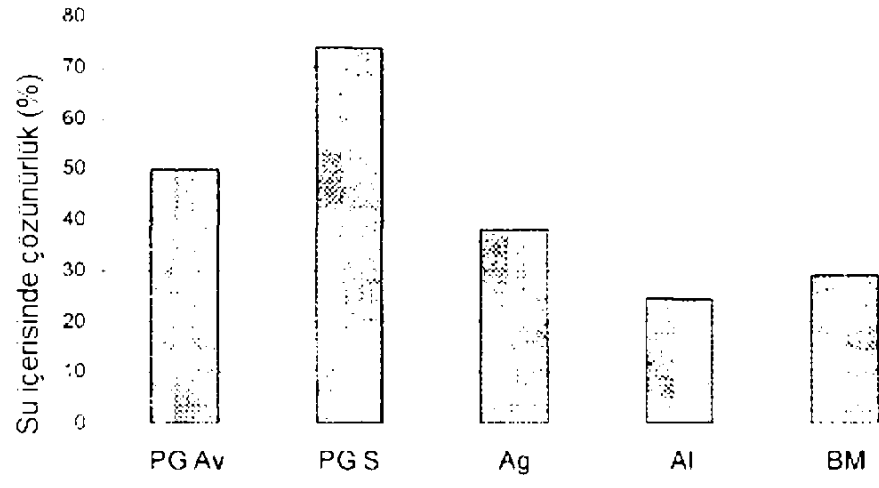
Şekil 20

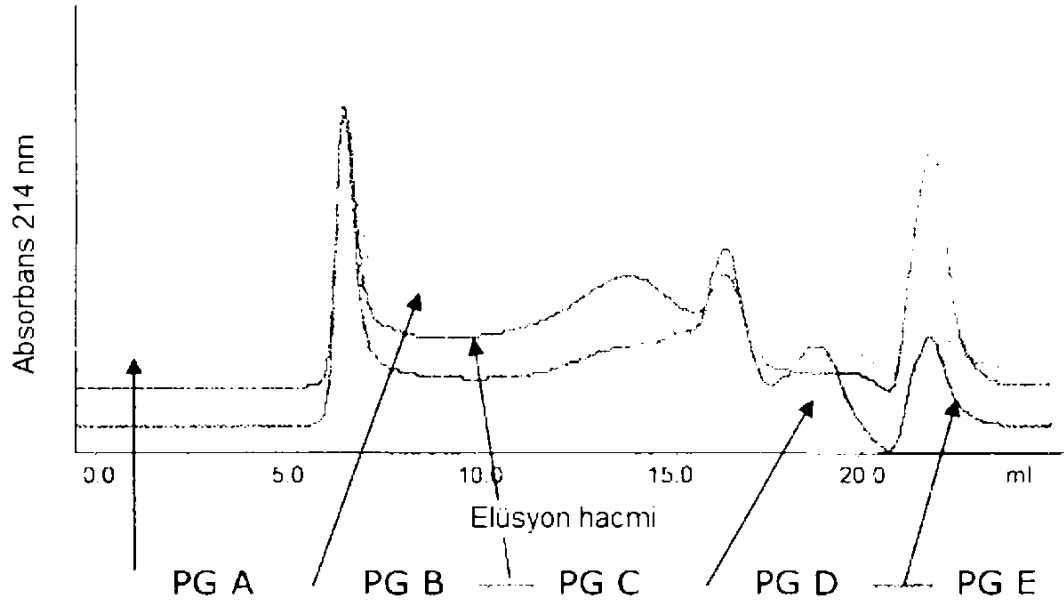


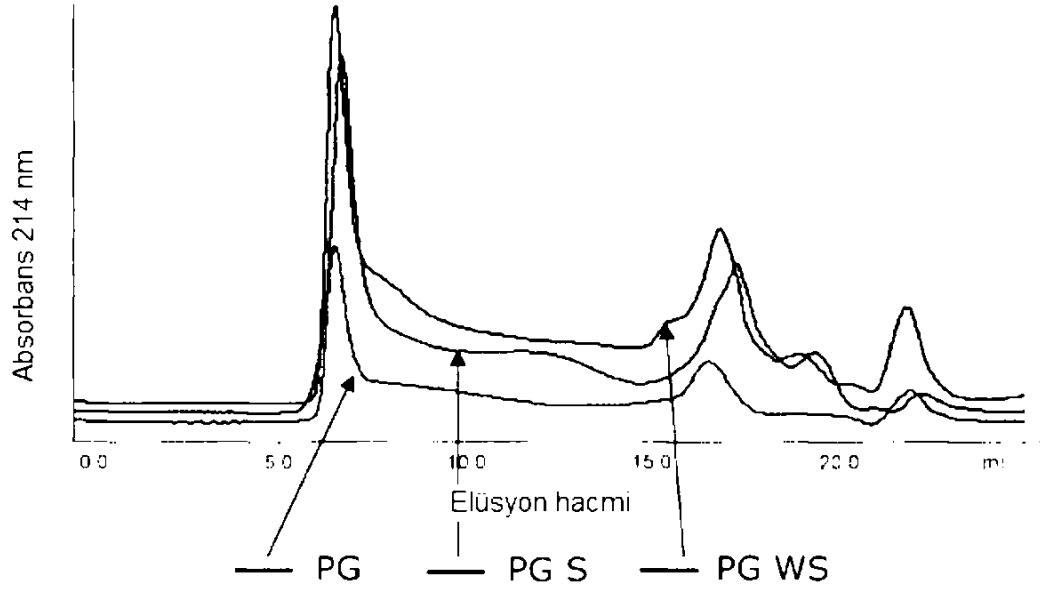
