(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191253 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.07

(22) Дата подачи заявки
2019.11.08

(51) Int. Cl. ***C08B 30/20*** (2006.01)
A23G 3/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

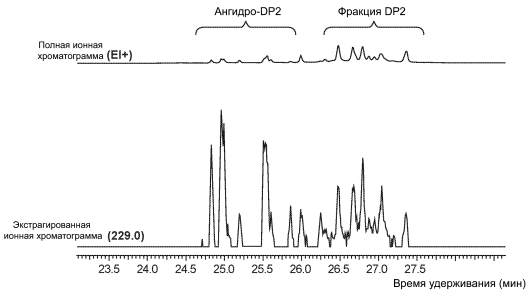
(31) **62/757,231**
(32) **2018.11.08**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/060453**
(87) **WO 2020/097454 2020.05.14**

(71) Заявитель:
МИДОРИ ЮЭсЭй, ИНК. (US); ДСМ АйПи АССЕТС, Б.В. (NL); КАЛЕЙДО БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Джеремия Джон М. (US), Хёллер Ульрих, Баур Мануэла, Кане-Мартинес Эстель, Эммануэлле Шатнер Александра Анне, Валь Гуидо (NL), Любомиров Анастасия В., Лю Кристофер Мэтью, Хехт Максвел Б., Хартман Мэдлин, Анталек Митчел Тайлер (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к селективным аналитическим способам детекции и/или количественного определения олигосахаридного препарата в питательной композиции, такой как корм для животных. Также раскрыты способы производства питательной композиции, содержащей олигосахаридный препарат, присутствие или концентрация которого могут быть выборочно обнаружены или определены.



202191253 A1

202191253 A1

СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет для предварительной заявки на патент США № 62/757231, поданной 8 ноября 2018 года, раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей полноте.

Уровень техники

Олигосахаридные препараты, которые обычно могут включать моносахариды, олигосахариды, полисахариды, функционализированные олигосахариды или их комбинации, используются в качестве добавок в питательных композициях, таких как корм для животных. Добавление олигосахаридных препаратов позволяет улучшить здоровье и продуктивность животного. Однако обнаружить или количественно определить добавку олигосахаридного препарата в питательной композиции сложно, поскольку питательные композиции обычно содержат другие источники углеводов, которые могут иметь структурное сходство с олигосахаридными препаратами. В результате существует потребность в способах селективной детекции или количественного определения олигосахаридных препаратов в питательной композиции.

Сущность изобретения

В настоящей заявке раскрыты простые, селективные и чувствительные аналитические способы для детекции и/или количественного определения олигосахаридного препарата или композиции, содержащей олигосахаридный препарат в питательной композиции. Также раскрыты способы производства питательной композиции, содержащей олигосахаридный препарат, присутствие или концентрацию которого можно избирательно и чувствительно обнаружить или определить.

В одном аспекте в настоящей заявке описан способ корреляции синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции, включающей синтетический олигосахаридный препарат и натуральную олигосахаридную композицию, где способ включает: (a) обеспечение образца питательной композиции; (b) детекцию сигнала по меньшей мере части олигосахаридов в образце питательной композиции, и (c) корреляцию концентрации синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции, причем сигнал является (i) показателем олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц, или (ii) ассоциированным с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β- (1,2)-гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными

связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов. В одном аспекте в настоящей заявке описан способ выполнения контроля качества питательной композиции, включающий: (a) обеспечение партии питательной композиции, содержащей синтетический олигосахаридный препарат и натуральную олигосахаридную композицию; (b) получение образца питательной композиции из партии; (c) детекцию сигнала по меньшей мере части олигосахаридов в образце питательной композиции с помощью аналитических приборов; и (d) приемку или браковку партии питательной композиции, где сигнал является (i) показателем олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц, или (ii) ассоциированным с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2)-гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления сигнал является показателем олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, имеют степень полимеризации 2 (DP2). В одном аспекте, описанном в настоящей заявке, предложен способ выполнения контроля качества питательной композиции, включающий: (a) обеспечение образца питательной композиции, содержащего натуральную олигосахаридную композицию, и (b) детекцию сигнала по меньшей мере части олигосахаридов в образце питательной композиции с помощью аналитических приборов, где сигнал является показателем олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц, со степенью полимеризации 2 (DP2). В некоторых вариантах осуществления питательная композиция содержит синтетический олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления способ включает корреляцию концентрации синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления сигнал обнаруживают с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии (ГХ), масс-спектрометрии (МС), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), эксклюзионной хроматографии (SEC), проточного фракционирования в силовом поле (ПФП), проточного фракционирования под влиянием асимметричного силового поля (A4F), определения массы фракций с помощью препаративной хроматографии; или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления питательная композиция содержит основную питательную композицию. В некоторых вариантах осуществления основная

питательная композиция содержит натуральную олигосахаридную композицию. В некоторых вариантах осуществления в основной питательной композиции отсутствует определяемый уровень олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция по существу не включает олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, происходят из синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления сигнал характерен для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеющих степень полимеризации 1 (DP1). В некоторых вариантах осуществления сигнал характерен для левоглюкозана, 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления сигнал характерен для олигосахаридов, содержащим ангидро-субъединицы, со степенью полимеризации 3 (DP3). В некоторых вариантах осуществления сигнал характерен для DP1, DP2 или DP3 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления сигнал характерен для DP2 олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления сигнал характерен для ангидроцеллобиозы. В некоторых вариантах осуществления детекция включает определение массы одной или нескольких фракций олигосахаридов со степенью полимеризации (DP). В некоторых вариантах осуществления изобретения детекция включает определение массы по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеет степень полимеризации 1, 2, или 3. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько фракций DP олигосахаридов или по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, выделяют препаративной хроматографией. В некоторых вариантах осуществления сигнал детектируют, по меньшей мере частично, с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS). В некоторых вариантах осуществления сигнал детектируют, по меньшей мере частично, с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (ЖХ-МС)/МС. В некоторых вариантах осуществления сигнал детектируют, по меньшей мере частично, с помощью ГХ-детектора пламенной ионизации (ГХ-ПИД) или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления сигнал детектируют, по меньшей мере частично, с помощью ЯМР-спектроскопии. В некоторых вариантах осуществления сигнал ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4)

гликозидными связями или β-(1,6) гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления изобретения детекция включает проведение ЯМР-спектроскопии. В некоторых вариантах осуществления сигнал ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления сигнал ассоциирован с α-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления сигнал ассоциирован с α-(1,6) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления сигнал ассоциирован с β-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления сигнал ассоциирован с β-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления сигнал ассоциирован с β-(1,4) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления сигнал ассоциирован с β-(1,6) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления детекция включает определение наличия или отсутствия сигнала. В некоторых вариантах осуществления детекция включает определение наличия или отсутствия DP1 или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, или тех и других. В некоторых вариантах осуществления детекция включает определение или корреляцию уровня сигнала. В некоторых вариантах осуществления детекция включает корреляцию уровня DP1 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения детекция включает корреляцию уровня DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в питательной композиции.

В одном аспекте в настоящей заявке описан способ выполнения контроля качества питательной композиции, содержащей синтетический олигосахаридный препарат и натуральную олигосахаридную композицию, где способ включает: (a) обеспечение первого образца питательной композиции; (b) обеспечение второго образца питательной композиции; (c) детекцию первого сигнала по меньшей мере части олигосахаридов в первом образце; (d) детекцию второго сигнала по меньшей мере части олигосахаридов во втором образце; и (e) сравнение первого сигнала и второго сигнала, где первый сигнал и второй сигнал независимо являются (i) показателями олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц; или (ii) ассоциированными с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления способ включает корреляцию концентрации синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции первого образца, концентрации синтетического олигосахаридного препарата в

питательной композиции второго образца, или того и другого. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй сигнал независимо являются показателями олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй сигнал характерны для одного и того же вида олигосахарида, содержащего ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй сигнал относятся к разным видам олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления первый образец и второй образец берут из разных партий питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй получены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии (ГХ), масс-спектрометрии (МС), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), эксклюзионной хроматографии (SEC), проточного фракционирования в силовом поле (ПФП), проточного фракционирования под влиянием асимметричного силового поля (A4F), определения массы фракций с помощью препаративной хроматографии, или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления питательная композиция содержит основную питательную композицию. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция включает натуральную олигосахаридную композицию. В некоторых вариантах осуществления в основной питательной композиции отсутствует определяемый уровень олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция по существу не включает олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, происходят из синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал, или оба сигнала независимо характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, со степенью полимеризации 1 (DP1). В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо характерны для левоглюкозана, 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, со степенью полимеризации 2 (DP2). В некоторых вариантах осуществления сигнал характерен для ангидроцеллобиозы. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, со степенью полимеризации 3 (DP3). В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо характерны для DP1, DP2 или DP3 олигосахаридов, содержащих ангидро-

субъединицы, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления детекция включает определение массы одной или нескольких фракций со степенью полимеризации (DP) из первого образца или второго образца. В некоторых вариантах осуществления изобретения детекция включает определение массы по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из первого или второго образца. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеет степень полимеризации 1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько фракций DP олигосахаридов или по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, выделяют препаративной хроматографией. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал, или оба сигнала независимо детектируют, по меньшей мере частично, с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS). В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо детектируют, по меньшей мере частично, с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (ЖХ-МС)/МС. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо детектируют, по меньшей мере частично, посредством ГХ с детектором пламенной ионизации (ГХ-ПИД) или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо детектируют, по меньшей мере частично, посредством ЯМР-спектроскопии. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями или β-(1,6) гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления изобретения детекция включает проведение ЯМР-спектроскопии. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с α-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с α-(1,6) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с β-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с β-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с β-(1,4) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с

β-(1,6) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, а второй сигнал ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления детекция включает определение наличия или отсутствия первого сигнала и второго сигнала. В некоторых вариантах осуществления детекция включает определение наличия или отсутствия DP1 или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, или того и другого. В некоторых вариантах осуществления детекция включает определение или корреляцию уровня первого сигнала и второго сигнала. В некоторых вариантах осуществления детекция включает корреляцию уровня DP1 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления детекция включает корреляцию уровня DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в питательной композиции.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ включает приемку или браковку партии питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления способ включает регулирование уровня синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции после детекции. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит множество олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит крахмал или растительные волокна. В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,2) гликозидной связи, α-(1,3) гликозидной связи, β-(1,2) гликозидной связи, β-(1,3) гликозидной связи или β-(1,4) гликозидной связи в основной питательной композиции по меньшей мере на 10% ниже, чем уровень такой же гликозидной связи в синтетическом олигосахаридном препарате. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию дериватизации перед детекцией. В некоторых вариантах осуществления способ включает экстракцию олигосахаридов из образца питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления способ включает фильтрацию или осветление экстрагированных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления способ включает концентрирование экстрагированных олигосахаридов. В некоторых вариантах концентрирование включает лиофилизацию. В некоторых вариантах концентрирование включает нанофильтрацию. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение внутреннего стандарта в экстрагированные или концентрированные

олигосахариды. В некоторых вариантах осуществления способ включает восстановление экстрагированных или концентрированных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления способ включает расщепление экстрагированных или концентрированных олигосахаридов одним или несколькими гидролитическими ферментами. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов включают карбогидратазу, протеазу, липазу, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов включают α-амилазу, амилогликозидазу, инвертазу, α-галактозидазу или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов расщепляют одну или несколько встречающихся в природе гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение нерасщепленных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления способ включает разделение экстрагированных, концентрированных, расщепленных или восстановленных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют хроматографически. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение разделенных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют или выделяют по степени их полимеризации. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение или разделение олигосахаридов со степенью полимеризации 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления выделяют или разделяют олигосахариды DP1. В некоторых вариантах осуществления выделяют или разделяют олигосахариды DP2. В некоторых вариантах осуществления выделяют или разделяют олигосахариды DP3. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение из образца по меньшей мере части DP1 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение из образца по меньшей мере части DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение из образца по меньшей мере части DP3 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенные или разделенные олигосахариды подвергают количественному определению. В некоторых вариантах осуществления изобретения большая часть подвергнутых количественному определению олигосахаридов происходит из синтетического олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления более 50%, более 60%, более 70%, более 80% более 90%, более 95% или более 99% по массе количественно определенного олигосахарида происходит из синтетического олигосахаридного препарата.

В одном аспекте в настоящей заявке описан способ корреляции синтетического

олигосахаридного препарата с питательной композицией, где питательная композиция включает (i) синтетический олигосахаридный препарат, включающий олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицу; и (ii) натуральную олигосахаридную композицию; где способ включает: (a) обеспечение образца питательной композиции; (b) выделение олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц, из образца; (c) детекцию сигнала, который указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, при этом детекция включает (i) определение массы по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца или (ii) анализ по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS), жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (ЖХ-МС)/МС или газовой хроматографии (ГХ)-МС; и (d) корреляцию концентрации синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления детекция включает определение массы по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеющих степень полимеризации 1 (DP1), из образца. В некоторых вариантах осуществления детекция включает определение массы по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеющих степень полимеризации 2 (DP2), из образца. В некоторых вариантах осуществления изобретения детекция включает анализ по меньшей мере части DP1 или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления детекция включает анализ по меньшей мере части DP1 или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления детекция включает анализ по меньшей мере части DP1 или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца с помощью ГХ/МС. В некоторых вариантах осуществления изобретения детекция включает анализ по меньшей мере части DP3 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделение включает разделение олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц, с помощью препаративной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации примерно от 1 до 5000 ч./млн. примерно от 1 до 1000 ч./млн., примерно от 1 до 500 ч./млн., примерно от 10 до 5000 ч./млн., примерно от 10 до 2000 ч./млн., примерно от 10 до 1000 ч./млн., примерно от 10 до 500 ч./млн., примерно от 10 до 250 ч./млн., примерно от 10 до 100 ч./млн., примерно от 50 до 5000 ч./млн., примерно от 50 до 2000 ч./млн., примерно от 50 до 1000 ч./млн., примерно от 50 до 500 ч./млн., примерно

от 50 до 250 ч./млн. или примерно от 50 до 100 ч./млн. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации более 10 ч./млн., более 50 ч./млн., более 100 ч./млн., более 200 ч./млн., более 300 ч./млн., более 400 ч./млн., более 500 ч./млн., более 600 ч./млн., более 1000 ч./млн. или более 2000 ч./млн. В некоторых вариантах осуществления питательная композиция представляет собой кормовую композицию для животных.

В одном аспекте в настоящей заявке описан способ производства питательной композиции, включающий: (a) объединение основной питательной композиции с синтетическим олигосахаридным препаратом, включающим олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы; и (b) выполнение метода контроля качества (например, способов корреляции синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции), как предусмотрено в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции DP1 - DPn), где n является целым числом, равным 3 или более; и где каждая фракция DP1 и DP2 независимо включает примерно от 0,5% до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной масс-спектрометрией. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции DP1 - DPn), где n представляет собой целое число, равное 2 или более; и где каждая фракция DP1 и DP2 независимо включает примерно от 0,1% до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, при измерении с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенности определяют с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенности олигосахаридов в каждой из n фракций монотонно уменьшается со степенью полимеризации.

В одном аспекте в настоящей заявке обеспечен способ количественной оценки олигосахаридного препарата в питательной композиции, включающий: (a) определение уровня сигнала в образце питательной композиции, и (b) расчет концентрации олигосахаридного препарата в питательной композиции на основе уровня сигнала, где сигнал является (i) показателем олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц; (ii) ассоциированным с распределением олигосахаридов по степени полимеризации (DP), или (iii) ассоциированным с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-

(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов. В одном аспекте в настоящей заявке обеспечивается способ выполнения контроля качества питательной композиции, включающий: (a) детекцию сигнала в образце питательной композиции с помощью аналитических приборов; и (b) приемку или браковку партии питательной композиции на основании наличия или отсутствия сигнала, при этом сигнал является (i) показателем олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц; (ii) ассоциированным с распределением олигосахаридов по степени полимеризации (DP); или (iii) ассоциированным с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов. В другом аспекте в настоящей заявке предусмотрен способ выполнения контроля качества питательной композиции, включающий: (a) детекцию с помощью аналитических приборов наличия или отсутствия первого сигнала в первом образце питательной композиции и второго сигнала во втором образце питательной композиции; и (b) сравнение первого сигнала и второго сигнала, при этом первый сигнал и второй сигнал являются (i) показателями олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц; (ii) ассоциированными с распределением олигосахаридов по степени полимеризации (DP); или (iii) ассоциированными с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связи, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β-гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β-гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления сигнал, уровень сигнала, первый сигнал и/или второй сигнал определяют или обнаруживают с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии (ГХ), масс-спектрометрии (МС), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), эксклюзионной хроматографии (SEC), проточного фракционирования в силовом поле (ПФП), проточного фракционирования под влиянием асимметричного силового поля (A4F), или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления питательная композиция содержит основную питательную композицию. В некоторых вариантах осуществления сигнал, первый сигнал и/или второй сигнал указывают на наличие олигосахаридов, содержащих

одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, происходят из олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала относятся к олигосахаридам, содержащим ангидро-субъединицы, из фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала относятся к левоглюкозану, 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозе или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов, содержащих одну или нескольким ангидро-субъединиц, из фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала относятся к целлобиозану. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала относятся к олигосахаридам, содержащим ангидро-субъединицы, из фракции DP3. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй сигнал относятся к одному и тому же виду олигосахарида, содержащего ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй сигнал относятся к различным видам олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления сигнал, уровень сигнала, первый сигнал и/или второй сигнал определяют или обнаруживают с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS). В некоторых вариантах осуществления сигнал, уровень сигнала, первый сигнал и/или второй сигнал определяют или обнаруживают с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (ЖХ-МС)/МС. В некоторых вариантах осуществления сигнал, уровень сигнала, первый сигнал и/или второй сигнал определяют или обнаруживают посредством ГХ с детектором плазменной ионизации (ГХ-ПИД) или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления сигнал, уровень сигнала, первый сигнал и/или второй сигнал определяют или обнаруживают с помощью ЯМР. В некоторых вариантах осуществления стадию дериватизации выполняют перед детекцией. В некоторых вариантах осуществления сигнал, уровень сигнала, первый сигнал и/или второй сигнал определяют по массе выделенных и/или очищенных фракций из препаративной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления в основной питательной композиции отсутствует определяемый уровень ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция по существу не содержит ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-

(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления сигнал, первый сигнал и/или второй сигнал обнаруживают или определяют с помощью ЯМР. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,6) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,4) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,6) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,1)-α гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,1)-β-гликозидными связями или β-(1,1)-α-гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,1)-β гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления сигнал, первый сигнал и/или второй сигнал ассоциированы с распределением DP олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала относятся к олигосахаридам из фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приемку или браковку партии питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает регулирование уровня олигосахаридного препарата после определения или детекции. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит множество олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит крахмал и/или растительные волокна. В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,2) гликозидной связи, α-(1,3) гликозидной связи, β-(1,2) гликозидной связи, β-(1,3) гликозидной связи или β-(1,4) гликозидной связи в

основной питательной композиции по меньшей мере на 10% ниже, чем уровень такой же гликозидной связи в олигосахаридном препарате. В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,1)-α гликозидных связей, α-(1,1)-β-гликозидных связей, β-(1,1)-α гликозидных связей или β-(1,1)-β гликозидных связей олигосахаридов в основной питательной композиции по меньшей мере на 10% ниже, чем уровень такой же гликозидной связи в олигосахаридном препарате. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает экстракцию олигосахаридов из образца питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает фильтрацию или осветление экстрагированных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает концентрирование экстрагированных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления концентрирование экстрагированных олигосахаридов включает лиофилизацию. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение внутреннего стандарта в экстрагированные или концентрированные олигосахариды. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает восстановление экстрагированных или концентрированных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает расщепление экстрагированных или концентрированных олигосахаридов с одним или несколькими гидролитическими ферментами. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов включают карбогидратазу, протеазу, липазу или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов включают α-амилазу, амилогликозидазу, инвертазу, α-галактозидазу или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов расщепляют одну или несколько встречающихся в природе гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение нерасщепленных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает разделение экстрагированных, концентрированных, расщепленных или восстановленных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют хроматографически. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение разделенных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют или выделяют по степени полимеризации. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение или разделение олигосахаридов со степенью полимеризации 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделяют или разделяют олигосахариды во фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления выделяют или разделяют олигосахариды во фракции DP2. В

некоторых вариантах осуществления выделяют или разделяют олигосахариды во фракции DP3. В некоторых вариантах осуществления выделяют или разделяют олигосахариды во фракции DP4. В некоторых вариантах осуществления выделяют или разделяют олигосахариды во фракции DP5. В некоторых вариантах осуществления выделенные или разделенные олигосахариды определяют количественно. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, в выделенных или разделенных олигосахаридах оценивают количественно. В некоторых вариантах осуществления большинство определенных количественно олигосахаридов получают из олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления более 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 99 масс.% количественно определенного олигосахарида получают из олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ гликозидных связей олигосахаридов с помощью ЯМР, где гликозидные связи представляют собой α-(1,2) гликозидные связи, α-(1,3) гликозидные связи, α-(1,6) гликозидные связи, β-(1,2) гликозидные связи, β-(1,3) гликозидные связи, β-(1,4) гликозидные связи, β-(1,6) гликозидные связи, α-(1,1)-α гликозидные связи, α-(1,1)-β гликозидные связи, β-(1,1)-α гликозидные связи или β-(1,1)-β гликозидные связи, тем самым обеспечивая определение или детекцию сигнала, уровня сигнала, первого сигнала или второго сигнала, связанного с соответствующими гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, с помощью масс-спектрометрии, тем самым обеспечивая определение или детекцию сигнала, уровня сигнала, первого сигнала или второго сигнала, характерного для олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, с помощью ВЭЖХ, тем самым обеспечивая определение или детекцию сигнала, уровня сигнала, первого сигнала или второго сигнала, характерного для олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, с помощью ПФП или A4F, тем самым обеспечивая определение или детекцию сигнала, уровня сигнала, первого сигнала или второго сигнала, характерного для олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ распределения DP олигосахаридов с помощью SEC, ГХ или ВЭЖХ, тем самым обеспечивая определение или детекцию сигнала, уровня сигнала, первого сигнала или второго сигнала, связанного с распределением DP. В некоторых вариантах осуществления способ включает количественное определение олигосахаридов во фракции DP2 с

помощью SEC, ГХ или ВЭЖХ, тем самым обеспечивая определение или детекцию сигнала, уровня сигнала, первого сигнала или второго сигнала, связанного с распределением DP. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит от 1 до 5000 ч./млн., от 1 до 1000 ч./млн., от 1 до 500 ч./млн., от 10 до 5000 ч./млн., от 10 до 2000 ч./млн., от 10 до 1000 ч./млн., от 10 до 500 ч./млн., от 10 до 250 ч./млн., от 10 до 100 ч./млн., от 50 до 5000 ч./млн., от 50 до 2000 ч./млн., от 50 до 1000 ч./млн., от 50 до 500 ч./млн., от 50 до 250 ч./млн. или от 50 до 100 ч./млн. по отношению к питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит более 10 ч./млн., 50 ч./млн., 100 ч./млн., 200 ч./млн., 300 ч./млн., 400 ч./млн., 500 ч./млн., 600 ч./млн., 1000 ч./млн. или 2000 ч./млн. по отношению к питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления питательная композиция представляет собой кормовую композицию для животных.