Şekil 21



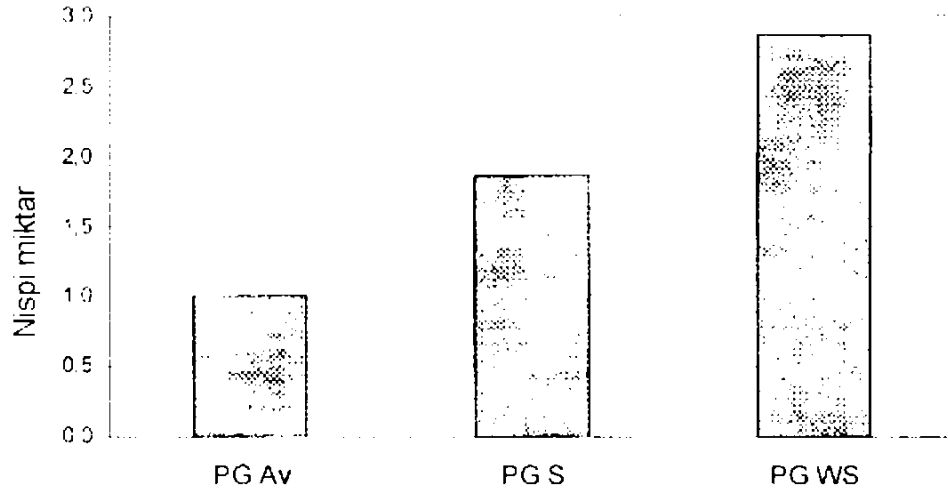
Şekil 22

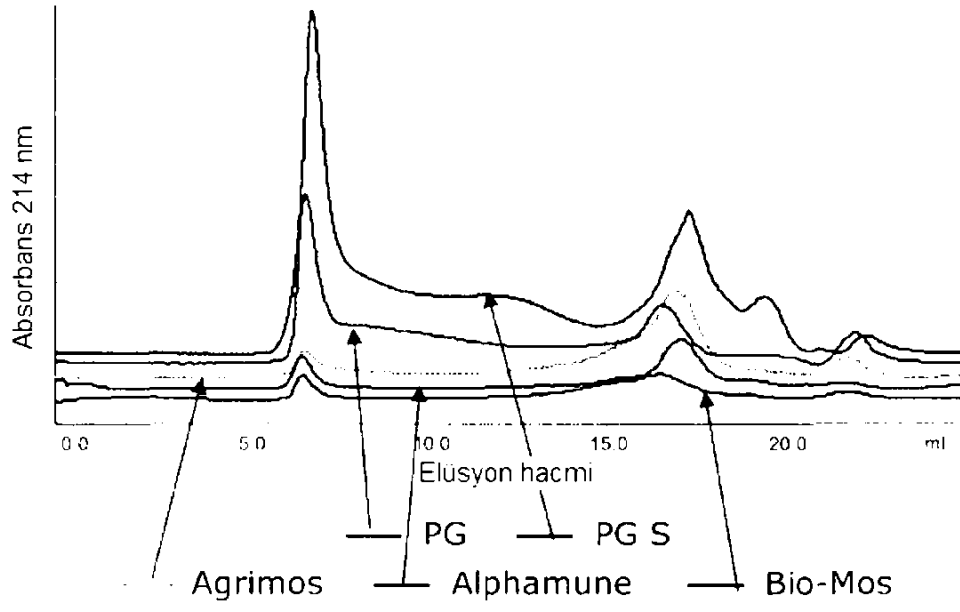
**Şekil 23**

**Şekil 24**