В одном аспекте в настоящей заявке обеспечен способ производства питательной композиции, включающий: (a) объединение синтетического олигосахаридного препарата, включающего олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, с основной питательной композицией, и (b) выполнение стадии контроля качества, как предусмотрено в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции DP1-DPn), где n является целым числом, равным 2 или более; где каждая фракция включает от 0,1% до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, с относительной распространенностью, измеренной масс-спектрометрией. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции DP1 - DPn), где n является целым числом, равным 3 или более; где каждая фракция включает от 0,5% до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, с относительной распространенностью, измеренной с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов в каждой из n фракций монотонно уменьшается со степенью полимеризации.

Дополнительные аспекты и преимущества настоящего изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники из следующего подробного описания, в котором показаны и описаны только иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения. Как будет понятно, настоящее раскрытие допускает другие и различные варианты осуществления, и некоторые его детали

допускают модификации в различных очевидных отношениях, все без отклонения от раскрытия. Соответственно, чертежи и описание следует рассматривать как иллюстративные по своей природе, а не как ограничительные.

Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены сюда посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки. В той степени, в которой публикации и патенты или заявки на патенты, включенные посредством ссылки, противоречат раскрытию, содержащемуся в описании, данное описание предназначено для замены и/или имеет преимущество над любым таким противоречащим материалом.

Краткое описание чертежей

Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено со ссылкой на следующее подробное описание, в котором представлены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы изобретения, и прилагаемые чертежи (также «фигуры» и «фиг.» в данном документе), где:

фиг. 1 иллюстрирует ^{1}H-, ^{13}C-HSQC ЯМР спектр олигосахаридного препарата из примера 9.7;

фиг. 2 иллюстрирует спектр MALDI-MS олигосахаридного препарата из примера 9, который демонстрирует присутствие ангидро-субъединиц;

фиг. 3 иллюстрирует спектр 1D ^{1}H-протонного ЯМР ангидро DP1-фракции, выделенной из олигосахарида из примера 9;

фиг. 4 иллюстрирует спектр 1D APT ^{13}C-ЯМР ангидро DP1-фракции, выделенной из олигосахарида из примера 9;

фиг. 5 иллюстрирует структуры двух ангидро-DP1-соединений (1,6-ангидро-бета-D-глюкофуранозы и 1,6-ангидро-бета-D-глюкопиранозы) и их ЯМР распределение;

фиг. 6 иллюстрирует увеличение хроматограммы ГХ-МС (графики TIC и XIC (m/z 229)) для олигосахаридного препарата из примера 9.7 после дериватизации;

фиг. 7 иллюстрирует спектры MALDI-MS, сравнивающие олигосахаридный препарат из примера 9 с обычным декстраном;

фиг. 8 иллюстрирует ЖХ-МС/МС детекцию форм ангидро DP2 при концентрации 1-80 мкг/мл олигосахаридного препарата в воде;

фиг. 9 иллюстрирует линейную калибровочную кривую, полученную в результате детекции ЖХ-МС/МС с фиг. 8;

фиг. 10 иллюстрирует количественное определение содержания ангидро-DP2 в различных контрольных и обработанных питательных композициях;

фиг. 11 иллюстрирует спектр 2D-1H JRES ЯМР образца глюкоолигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы;

фиг. 12 представляет собой типичный спектр ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР образца глюкоолигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, с соответствующими резонансами и назначениями, используемыми для распределения связей;

фиг. 13 иллюстрирует наложение спектров 1H DOSY трех олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы;

фиг. 14 иллюстрирует сравнение 1,6-ангидро-ß-D-глюкозы (DP1-18), 1,6-ангидро-ß-D-целлобиозы (DP2-18) и образца олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы;

фиг. 15 иллюстрирует масс-хроматограммы олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, (вверху), и расщепленных олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы (внизу), при выбранном мониторинге множественных реакций (MRM);

фиг. 16 иллюстрирует масс-хроматограммы (1) корма, включающего олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы; (2) расщепленного корма, включающего олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы; и (3) холостой пробы расщепленного корма при выбранном MRM;

фиг. 17 иллюстрирует типичную поточную диаграмму для анализа препаратов олигосахаридов в кормах для животных;

фиг. 18 иллюстрирует два олигосахарида, содержащих ангидро-субъединицу, из фракции DP1, и один из фракции DP2;

фиг. 19 иллюстрирует олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы (целлотриозан);

фиг. 20A иллюстрирует спектр MALDI-MS олигосахаридного препарата из примера 2, который демонстрирует присутствие ангидро-субъединиц; фиг. 20B иллюстрирует увеличение части спектра MALDI-MS, показанного на фиг. 20A;

фиг. 21A иллюстрирует детекцию с помощью ЖХ-МС/МС форм ангидро-DP2 олигосахаридного препарата из примера 1; фиг. 21B иллюстрирует детекцию с помощью ЖХ-МС/МС форм ангидро-DP1 олигосахаридного препарата из примера 1; фиг. 21C иллюстрирует детекцию с помощью ЖХ-МС/МС видов DP2 из олигосахаридного препарата из примера 1;

фиг. 22A иллюстрирует детекцию с помощью ЖХ-МС/МС форм ангидро-DP2 из олигосахаридного препарата из примера 3; фиг. 22B иллюстрирует детекцию с помощью ЖХ-МС/МС форм ангидро-DP1 из олигосахаридного препарата из примера 3; фиг. 22C

иллюстрирует детекцию с помощью ЖХ-МС/МС форм DP2 из олигосахаридного препарата из примера 3;

фиг. 23А иллюстрирует детекцию с помощью ЖХ-МС/МС форм ангидро-DP2 из олигосахаридного препарата из примера 4; фиг. 23В иллюстрирует детекцию с помощью ЖХ-МС/МС форм ангидро-DP1 из олигосахаридного препарата из примера 4; фиг. 23С иллюстрирует детекцию с помощью ЖХ-МС/МС форм DP2 из олигосахаридного препарата из примера 4;

фиг. 24А иллюстрирует детекцию с помощью ЖХ-МС/МС форм ангидро-DP2 из олигосахаридного препарата из примера 7; фиг. 24В иллюстрирует ЖХ-МС/МС детекцию форм ангидро-DP1 из олигосахаридного препарата из примера 7; фиг. 24С иллюстрирует ЖХ-МС/МС детекцию форм DP2 из олигосахаридного препарата из примера 7;

фиг. 25А иллюстрирует детекцию с помощью ГХ-МС спектра фракций DP1, ангидро-DP1, DP2 и ангидро-DP2 из олигосахаридного препарата из примера 1; фиг. 25В иллюстрирует увеличенные фракции DP2 и ангидро-DP2, показанные на фиг. 25А;

фиг. 26А иллюстрирует определение спектра ГХ-МС фракций DP1, ангидро-DP1, DP2 и ангидро-DP2 олигосахаридного препарата из примера 3; фиг. 26В иллюстрирует увеличенные фракции DP2 и ангидро-DP2, показанные на фиг. 26А;

фиг. 27А иллюстрирует определение спектра ГХ-МС фракций DP1, ангидро-DP1, DP2 и ангидро-DP2 из олигосахаридного препарата из примера 4; фиг. 27В иллюстрирует увеличенные фракции DP2 и ангидро-DP2, показанные на фиг. 27А;

фиг. 28А иллюстрирует определение спектра ГХ-МС фракций DP1, ангидро-DP1, DP2 и ангидро-DP2 из олигосахаридного препарата из примера 7; фиг. 28В иллюстрирует увеличенные фракции DP2 и ангидро-DP2, показанные на фиг. 28А;

фиг. 29 иллюстрирует влияние температуры реакции, содержания воды и времени реакции на содержание DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в олигосахаридных препаратах по сравнению с олигосахаридным препаратом согласно примеру 2;

фиг. 30 иллюстрирует спектры MALDI-MS, сравнивающие олигосахаридный препарат из примера 9 при различных энергиях лазера.

Подробное описание изобретения

Следующее ниже описание и примеры подробно иллюстрируют варианты осуществления настоящего изобретения. Следует понимать, что это настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящей заявке, и как таковое может варьировать. Специалисты в данной области техники поймут, что существуют многочисленные вариации и модификации этого

настоящего изобретения, которые входят в его объем.

Все термины предназначены для понимания так, как они будут поняты специалисту в данной области техники. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится изобретение.

Заголовки разделов, используемые в настоящей заявке, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описанный предмет.

Хотя различные признаки настоящего изобретения могут быть описаны в контексте единственного варианта осуществления, эти признаки также могут быть предоставлены отдельно или в любой подходящей комбинации. И наоборот, хотя настоящее изобретение может быть описано здесь в контексте отдельных вариантов осуществления для ясности, настоящее изобретение также может быть реализовано в одном варианте осуществления.

Следующие ниже определения дополняют определения в данной области техники и относятся к текущей заявке и не должны относиться к какому-либо связанному или не связанному случаю, например, к какому-либо общему патенту или заявке. Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, могут быть использованы на практике для тестирования настоящего изобретения, здесь описаны предпочтительные материалы и методы. Соответственно, используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

I. Определения

Используемый в настоящей заявке термин «применение» включает обеспечение синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, жидкости или кормовой композиции для животных, описанных в данном документе, для животного таким образом, чтобы животное могло проглотить синтетический олигосахаридный препарат, питательную композицию, жидкость или кормовую композицию для животных. В таких вариантах осуществления животное поглощает некоторую часть синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции или кормовой композиции для животных. В некоторых вариантах осуществления животное поглощает некоторую часть синтетического олигосахаридного препарата, питательной композиции, жидкости или кормовой композиции для животных каждые 24 часа или каждый другой 24-часовой период в течение по меньшей мере 7 дней, 14 дней, 21 дней, 30 дней, 45 дней, 60 дней, 75 дней, 90 дней или 120 дней. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат может быть растворен в воде или другой жидкости, и животное поглощает

некоторую часть олигосахаридного препарата, выпивая жидкость. В некоторых вариантах осуществления олигосахарид доставляют животному через питьевую воду. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, питательная композиция, жидкость или кормовая композиция для животных потребляются по желанию.

Используемый в настоящей заявке термин «уровень включения» или «доза» относится к концентрации олигосахаридного препарата в питательной композиции, жидкости, рационе или кормовой композиции для животных, предоставляемой животному. В некоторых вариантах осуществления уровень включения измеряется как массовая концентрация олигосахаридного препарата в конечной питательной композиции, жидкости, рационе или корме для животных. Например, уровень включения может быть измерен в частях на миллион (ч./млн.) олигосахарида в пересчете на массу сухих твердых веществ на основе общей массы конечной питательной композиции, жидкости, рациона или корма для животных. В некоторых вариантах осуществления массу сухих твердых веществ олигосахаридного препарата измеряют как массу в пересчете на сухое вещество видов DP1+. В других вариантах осуществления массу сухих твердых веществ олигосахаридного препарата измеряют как массу в пересчете на сухое вещество видов DP2 +.

Используемый в настоящей заявке термин «удельная доза» относится к количеству олигосахаридного препарата, потребляемому животным за единицу времени, по отношению к его массе тела. В некоторых вариантах осуществления конкретная доза может быть измерена в единицах мг олигосахаридного препарата (в пересчете на сухие вещества) на кг массы тела животного в сутки (т.е. мг/кг/сутки).

Используемый в настоящей заявке термин «ангидро-субъединица» относится к продукту термической дегидратации моносахарида (или моносахаридной субъединицы) или продукту карамелизации сахара. Например, «ангидро-субъединица» может представлять собой ангидромоносахарид, такой как ангидроглюкоза. В качестве другого примера «ангидро-субъединица» может быть связана с одной или несколькими регулярными или ангидромоносахаридными субъединицами через гликозидную связь.

Используемый в настоящей заявке термин «ангидро-DPn-олигосахарид», «ангидро-DPn-вид» или «DPn-олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицу» относится к олигосахариду, который имеет степень полимеризации n и включает одну или несколько ангидро-субъединиц. По существу, ангидроглюкоза представляет собой DP1 олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы, а целлотриозан представляет собой DP3 олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы.

Используемый в настоящей заявке термин «коэффициент конверсии корма (FCR)»

относится к отношению массы введенного корма (например, потребляемого животным) к выпуску у животного, при этом выпуск у животного представляет собой целевой продукт животного происхождения. Например, продуктом животноводства для молочных животных является молоко, тогда как продуктом животноводства для животных, выращиваемых на мясо, является масса тела.

Термин «олигосахарид» относится к моносахариду или соединению, содержащему две или более моносахаридных субъединиц, связанных гликозидными связями. По существу, олигосахарид включает обычный моносахарид, ангидромоносахарид или соединение, содержащее две или более моносахаридных субъединиц, где одна или более моносахаридных субъединиц при необходимости независимо заменены одной или несколькими ангидро-субъединицами. Олигосахарид может быть функционализирован. Используемый в настоящей заявке термин «олигосахарид» охватывает все виды олигосахаридов, где каждая моносахаридная субъединица в олигосахариде независимо и необязательно функционализирована и/или заменена соответствующей ангидромоносахаридной субъединицей.

Используемый в настоящей заявке термин «олигосахаридный препарат» относится к препарату, который содержит по меньшей мере один олигосахарид.

Используемый в настоящей заявке термин «глюкоолигосахарид» относится к глюкозе или соединению, содержащему две или более субъединиц моносахарида глюкозы, связанных гликозидными связями. По существу, глюкоолигосахарид включает глюкозу, ангидроглюкозу или соединение, содержащее две или более субъединиц моносахарида глюкозы, связанных гликозидными связями, причем каждая из указанных субъединиц моносахарида глюкозы при необходимости и независимо заменена субъединицей ангидроглюкозы.

Используемый в настоящей заявке термин «галактоолигосахарид» относится к галактозе или соединению, содержащему две или более субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями. По существу, галактоолигосахарид включает галактозу, ангидрогалактозу или соединение, содержащее две или более субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями, где каждая из указанных субъединиц моносахарида галактозы при необходимости и независимо заменена субъединицей ангидрогалактозы.

Используемый в настоящей заявке термин «глюкогалактоолигосахаридный препарат» относится к композиции, которую получают в результате реакции полной или неполной конденсации сахаров глюкозы и галактозы. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления глюкогалактозоолигосахаридный препарат включает

глюкоолигосахариды, галактоолигосахариды, соединения, содержащие одну или несколько субъединиц моносахарида глюкозы и одну или несколько субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления глюкогалактозоолигосахаридный препарат включает глюкоолигосахариды и соединения, содержащие одну или несколько субъединиц моносахарида глюкозы и одну или несколько субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления глюкогалактозоолигосахаридный препарат включает галактоолигосахариды и соединения, содержащие одну или несколько субъединиц моносахарида глюкозы и одну или несколько субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления глюкогалактозоолигосахаридный препарат включает соединения, содержащие одну или несколько субъединиц моносахарида глюкозы и одну или несколько субъединиц моносахарида галактозы, связанных гликозидными связями.

Используемые в настоящей заявке термины «моносахаридная единица» и «моносахаридная субъединица» используются взаимозаменяемо. «Моносахаридная субъединица» относится к мономеру моносахарида в олигосахариде. Для олигосахарида, имеющего степень полимеризации 1, олигосахарид может называться моносахаридной субъединицей или моносахаридом. Для олигосахарида, имеющего степень полимеризации 2 или выше, его моносахаридные субъединицы связаны гликозидными связями.

Используемый в настоящей заявке термин «регулярный моносахарид» относится к моносахариду, который не содержит ангидро-субъединицу. Термин «регулярный дисахарид» относится к дисахариду, который не содержит ангидро-субъединицу. Соответственно, термин «регулярная субъединица» относится к субъединице, которая не является ангидро-субъединицей.

Термин «относительная распространенность» или «распространенность» в контексте настоящего описания относится к распространенности вида с точки зрения того, насколько часто или редко встречается этот вид. Например, фракция DP1, включающая 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, может относиться к множеству олигосахаридов DP1, где 10% олигосахаридов DP1 представляют собой ангидромоносахариды. Относительную распространенность, например, для определенной фракции DP олигосахаридов, можно определить с помощью подходящих аналитических инструментов, например, масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии, такой как ЖХ-МС/МС, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность определяют путем интегрирования площади под пиками на хроматографах (например,

ЖХ-МС/МС, ГХ-МС и ВЭЖХ-МС), которые соответствуют интересующим фракциям. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность определяют по интенсивности пиков (например, MALDI-MS). В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность определяют комбинацией аналитических методов, таких как определение массы после разделения с помощью жидкостной хроматографии.

Используемые в настоящей заявке формы единственного числа включают множественное число, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на термин «агент» включает множество таких агентов, а ссылка на «олигосахарид» включает ссылку на один или несколько олигосахаридов (или на множество олигосахаридов) и их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники, и так далее.

Когда в настоящей заявке используются диапазоны физических свойств, таких как молекулярная масса, или химические свойства, такие как химические формулы, предполагается, что все комбинации и субкомбинации диапазонов и конкретные варианты осуществления в них включены. Термин «примерно» при ссылке на число или числовой диапазон означает, что указанное число или числовой диапазон является приблизительным в пределах экспериментальной вариабельности (или в пределах статистической экспериментальной ошибки), и, таким образом, число или числовой диапазон в некоторых случаях будет варьировать от 1% до 15% от указанного числа или числового диапазона. В некоторых вариантах осуществления термин «примерно» означает в пределах 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, или 0,05% от заданного значения или диапазона.

Термин «содержащий» (и связанные с ним термины, такие как «содержать» или «содержит», или «имеющий» или «включающий») предназначен для включения, но не обязательно ограничивается описанным.

II. Применение способов

Олигосахаридные препараты используются в качестве добавок в питательных композициях, таких как полный корм для животных. Добавление таких олигосахаридных препаратов улучшает здоровье и продуктивность (вес, скорость роста, эффективность конверсии корма) таких животных, как домашняя птица (бройлеры, несушки, племенные бройлеры, индейки) и свиньи (поросята-отъемыши, поросята для выращивания/откорма, свиноматки и т.д., и другие виды).

Влияние олигосахаридного препарата на здоровье и продуктивность животных зависит от химических и физико-химических свойств олигосахаридов. В частности, химический состав олигосахаридного препарата может влиять на способ его

использования микрофлорой животного, в частности микробиомом кишечника. Микрофлора животного и, в частности, микробиом кишечника, в свою очередь, влияет на здоровье и продуктивность животного в целом. Такие эффекты включают, например, физиологическое и морфологическое воздействие на пищеварительный тракт, активацию иммунной системы, стимуляцию выработки слизи, улучшение барьерной функции кишечника, улучшение высвобождения и абсорбции питательных веществ, модуляцию численности различных членов микрофлоры кишечника (например, подавление патогенных видов, увеличение числа полезных комменсальных видов) и модуляцию биохимических видов, продуцируемых микрофлорой кишечника. Соответственно, олигосахаридные препараты можно добавлять в питательные композиции, такие как корм для животных, для действия в качестве пребиотиков.

В настоящей заявке обеспечен способ получения олигосахаридных препаратов, подходящих для использования в качестве добавки в питательные композиции. Олигосахаридные препараты также могут быть получены другими способами, включая ферментативный гидролиз или кислотный гидролиз растительных волокон, экстракцию гликанов и гликопептидов бактериальных и дрожжевых клеточных стенок, ферментативную конденсацию из сахаридов и ферментацию микроорганизмами дикого типа или рекомбинантными микроорганизмами.