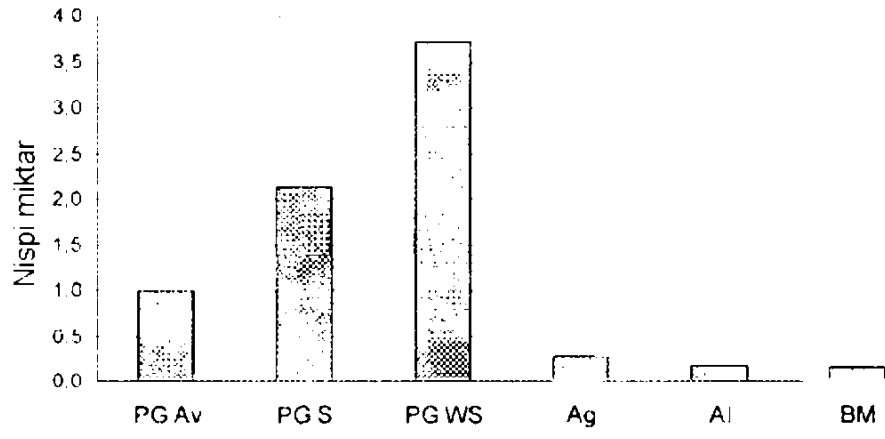


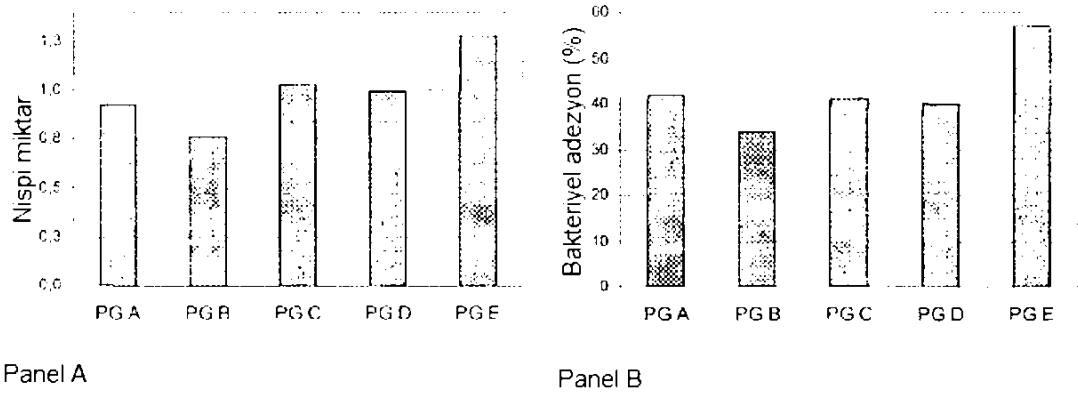
Şekil 25

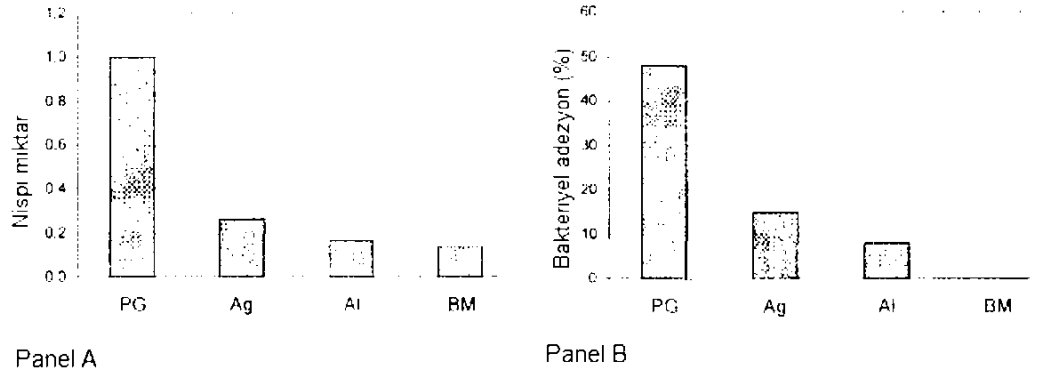