Из-за соответствующей структурной сложности как питательных композиций, так и олигосахаридных препаратов отсутствует простой, селективный и чувствительный метод анализа присутствия и концентрации олигосахаридных препаратов в кормовом материале. Питательные композиции содержат большое количество и разнообразие углеводных структур (например, крахмал, растительные волокна и пектины). Поэтому особенно сложно отличить небольшие количества кормовых добавок на основе олигосахаридов от огромного количества других углеводов, присутствующих в качестве основы питательной композиции. Таким образом, необходим аналитический метод с необходимой чувствительностью и селективностью, чтобы отличить такие олигосахаридные кормовые добавки от природных олигомеров.

Он имеет коммерческую ценность для анализа присутствия и/или концентрации кормовых добавок. Такой анализ может быть выполнен с целью контроля качества, чтобы определить, была ли добавка смешана надлежащим образом с основной питательной композицией для получения конечной питательной композиции, содержащей добавку в намеченной дозе или уровне включения. В некоторых вариантах осуществления процесс производства может включать стадию приемки или браковки количества (например, серии или партии) конечной кормовой композиции на основании определения того, что добавка

была включена в пределах диапазона заранее определенного значения.

Такие олигосахаридные препараты содержат множество гликозидных связей между различными мономерами в олигосахаридном препарате. В некоторых вариантах осуществления относительное количество гликозидных связей, например, α-(1,4) связей, легко гидролизуемых пищеварительными кислотами и ферментами верхнего пищеварительного тракта животного, является низким. Таким образом, олигосахариды сохраняются при первичном переваривании животным и проходят через пищеварительный тракт в нижний пищеварительный тракт, где они взаимодействуют с микробиомом кишечника. В некоторых вариантах осуществления относительное количество гликозидных связей, обычно встречающихся в растительных волокнах и пектинах, также невелико. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты содержат связи, которые встречаются только при низкой относительной распространенности основных углеводов (т.е. фоновых углеводов) в питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты включают олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты содержат химически синтезированные олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы.

Несмотря на необходимость детекции и/или количественной оценки относительного содержания олигосахаридных препаратов в питательных композициях, существующие аналитические методы количественного определения различных гликозидных связей в сложных углеводах могут не иметь чувствительности. Некоторые существующие аналитические методы имеют минимальный порог разрешения гликозидных связей на уровне нескольких процентов. Однако коммерчески значимые уровни включения кормовых добавок обычно находятся в диапазоне от 1 до 5000 ч./млн., от 10 до 1000 ч./млн., от 10 до 500 ч./млн. или от 50 до 500 ч./млн. Таким образом, гликозидные связи в кормовых добавках невозможно обнаружить с помощью некоторых существующих методов.

Неожиданно мы обнаружили, что олигосахаридные препараты можно анализировать и количественно определять в сложной питательной композиции, такой как полный корм для животных, как предусмотрено в настоящей заявке.

III. Олигосахаридные препараты.

Олигосахариды по способу производства

В настоящей заявке предложены олигосахаридные препараты, подходящие для использования в питательных композициях. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты, как предусмотрено в настоящей заявке, могут содержать

моносахариды, олигосахариды, полисахариды или любую их комбинацию, где одна или несколько субъединиц моносахаридов в любом из моносахаридов, олигосахаридов или полисахаридов могут быть независимо функционализированы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты содержат олигосахариды, полученные гидролизом или пиролизом полисахаридов, таких как целлюлоза и крахмал, конденсацией или полимеризацией моносахаридов или олигосахаридов, ферментативным гидролизом или кислотным гидролизом полисахаридов, таких как растительные волокна, экстракцией гликанов и гликопептидов клеточной стенки бактерий и дрожжей, ферментативной конденсацией из сахаридов, ферментацией микроорганизмами дикого типа или рекомбинантными микроорганизмами, или любой их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты могут содержать любые олигосахариды, известные в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты получают химическим, естественным или ферментативным путем.

В одном аспекте описанный олигосахаридный препарат, подходящий для описанных в настоящей заявке способов, представляет собой синтетический олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат относится к множеству олигосахаридов, полученных способом, не требующим живых организмов. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат относится к множеству олигосахаридов, полученных с помощью способа, который не требует ферментов. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат относится к множеству олигосахаридов, полученных химическим способом. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат относится к множеству олигосахаридов, полученных конденсацией сахаров.

Распределение по степени полимеризации (DP)

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке препарат олигосахаридов содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции DP1-DPn). В некоторых вариантах осуществления препарат олигосахаридов содержит n фракций олигосахаридов, где каждая фракция имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции DP1 - DPn). В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 содержит один или несколько моносахаридов и/или один или несколько ангидромоносахаридов. В качестве другого примера, в некоторых вариантах осуществления фракция DP1 включает глюкозу, галактозу, фруктозу, 1,6-ангидро-β-D-

глюкофуранозу, 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозу или любую их комбинацию. Например, в некоторых вариантах осуществления фракция DP2 содержит один или несколько регулярных дисахаридов и один или несколько дисахаридов, содержащих ангидро-субъединицу. В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 содержит лактозу.

В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 42, по меньшей мере 43, по меньшей мере 44, по меньшей мере 45, по меньшей мере 46, по меньшей мере 47, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49, по меньшей мере 50, по меньшей мере 51, по меньшей мере 52, по меньшей мере 53, по меньшей мере 54, по меньшей мере 55, по меньшей мере 56, по меньшей мере 57, по меньшей мере 58, по меньшей мере 59, по меньшей мере 60, по меньшей мере 61, по меньшей мере 62, по меньшей мере 63, по меньшей мере 64, по меньшей мере 65, по меньшей мере 66, по меньшей мере 67, по меньшей мере 68, по меньшей мере 69, по меньшей мере 70, по меньшей мере 71, по меньшей мере 72, по меньшей мере 73, по меньшей мере 74, по меньшей мере 75, по меньшей мере 76, по меньшей мере 77, по меньшей мере 78, по меньшей мере 79, по меньшей мере 80, по меньшей мере 81, по меньшей мере 82, по меньшей мере 83, по меньшей мере 84, по меньшей мере 85, по меньшей мере 86, по меньшей мере 87, по меньшей мере 88, по меньшей мере 89, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99, или по меньшей мере 100. В некоторых вариантах осуществления n равно 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100. В некоторых вариантах осуществления n составляет менее 10, менее 11, менее 12, менее 13, менее 14, менее 15, менее 16, менее 17, менее 18, менее 19, менее

20, менее 21, менее 22, менее 23, менее 24, менее 25, менее 26, менее 27, менее 28, менее 29, менее 30, менее 31, менее 32, менее 33, менее 34, менее 35, менее 36, л менее 37, менее 38, менее 39, менее 40, менее 41, менее 42, менее 43, менее 44, менее 45, менее 46, менее 47, менее 48, менее 49, менее 50, менее 51, менее 52, менее 53, менее 54, менее 55, менее 56, менее 57, менее 58, менее 59, менее 60, менее 61, менее 62, менее 63, менее 64, менее 65, менее 66, менее 67, менее 68, менее 69, менее 70, менее 71, менее 72, менее 73, менее 74, менее 75, менее 76, менее 77, менее 78, менее 79, менее 80, менее 81, менее 82, менее 83, менее 84, менее 85, менее 86, менее 87, менее 88, менее 89, менее 90, менее 91, менее 92, менее 93, менее 94, менее 95, менее 96, менее 97, менее 98, менее 99 или менее 100. В некоторых вариантах осуществления n составляет от 2 до 100, от 5 до 90, от 10 до 90, от 10 до 80, от 10 до 70, от 10 до 60, от 10 до 50, от 10 до 40, от 10 до 30, от 15 до 60, от 15 до 50, от 15 до 45, от 15 до 40, от 15 до 35 или от 15 до 30.

Распределение степени полимеризации олигосахаридного препарата может быть определено любым подходящим аналитическим методом и оборудованием, включая метод концевых групп, осмотическое давление (осмометрию), ультрацентрифугирование, измерение вязкости, метод светорассеяния, эксклюзионную хроматографию (SEC), SEC-MALLS, проточное фракционирование в силовом поле (ПФП), проточное фракционирование под влиянием асимметричного силового поля (A4F), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и масс-спектрометрию (МС), но не ограничиваясь ими. Например, распределение степени полимеризации может быть определено и/или обнаружено с помощью масс-спектрометрии, такой как масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI)-MS, жидкостной хроматографии (ЖХ)-МС или газовой хроматографии (ГХ)-МС. В другом примере распределение степени полимеризации может быть определено и/или обнаружено с помощью SEC, такой как гельпроникающая хроматография (GPC). В качестве еще одного примера распределение степени полимеризации можно определить и/или обнаружить с помощью ВЭЖХ, ПФП или A4F. В некоторых вариантах осуществления распределение степени полимеризации определяют и/или выявляют с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления распределение степени полимеризации определяют и/или обнаруживают с помощью ГХ-МС или ЖХ-МС. В некоторых вариантах осуществления распределение степени полимеризации определяют и/или обнаруживают с помощью SEC. В некоторых вариантах осуществления распределение степени полимеризации определяют и/или обнаруживают с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления распределение степени полимеризации определяют и/или обнаруживают с помощью комбинации аналитических инструментов,

таких как MALDI-MS и SEC. В некоторых вариантах осуществления степень полимеризации олигосахаридного препарата может быть определена на основании его молекулярной массы и молекулярно-массового распределения. Например, фиг. 2 показывает спектр MALDI-MS, который иллюстрирует степени полимеризации различных фракций и присутствие олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы (смещение пиков -18 г/моль MW) во всех наблюдаемых фракциях.

В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов в большинстве фракций монотонно уменьшается со степенью полимеризации. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов менее 6, менее 5, менее 4, менее 3 или менее 2 фракций олигосахаридного препарата не уменьшается монотонно с увеличением степени его полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов в по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45 или по меньшей мере 50 фракциях DP монотонно уменьшается со степенью полимеризации. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенности олигосахаридов в по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45 или по меньшей мере 50 последовательных фракциях DP монотонно уменьшается со степенью полимеризации. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенности олигосахаридов в по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30 фракциях DP монотонно уменьшается со степенью полимеризации. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенности олигосахаридов в по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30 последовательных фракциях DP монотонно уменьшается со степенью полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов в каждой из n фракций монотонно уменьшается со степенью полимеризации. Например, фиг. 10 представляет собой пример распределения DP, где относительная распространенность олигосахаридов в каждой из n фракций монотонно уменьшается с увеличением DP. Например, в некоторых вариантах осуществления только относительная распространенность олигосахаридов во фракции DP3 не уменьшается монотонно со степенью полимеризации, т.е. относительная распространенность олигосахаридов во фракции DP3 ниже, чем относительная распространенность

олигосахаридов во фракции DP4. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов во фракции DP2 ниже, чем относительная распространенность олигосахаридов во фракции DP3.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP1 примерно от 1% до 50%, примерно от 1% до 40%, примерно от 1% до 35%, примерно от 1% до 30%, примерно от 1% до 25%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 5% до 50%, примерно от 5% до 40%, примерно от 5% до 35%, примерно от 5% до 30%, примерно от 5% до 25%, примерно от 5% до 20%, примерно от 5% до 15%, примерно от 10% до 50%, примерно от 10% до 40%, примерно от 10% до 35%, примерно от 10% до 30%, примерно от 10% до 25%, примерно от 10% до 20% или примерно от 10% до 15% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP1 примерно от 10% до 35%, примерно от 10% до 20% или примерно от 10% до 15% по массе или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP1 определяют масс-спектрометрией. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP1 определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP1 определяют с помощью ЖХ-МС/МС или ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP2 примерно от 1% до 35%, примерно от 1% до 30%, примерно от 1% до 25%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 5% до 30%, примерно от 5% до 25%, примерно от 5% до 20%, примерно от 5% до 15%, или примерно от 5% до 10% по массе или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP2 примерно от 5% до 25%, примерно от 5% до 20%, примерно от 5% до 15%, или примерно от 5% до 10% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP2 определяют масс-спектрометрией. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP2 определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP2 определяют с помощью ЖХ-МС/МС или ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления описанный здесь олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP3 примерно от 1% до 30%, примерно от 1% до 25%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 5% до 30%, примерно от 5% до 25%, примерно от 5% до 20%, примерно от 5% до 15%,

или примерно от 5% до 10% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP3 примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 5% до 15% или примерно от 5% до 10% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах содержание фракции DP3 определяют с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP3 определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP3 определяют с помощью ЖХ-МС/МС или ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP4 примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,1% до 15%, примерно от 0,1% до 10%, примерно от 0,1% до 5%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10% или примерно от 1% до 5% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP4 примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, или примерно от 1% до 5% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP5 примерно от 0,1% до 15%, примерно от 0,1% до 10%, примерно от 0,1% до 5%, примерно от 1% до 15%., примерно от 1% до 10% или примерно от 1% до 5% по массе или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет содержание фракции DP5 примерно от 1% до 10% или примерно от 1% до 5% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP4 и/или DP5 определяют с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP4 и/или DP5 определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции DP4 и/или DP5 определяют с помощью ЖХ-МС/МС или ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления отношение фракции DP2 к фракции DP1 в олигосахаридном препарате составляет примерно от 0,01 до 0,8, примерно от 0,02 до 0,7, примерно от 0,02 до 0,6, примерно от 0,02 до 0,5, примерно от 0,02 до 0,4, примерно от 0,02 до 0,3, примерно от 0,02 до 0,2, примерно от 0,1 до 0,6, примерно от 0,1 до 0,5, примерно от 0,1 до 0,4 или примерно от 0,1 до 0,3 по их массе или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления отношение фракции DP2 к фракции DP1 в олигосахаридном препарате составляет примерно от 0,02 до 0,4 по их массе или относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления отношение фракции DP3 к фракции DP2 в

олигосахаридном препарате составляет примерно от 0,01 до 0,7, примерно от 0,01 до 0,6, примерно от 0,01 до 0,5, примерно от 0,01 до 0,4, примерно от 0,01 до 0,3 или примерно от 0,01 до 0,2 по массе или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления отношение фракции DP3 к фракции DP2 в олигосахаридном препарате составляет примерно от 0,01 до 0,3 по массе или относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления совокупное содержание фракций DP1 и DP2 в препарате олигосахаридов составляет менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, или менее 10% по массе или по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления совокупное содержание фракций DP1 и DP2 в препарате олигосахаридов составляет менее 50%, менее 30% или менее 10% по массе или по относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, описанный в настоящей заявке, имеет среднее значение DP в диапазоне от 2 до 10. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет среднее значение DP примерно от 2 до 8, примерно от 2 до 5 или примерно от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет среднее значение DP примерно 3,5. Среднее значение DP может быть определено с помощью SEC или элементного анализа.

Уровень ангидро-субъединиц

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит одну или несколько ангидро-субъединиц, т.е. олигосахаридный препарат включает олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления каждая из n фракций олигосахаридов в описанном в настоящей заявке олигосахаридном препарате независимо включает уровень ангидро-субъединиц. Например, в некоторых вариантах осуществления фракция DP1 содержит примерно 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, а фракция DP2 включает примерно 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В другом примере, в некоторых вариантах осуществления каждая фракция из DP1, DP2 и DP3 содержит примерно 5%, примерно 10% и примерно 2% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительном распространенности, соответственно. В некоторых вариантах осуществления две или более фракций олигосахаридов содержат аналогичные уровни олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. Например, в некоторых вариантах осуществления каждая фракция из DP1 и DP3 содержит примерно 5% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах

осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат не содержит каких-либо ангидро-субъединиц, т.е. олигосахаридный препарат не включает каких-либо олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций от 1 до n в описанном в настоящей заявке олигосахаридном препарате независимо включает примерно от 0,1% до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии, ЖХ-МС/МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций от 1 до n в олигосахаридном препарате независимо включает примерно от 0,5% до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии, ЖХ-МС/МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления ЖХ-МС/МС используют для определения относительной распространенности олигосахаридов во фракциях DP1, DP2 и/или DP3.

В некоторых вариантах осуществления присутствие, тип разновидностей и/или уровень ангидро-субъединиц можно определять и/или обнаруживать любыми подходящими аналитическими методами, такими как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрия, ВЭЖХ, ПФП, A4F или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления присутствие и уровень олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют и/или выявляют с помощью MALDI-MS, как показано пиками, смещенными на -18 г/моль MW на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления присутствие и тип разновидностей ангидро-субъединиц определяют и/или обнаруживают с помощью ЯМР, как проиллюстрировано в примере 11 на фиг. 3 и фиг. 4. В некоторых вариантах осуществления присутствие, тип разновидностей и/или уровень ангидро-субъединиц или олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют и/или обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью масс-спектрометрии, такой как MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления присутствие, тип разновидностей и/или уровень ангидро-субъединиц или олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют и/или обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью ЯМР. В некоторых вариантах осуществления присутствие, тип разновидностей и/или уровень ангидро-субъединиц или олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют и/или обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих субъединицы, определяют с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ЖХ-МС/МС, как показано на фиг. 21A-

21C, 22A-22C, 23A-23C и 24A-24C. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ГХ-МС, как показано на фиг. 25A-25B, 26A-26B, 27A-27B и 28A-28B. В некоторых вариантах осуществления ГХ-МС или ЖХ-МС/МС используют для определения относительной распространенности олигосахаридов во фракциях DP1, DP2 и/или DP3. В некоторых вариантах осуществления MALDI-MS используют для определения относительной распространенности олигосахаридов во фракции DP4 или фракции с более высокой DP. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность конкретной фракции определяют путем интегрирования площади под пиками хроматограммы ЖХ-МС/МС, которые обозначены как соответствующие этой фракции. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность конкретной фракции определяют путем интегрирования площади под пиками хроматограммы ГХ-МС, которые обозначены как соответствующие этой фракции.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее чем 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3% или менее 2% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает более 0,5%, более 0,8%, более 1%, более 2%, более 3%, более 4%, более 5%, более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14%, более 15%, более 16%, более 17%, более 18%, более 19%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70%, или более 80% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает более 20%, более 21%, более 22%, более 23%, более 24%, более 25%, более 26%, более 27%, более 28%, более 29% или более 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция (такая как DP1, DP2 и/или DP3)

олигосахаридного препарата содержит примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 1,5%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% , примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17%, примерно 18%, примерно 19%, примерно 20%, примерно 21%, примерно 22%, примерно 23%, примерно 24%, примерно 25% или примерно 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция (такая как DP1, DP2 и/или DP3) олигосахаридного препарата содержит примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна фракция (такая как DP1, DP2 и/или DP3) олигосахаридного препарата содержит примерно от 0,1% до 90%, примерно от 0,5% до 90%, примерно от 0,5% до 80%, примерно от 0,5% до 70%, примерно от 0,5% до 60%, примерно от 0,5% до 50%, примерно от 0,5% до 40%, примерно от 0,5% до 30%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5% до 9%, примерно от 0,5% до 8%, примерно от 0,5% до 7%, примерно от 0,5% до 6% примерно от 0,5% до 5%, примерно от 0,5% до 4%, примерно от 0,5% до 3%, примерно от 0,5% до 2%, примерно от 2% до 9%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 7%, примерно от 2% до 6%, примерно от 2% до 5%, примерно от 2% до 4%, примерно от 2% до 3%, или примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенности измеряют масс-спектрометрией, ЖХ-МС/МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция DP1 и DP2 независимо включает примерно от 0,5% до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии или ЖХ-МС/МС или ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1%

олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция описанного здесь олигосахаридного препарата содержит менее 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% или 2% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит более 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит более 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% или 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 1,5%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17%, примерно 18%, примерно 19%, примерно 20%, примерно 21%, примерно 22%, примерно 23%, примерно 24%, примерно 25% или примерно 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления каждая фракция описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает примерно от 0,1% до 90%, примерно от 0,1% до 15%, примерно от 0,5% до 90%, примерно от 0,5% до 80%, примерно от 0,5% до 70%, примерно от 0,5% до 60%, примерно от 0,5% до 50%, примерно от 0,5% до 40%, примерно от 0,5% до 30%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5% до 9%, примерно от 0,5% до 8%, примерно от 0,5% до 7%, примерно от 0,5% до 6%, примерно от 0,5% до 5%, примерно от 0,5% до 4%, примерно от 0,5% до 3%, примерно от 0,5% до 2%, примерно от 2% до 9%, примерно от 1% до 10% примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 7%, примерно от 2% до 6%, примерно от 2% до 5%, примерно

от 2% до 4%, примерно от 2% до 3% или примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит менее 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит более 0,5%, более 0,8%, более 1%, более 2%, более 3%, более 4%, более 5%, более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14%, более 15%, более 16%, более 17%, более 18%, более 19%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70% или более 80% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В других вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит более 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% или 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17%, примерно 18%, примерно 19%, примерно 20%, примерно 21%, примерно 22%, примерно 23%, примерно 24%, примерно 25% или примерно 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 1,5%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает примерно от 0,1% до 90%, примерно от 0,1% до 15%, примерно от 0,5% до 90%,

примерно от 0,5% до 80%, примерно от 0,5% до 70%, примерно от 0,5% до 60%, примерно от 0,5% до 50%, примерно от 0,5% до 40%, примерно от 0,5% до 30%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5% до 9%, примерно от 0,5% до 8%, примерно от 0,5% до 7%, примерно от 0,5% до 6%, примерно от 0,5% до 5 %, примерно от 0,5% до 4%, примерно от 0,5% до 3%, примерно от 0,5% до 2%, примерно от 2% до 9%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 7%, примерно от 2% до 6%, примерно от 2% до 5%, примерно от 2% до 4%, примерно от 2% до 3% или примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности.

В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит менее 30%, менее 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает более 0,1%, более 0,5%, более 0,8%, более 1%, более 1,5%, более 2%, более 3%, более 4%, более 5%, более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14% или более 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит примерно 0,5%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16% примерно 17%, примерно 18%, примерно 19% или примерно 20% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит примерно от 0,1% до 15%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5% до 15%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 2% до 14%, примерно от 3% до 13%, примерно от 4% до 12%, примерно от 5% до 11%, примерно от 5% до 10%, примерно от 6% до 9% или примерно от 7% до 8% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, или в любых интервалах между ними. В некоторых вариантах осуществления фракция DP1 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает примерно от 5% до 10% олигосахаридов,

содержащих ангидро-субъединицу, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит менее 30%, менее 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает более 0,1%, более 0,5%, более 0,8%, более 1%, более 1,5%, более 2%, более 3%, более 4%, более 5%, более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14% или более 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит примерно 0,5%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17%, примерно 18%, примерно 19% или примерно 20% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит примерно от 0,1% до 15%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5% до 15%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 2% до 14%, примерно от 3% до 13%, примерно от 4% до 12%, примерно от 5% до 11%, примерно от 5% до 10%, примерно от 6% до 9%, или примерно от 7% до 8% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, или в любых диапазонах между ними. В некоторых вариантах осуществления фракция DP2 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов,

содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью масс-спектрометрии, такой как MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления фракция DP3 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит менее 30%, менее 20%, менее 19%, менее 18%, менее 17%, менее 16%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP3 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата включает более 0,1%, более 0,5%, более 0,8%, более 1%, более 1,5%, более 2%, более 3%, более 4%, более 5%, более 6%, более 7%, более 8%, более 9%, более 10%, более 11%, более 12%, более 13%, более 14% или более 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP3 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит примерно 0,5%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16% примерно 17%, примерно 18%, примерно 19% или примерно 20% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления фракция DP3 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит примерно от 0,1% до 15%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,5% до 20%, примерно от 0,5% до 10%, примерно от 0,5% до 15%, примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 15%, примерно от 1% до 10%, примерно от 2% до 14%, примерно от 3% до 13%, примерно от 4% до 12%, примерно от 5% до 11%, примерно от 5% до 10%, примерно от 6% до 9% или примерно от 7% до 8% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, или в любых диапазонах между ними. В некоторых вариантах осуществления фракция DP3 описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата содержит примерно от 5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления относительное количество олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью масс-спектрометрии, такой как MALDI-

MS. В некоторых вариантах осуществления относительное количество олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления относительное количество олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, определяют с помощью ГХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы, включает одну или несколько ангидро-субъединиц. Например, DP1 олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы, включает одну ангидро-субъединицу. В некоторых вариантах осуществления DPn олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы, может содержать от 1 до n ангидро-субъединиц. Например, в некоторых вариантах осуществления DP2 олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы, включает одну или две ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления каждый олигосахарид в олигосахаридном препарате независимо содержит ноль, одну или две ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления более 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35% или 30% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеют только одну ангидро-субъединицу. В некоторых вариантах осуществления более 99%, 95%, 90%, 85% или 80% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, содержат только одну ангидро-субъединицу.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько олигосахаридов в олигосахаридном препарате или в каждой фракции олигосахаридного препарата содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ангидро-субъединиц, каждая из которых связана через гликозидную связь, где гликозидная связь, связывающая каждую ангидро-субъединицу, выбрана независимо. В некоторых вариантах осуществления один или несколько олигосахаридов в олигосахаридном препарате в или в каждой фракции олигосахаридного препарата содержат 1, 2 или 3 ангидро-субъединицы, каждая из которых связана гликозидной связью, при этом гликозидная связь, связывающая каждую ангидро-субъединицу, выбрана независимо. В некоторых вариантах осуществления более 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 99% олигосахаридов в олигосахаридном препарате или в каждой фракции содержат 1, 2 или 3 ангидро-субъединицы, каждая из которых связана гликозидной связью, где гликозидная связь, связывающая каждую ангидро-субъединицу, выбрана независимо. В некоторых вариантах осуществления один или несколько олигосахаридов в олигосахаридном препарате или в каждой фракции содержат 1 ангидро-субъединицу, связанную гликозидной связью. В некоторых вариантах осуществления более 50%, более 60%, более 70%, более 80%, более 90% или более 99% олигосахаридов в олигосахаридном препарате или в каждой фракции содержат 1 ангидро-субъединицу, связанную через гликозидную связь.

Виды ангидро-субъединиц

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит различные виды ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления типичные олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицу, проиллюстрированы на фиг. 5, фиг. 18 и фиг. 19. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько ангидро-субъединиц, которые являются продуктами термической дегидратации моносахаридов, то есть ангидромоносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько ангидро-субъединиц, которые являются продуктами обратимой термической дегидратации моносахаридов.

Следует понимать, что ангидромоносахарид (или ангидромоносахаридная субъединица) относится к одному или нескольким видам продуктов термической дегидратации моносахарида. Например, в некоторых вариантах осуществления ангидроглюкоза относится к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе (левоглюкозану) или 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозе. В некоторых вариантах осуществления множество ангидроглюкоз относится к множеству 1,6-ангидро-β-D-глюкопираноз (левоглюкозанов), множеству 1,6-ангидро-β-D-глюкофураноз, множеству других термических продуктов дегидратации глюкозы, или любых их комбинаций. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления термин «множество ангидрогалактоз» относится к множеству любых продуктов термической дегидратации галактозы или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, олигосахаридный препарат, как описано в настоящей заявке, содержит одну или несколько субъединиц ангидроглюкозы, ангидрогалактозы, ангидроманнозы, ангидроаллозы, ангидроальтрозы, ангидрогулозы, ангидроиндозы, ангидроталозы, ангидрофруктозы, ангидрорибозы, ангидроарабинозы, ангидрорамнозы, ангидроликсозы, ангидроксилозы, или любую комбинацию этих субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько субъединиц ангидроглюкозы, ангидрогалактозы, ангидроманнозы или ангидрофруктозы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, как описано в настоящей заявке, содержит один или несколько из 1,6-ангидро-3-O-β-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозы, 1,6-ангидро-3-O-α-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозы, 1,6-ангидро-2-O-β-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозы, 1,6-ангидро-2-O-α-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозы, 1,6-ангидро-β-D-целлобиозы (целлобиозана), 1,6-ангидро-β-D-целлотриозы (целлотриозана), 1,6-ангидро-β-D-целлотетраозы (целлотетраозана), 1,6-ангидро-β-D-целлопентаозы (целлопентаозана) и 1,6-ангидро-β-D-мальтозы (мальтозана).

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько субъединиц 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько субъединиц 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы (левоглюкозана). Например, фиг. 18 иллюстрирует два DP1 олигосахарида, содержащих ангидро-субъединицы (левоглюкозан и 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозу) и DP2 олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицы (ангидроцеллобиозу).

Присутствие и уровень разновидностей ангидро-субъединицы могут варьировать в зависимости от кормовых сахаров, используемых для производства олигосахарида. Например, в некоторых вариантах осуществления глюкоолигосахариды содержат ангидроглюкозные субъединицы, галактоолигосахариды содержат ангидрогалактозные субъединицы, а глюкогалактоолигосахариды содержат ангидроглюкозные и ангидрогалактозные субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит как 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозные, так и 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозные ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 0,1%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 99% ангидро-субъединиц выбраны из группы, состоящей из 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы и 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% ангидро-субъединиц представляют собой ангидро-субъединицы 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 60% ангидро-субъединиц представляют собой 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозу.

В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно от 10:1 до 1:10, от 9:1 до 1:10, от 8:1 до 1:10, от 7:1 до 1:10, от 6:1 до 1:10, от 5:1 до 1:10, от 4:1 до 1:10, от 3:1 до 1:10, от 2:1 до 1:10, от 10:1 до 1:9, от 10:1 до 1:8, от 10:1 до 1:7, от 10:1 до 1:6, от 10:1 до 1:5, от 10:1 до 1:4, от 10:1 до 1:3, от 10:1 до 1:2 или от 1:1 до 3:1 в препарате. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:8, 1:9 или 1:10 в препарате. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы и 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы в препарате составляет примерно 2:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно от 10:1 до 1:10, от

9:1 до 1:10, от 8:1 до 1:10, от 7:1 до 1:10, от 6:1 до 1:10, от 5:1 до 1:10, от 4:1 до 1:10, от 3:1 до 1:10, от 2:1 до 1:10, от 10:1 до 1:9, от 10:1 до 1:8, от 10:1 до 1:7, от 10:1 до 1:6, от 10:1 до 1:5, от 10:1 до 1:4, от 10:1 до 1:3, от 10:1 до 1:2 или от 1:1 до 3:1 в каждой фракции. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 в каждой фракции. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно 2:1 в каждой фракции.

В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно от 10:1 до 1:10, от 9:1 до 1:10, от 8:1 до 1:10, от 7:1 до 1:10, от 6:1 до 1:10, от 5:1 до 1:10, от 4:1 до 1:10, от 3:1 до 1:10, от 2:1 до 1:10, от 10:1 до 1: 9, от 10:1 до 1:8, от 10:1 до 1:7, от 10:1 до 1:6, от 10:1 до 1:5, от 10:1 до 1:4, от 10:1 до 1:3, от 10:1 до 1:2 или от 1:1 до 3:1 по меньшей мере в одной фракции. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по меньшей мере в одной фракции. В некоторых вариантах осуществления отношение 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозе составляет примерно 2:1 по меньшей мере в одной фракции.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат включает DP2 олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит ангидролактозу, ангидросахарозу, ангидроцеллобиозу или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает примерно от 2 до 20, от 2 до 15, от 5 до 20, от 5 до 15 или от 5 до 10 видов DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, описанный в настоящей заявке, не содержит целлобиозан или не содержит определяемого уровня целлобиозана.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит одну или несколько ангидро-субъединиц, которые представляют собой продукты карамелизации сахара. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит одну или несколько ангидро-субъединиц, являющихся продуктами карамелизации сахара, выбранными из группы, состоящей из метанола; этанола; фурана; метилглиоксаля; 2-метилфурана; винилацетата; гликольальдегида; уксусной кислоты; ацетола; фурфурола; 2-фуранметанола; 3-

фуранметанола; 2-гидроксициклопент-2-ен-1-она; 5-метилфурфурола; 2(5H)-фуранона; 2-метилциклопентенолона; левоглюкозенона; циклического гидроксил-лактона; 1,4,3,6-диангидро-α-D-глюкопиранозы; диангидроглюкопиранозы; и 5-гидроксиметилфурфурола (5-hmf).

В некоторых вариантах осуществления в олигосахаридном препарате или по меньшей мере в одной из фракций DP ангидро-субъединицы, которые являются продуктами карамелизации, менее распространены, чем ангидро-субъединицы, которые являются продуктами обратимой термической дегидратации моносахарида. В некоторых вариантах осуществления в олигосахаридном препарате или по меньшей мере в одной из фракций ангидро-субъединицы, которые являются продуктами карамелизации, более распространены, чем ангидро-субъединицы, которые являются продуктами обратимой термической дегидратации моносахарида. В некоторых вариантах осуществления в олигосахаридном препарате или по меньшей мере в одной из фракций ангидро-субъединицы, которые являются продуктами карамелизации, и ангидро-субъединицы, которые являются продуктами обратимой термической дегидратации моносахарида, имеют аналогичную распространенность.

В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,01% до 50%, примерно от 0,01% до 40%, примерно от 0,01% до 30%, примерно от 0,01% до 20%, примерно от 0,01% до 10 %, примерно от 0,01% до 5%, примерно от 0,01% до 4%, примерно от 0,01% до 3%, примерно от 0,01% до 2%, примерно от 0,01% до 1%, примерно от 0,1% до 0,5%, примерно от 0,1% до 50%, примерно от 0,1% до 40%, примерно от 0,1% до 30%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,1% до 10% примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 4%, примерно от 0,1% до 3%, примерно от 0,1% до 2%, примерно от 0,1% до 1%, или от примерно от 0,1% до 0,5% ангидро-субъединиц в описанном здесь олигосахаридном препарате являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 2% или примерно от 0,1% до 1% ангидро-субъединиц в олигосахаридном препарате являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% ангидро-субъединиц в олигосахаридном препарате являются продуктами карамелизации.

В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,01% до 50%, примерно от 0,01% до 40%, примерно от 0,01% до 30%, примерно от 0,01% до 20%, примерно от 0,01% до 10%, примерно от 0,01% до 5%, примерно от 0,01% до 4%, примерно от 0,01% до 3%, примерно от 0,01% до 2%, примерно от 0,01% до 1%, примерно от 0,01 примерно от 0,1%

до 0,5%, примерно от 0,1% до 50%, примерно от 0,1% до 40%, примерно от 0,1% до 30%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,1% до 10% примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 4%, примерно от 0,1% до 3%, примерно от 0,1% до 2%, примерно от 0,1% до 1% или примерно от 0,1% % до 0,5% ангидро-субъединиц по меньшей мере в одной фракции (например, DP1, DP2 и/или DP3) описанного здесь препарата являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 2% или примерно от 0,1% до 1% ангидро-субъединиц по меньшей мере в одной фракции (например, DP1, DP2 и/или DP3) препарата являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления менее 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% ангидро-субъединиц по меньшей мере в одной фракции препарата являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления менее 20%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4 %, менее 3%, менее 2% или менее 1% ангидро-субъединиц во фракциях DP1, DP2 и/или DP3 описанного здесь олигосахаридного препарата являются продуктами карамелизации.

В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,01% до 50%, примерно от 0,01% до 40%, примерно от 0,01% до 30%, примерно от 0,01% до 20%, примерно от 0,01% до 10%, примерно от 0,01% до 5%, примерно от 0,01% до 4%, примерно от 0,01% до 3%, примерно от 0,01% до 2%, примерно от 0,01% до 1%, примерно от 0,01 примерно от 0,1% до 0,5%, примерно от 0,1% до 50%, примерно от 0,1% до 40%, примерно от 0,1% до 30%, примерно от 0,1% до 20%, примерно от 0,1% до 10% примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 4%, примерно от 0,1% до 3%, примерно от 0,1% до 2%, примерно от 0,1% до 1% или примерно от 0,1% до 0,5% ангидро-субъединиц в каждой фракции описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления примерно от 0,1% до 5%, примерно от 0,1% до 2% или примерно от 0,1% до 1% ангидро-субъединиц в каждой фракции препарата являются продуктами карамелизации. В некоторых вариантах осуществления менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее более 12%, менее 11%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее более 2% или менее 1% ангидро-субъединиц в каждой фракции препарата являются продуктами карамелизации.

В некоторых вариантах осуществления каждый из олигосахаридов в описанном в настоящей заявке олигосахаридном препарате независимо и при необходимости содержит ангидро-субъединицу. В некоторых вариантах осуществления два или более независимых

олигосахарида содержат одинаковые или разные ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления два или более независимых олигосахарида содержат разные ангидро-субъединицы. Например, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает DP1 олигосахарид, содержащий ангидро-субъединицу, который включает 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозу, и олигосахарид DP2, содержащий ангидро-субъединицу, который включает 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозную субъединицу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько олигосахаридов в олигосахаридном препарате содержат две или более одинаковых или разных ангидро-субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления в любой фракции олигосахаридного препарата, которая имеет степень полимеризации, равную 2 или более (т.е. фракции DP2-DPn), ангидро-субъединица может быть связана с одной или несколькими регулярными или ангидро-субъединицами. В некоторых вариантах осуществления во фракциях DP2-DPn по меньшей мере одна ангидро-субъединица связана с одной, двумя или тремя другими регулярными или ангидро-субъединицами. В некоторых вариантах осуществления во фракциях DP2-DPn по меньшей мере одна ангидро-субъединица связана с одной или двумя регулярными субъединицами. В некоторых вариантах осуществления во фракциях DP2-DPn по меньшей мере одна ангидро-субъединица связана с одной регулярной субъединицей. В некоторых вариантах осуществления в любой из фракций DP2-DPn более 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40% или 30% ангидро-субъединиц связаны с одной регулярной субъединицей. В некоторых вариантах осуществления в каждой из фракций DP2-DPn более 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40% или 30% ангидро-субъединиц связаны с одной регулярной субъединицей.

В некоторых вариантах осуществления в любой фракции олигосахаридного препарата, которая имеет степень полимеризации, равную 2 или более (т.е. фракции DP2-DPn), ангидро-субъединица может быть расположена на конце цепи олигосахарида. В некоторых вариантах осуществления в любой фракции олигосахаридного препарата, которая имеет степень полимеризации, равную 3 или более (т.е. фракции DP3-DPn), ангидро-субъединица может находиться в положении, которое не является концом цепи олигосахарида. В некоторых вариантах осуществления более 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35% или 30% ангидро-субъединиц во фракциях DP2-DPn расположены на конце цепи олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления более 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, включают ангидро-субъединицу на конце цепи. В некоторых вариантах осуществления более 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% или 99% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, включают ангидро-субъединицу на конце цепи.

В некоторых вариантах осуществления более 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, включают ангидро-субъединицу на конце цепи. В некоторых вариантах осуществления более 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, включают ангидро-субъединицу на конце цепи.

Гликозидные связи

В некоторых вариантах осуществления описанный здесь олигосахаридный препарат, используемый в способах, описанных в настоящей заявке, содержит множество гликозидных связей. Тип и распределение гликозидных связей может зависеть от источника и способа производства олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления тип и распределение различных гликозидных связей можно определять и/или обнаруживать любыми подходящими способами, известными в данной области техники, такими как ЯМР. Например, в некоторых вариантах осуществления гликозидные связи определяют и/или обнаруживают с помощью ^{1}H-ЯМР, ^{13}C-ЯМР, 2D ЯМР, такого как 2D JRES, HSQC, HMBC, DOSY, COSY, ECOSY, TOCSY, NOESY или ROESY, или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи определяют и/или обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью протонного ЯМР. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи определяют и/или обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью ^{13}C-ЯМР. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи определяют и/или обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит одну или несколько α-(1,2) гликозидных связей, α-(1,3) гликозидных связей, α-(1,4) гликозидных связей, α-(1,6) гликозидных связей, β-(1,2) гликозидных связей, β-(1,3) гликозидных связей, β-(1,4) гликозидных связей, β-(1,6) гликозидных связей, α-(1,1)-α-гликозидных связей, α-(1,1)-β-гликозидных связей, β-(1,1)-β-гликозидных связей или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 60 мол.%, примерно от 5% до 55 мол.%, примерно от 5% до 50 мол.%, примерно от 5%. до 45 мол.%, примерно от 5% до 40 мол.%, примерно от 5% до 35 мол.%, примерно от 5% до 30 мол.%, примерно от 5% до 25 мол.%, примерно от 10% до 60 мол.%, примерно от 10% до 55 мол.%, примерно от 10% до 50 мол.%, примерно от 10% до 45 мол.%, примерно от 10% до 40 мол.%, примерно от 10%