**Şekil 26**

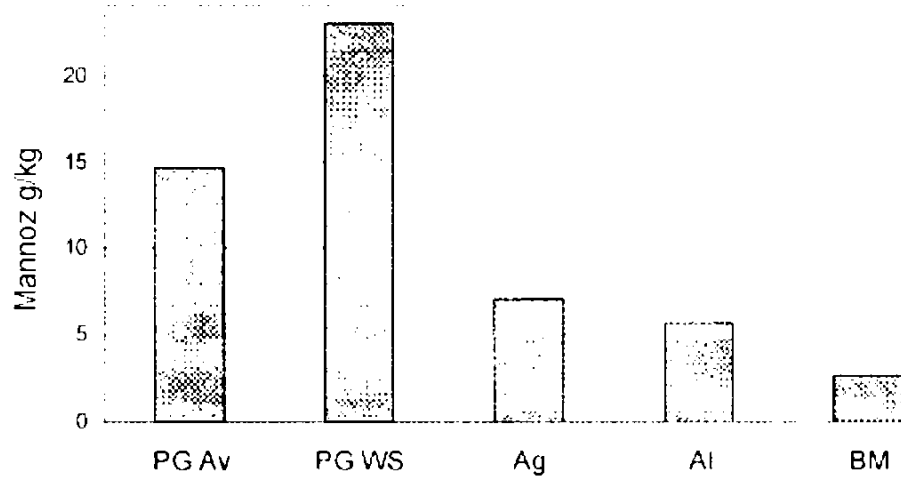


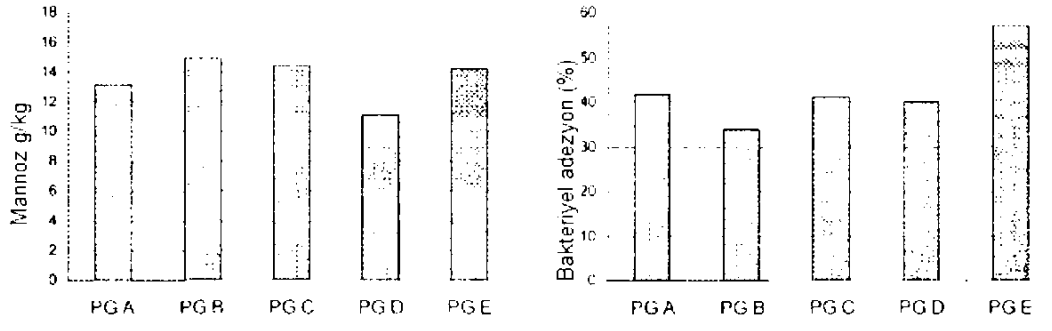
Şekil 27

**Şekil 28**

**Şekil 29**

**Şekil 30**