до 35 мол.%, примерно от 15% до 60 мол.%, примерно от 15% до 55 мол.%, примерно от 15% до 50 мол.%, примерно от 15% до 45 мол.%, примерно от 15% до 40 мол.%, примерно от 15% до 35 мол.%, примерно от 20% до 60 мол.%, примерно от 20% до 55 мол.%, примерно от 20% до 50 мол.%, примерно от 20% до 45 мол.%, примерно от 20% до 40 мол.%, примерно от 20% до 35 мол.%, примерно от 25% до 60 мол.%, примерно от 25% до 55 мол.%, примерно от 25% до 50 мол.%, примерно от 25% до 45 мол.%, примерно от 25% до 40 мол.%, или примерно от 25% до 35 мол.% α-(1,6) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 50 мол.%, примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 35 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 5% до 40 мол.%, примерно от 5% до 35 мол.%, примерно от 5% до 30 мол.% примерно от 5% до 25 мол.%, примерно от 5% до 20 мол.%, примерно от 10% до 40 мол.%, примерно от 10% до 35 мол.%, примерно от 10% до 20 мол.% примерно от 15% до 40 мол.%, примерно от 15% до 35 мол.%, примерно от 15% до 30 мол.%, примерно от 15% до 25 мол.% или примерно от 15% до 20 мол.% α-(1,3) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 35 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол. мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.%, примерно от 2% до 30 мол.%, примерно от 2% до 25 мол.%, примерно от 2% до 20 мол.%, примерно от 2% до 15 мол.%, примерно от 2% до 10 мол.%, примерно от 3% до 30 мол.%, примерно от 3% до 25 мол.%, примерно от 3% до 20 мол.%, примерно от 3% до 15 мол.%, примерно от 3% до 10 мол.%, примерно от 5% до 30 мол.%, примерно от 5% до 25 мол.%, примерно от 5% до 20 мол.%, примерно от 5% до 15 мол.% или примерно от 5% до 10 мол.% α-(1,2) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.% или примерно от 0 до 5 мол.% α-(1,4) гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид сахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи менее 40 мол.%, менее 30 мол.%, менее 20 мол.%, менее 15 мол.%, менее 10 мол.%, менее 9 мол.%, менее 8 мол.%, менее 7 мол.%, менее 6 мол.%, менее 5 мол.%, менее 4 мол.%, менее 3 мол.% или менее 2 мол.% α-(1,4) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 35 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.%, примерно от 2% до 30 мол.%, примерно от 2% до 25 мол.%, примерно от 2% до 20 мол.%, примерно от 2% до 15 мол.%, примерно от 2% до 10 мол.%, примерно от 5% до 30 мол.%, примерно от 5% до 25 мол.%, примерно от 5% до 20 мол.%, примерно от 5% до 15 мол.%, примерно от 5% до 10 мол.%, примерно от 8% до 30 мол.%, примерно от 8% до 25 мол.%, примерно от 8% до 20 мол.%, примерно от 8% до 15 мол.% или примерно от 10% до 15 мол.% β-(1,6) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 35 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.%, примерно от 2% до 30 мол.%, примерно от 2% до 25 мол.%, примерно от 2% до 20 мол.%, примерно от 2% до 15 мол.%, примерно от 2% до 10 мол.%, примерно от 3% до 30 мол.%, примерно от 3% до 25 мол.%, примерно от 3% до 20 мол.%, примерно от 3% до 15 мол.%, примерно от 3% до 10 мол.%, примерно от 5% до 30 мол.%, примерно от 5% до 25 мол.%, примерно от 5% до 20 мол.%, примерно от 5% до 15 мол.% или примерно от 5% до 10 мол.% β-(1,4) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.%, примерно от 0 до 5 мол.%, примерно от 1% до 20 мол.%, примерно от 1% до 15 мол.%, примерно от 1% до 10 мол.%, примерно от 1% до 5 мол.%, примерно от 2% до 20 мол.%, примерно от 2% до 15 мол.%, примерно от 2% до 10 мол.%, или примерно от 2% до 5 мол.% β-(1,2) гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи менее 40 мол.%, менее 30 мол.%, менее 20 мол.%, менее 15 мол.%, менее 10 мол.%, менее 9 мол.%, менее 8 мол.%, менее 7 мол.%, менее 6 мол.%, менее 5 мол.%, менее 4 мол.%, менее 3 мол.% или менее 2 мол.% β-(1,2) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи примерно от 0 до 40 мол.%, примерно от 0 до 30 мол.%, примерно от 0 до 25 мол.%, примерно от 0 до 20 мол.%, примерно от 0 до 15 мол.%, примерно от 0 до 10 мол.%, примерно от 0 до 5 мол.%, примерно от 1% до 20

мол.%, примерно от 1% до 15 мол.%, примерно от 1% до 10 мол.%, примерно от 1% до 5 мол.%, примерно от 2% до 20 мол.%, примерно от 2% до 15 мол.%, примерно от 2% до 10 мол.%, или примерно от 2% до 5 мол.% β-(1,3) гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи менее 40 мол.%, менее 30 мол.%, менее 20 мол.%, менее 15 мол.%, менее 10 мол.%, менее 9 мол.%, менее 8 мол.%, менее 7 мол.%, менее 6 мол.%, менее 5 мол.%, менее 4 мол.%, менее 3 мол.% или менее 2 мол.% β-(1,3) гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типа гликозидной связи, которое отличается от распределения типа гликозидной связи в несинтетических олигосахаридных препаратах. Например, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют распределение типов гликозидных связей, которое отличается от такового в основных питательных композициях. В некоторых вариантах осуществления основные питательные композиции содержат природный источник углеводов, такой как крахмал и растительные волокна. Некоторые из природных источников углеводов имеют высокий процент α-(1,4), α-(1,6) и/или β-(1,6) гликозидных связей. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют более низкий процент α-(1,4) гликозидных связей, чем основная питательная композиция. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют более низкий процент α-(1,6) гликозидных связей, чем основная питательная композиция. В других вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют более высокий процент α-(1,6) гликозидных связей, чем основная питательная композиция. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридные препараты имеют более низкий процент β-(1,6) гликозидных связей, чем основная питательная композиция. В некоторых вариантах осуществления препарат олигосахаридов содержит гликозидные связи, которые трудно расщепляются или гидролизуются ферментами.

В частности, в некоторых вариантах осуществления α-(1,2), α-(1,3), α-(1,4), α-(1,6), β-(1,2), β-(1,3), β-(1,4) и/или β-(1,6) гликозидные связи в распределении типа гликозидной связи описанных в настоящей заявке препаратов олигосахаридов составляют по меньшей мере на 50 мол.%, по меньшей мере на 40 мол.%, по меньшей мере на 30 мол.%, по меньшей мере на 20 мол.%, по меньшей мере на 15 мол.%, по меньшей мере на 10 мол.%, по меньшей мере на 5 мол.%, по меньшей мере на 2 мол.% или по меньшей мере на 1 мол.% ниже, чем в основной питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления α-(1,2), α-(1,3), α-(1,4), α-(1,6), β-(1,2), β-(1, 3), β-(1,4) и/или β-(1,6) гликозидные связи в распределении типа гликозидной связи препаратов олигосахаридов

по меньшей мере на 50 мол.%, по меньшей мере на 40 мол.%, по меньшей мере на 30 мол.%, по меньшей мере на 20 мол.%, по меньшей мере на 15 мол.%, по меньшей мере на 10 мол.%, по меньшей мере на 5 мол.%, по меньшей мере на 2 мол.% или по меньшей мере на 1 мол.% выше, чем в основной питательной композиции.

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что определенные типы гликозидных связей могут быть неприменимы к олигосахаридам, содержащим определенный тип моносахаридов. Например, в некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит α-(1,2) гликозидные связи и α-(1,6) гликозидные связи. В других вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит α-(1,2) гликозидные связи и β-(1,3) гликозидные связи. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит α-(1,2) гликозидные связи, α-(1,3) гликозидные связи и β-(1,6) гликозидные связи. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит α-(1,2) гликозидные связи, α-(1,3) гликозидные связи, α-(1,4) гликозидные связи, α-(1,6) гликозидные связи, β-(1,2) гликозидные связи, β-(1,3) гликозидные связи, β-(1,4) гликозидные связи и β-(1,6) гликозидные связи.

Молекулярная масса

Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение описанных в настоящей заявке олигосахаридных препаратов могут быть определены любыми подходящими аналитическими средствами и инструментами, такими как метод концевых групп, осмотическое давление (осмометрия), ультрацентрифугирование, измерение вязкости, метод светорассеяния, SEC, SEC-MALLS, ПФП, A4F, ВЭЖХ и масс-спектрометрия. В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение определяют масс-спектрометрией, такой как MALDI-MS, ЖХ-МС или ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение определяют с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), такой как гельпроникающая хроматография (GPC). В других вариантах осуществления молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение определяют с помощью MALDI-MS.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат имеет средневесовую молекулярную массу примерно от 100 до 10000 г/моль, примерно от 200 до 8000 г/моль, примерно от 300 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 5000 г/моль, примерно от 700 до 5000 г/моль, примерно от 900 до 5000 г/моль, примерно от 1100 до 5000 г/моль, примерно от 1300 до 5000 г/моль, примерно от 1500 до 5000 г/моль, примерно от 1700 до 5000 г/моль, примерно от 300 до 4500 г/моль,

примерно от 500 до 4500 г/моль, примерно от 700 до 4500 г/моль, примерно от 900 до 4500 г/моль, примерно от 1100 до 4500 г/моль, примерно от 1300 до 4500 г/моль, примерно от 1500 до 4500 г/моль, примерно от 1700 до 4500 г/моль, примерно от 1900 до 4500 г/моль, примерно от 300 до 4000 г/моль, примерно от 500 до 4000 г/моль, примерно от 700 до 4000 г/моль, примерно от 900 до 4000 г/моль, примерно от 1100 до 4000 г/моль, примерно от 1300 до 4000 г/моль, примерно от 1500 до 4000 г/моль, примерно от 1700 до 4000 г/моль, примерно от 1900 до 4000 г/моль, примерно от 300 до 3000 г/моль, примерно от 500 до 3000 г/моль, примерно от 700 до 3000 г/моль, примерно от 900 до 3000 г/моль, примерно от 1100 до 3000 г/моль, примерно от 1300 до 3000 г/моль, примерно от 1500 до 3000 г/моль, примерно от 1700 до 3000 г/моль, примерно от 1900 до 3000 г/моль, примерно от 2100 до 3000 г/моль, примерно от 300 до 2500 г/моль, примерно от 500 до 2500 г/моль, примерно от 700 до 2500 г/моль, примерно от 900 до 2500 г/моль, примерно от 1100 до 2500 г/моль, примерно от 1300 до 2500 г/моль, примерно от 1500 до 2500 г/моль, примерно от 1700 до 2500 г/моль, примерно от 1900 до 2500 г/моль, примерно от 2100 до 2500 г/моль, примерно от 300 до 1500 г/моль, примерно от 500 до 1500 г/моль, примерно от 700 до 1500 г/моль, примерно от 900 до 1500 г/моль, примерно от 1100 до 1500 г/моль, примерно от 1300 до 1500 г/моль, примерно от 2000 до 2800 г/моль, примерно от 2100 до 2700 г/моль, примерно от 2200 до 2600 г/моль, примерно от 2300 до 2500 г/моль или примерно от 2320 до 2420 г/моль. В некоторых вариантах осуществления средневесовая молекулярная масса олигосахаридного препарата составляет примерно от 2000 до 2800 г/моль, примерно от 2100 до 2700 г/моль, примерно от 2200 до 2600 г/моль, примерно от 2300 до 2500 г/моль, или примерно от 2320 до 2420 г/моль. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет средневесовую молекулярную массу в диапазоне по меньшей мере от 500 г/моль, 750 г/моль, 1000 г/моль или 1500 г/моль до не более 1750 г/моль, 2000 г/моль, 2250 г/моль, 2500 г/моль или 3000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления средневесовую молекулярную массу описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата определяют с помощью ВЭЖХ согласно примеру 9.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат имеет среднечисленную молекулярную массу примерно от 100 до 10000 г/моль, примерно от 200 до 8000 г/моль, примерно от 300 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 5000 г/моль, примерно от 700 до 5000 г/моль, примерно от 900 до 5000 г/моль, примерно от 1100 до 5000 г/моль, примерно от 1300 до 5000 г/моль, примерно от 1500 до 5000 г/моль, примерно от 1700 до 5000 г/моль, примерно от 300 до 4500 г/моль, примерно от 500 до 4500 г/моль, примерно от 700 до 4500 г/моль, примерно от 900 до 4500 г/моль, примерно от 1100 до 4500 г/моль, примерно от 1300 до 4500 г/моль, примерно от

1500 до 4500 г/моль, примерно от 1700 до 4500 г/моль, примерно от 1900 до 4500 г/моль, примерно от 300 до 4000 г/моль, примерно от 500 до 4000 г/моль, примерно от 700 до 4000 г/моль, примерно от 900 до 4000 г/моль, примерно от 1100 до 4000 г/моль, примерно от 1300 до 4000 г/моль, примерно от 1500 до 4000 г/моль, примерно от 1700 до 4000 г/моль, примерно от 1900 до 4000 г/моль, примерно от 300 до 3000 г/моль, примерно от 500 до 3000 г/моль, примерно от 700 до 3000 г/моль, примерно от 900 до 3000 г/моль, примерно от 1100 до 3000 г/моль, примерно от 1300 до 3000 г/моль, примерно от 1500 до 3000 г/моль, примерно от 1700 до 3000 г/моль, примерно от 1900 до 3000 г/моль, примерно от 2100 до 3000 г/моль, примерно от 300 до 2500 г/моль, примерно от 500 до 2500 г/моль, примерно от 700 до 2500 г/моль, примерно от 900 до 2500 г/моль, примерно от 1100 до 2500 г/моль, примерно от 1300 до 2500 г/моль, примерно от 1500 до 2500 г/моль, примерно от 1700 до 2500 г/моль, примерно от 1900 до 2500 г/моль, примерно от 2100 до 2500 г/моль, примерно от 300 до 2000 г/моль, примерно от 500 до 300 до 2000 г/моль, примерно от 700 до 2000 г/моль, примерно от 900 до 2000 г/моль, примерно от 1100 до 2000 г/моль, примерно от 300 до 1500 г/моль, примерно от 500 до 1500 г/моль, примерно от 700 до 1500 г/моль, примерно от 900 до 1500 г/моль, примерно от 1100 до 1500 г/моль, примерно от 1300 до 1500 г/моль, примерно от 1000 до 2000 г/моль, примерно от 1100 до 1900 г/моль, примерно от 1200 до 1800 г/моль, примерно от 1300 до 1700 г/моль, примерно от 1400 до 1600 г/моль или примерно от 1450 до 1550 г/моль. В некоторых вариантах осуществления среднечисленная молекулярная масса олигосахаридного препарата составляет примерно от 1000 до 2000 г/моль, примерно от 1100 до 1900 г/моль, примерно от 1200 до 1800 г/моль, примерно от 1300 до 1700 г/моль, примерно от 1400 до 1600 г/моль или примерно от 1450 до 1550 г/моль. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат имеет среднечисленную молекулярную массу в диапазоне по меньшей мере от 500 г/моль, 750 г/моль, 1000 г/моль или 1500 г/моль до не более 1750 г/моль, 2000 г/моль, 2250 г/моль, 2500 г/моль или 3000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления среднечисленную молекулярную массу описанного в настоящей заявке олигосахаридного препарата определяют с помощью ВЭЖХ согласно примеру 9.

Типы олигосахаридов

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящей заявке олигосахаридные препараты содержат один или несколько видов моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат может содержать олигосахариды с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более различными видами моносахаридных субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке

олигосахаридный препарат содержит одну или несколько моносахаридных субъединиц, выбранных из группы, состоящей из триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы и любой их комбинации, где каждая из указанных триозной, тетрозной, пентозной, гексозной или гептозной субъединиц независимо и при необходимости функционализирована и/или заменена одной из своих соответствующих ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления соответствующая ангидро-субъединица является продуктом обратимой термической дегидратации моносахаридной субъединицы. В некоторых вариантах осуществления соответствующая ангидро-субъединица представляет собой продукт карамелизации моносахаридной субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит пентозные субъединицы, гексозные субъединицы или любую их комбинацию, где каждая из указанных пентозных или гексозных субъединиц независимо и при необходимости функционализирована и/или заменена одной из своих соответствующих ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит гексозные субъединицы, где каждая из указанных гексозных субъединиц независимо и при необходимости заменена одной из своих соответствующих ангидро-субъединиц.

В контексте настоящего изобретения тетроза относится к моносахариду с четырьмя атомами углерода, такому как эритроза, треоза и эритрулоза. В контексте настоящего изобретения пентоза относится к моносахариду с пятью атомами углерода, такому как арабиноза, ликсоза, рибоза и ксилоза. В контексте настоящего изобретения гексоза относится к моносахариду с шестью атомами углерода, такому как аллоза, альтроза, глюкоза, манноза, гулоза, идоза, галактоза, талоза, псикоза, фруктоза, сорбоза и тагатоза. В контексте настоящего изобретения гептоза относится к моносахариду с семью атомами углерода, такому как седогептулоза и манногептулоза.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит глюкозную субъединицу, где по меньшей мере одна глюкозная субъединица при необходимости заменена ангидроглюкозной субъединицей. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит галактозную субъединицу, где по меньшей мере одна галактозная субъединица при необходимости заменена ангидрогалактозной субъединицей. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит галактозные и глюкозные субъединицы, где по меньшей мере одна галактозная субъединица или по меньшей мере одна глюкозная субъединица при необходимости заменена одной из ее соответствующих ангидро-субъединиц. В некоторых

вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит фруктозные и глюкозные субъединицы, где по меньшей мере одна фруктозная субъединица или по меньшей мере одна глюкозная субъединица при необходимости заменена одной из ее соответствующих ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит маннозную и глюкозную субъединицы, где по меньшей мере одна маннозная субъединица или по меньшей мере одна глюкозная субъединица при необходимости заменена одной из ее соответствующих ангидро-субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат включает глюкогалактозоолигосахаридный препарат, глюкоолигосахаридный препарат, галактоолигосахаридный препарат, фруктоолигосахаридный препарат, манноолигосахаридный препарат, арабиноолигосахаридный препарат, ксилоолигосахаридный препарат, глюкофруктоолигосахаридный препарат, глюкоманноолигосахаридный препарат, глюкоарабиноолигосахаридный препарат, глюкоксилоолигосахаридный препарат, галактофруктоолигосахаридный препарат, манноолигосахаридный препарат, галактоарабиноолигосахаридный препарат, галактоксилоолигосахаридный препарат, фруктоманноолигосахаридный препарат, фруктоарабиноолигосахаридный препарат, фруктоксилоолигосахаридный препарат, манноарабиноолигосахаридный препарат, манноксилоолигосахаридный препарат, арабиноксилоолигосахаридный препарат, галактоарабиноксилоолигосахаридный препарат, фруктогалактоксилоолигосахаридный препарат, арабинофруктоманноксилоолигосахаридный препарат, глюкофруктогалактоарабиноолигосахаридный препарат, фруктоглюкоарабиноманноксилоолигосахаридный препарат, глюкогалактофруктоманноарабиноксилоолигосахаридный препарат, или любые их комбинации; где каждая из моносахаридных субъединиц в составе препарата независимо и при необходимости функционализирована и/или заменена одной из своих соответствующих ангидро-субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит более 99% субъединиц глюкозы по массе. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит только глюкозные субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит примерно от 45% до 55% субъединиц глюкозы и примерно от 55% до 45% субъединиц галактозы по массе. В некоторых вариантах

осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно 50% субъединиц глюкозы и 50% субъединиц галактозы по массе.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит примерно от 80% до 95% субъединиц глюкозы и примерно от 20% до 5% субъединиц маннозы по массе. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно от 85% до 90% субъединиц глюкозы и примерно от 15% до 10% субъединиц маннозы по массе.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит примерно от 80% до 95% глюкозных субъединиц и примерно от 20% до 5% галактозных субъединиц по массе. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно от 85% до 90% глюкозных субъединиц и примерно от 15% до 10% галактозных субъединиц по массе.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит примерно от 80% до 95% глюкозных субъединиц, от 0% до 8% галактозных субъединиц и от 5% до 20% маннозных субъединиц по массе. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат содержит примерно от 80% до 90% глюкозных субъединиц, от 1% до 5% галактозных субъединиц и от 10% до 15% маннозных субъединиц по массе.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат, описанный в настоящей заявке, содержит примерно от 1 до 100 масс.%, примерно от 50 масс.% до 100 масс.%, примерно от 80 масс.% до 98 масс.% или примерно от 85 масс.%. до 95 масс.% глюкозных субъединиц, или в любых диапазонах между ними. В некоторых вариантах осуществления галактозные субъединицы присутствуют в олигосахаридном препарате, описанном в настоящей заявке, в количестве примерно от 0 до 90 масс.%, примерно от 1 до 50 масс.%, примерно от 2 до 20 масс.%, или примерно от 5 масс.% до 15 масс.%, или в любом диапазоне между ними. В некоторых вариантах осуществления маннозные субъединицы присутствуют в олигосахаридном препарате, описанном в настоящей заявке, в количестве примерно от 0 масс.% до 90 масс.%, примерно от 1 масс.% до 50 масс.%, примерно от 2 масс.% до 20 масс.%, или примерно от 5 масс.% до 15 масс.%, или в любом диапазоне между ними.

D-формы и L-формы

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна моносахаридная субъединица в олигосахариде находится в L-форме. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна моносахаридная субъединица в олигосахариде находится в D-форме. В некоторых вариантах осуществления моносахаридные

субъединицы в описанном в настоящей заявке олигосахаридном препарате находятся в их естественной распространенной форме, например, в виде D-глюкозы, D-ксилозы и L-арабинозы.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат включает смесь L- и D-форм моносахаридных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления отношение моносахаридных субъединиц L- к D- или D- к L- форме составляет примерно 1:1, примерно 1:2, примерно 1:3, примерно 1:4, примерно 1:5, примерно 1: 6, примерно 1: 7, примерно 1: 8, примерно 1: 9, примерно 1:10, примерно 1:12, примерно 1:14, примерно 1:16, примерно 1:18, примерно 1:20, примерно 1:25, примерно 1:30, примерно 1:35, примерно 1:40, примерно 1:45, примерно 1:50, примерно 1:55, примерно 1:60, примерно 1:65, примерно 1:70, примерно 1:75, примерно 1:80, примерно 1:85, примерно 1:90, примерно 1:100 или примерно 1:150.

Функционализированные олигосахариды

В некоторых вариантах осуществления один или несколько олигосахаридов в описанном в настоящей заявке олигосахаридном препарате функционализированы независимо. Функционализированные олигосахариды могут быть получены, например, путем объединения одного или нескольких сахаров с одним или несколькими функционализирующими соединениями в присутствии катализатора. Способы получения функционализированных олигосахаридов описаны в WO 2012/118767, WO 2014/031956 и WO/2016/122887, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для их раскрытия.

В некоторых вариантах осуществления функционализирующее соединение содержит одну или несколько кислотных групп (например, -COOH), гидроксильных групп или N-содержащих групп (например, –CN, $-NO_2$ и $-N(Ra)_2$, где Ra представляет собой водородную, алкильную, алкенильную, алкинильную, галогеналкильную, гетероалкильную, циклоалкильную, арильную, гетероциклоалкильную или гетероарильную группу), S-содержащих групп (например, тиольных и сульфатных), галогенидов (например, -Cl), P-содержащих группы (например, фосфатных) или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления функционализирующее соединение связано по меньшей мере с одной моносахаридной субъединицей посредством простой эфирной, сложноэфирной, кислород-серной, аминной или кислород-фосфорной связи. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько функционализирующих соединений связаны с моносахаридной субъединицей посредством одной связи. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно функционализирующее соединение связано с одним или двумя олигосахаридами двумя или более связями.

Следует понимать, что для каждого олигосахарида в олигосахаридном препарате каждый из описанных вариантов осуществления является независимым и может быть объединен, как если бы каждая комбинация была перечислена отдельно; таким образом, любое сочетание вариантов осуществления охвачено настоящим раскрытием. Например, различные варианты осуществления могут быть сгруппированы в несколько категорий, которые включают (i) наличие или отсутствие ангидро-субъединицы; (ii) количество и уровень ангидро-субъединицы; (iii) тип разновидностей ангидро-субъединицы; (iv) расположение ангидро-субъединицы; (v) степень полимеризации; (vi) молекулярную массу; (vii) наличие или отсутствие каких-либо функциональных групп; (viii) тип олигосахарида; (ix) тип гликозидной связи и (x) L- или D-форму; но не ограничиваются ими. Соответственно, описанный олигосахаридный препарат включает множество олигосахаридов разных видов. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 или 10^{10} различных видов олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит по меньшей мере 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 или 10^9 различных видов олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит по меньшей мере 10^3 различных вида олигосахаридов.

IV. Способы производства олигосахаридных препаратов

В одном аспекте в настоящей заявке представлены способы производства олигосахаридных препаратов. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлены способы производства олигосахаридных препаратов, подходящих для использования в питательной композиции, такой как кормовая композиция для животных, или для скармливания непосредственно животному. В одном аспекте в настоящей заявке представлены способы производства олигосахаридного препарата, включающие нагревание водной композиции, содержащей один или несколько кормовых сахаров и катализатор, до температуры и в течение времени, достаточных для индукции полимеризации, где катализатор выбран из группы, состоящей из: (+)-камфор-10-сульфоновой кислоты; 2-пиридинсульфоновой кислоты; 3-пиридинсульфоновой кислоты; 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрата; α-гидрокси-2-пиридинметансульфоновой кислоты; (β)-камфор-10-сульфоновой кислоты; бутилфосфоновой кислоты; дифенилфосфиновой кислоты; гексилфосфоновой кислоты; метилфосфоновой кислоты; фенилфосфиновой кислоты; фенилфосфоновой кислоты; трет-бутилфосфоновой кислоты; (S)-VAPOL-гидрофосфата; 6-хинолинсульфоновой кислоты, 3-(1-пиридино)-1-пропансульфоната; 2-(2-пиридинил)этансульфоновой кислоты; 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-п,п'-дисульфоновой кислоты мононатриевой соли

гидрата; 1,1'-бинафтил-2,2'-диил-гидрофосфата; бис(4-метоксифенил)фосфиновой кислоты; фенил(3,5-ксилил)фосфиновой кислоты; L-цистеиновой кислоты моногидрата; поли(стиролсульфоновой кислоты-со-дивинилбензола); лизина; этандисульфоновой кислоты; этансульфоновой кислоты; изетионовой кислоты; гомоцистеиновой кислоты; HEPBS (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(4-бутансульфоновой кислоты)); HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты); 2-гидрокси-3-морфолинопропансульфоновой кислоты; 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты; метансульфоновой кислоты; метаниазида; нафталин-1-сульфоновой кислоты; нафталин-2-сульфоновой кислоты; перфторбутансульфоновой кислоты; 6-сульфохиновозы; трифликовой кислоты; 2-аминоэтансульфоновой кислоты; бензойной кислоты; хлоруксусной кислоты; трифторуксусной кислоты; капроновой кислоты; энантовой кислоты; каприловой кислоты; пеларгоновой кислоты; лауриновой кислоты; памитовой кислоты; стеариновой кислоты; арахидиновой кислоты; аспарагиновой кислоты; глутаминовой кислоты; серина; треонина; глутамина; цистеина; глицина; пролина; аланина; валина; изолейцина; лейцина; метионина; фенилаланина; тирозина; триптофана, и где олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 (фракция DP1) до n (фракция DPn), где n представляет собой целое число, равное 2 или более. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное 3 или более. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 или 50. В некоторых вариантах осуществления полимеризация кормовых сахаров достигается путем ступенчатой полимеризации. В некоторых вариантах осуществления полимеризация кормовых сахаров достигается поликонденсацией.

Кормовой сахар

В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридных препаратов, описанный в настоящей заявке, включает нагревание одного или нескольких типов кормовых сахаров. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержит моносахариды, дисахариды, трисахариды, тетрасахариды или любые их смеси.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и галактозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу, ксилозу и галактозу. В некоторых

вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и маннозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и фруктозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу, фруктозу и галактозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу, галактозу и маннозу.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат дисахариды, такие как лактоза, сахароза и целлобиоза. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат трисахариды, такие как мальтотриоза или рафиноза. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу, маннозу, галактозу, ксилозу, мальтодекстрин, арабинозу или галактозу, или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат сахарный сироп, такой как кукурузный сироп. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и лактозу. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и сахарозу.

В некоторых вариантах осуществления тип кормовых сахаров может влиять на получаемые в результате олигосахаридные препараты. Например, в некоторых вариантах, когда один или несколько кормовых сахаров представляют собой глюкозу, полученные олигосахаридные препараты включают глюкоолигосахаридные препараты. В других вариантах осуществления, когда один или несколько кормовых сахаров представляют собой маннозу, полученные олигосахаридные препараты включают манноолигосахаридные препараты. В некоторых вариантах осуществления, где один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу и галактозу, полученные олигосахаридные препараты включают глюкогалактоолигосахаридные препараты. В еще других вариантах осуществления, где один или несколько кормовых сахаров включают ксилозу, глюкозу и галактозу, полученные олигосахаридные препараты включают глюкогалактоксилоолигосахаридные препараты.

В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или нескольких кормовых сахаров может независимо находиться в своей дегидратированной или гидратной форме. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу или любую их комбинацию, и где каждая из глюкозы, галактозы, фруктозы или маннозы независимо находится в своей моногидратной или дегидратированной форме. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат моногидрат моносахарида, такой как

моногидрат глюкозы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат дигидрат сахарида, такой как дигидрат трегалозы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат по меньшей мере один сахар в его дегидратированной форме и по меньшей мере один сахар в его гидратной форме.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров могут быть обеспечены в виде сахарного раствора, в котором сахара объединены с водой и загружены в реактор. В некоторых вариантах осуществления сахара можно подавать в реактор в твердой форме и объединять с водой в реакторе. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров объединяют и перемешивают перед добавлением воды. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров объединяют в воде и после этого смешивают.

В некоторых вариантах осуществления способ включает объединение двух или более кормовых сахаров с катализатором для получения олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления два или более кормовых сахара включают глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу, лактозу или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления способ включает объединение смеси сахаров (например, моносахаридов, дисахаридов и/или трисахаридов) с катализатором для получения олигосахаридного препарата. В других вариантах осуществления способ включает объединение смеси сахаров и сахароспиртов с катализатором для получения олигосахаридного препарата.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров содержат функционализированные или модифицированные сахара. Функционализированные или модифицированные сахара могут включать аминосахара, сахарные кислоты, сахароспирты, амиды сахаров, простые эфиры сахаров или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления аминосахара относятся к молекулам сахара, в которых гидроксильная группа заменена аминогруппой. Примеры аминосахаров включают N-ацетил-D-глюкозамин, маннозамин, нейраминовую кислоту, мурамовую кислоту, N-ацетилнейраминовую кислоту, N-ацетилмурамовую кислоту, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-маннозу, N-гликолилнейраминовую кислоту, акарвиозин, D-глюкозамин и D-галактозамин, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления сахарные кислоты относятся к сахарам с карбоксильной группой. Примеры сахарных кислот включают альдоновые кислоты (такие как глицериновая кислота, ксилоновая кислота, глюконовая кислота и аскорбиновая кислота), улозоновые кислоты (такие как нейраминовая кислота и

кетодезоксиоктулозоновая кислота), уроновые кислоты (такие как глюкуроновая кислота, галактуроновая кислота и идуроновая кислота) и альдаровые кислоты (такие как винная кислота, муциновая кислота и сахарная кислота), но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления сахароспирты относятся к полиолам, производным от сахаров. Примеры сахароспиртов включают этиленгликоль, арабитол, глицерин, эритритол, треитол, ксилитол, рибитол, маннитол, сорбитол, галактитол, фуцитол, идитол, инозитол и волемитол, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления изобретения амиды сахаров относятся к молекулам сахара, которые содержат группу -C(=O)-N-. В некоторых вариантах осуществления изобретения простые эфиры сахаров относятся к молекулам сахара, которые содержат эфирную связь, например, к глюкозидам.

В некоторых вариантах осуществления функционализированные или модифицированные сахарные кислоты включают глюкозамин, N-ацетилглюкозамин, глюкуроновую кислоту, галактуроновую кислоту, глюцитол, ксилитол, маннитол, сорбитол. В некоторых вариантах осуществления один или несколько кормовых сахаров включают дезоксисахара, такие как фукоза, рамноза, дезоксирибоза или фукулоза.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ производства олигосахаридного препарата осуществляют в граммовом масштабе. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ производства олигосахаридного препарата осуществляют в килограммовом или более крупном масштабе. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции, содержащей один или несколько кормовых сахаров в количестве более 0,5, более 1, более 2, более 3, более 4, более 5, более 6, более 7, более 9, более 10, более 100 или более 1000 кг. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции, содержащей один или несколько кормовых сахаров в количестве не более 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 100, 1000 или 1500 кг. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции, содержащей один или несколько кормовых сахаров в количестве более 1 кг.

Катализатор

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ производства олигосахаридного препарата включает добавление одного или нескольких катализаторов. В некоторых вариантах осуществления предложенный здесь катализатор включает одну или несколько кислот. В некоторых вариантах осуществления предложенный здесь катализатор включает минеральную кислоту, карбоновую кислоту; аминокислоту; сульфоновую кислоту; бороновую кислоту; фосфоновую кислоту;

фосфиновую кислоту; серную кислоту; фосфорную кислоту; поли(стиролсульфоновой кислоты-со-винилбензил-имидазолия сульфат-со-дивинилбензол); поли(стиролсульфоновой кислоты-со-дивинилбензол); (+)-камфор-10-сульфоновую кислоту; 2-пиридинсульфоновую кислоту; 3-пиридинсульфоновую кислоту; 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрат; α-гидрокси-2-пиридинметансульфоновую кислоту; (β)-камфор-10-сульфоновую кислоту; бутилфосфоновую кислоту; дифенилфосфиновую кислоту; гексилфосфоновую кислоту; метилфосфоновую кислоту; фенилфосфиновую кислоту; фенилфосфоновую кислоту; трет-бутилфосфоновую кислоту; (S)-VAPOL-гидрофосфат; 6-хинолинсульфоновую кислоту; 3-(1-пиридино)-1-пропансульфонат; 2-(2-пиридинил)этансульфоновую кислоту; 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-п,п'-дисульфоновой кислоты мононатриевой соли гидрат; 1,1'-бинафтил-2,2'-диилгидрофосфат; бис(4-метоксифенил)фосфиновую кислоту; фенил(3,5-ксилил) фосфиновую кислоту; L-цистеиновой кислоты моногидрат; уксусную кислоту; пропионовую кислоту; бутановую кислоту; глутаминовую кислоту; лизин, этандисульфоновую кислоту; этансульфоновую кислоту; изетионовую кислоту; гомоцистеиновую кислоту; HEPBS (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(4-бутансульфоновую кислоту)); HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту); 2-гидрокси-3-морфолинопропансульфоновую кислоту; 2-(N-морфолино) этансульфоновую кислоту; метансульфоновую кислоту; метаниазид; нафталин-1-сульфоновую кислоту; нафталин-2-сульфоновую кислоту; перфторбутансульфоновую кислоту; 6-сульфохиновозу; трифликовую кислоту; 2-аминоэтансульфоновую кислоту; бензойную кислоту; хлоруксусную кислоту; трифторуксусную кислоту; капроновую кислоту; энантовую кислоту; каприловую кислоту; пеларгоновую кислоту; лауриновую кислоту; памитовую кислоту; стеариновую кислоту; арахидиновую кислоту; аспарагиновую кислоту; глутаминовую кислоту; серин; треонин; глутамин; цистеин; глицин; пролин; аланин; валин; изолейцин; лейцин; метионин; фенилаланин; тирозин; триптофан; полимерную кислоту; кислоту на углеродной основе; или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления предлагаемый в настоящей заявке катализатор включает: (+)-камфор-10-сульфоновую кислоту; 2-пиридинсульфоновую кислоту; 3-пиридинсульфоновую кислоту; 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрат; α-гидрокси-2-пиридинметансульфоновую кислоту; (β)-камфор-10-сульфоновую кислоту; бутилфосфоновую кислоту; дифенилфосфиновую кислоту; гексилфосфоновую кислоту; метилфосфоновую кислоту; фенилфосфиновую кислоту; фенилфосфоновую кислоту; трет-бутилфосфоновую кислоту; (S)-VAPOL-гидрофосфат; 6-

хинолинсульфоновую кислоту, 3-(1-пиридино)-1-пропансульфонат; 2-(2-пиридинил) этансульфоновую кислоту; 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-п,п'-дисульфоновой кислоты мононатриевой соли гидрат; 1,1'-бинафтил-2,2'-диилгидрофосфат; бис(4-метоксифенил)фосфиновую кислоту; фенил(3,5-ксилил)фосфиновую кислоту; L-цистеиновой кислоты моногидрат; поли(стиролсульфоновую кислоту-со-дивинилбензол); лизин; этандисульфоновую кислоту; этансульфоновую кислоту; изетионовую кислоту; гомоцистеиновую кислоту; HEPBS (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(4-бутансульфоновую кислоту)); HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту); 2-гидрокси-3-морфолинопропансульфоновую кислоту; 2-(N-морфолино) этансульфоновую кислоту; метансульфоновую кислоту; метаниазид; нафталин-1-сульфоновую кислоту; нафталин-2-сульфоновую кислоту; перфторбутансульфоновую кислоту; 6-сульфохиновозу; трифликовую кислоту; 2-аминоэтансульфоновую кислоту; бензойную кислоту; хлоруксусную кислоту; трифторуксусную кислоту; капроновую кислоту; энантовую кислоту; каприловую кислоту; пеларгоновую кислоту; лауриновую кислоту; памитовую кислоту; стеариновую кислоту; арахидиновую кислоту; аспарагиновую кислоту; глутаминовую кислоту; серин; треонин; глутамин; цистеин; глицин; пролин; аланин; валин; изолейцин; лейцин; метионин; фенилаланин; тирозин; триптофан; или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой (+)-камфор-10-сульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой 2-пиридинсульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой 3-пиридинсульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой α-гидрокси-2-пиридинметансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой (β)-камфор-10-сульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой бутилфосфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой дифенилфосфиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой гексилфосфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой метилфосфоновую кислоту. В некоторых вариантах

осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой фенилфосфиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой фенилфосфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой трет-бутилфосфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой (S)-VAPOL гидрофосфат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой 6-хинолинсульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой 3-(1-пиридино)-1-пропансульфонат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой 2-(2-пиридинил) этансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-п,п'-дисульфоновой кислоты мононатриевой соли гидрат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой 1'-бинафтил-2,2'-диилгидрофосфат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой бис(4-метоксифенил) фосфиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой фенил(3,5-ксилил)фосфиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой L-цистеиновой кислоты моногидрат. В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой поли (стиролсульфоновую кислоту-со-дивинилбензол). В некоторых вариантах осуществления катализатор, предложенный в настоящей заявке, представляет собой лизин.

В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой этандисульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой этансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой изетионовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой гомоцистеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой HEPBS (N-(2-гидроксиэтил) пиперазин-N'-(4-бутансульфоновую кислоту)). В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту). В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой 2-гидрокси-3-морфолинопропансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой 2-(N-морфолино)

этансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой метансульфоновую кислоту. В вариантах осуществления катализатор представляет собой нафталин-1-сульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой метаниазид. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой нафталин-2-сульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой перфторбутансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой 6-сульфохиновозу. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой трифликовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой 2-аминоэтансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой хлоруксусную кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой трифторуксусную кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой капроновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой энантовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой каприловую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой пеларгоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой лауриновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой памитовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой стеариновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой арахидиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой аспарагиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой глутаминовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой серин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой треонин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой глутамин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой цистеин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой пролин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой аланин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой валин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой изолейцин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой лейцин. В некоторых вариантах

осуществления катализатор представляет собой метионин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой фенилаланин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой тирозин. В некоторых вариантах осуществления катализатор представляет собой триптофан. В некоторых вариантах осуществления катализатор, представленный в настоящей заявке, представляет собой полимерный катализатор или катализатор на углеродной подложке, раскрытый в WO2016122887, который включен сюда посредством ссылки во всей полноте и для его раскрытия.

В некоторых вариантах осуществления предложенный в настоящей заявке катализатор присутствует в количестве примерно от 0,01% до 5%, примерно от 0,02% до 4%, примерно от 0,03% до 3% или примерно от 0,05% до 2% от одного или нескольких кормовых сахаров по массе сухого вещества. В некоторых вариантах осуществления предлагаемый в настоящей заявке катализатор присутствует в количестве примерно от 1% до 2% от одного или нескольких сахаров исходного сырья по массе сухого вещества. В некоторых вариантах осуществления предложенный в настоящей заявке катализатор присутствует в количестве примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1,0%, примерно 1,1%, примерно 1,2%, примерно 1,3%, примерно 1,4%, примерно 1,5%, примерно 1,6%, примерно 1,7%, примерно 1,8%, примерно 1,9%, примерно 2,0%, примерно 2,1%, примерно 2,2%, примерно 2,3%, примерно 2,4%, примерно 2,5%, примерно 2,6%, примерно 2,7%, примерно 2,8%, примерно 2,9% или примерно 3,0% от одного или нескольких кормовых сахаров по массе сухого вещества.

В некоторых вариантах осуществления предложенный в настоящей заявке катализатор присутствует в количестве примерно от 0,01% до 5%, примерно от 0,02% до 4%, примерно от 0,03% до 3% или примерно от 0,05% до 2% от водной композиции по массе сухого вещества. В некоторых вариантах осуществления предложенный в настоящей заявке катализатор присутствует в количестве примерно от 1% до 2% от водной композиции по массе сухого вещества. В некоторых вариантах осуществления предложенный здесь катализатор присутствует в количестве примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1,0%, примерно 1,1%, примерно 1,2%, примерно 1,3%, примерно 1,4%, примерно 1,5%, примерно 1,6%, примерно 1,7%, примерно 1,8%, примерно 1,9%, примерно 2,0%, примерно 2,1%, примерно 2,2%, примерно 2,3%, примерно 2,4%, примерно 2,5%, примерно 2,6%, примерно 2,7%, примерно 2,8%, примерно 2,9 % или примерно 3,0% водной композиции по массе сухого вещества.

В некоторых вариантах осуществления предлагаемый в настоящей заявке

катализатор представляет собой комбинацию двух или более различных катализаторов. В некоторых вариантах осуществления катализатор включает пригодный для повторного использования катализатор, такой как смолы и полимерные катализаторы, и не подлежащий повторному использованию катализатор. В некоторых вариантах осуществления, когда катализатор включает по меньшей мере два разных катализатора, каждый из катализаторов присутствует в количестве, предусмотренном в настоящей заявке. В других вариантах осуществления, где катализатор включает по меньшей мере два разных катализатора, по меньшей мере два разных катализатора присутствуют в совокупности в указанном в настоящей заявке количестве.

В некоторых вариантах осуществления катализатор добавляют в водную композицию в сухой форме. В других вариантах осуществления катализатор добавляют в водную композицию во влажной форме, например, в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления катализатор объединяют с одним или несколькими кормовыми сахарами перед добавлением воды. В других вариантах осуществления катализатор растворяют в воде перед его объединением с одним или несколькими кормовыми сахарами. В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящей заявке, включает получение водной композиции путем объединения одного или нескольких кормовых сахаров в дегидратированной форме и катализатора во влажной форме (например, в виде водного раствора).

Добавление воды

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ производства олигосахаридных препаратов включает добавление воды для образования водной композиции. В некоторых вариантах осуществления всю или часть воды в водной композиции добавляют в виде свободной воды. В других вариантах осуществления всю воду в водной композиции добавляют в виде связанной воды, например, в моно- или дигидрате сахарида. В некоторых вариантах осуществления всю воду в водной композиции добавляют в виде связанной воды в моногидрате моносахарида, таком как моногидрат глюкозы. В некоторых вариантах осуществления всю или часть воды в водной композиции добавляют с катализатором, то есть через раствор катализатора.