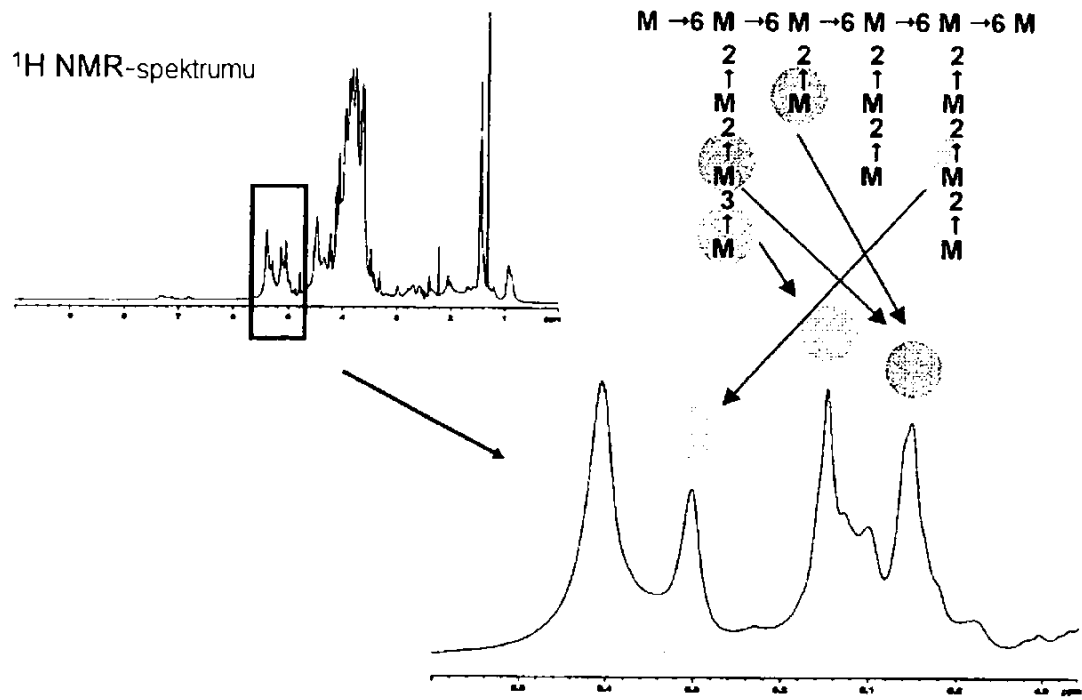
**Şekil 31**



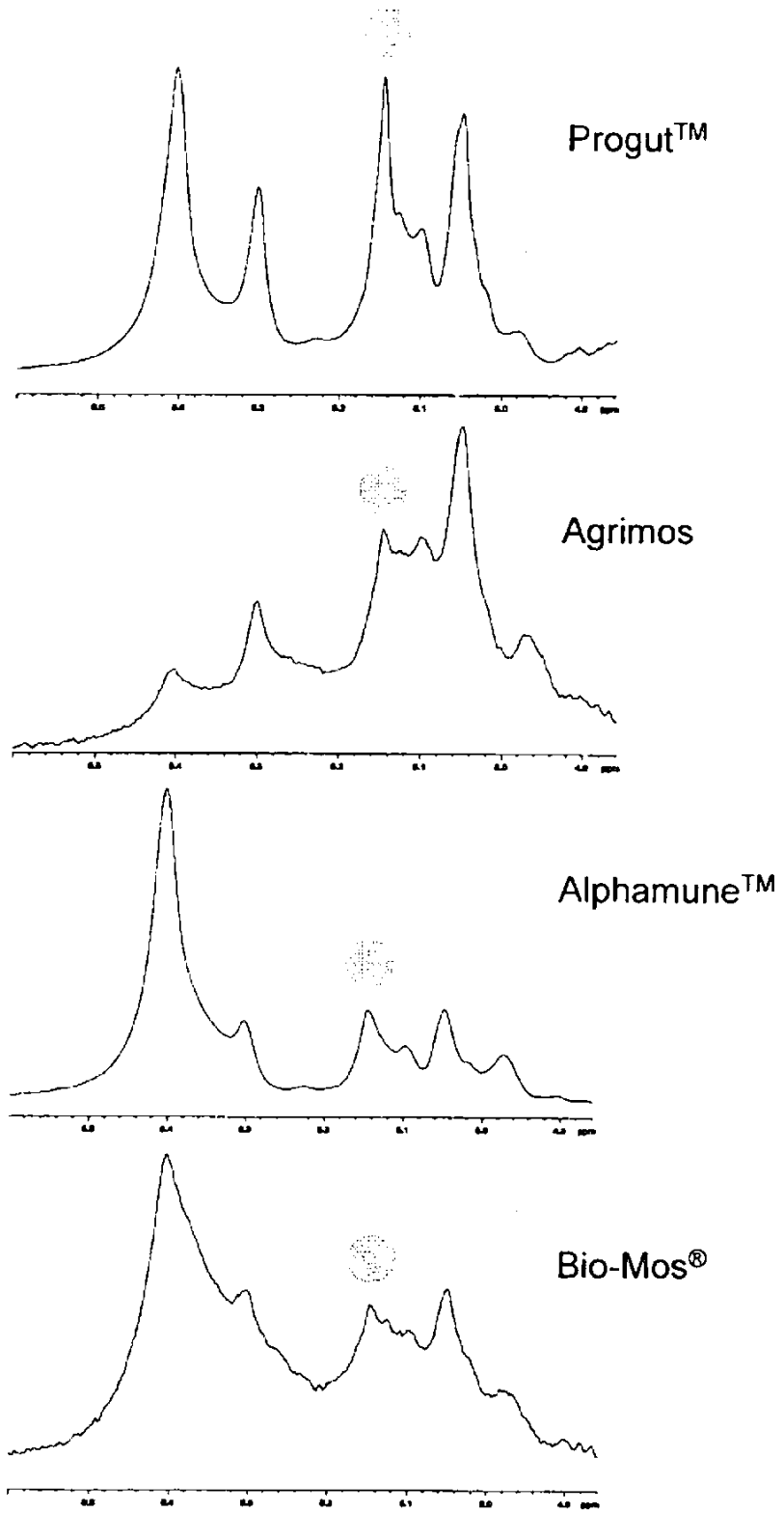
Panel A

Panel B

Şekil 32



Şekil 33



Şekil 34