Содержание воды

По мере развития способов производства препаратов олигосахаридов вода может быть получена посредством реакции. Например, в некоторых вариантах осуществления воду получают (i) с образованием гликозидной связи, (ii) с образованием ангидро-субъединицы или (iii) с помощью других механизмов или источников. Поскольку обе реакции конденсации сахара и дегидратации включают воду, в некоторых вариантах

осуществления содержание воды влияет на состав олигосахаридного препарата.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления содержание воды влияет на вязкость водной композиции, что, в свою очередь, может влиять на эффективность смешивания водной композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления чрезмерно вязкая водная композиция может привести к нежелательному гетерогенному распределению катализатора в водной композиции. Более того, в некоторых вариантах очень низкое содержание воды может привести к затвердеванию водной композиции, что препятствует эффективному смешиванию. С другой стороны, в некоторых других вариантах осуществления чрезвычайно высокое содержание воды может препятствовать реакции конденсации сахара и понижать уровень ангидро-субъединиц. Соответственно, настоящее изобретение описывает подходящее содержание воды для производства олигосахаридных препаратов.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ производства олигосахаридного препарата включает формирование и/или нагревание водной композиции. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит примерно от 0% до 80%, примерно от 0% до 70%, примерно от 0% до 60%, примерно от 0% до 50%, примерно от 0% до 40%, примерно от 0% до 35%, примерно от 0% до 30%, примерно от 0% до 25%, примерно от 0% до 20%, примерно от 0% до 19%, примерно от 0% до 18%, примерно от 0% до 17%, примерно от 0% до 16%, примерно от 0% до 15%, примерно от 0% до 14%, примерно от 0% до 13 %, примерно от 0% до 12%, примерно от 0% до 11%, примерно от 0% до 10%, примерно от 0% до 9%, примерно от 0% до 8%, примерно от 0% % до 7%, примерно от 0% до 6%, примерно от 0% до 5%, примерно от 0% до 4%, примерно от 0% до 3%, примерно от 0% до 2% или примерно от 0% до 1% воды от общей массы. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 18%, примерно от 1% до 16%, примерно от 1% до 14%, примерно от 1% до 12%, примерно от 1% до 10%, примерно от 1% до 8%, примерно от 1% до 6% или примерно от 1% до 4% воды от общей массы. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит примерно от 3% до 16%, примерно от 3% до 14%, примерно от 3% до 12%, примерно от 3% до 10%, примерно от 3% до 8%, примерно от 3% до 6%, примерно от 5% до 16%, примерно от 5% до 14%, примерно от 5% до 12%, примерно от 5% до 10%, примерно от 7% до 16%, примерно от 7% до 14%, примерно от 7% до 12%, примерно от 7% до 10% или примерно от 8% до 10% воды от общей массы. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%,

примерно 12%, примерно 13%, примерно 14% или примерно 15% воды от общей массы. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит примерно 9% воды от общей массы. Однако следует понимать, что количество воды в водной композиции можно регулировать в зависимости от условий реакции и конкретного используемого катализатора. В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции, как описано выше, измеряют в начале реакции, например, перед нагреванием кормовых сахаров. В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции, описанной выше, измеряют в конце реакции полимеризации или конденсации. В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции, описанной выше, измеряют как среднее содержание воды в начале реакции и в конце реакции.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, может дополнительно включать мониторинг содержания воды, присутствующей в водной композиции, и/или отношения воды к сахарам или катализатору в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции, например, путем дистилляции. Для удаления воды из водной композиции можно использовать любой способ, известный в данной области техники, включая, например, вакуумную фильтрацию, вакуумную перегонку, нагревание, пар, горячий воздух и/или испарение.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящей заявке олигосахаридные препараты являются гигроскопичными. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гигроскопичность исходных сахаров и олигосахаридов, образующихся при полимеризации, может влиять на скорость, с которой вода может быть удалена из водной композиции.

В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции составляло примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 18%, примерно от 1% до 16%, примерно от 1% до 14%, примерно от 1% до 12%, примерно от 1% до 10%, примерно от 1% до 8%, примерно от 2% до 16% примерно от 2% до 14%, примерно от 2% до 12%, примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 6%, примерно от 4% до 16%, примерно от 4% до 14%, примерно от 4% до 12%, примерно от 4% до 10%, примерно от 4% до 8%, примерно от 6% до 16%, примерно от 6% до 12%, примерно от 6% до 10% или примерно от 6% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции

составило примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8% или примерно от 4% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции, так чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно от 4% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы в конце реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции было таким, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы в начале реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции было таким, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции таким образом, чтобы среднее содержание воды в водной композиции в начале и в конце реакции полимеризации и/или конденсации находилось в пределах диапазона, описанного выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает удаление по меньшей мере части воды из водной композиции, так чтобы на протяжении реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции было в пределах диапазона, описанного выше.

В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 18%, примерно от 1% до 16%, примерно от 1% до 14%, примерно от 1% до 12%, примерно от 1% до 10%, примерно от 1% до 8%, примерно от 2% до 16%, примерно от 2% до 14%, примерно от 2% до 12%, примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 6%, от примерно от 4% до 16%, примерно от 4% до 14%, примерно от 4% до 12%, примерно от 4% до 10%, примерно от 4% до 8%, примерно от 6% до 16%, примерно от 6% до 12%, примерно от 6% до 10% или примерно от 6% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8% или примерно от 4% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы

содержание воды в водной композиции составило примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию, так чтобы содержание воды в водной композиции составило примерно от 4% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы в конце реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции было таким, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы в начале реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции было таким, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию таким образом, чтобы среднее содержание воды в водной композиции в начале и в конце реакции полимеризации и/или конденсации находилось в пределах диапазона, описанного выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление по меньшей мере части воды в водную композицию, так чтобы на протяжении реакции полимеризации и/или конденсации содержание воды в водной композиции оставалось в пределах диапазона, описанного выше.

В некоторых вариантах осуществления степени полимеризации олигосахаридов и/или количество и тип ангидро-субъединиц в олигосахаридном препарате можно регулировать, устанавливая или контролируя содержание воды, присутствующей в водной композиции, на протяжении всего производственного процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления степень полимеризации олигосахаридов и количество ангидро-субъединиц увеличивают за счет уменьшения содержания воды.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает внутрипроцессный контроль (IPC) содержания воды, который может включать мониторинг содержания воды, поддержание содержания воды, увеличение содержания воды, уменьшение содержания воды или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления процесс IPC включает поддержание содержания воды, пока водная композиция нагревается до температуры, описанной в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления способ включает поддержание содержания воды в течение времени, достаточного для индукции полимеризации. В некоторых вариантах осуществления способ включает поддержание содержания воды в раскрытом диапазоне либо путем добавления воды, либо путем удаления воды из водной композиции, либо и того, и другого. В некоторых вариантах осуществления способ включает поддержание

содержания воды в раскрытом диапазоне путем перегонки. В некоторых вариантах осуществления способ включает поддержание содержания воды в раскрытом диапазоне с помощью вакуумной перегонки. В некоторых вариантах осуществления способ включает поддержание содержания воды в раскрытом диапазоне путем перегонки при атмосферном давлении.

В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции поддерживают в диапазоне примерно от 1% до 20%, примерно от 1% до 18%, примерно от 1% до 16%, примерно от 1% до 14%, примерно от 1% до 12%, примерно от 1% до 10%, примерно от 1% до 8%, примерно от 2% до 16%, примерно от 2% до 14% примерно от 2% до 12%, примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8%, примерно от 2% до 6%, примерно от 4% до 16%, примерно от 4% до 14%, примерно от 4% до 12%, примерно от 4% до 10%, примерно от 4% до 8%, примерно от 6% до 16%, примерно от 6% до 12%, примерно от 6% до 10% или примерно от 6% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции поддерживают в диапазоне примерно от 2% до 10%, примерно от 2% до 8% или примерно от 4% до 8% от общей массы. В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции поддерживают в диапазоне примерно от 2% до 8% от общей массы.

Содержание воды в водной композиции может быть определено множеством аналитических методов и инструментов. В некоторых вариантах осуществления содержание воды определяют методом испарения (например, методом потери массы при сушке), методом дистилляции или методом химической реакции (например, титрованием по Карлу Фишеру). В некоторых вариантах осуществления содержание воды определяют аналитическим прибором, таким как анализатор влажности. В некоторых вариантах осуществления содержание воды определяют титрованием по Карлу Фишеру.

В некоторых вариантах осуществления содержание воды в водной композиции измеряют во время реакции и используют для осуществления контроля содержания воды в процессе (IPC). В некоторых вариантах осуществления содержание воды в реакции измеряют титрованием по Карлу-Фишеру, ИК-спектроскопией, БИК-спектроскопией, по проводимости, вязкости, плотности, моменту перемешивания или энергии перемешивания. В некоторых вариантах осуществления измерение содержания воды в реакции используют для управления устройством, которое активно регулирует содержание воды в реакции, например, насосом для добавления воды или проточным клапаном.

Не желая углубляться в теорию, считается, что содержание воды во время реакции полимеризации сахара и/или конденсации может влиять на уровень ангидро-субъединиц в

описанном здесь олигосахаридном препарате. Например, как показано на фиг. 29, в некоторых вариантах осуществления более высокое содержание воды коррелирует с более низким уровнем ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления более низкая температура реакции может коррелировать с более низким уровнем содержания ангидро-субъединиц.

Температура

В некоторых вариантах осуществления, степени полимеризации олигосахаридов и/или количество и тип ангидро-субъединиц в препарате олигосахаридов можно регулировать путем регулирования температуры, до которой нагревают водную композицию. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ производства олигосахаридного препарата включает нагревание водной композиции до температуры примерно от 80°C до 250°C, примерно от 90°C до 200°C, примерно от 100°C до 200°C, примерно от 100°C до 180°C, примерно от 110°C до 170°C, примерно от 120°C до 160°C, примерно от 130°C до 150°C или примерно от 135°C до 145°C. В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата включает нагревание водной композиции до температуры примерно от 100°C до 200°C, примерно от 100°C до 180°C, примерно от 110°C до 170°C, примерно от 120°C примерно от 160°C до 160°C, примерно от 130°C до 150°C или примерно от 135°C до 145°C. В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата включает нагревание водной композиции до температуры примерно от 135°C до 145°C. В других вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата включает нагревание водной композиции до температуры примерно от 125°C до 135°C.

Время реакции

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ производства олигосахаридного препарата включает нагревание водной композиции в течение достаточного времени. В некоторых вариантах осуществления степень полимеризации олигосахаридов, полученных в соответствии с описанными здесь способами, может регулироваться временем реакции.

В некоторых вариантах осуществления достаточное время описывают количеством часов. Например, в некоторых вариантах осуществления достаточное время составляет по меньшей мере 30 минут, по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 3 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 5 часов, по меньшей мере 6 часов, по меньшей мере 7 часов, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 9 часов или по меньшей мере 10 часов. В некоторых вариантах осуществления достаточное время

составляет примерно от 1 до 24 часов, примерно от 1 до 16 часов, примерно от 1 до 8 часов, примерно от 1 до 4 часов, примерно от 1 до 3 часов, примерно от 1 до 2 часов, примерно от 2 до 12 часов, примерно от 2 до 10 часов, примерно от 2 до 8 часов, примерно от 2 до 6 часов, примерно от 2 до 4 часов, примерно от 3 до 8 часов, примерно от 3 до 6 часов, примерно от 3 до 5 часов или примерно от 3 до 4 часов.

В некоторых вариантах осуществления, достаточное время определяют путем измерения одного или нескольких химических или физических свойств олигосахаридного препарата, например, содержания воды, вязкости, молекулярной массы, содержания ангидро-субъединиц и/или распределения по степени полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу олигосахаридного препарата контролируют во время полимеризации. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для того, чтобы водная композиция достигла среднечисленной молекулярной массы или средневесовой молекулярной массы, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для достижения водной композиции среднечисленной молекулярной массы в диапазоне примерно от 300 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 5000 г/моль, примерно от 700 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 2000 г/моль, примерно от 700 до 2000 г/моль, примерно от 700 до 1500 г/моль, примерно от 300 до 1500 г/моль, примерно от 300 до 2000 г/моль, примерно от 400 до 1000 г/моль, примерно от 400 до 900 г/моль, примерно от 400 до 800 г/моль, примерно от 500 до 900 г/моль, или примерно от 500 до 800 г/моль. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для достижения водной композиции среднечисленной молекулярной массы примерно от 500 до 2000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для достижения водной композиции средневесовой молекулярной массы в диапазоне примерно от 300 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 5000 г/моль, примерно от 700 до 5000 г/моль, примерно от 500 до 2000 г/моль, примерно от 700 до 2000 г/моль, примерно от 700 до 1500 г/моль, примерно от 300 до 1500 г/моль, примерно от 300 до 2000 г/моль, примерно от 400 до 1300 г/моль, примерно от 400 до 1200 г/моль, примерно от 400 до 1100 г/моль, примерно от 500 до 1300 г/моль, примерно от 500 до 1200 г/моль, примерно от 500 до 1100 г/моль, примерно от 600 до 1300 г/моль, примерно от 600 до 1200 г/моль или примерно от 600 до 1100 г/моль. В некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для достижения водной композиции средневесовой молекулярной массы

примерно от 700 до 3000 г/моль.

В некоторых вариантах осуществления достаточное время - это время, необходимое водной композиции для достижения реакционного равновесия при соответствующей температуре реакции. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ включает нагревание водной композиции в течение времени, достаточного для того, чтобы водная композиция достигла равновесия. Например, в некоторых вариантах осуществления равновесие определяют путем измерения молекулярной массы, вязкости или распределения DP водной композиции.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют путем измерения среднечисленной или средневесовой молекулярной массы водной композиции. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяется среднечисленной или средневесовой молекулярной массой водной композиции, которая остается практически неизменной с течением времени. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяется изменением среднечисленной или средневесовой молекулярной массы водной композиции, которое составляет менее определенного процента в течение периода времени. В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу водной композиции измеряют с помощью ВЭЖХ или SEC.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по изменению среднечисленной или средневесовой молекулярной массы водной композиции менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% в течение периода времени. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют изменением среднечисленной или средневесовой молекулярной массы водной композиции в течение 3 часов, 2 часов, 1 часа, 30 минут, 20 минут или 10 минут. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют изменением средневесовой молекулярной массы водной композиции менее чем на 15% в течение 1 часа.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют путем измерения вязкости водной композиции. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по вязкости водной композиции, которая остается практически неизменной с течением времени. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по изменению вязкости водной композиции, которая составляет менее определенного процента в течение периода времени. В некоторых вариантах вязкость водной композиции измеряют вискозиметром или реометром.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по изменению вязкости водной композиции менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% за период времени. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по

изменению вязкости водной композиции в течение 3 часов, 2 часов, 1 часа, 30 минут, 20 минут или 10 минут. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют по изменению вязкости водной композиции менее чем на 15% за период 1 час.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют путем измерения распределения DP водной композиции. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют распределением DP водной композиции, которое остается по существу неизменным с течением времени. В некоторых вариантах осуществления изменение распределения DP водной композиции определяют путем вычисления ряда Km, где $Km = \frac{[DP_m][H_2O]}{[DP_{m-1}][DP1]}$, где $[H_2O]$ представляет собой молярную концентрацию воды (моль/л), а [DP1], [DPm-1] и [DPm] представляют собой молярные концентрации олигосахаридов (моль/л) в DP1, DPm-1 и DPm фракциях, соответственно. Например, K2 равно $[DP2][H_2O]/[DP1][DP1]$ согласно приведенной более формуле. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число более 1 и менее n. В других вариантах осуществления m равно n. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число больше 1 и или равное n или менее. В некоторых вариантах осуществления m равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридов во фракциях DP1, DPm-1 и DPm определяют с помощью SEC, ВЭЖХ, ПФП, A4F, масс-спектрометрии или любого другого подходящего метода. В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридов во фракциях DP1, DPm-1 и DPm определяют с помощью SEC, например, GPC. В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридов во фракциях DP1, DPm-1 и DPm определяют масс-спектрометрией, такой как ГХ-МС, ЖХ-МС/МС и MALDI-MC. В некоторых вариантах осуществления концентрацию олигосахаридов во фракциях DP1, DPm-1 и DPm определяют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления концентрацию воды определяют методом испарения (например, методом потери при сушке), методом дистилляции или методом химической реакции (например, титрованием по Карлу Фишеру). В некоторых вариантах осуществления концентрацию воды определяют любым подходящим аналитическим прибором, таким как анализатор влажности.

В некоторых вариантах осуществления способ включает вычисление ряда из по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40 или по меньшей мере 50 значений Km. В некоторых вариантах осуществления способ включает вычисление ряда из по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по

меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 15 значений Km. В некоторых вариантах осуществления способ включает вычисление примерно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 значений Km. В некоторых вариантах осуществления способ включает вычисление от K2 до K4, от K2 до K5, от K2 до K6, от K2 до K7, от K2 до K8, от K2 до K9, от K2 до K10, от K2 до K11, от K2 до K12, от K2 до K13, от K2 до K14, от K2 до K15, от K3 до K5, от K3 до K6, от K3 до K7, от K3 до K8, от K3 до K9, от K3 до K10, от K3 до K11, от K3 до K12, от K3 до K13, от K3 до K14, или от K3 до K15. В некоторых вариантах осуществления способ включает вычисление от K2 до K4 или от K3 до K5.

В некоторых вариантах осуществления значение Km зависит от температуры, концентрации воды и/или количества и типа кормовых сахаров. В некоторых вариантах осуществления Km составляет примерно от 0,1 до 100, примерно от 0,1 до 90, примерно от 0,1 до 80, примерно от 0,1 до 70, примерно от 0,1 до 60, примерно от 0,1 до 50, примерно от 0,1 до 40, примерно от 0,1 до 30, примерно от 0,1 до 25, примерно от 0,1 до 20 или примерно от 0,1 до 15. В некоторых вариантах осуществления Km составляет примерно от 1 до 100, примерно от 1 до 90, примерно от 1 до 80, примерно от 1 до 70, примерно от 1 до 60, примерно от 1 до 50, примерно от 1 до 40, примерно от 1 до 30, примерно от 1 до 25, примерно от 1 до 20, примерно от 1 до 15, примерно от 1 до 10, примерно от 5 до 50, примерно от 5 до 40, примерно от 5 до 30, примерно от 5 до 20, примерно от 5 до 15 или примерно от 5 до 10. В некоторых вариантах осуществления Km составляет примерно от 1 до 15 или примерно от 5 до 15.

В некоторых вариантах осуществления для ряда рассчитанных Km определяют среднее значение, стандартное отклонение и/или относительное стандартное отклонение. В данном контексте относительное стандартное отклонение выражают в процентах и получают путем умножения стандартного отклонения на 100 и деления этого произведения на среднее значение.

В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют относительным стандартным отклонением ряда Km менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 9 %, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1%. В некоторых вариантах осуществления равновесие определяют относительным стандартным отклонением ряда Km менее 15%, менее 10% или менее 5%.

Стадии после реакции

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ производства олигосахаридных препаратов дополнительно включает одну или несколько дополнительных стадий обработки после нагревания водной композиции при температуре

и в течение достаточного времени. В некоторых вариантах осуществления дополнительные стадии обработки включают, например, разделение (такое как хроматографическое разделение), разбавление, концентрирование, сушку, фильтрацию, деминерализацию, экстракцию, обесцвечивание или любую их комбинацию. Например, в некоторых вариантах осуществления способ включает стадию разбавления и стадию обесцвечивания. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию фильтрации и стадию сушки.

В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию разбавления, на которой воду добавляют в олигосахаридный препарат для получения сиропа олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления концентрация олигосахаридного препарата в сиропе составляет примерно от 5% до 80%, примерно от 10% до 70%, примерно от 10% до 60%, примерно от 10% до 50%, примерно от 10% до 40%, примерно от 10% до 30%, или примерно от 15% до 25%. В других вариантах осуществления способ не включает стадию разбавления, а скорее олигосахаридному препарату дают затвердеть. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию фильтрации. В некоторых вариантах осуществления способ включает рециркуляцию катализатора путем фильтрации.

В некоторых вариантах осуществления описанный способ включает стадию обесцвечивания. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат может подвергаться стадии обесцвечивания с использованием любого метода, известного в данной области техники, включая, например, обработку абсорбентом, активированным углем, хроматографию (например, с использованием ионообменной смолы), гидрирование и/или фильтрацию (например, микрофильтрацию).

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат приводят в контакт с материалом для удаления солей, минералов и/или других ионных частиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат пропускают через пару анионно/катионообменных колонок. В одном варианте осуществления анионообменная колонка содержит слабую смолу для обмена оснований в форме гидроксида, а катионообменная колонка содержит сильную смолу для обмена кислот в протонированной форме.

В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию концентрирования. В некоторых вариантах осуществления на стадии концентрирования получают олигосахаридный препарат с повышенной концентрацией. Например, в некоторых вариантах осуществления стадия концентрирования включает выпаривание (например, вакуумное испарение), сушку (например, лиофилизацию и распылительную

сушку) или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию выделения, на которой отделяют по меньшей мере часть олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления стадия выделения включает кристаллизацию, осаждение, фильтрацию (например, вакуумную фильтрацию) и центрифугирование, или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию разделения. В некоторых вариантах осуществления стадия разделения включает отделение по меньшей мере части олигосахаридного препарата по меньшей мере от части катализатора, по меньшей мере от части непрореагировавших исходных сахаров, или от того и другого. В некоторых вариантах осуществления стадия разделения включает фильтрацию, хроматографию, дифференциальную растворимость, осаждение, экстракцию или центрифугирование.

Реакторы

Описанные в настоящей заявке способы могут включать использование одного или нескольких реакторов, подходящих для конденсации сахара, с учетом температуры реакции, pH, давления и других факторов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько подходящих реакторов включают реактор периодического действия с подпиткой и перемешиванием, реактор периодического действия с мешалкой, реактор с непрерывным потоком с мешалкой, реактор непрерывного действия с поршневым потоком, реактор с истиранием или реактор с перемешиванием, индуцируемым электромагнитным полем. В некоторых вариантах осуществления один или несколько подходящих реакторов включают реактор, описанный в Ryu, S. K., and Lee, J. M., Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, Biotechnol. Bioeng. 25: 53-65(1983); Gusakov, A. V., and Sinitsyn, A. P., Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process, Enz. Microb. TechnoL, 7: 346-352 (1985); Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field, Appl. Biochem. Biotechnol., 56: 141-153(1996); or Fernanda de Castilhos Corazza, Flavio Faria de Moraes, Gisella Maria Zanin and Ivo Neitzel, Optimal control in fed-batch reactor for the cellobiose hydrolysis, Acta Scientiarum. Technology, 25: 33-38 (2003).

В некоторых вариантах осуществления один или несколько подходящих реакторов включают реакторы с псевдоожиженным слоем, с бланкетом с восходящим потоком, с иммобилизацией, или реакторы экструдерного типа для гидролиза и/или ферментации. В

некоторых вариантах осуществления один или несколько подходящих реакторов включают открытый реактор, закрытый реактор, или оба из них. В некоторых вариантах осуществления, когда способ включает непрерывный процесс, один или несколько подходящих реакторов могут включать смеситель непрерывного действия, такой как шнековый смеситель.

Процесс

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ производства олигосахаридных препаратов включает периодический процесс, непрерывный процесс или и то, и другое. В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата включает периодический процесс. Например, в некоторых вариантах осуществления периодического процесса производство последующих партий олигосахаридного препарата не начинают до завершения текущей партии. В некоторых вариантах осуществления во время периодического процесса весь препарат или существенное количество олигосахаридного препарата удаляют из реактора. В некоторых вариантах осуществления во время периодического процесса все кормовые сахара и катализатор объединяют в реакторе до того, как водная композиция нагревается до описанной температуры или до того, как инициируют полимеризацию. В некоторых вариантах осуществления во время периодического процесса кормовые сахара добавляют до, после или одновременно с добавлением катализатора.

В некоторых вариантах осуществления периодический процесс представляет собой периодический процесс с подпиткой, в котором все кормовые сахара не добавляют в реактор одновременно. В некоторых вариантах осуществления периодического процесса с подпиткой по меньшей мере часть кормовых сахаров добавляют в реактор во время полимеризации или после того, как водная композиция нагревается до описанной температуры. В некоторых вариантах осуществления периодического процесса с подпиткой по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 60% по массе кормовых сахаров добавляют в реактор во время полимеризации или после того, как водная композиция нагревается до описанной температуры.

В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридного препарата представляет собой непрерывный процесс. Например, в некоторых вариантах осуществления непрерывного процесса содержимое реактора непрерывно протекает через реактор. В некоторых вариантах осуществления комбинацию исходных сахаров с катализатором и удаление по меньшей мере части олигосахаридного препарата выполняют одновременно.

В некоторых вариантах осуществления способ производства олигосахаридного

препарата включает однореакторный и многореакторный процесс. Например, в некоторых вариантах осуществления однореакторного процесса полимеризацию проводят в одном реакторе. В качестве другого примера, в некоторых вариантах осуществления многореакторного процесса полимеризацию проводят в более чем одном реакторе. В некоторых вариантах осуществления многореакторного процесса способ включает 2, 3 или более реакторов. В некоторых вариантах осуществления многореакторного процесса способ включает стадию комбинирования, на которой объединяют продукты полимеризации из двух или более реакторов.

V. Питательная композиция, содержащая ангидро-субъединицы

В настоящей заявке представлены питательные композиции, содержащие олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлены питательные композиции, содержащие описанный олигосахаридный препарат, где присутствие и/или концентрация олигосахаридного препарата в составе питательных композиций могут быть выборочно определены и/или обнаружены. Олигосахаридные препараты, которые демонстрируют сложную функциональную модуляцию микробного сообщества, могут быть важными компонентами питательных композиций. Таким образом, присутствие и/или концентрация олигосахаридного препарата в питательных композициях может быть одним из факторов, которые необходимо измерять в процессе контроля качества и производства питательных композиций. Соответственно, предлагаемые питательные композиции являются выгодными с точки зрения контроля качества и производственных целей, поскольку присутствие и/или концентрация олигосахаридного препарата могут быть выборочно определены и/или обнаружены. Например, в некоторых вариантах осуществления присутствие и концентрацию олигосахаридного препарата можно определить и/или обнаружить путем измерения сигнала, связанного с олигосахаридами, содержащими ангидро-субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления питательная композиция представляет собой кормовую композицию для животных. В некоторых вариантах осуществления питательная композиция включает основную питательную композицию.

Основные питательные композиции

В некоторых вариантах осуществления описанная в настоящей заявке питательная композиция содержит основную питательную композицию и описанный олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит источник углеводов, отличный от олигосахаридного препарата. Например, в некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция включает

натуральный источник углеводов (или натуральную олигосахаридную композицию), такой как крахмал и растительные волокна. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит крахмал. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит растительные волокна.

В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит один или несколько источников углеводов, которые получены из семян, корней, клубней, кукурузы, тапиоки, маранта, пшеницы, риса, картофеля, сладкого картофеля, саго, бобов (например, кормовых бобов, чечевицы, бобов мунг, гороха и нута), кукурузы, маниоки или других крахмалистых продуктов (например, желудей, маранта, арракачи, бананов, ячменя, плодов хлебного дерева, гречки, канны, колоказии, кандыка японского, пуэрарии, ксантозомы, проса, овса, кислицы клубненосной, полинезийского маранта, сорго, ржи, таро, каштана, водяного ореха и ямса).

В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит один или несколько источников углеводов, которые получены из бобовых (например, гороха, соевых бобов, люпина, зеленой фасоли и других бобов), овса, ржи, чиа, ячменя, фруктов (например, инжира, авокадо, сливы, чернослива, ягод, бананов, кожуры яблока, айвы и груши), овощей (например, брокколи, моркови, цветной капусты, кабачков, сельдерея, нопала и топинамбура), корневых клубней, корнеплодов (например, сладкого картофеля и лука), шелухи семян подорожника, семян (например, семян льна), орехов (например, миндаля), цельнозерновых продуктов, пшеницы, кукурузных отрубей, лигнанов или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления композиция включает одно или несколько растительных волокон, полученных из пшеничных отрубей, жома сахарной свеклы, пушистых семян хлопка, шелухи сои или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит менее 500 ч./млн., менее 400 ч./млн., менее 300 ч./млн., менее 200 ч./млн., менее 100 ч./млн., менее 50 ч./млн., менее 10 ч./млн., менее 5 ч./млн. или менее 1 ч./млн ангидро-субъединиц или олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит менее 50 ч./млн, менее 10 ч./млн, менее 5 ч./млн или менее 1 ч./млн. ангидро-субъединиц или олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция по существу не содержит ангидро-субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления в основной питательной композиции отсутствует определяемый уровень ангидро-субъединиц. В зависимости от методов детекции или определения уровень ангидро-субъединиц ниже определенного порога

может быть не обнаруживаемым. Например, в некоторых вариантах осуществления обнаруживаемый уровень ангидро-субъединиц может относиться к по меньшей мере 1000 ч./млн., по меньшей мере 500 ч./млн., по меньшей мере 400 ч./млн., по меньшей мере 300 ч./млн., по меньшей мере 200 ч./млн., по меньшей мере 100 ч./млн., по меньшей мере 50 ч./млн., по меньшей мере 10 ч./млн., по меньшей мере 5 ч./млн. или по меньшей мере 1 ч./млн. ангидро-субъединиц или олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в основной питательной композиции.

В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит множество олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция включает распределение типа гликозидной связи, которое отличается от олигосахаридного препарата. Например, в некоторых вариантах осуществления основная питательная композиция содержит более высокий процент α-(1,4) гликозидных связей, чем олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи, такие как α-(1,4) гликозидные связи в основных питательных композициях, расщепляются одним или несколькими ферментами. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи в основной питательной композиции легче расщепляются и/или гидролизуются, чем гликозидные связи в олигосахаридном препарате.

В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,2) гликозидной связи, α-(1,3) гликозидной связи, α-(1,6) гликозидной связи, β-(1,2) гликозидной связи, β-(1,3) гликозидной связи, β-(1,4) гликозидной связи или β-(1,6) гликозидной связи в основной питательной композиции по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, по меньшей мере на 13%, по меньшей мере на 14%, или по меньшей мере на 15% ниже уровня соответствующей гликозидной связи в олигосахаридном препарате. В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,2) гликозидной связи, α-(1,3) гликозидной связи, α-(1,6) гликозидной связи, β-(1,2) гликозидной связи, β-(1,3) гликозидной связи, β-(1,4) гликозидной связи или β-(1,6) гликозидной связи в основной питательной композиции по меньшей мере на 10% ниже уровня соответствующей гликозидной связи в олигосахаридном препарате.

В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,4) гликозидной связи в основной питательной композиции по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 5%

или по меньшей мере на 2% выше уровня α-(1,4) гликозидной связи в олигосахаридном препарате. В некоторых вариантах осуществления уровень α-(1,4) гликозидной связи в основной питательной композиции по меньшей мере на 10% выше уровня α-(1,4) гликозидной связи в олигосахаридном препарате.

Кормовая композиция для животных

В зависимости от типа и возраста животного питательная композиция может содержать олигосахаридный препарат и основную питательную композицию в различных соотношениях. Например, олигосахаридный препарат можно комбинировать с основной питательной композицией в различных соотношениях, подходящих для типа и возраста животного. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации примерно от 1 до 10000 ч./млн., примерно от 1 до 5000 ч./млн., примерно от 1 до 3000 ч./млн., примерно от 1 до 2000 ч./млн., от примерно от 1 до 1500 ч./млн., примерно от 1 до 1000 ч./млн., примерно от 1 до 500 ч./млн., примерно от 1 до 250 ч./млн., примерно от 1 до 100 ч./млн., примерно от 10 до 5000 ч./млн., примерно от 10 до 3000 ч./млн., примерно от 10 до 2000 ч./млн., примерно от 10 до 1500 ч./млн., примерно от 10 до 1000 ч./млн., примерно от 10 до 500 ч./млн., примерно от 10 до 250 ч./млн., примерно от 10 до 100 ч./млн., примерно от 50 до 5000 ч./млн., примерно от 50 до 3000 ч./млн., примерно от 50 до 2000 ч./млн., примерно от 50 до 1500 ч./млн., примерно от 50 до 1000 ч./млн., примерно от 50 до 500 ч./млн., примерно от 50 до 250 ч./млн., примерно от 50 до 100 ч./млн., примерно от 100 до 5000 ч./млн., примерно от 100 до 3000 ч./млн., от примерно от 100 до 2000 ч./млн., примерно от 100 до 1500 ч./млн., примерно от 100 до 1000 ч./млн., примерно от 100 до 500 ч./млн., примерно от 100 до 400 ч./млн., примерно от 100 до 300 ч./млн., примерно от 100 до 200 ч./млн., примерно от 200 до 5000 ч./млн., примерно от 200 до 3000 ч./млн., примерно от 200 до 2500 ч./млн., примерно от 200 до 2000 ч./млн., примерно от 200 до 1500 ч./млн., примерно от 200 до 1000 ч./млн., примерно от 200 до 500 ч./млн., примерно от 500 до 5000 ч./млн., примерно от 500 до 3000 ч./млн., примерно от 500 до 2500 ч./млн., примерно от 500 до 2000 ч./млн., примерно от 500 до 1500 ч./млн. или примерно от 500 до 1000 ч./млн. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации примерно от 1 до 5000 ч./млн., примерно от 1 до 1000 ч./млн., примерно от 1 до 500 ч./млн., примерно от 10 до 5000 ч./млн., примерно от 10 до 2000 ч./млн., примерно от 10 до 1000 ч./млн., примерно от 10 до 500 ч./млн., примерно от 10 до 250 ч./млн., примерно от 10 до 100 ч./млн., примерно от 50 до 5000 ч./млн., примерно от 50 до 2000 ч./млн., примерно от 50 до 1000 ч./млн., примерно от 50 до 500 ч./млн., примерно от 50 до 250 ч./млн. или примерно от 50 до 100 ч./млн.. В некоторых

вариантах осуществления олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации примерно от 1 до 5000 ч./млн., примерно от 10 до 1000 ч./млн., примерно от 10 до 500 ч./млн. или примерно от 50 до 500 ч./млн.

В некоторых вариантах осуществления, олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации более 10 ч./млн., более 50 ч./млн., более 100 ч./млн., более 200 ч./млн., более 300 ч./млн., более 400 ч./млн., более 500 ч./млн., более 600 ч./млн., более 1000 ч./млн. или более 2000 ч./млн. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации более 10 ч./млн., более 50 ч./млн., более 100 ч./млн., более 200 ч./млн. или более 500 ч./млн.

В некоторых вариантах осуществления в зависимости от типа и возраста животного, питательная композиция может дополнительно включать белки, минералы (такие как медь, кальций и цинк), соли, незаменимые аминокислоты, витамины и/или антибиотики.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке описаны способы производства питательных композиций для кормов для животных. В некоторых вариантах осуществления животное выбрано из крупного рогатого скота (например, мясного и молочного скота), свиней, водных животных, домашних птиц и человека. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой свинью, такую как свиноматки, поросята и боровы. В других вариантах осуществления животное представляет собой домашнюю птицу, такую как цыпленок, утка, индейка, гусь, перепел и курица. В некоторых вариантах осуществления изобретения домашняя птица представляет собой бройлера, племенную птицу или несушку. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой водное животное, такое как лосось, сом, окунь, угорь, тилапия, камбала, креветка и краб. В некоторых вариантах осуществления питательную композицию дают животному в сухой форме, жидкой форме, в виде пасты, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления форма применения, скорость кормления и режим кормления могут варьировать в зависимости от типа и возраста животного.

Способы производства питательных композиций

В настоящей заявке представлены способы производства питательной композиции, включающие объединение олигосахаридного препарата с основной питательной композицией. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат включает распределение типа гликозидной

связи, которое отличается от такового в основной питательной композиции.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат представляет собой синтетический олигосахаридный препарат. В некоторых вариантах осуществления синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn). В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное 2 или более. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число больше 2. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное 3 или более. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 или 50. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций DP1-DPn включает от 0,1% до 90% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций DP1 и DP2 олигосахаридного препарата независимо включает примерно от 0,1% до 15% или примерно от 0,5% до 10% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления каждая из фракций DP1 и DP2 олигосахаридного препарата независимо включает олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, в диапазоне примерно от 0,1%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4% или 1,5% до 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 15% или 20% по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенности олигосахаридов в каждой из n фракций монотонно уменьшается со степенью полимеризации. В некоторых вариантах осуществления относительная распространенность олигосахаридов по меньшей мере в 5, 10, 20 или 30 фракциях DP монотонно уменьшается со степенью полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления способ производства питательной композиции включает смешивание олигосахаридного препарата с основной питательной композицией. Например, в некоторых вариантах осуществления смешивание может быть выполнено с помощью промышленного смесителя и/или такого смесителя, как барабанный смеситель, двухконусный смеситель, ленточный смеситель, V-образный смеситель, смеситель со сдвиговым усилием и лопастной смеситель.

В некоторых вариантах осуществления способ производства питательной композиции дополнительно включает описанную в настоящей заявке стадию контроля качества. В некоторых вариантах осуществления описанная здесь стадия контроля

качества включает определение уровня сигнала в образце питательной композиции и вычисление концентрации олигосахаридного препарата в питательной композиции на основе уровня сигнала. В некоторых вариантах осуществления описанная здесь стадия контроля качества включает детекцию сигнала в образце питательной композиции с помощью аналитических приборов, и приемку или браковку партии питательной композиции на основании наличия или отсутствия сигнала. В некоторых вариантах осуществления описанная здесь стадия контроля качества включает детекцию с помощью аналитических приборов наличия или отсутствия первого сигнала в первом образце питательной композиции и второго сигнала во втором образце питательной композиции и сравнение первого сигнала и второго сигнала. В некоторых вариантах осуществления сигнал, первый сигнал и/или второй сигнал (i) указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц; (ii) ассоциирован с распределением олигосахаридов по степени полимеризации (DP); или (iii) ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α-гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления способ производства питательной композиции включает после выполнения стадии контроля качества дополнительное смешивание олигосахаридного препарата с основной питательной композицией, регуляцию уровня олигосахаридного препарата, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления регуляция уровня олигосахаридного препарата включает добавление дополнительного олигосахаридного препарата в питательную композицию или удаление части олигосахаридного препарата из питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления регуляция уровня олигосахаридного препарата включает добавление дополнительной основной питательной композиции в питательную композицию или удаление части основной питательной композиции из питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления регуляция уровня олигосахаридного препарата включает добавление дополнительного олигосахаридного препарата в питательную композицию.

VI. Способ корреляции олигосахаридного препарата

В настоящей заявке представлены способы корреляции присутствия, отсутствия и/или концентрации описанного олигосахаридного препарата в питательной композиции. В настоящей заявке предложены способы осуществления способа контроля качества в

процессе производства питательных композиций, содержащих олигосахаридный препарат и основную питательную композицию. В настоящей заявке представлены способы определения качества питательных композиций, содержащих олигосахаридный препарат и основную питательную композицию. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке описаны способы корреляции синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления способ корреляции может относиться к установлению, соотнесению и/или связыванию отношений между двумя предметами, а также может относиться к сравнению присутствия и количества двух предметов и оценке соотношения двух предметов. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке описаны способы определения концентрации, присутствия и/или отсутствия синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления питательная композиция включает описанный синтетический олигосахаридный препарат и натуральную олигосахаридную композицию (например, основную питательную композицию).

В некоторых вариантах осуществления, используемых в настоящей заявке, термин «качество» может относиться к уровню олигосахаридного препарата (например, синтетического олигосахаридного препарата) в питательной композиции; например, находится ли уровень в заданном диапазоне, таком как от 1 до 5000 ч./млн., от 10 до 1000 ч./млн., от 10 до 500 ч./млн. или от 50 до 500 ч./млн. В некоторых вариантах осуществления термин «качество» может относиться к уровню олигосахаридного препарата в питательной композиции, что подтверждается сигналом, показанным аналитическим прибором; например, присутствием или отсутствием указанного пика на хроматограмме или спектре ЯМР, ГХ-МС, ЖХ-МС/МС, MALDI-MS или ВЭЖХ и/или при определении массы.

В некоторых вариантах осуществления термин «качество» может относиться к распределению олигосахаридного препарата (например, синтетического олигосахаридного препарата) в питательной композиции, например, относительно того, равномерно и однородно ли распределен олигосахаридный препарат в питательной композиции. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления качество партии питательной композиции можно определить путем сравнения уровней и/или сигналов олигосахаридного препарата в двух или более образцах питательной композиции, взятых из одной и той же партии. В некоторых вариантах осуществления качество партии питательной композиции может быть определено путем сравнения уровней и/или сигналов олигосахаридного препарата в двух или более образцах питательной

композиции, взятых из разных партий.

Таким образом, в настоящей заявке предложен способ количественной оценки олигосахаридного препарата в питательной композиции, включающий определение уровня сигнала в образце питательной композиции и расчет концентрации олигосахаридного препарата в питательной композиции на основе уровня сигнала. В настоящей заявке предложен способ выполнения контроля качества питательной композиции, включающий детекцию сигнала в образце питательной композиции с помощью аналитических приборов и приемку или браковку партии питательной композиции на основании наличия или отсутствия сигнала. Кроме того, в настоящей заявке предложен способ выполнения контроля качества питательной композиции, включающий детекцию с помощью аналитических приборов наличия или отсутствия первого сигнала в первом образце питательной композиции и второго сигнала во втором образце питательной композиции, и сравнение первого сигнала и второго сигнала. В некоторых вариантах осуществления сигнал, первый сигнал и/или второй сигнал (i) указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц; (ii) ассоциирован с распределением олигосахаридов по степени полимеризации (DP); или (iii) ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке описан способ количественного определения синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции, включающей синтетический олигосахаридный препарат и натуральную олигосахаридную композицию, где способ включает (a) определение уровня сигнала в образце питательной композиции, и (b) корреляцию концентрации олигосахаридного препарата в питательной композиции на основе уровня сигнала, где сигнал (i) указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц; (ii) ассоциирован с распределением олигосахаридов по степени полимеризации (DP); (iii) ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связи, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке описан способ выполнения контроля качества питательной композиции,

включающий (a) обеспечение партии питательной композиции, содержащей синтетический олигосахаридный препарат и натуральную олигосахаридную композицию; (b) получение образца питательной композиции из партии; (c) детекцию сигнала по меньшей мере части олигосахаридов в образце питательной композиции с помощью аналитических приборов; и (d) приемку или браковку партии питательной композиции; при этом сигнал (i) указывает на наличие олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц; (ii) ассоциирован с распределением олигосахаридов по степени полимеризации (DP); или (iii) ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидные связи, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β-гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке описан способ выполнения контроля качества питательной композиции, включающий (a) обеспечение образца питательной композиции, включающей натуральную олигосахаридную композицию; (b) детекцию сигнала по меньшей мере части олигосахаридов в образце питательной композиции с помощью аналитических приборов, и где сигнал (i) указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц; (ii) ассоциирован с распределением олигосахаридов по степени полимеризации (DP); или (iii) ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления сигнал указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке описан способ выполнения контроля качества питательной композиции, содержащей синтетический олигосахаридный препарат и натуральную олигосахаридную композицию, причем способ включает: (a) детекцию с помощью аналитических инструментов наличия или отсутствия первого сигнала в первом образце питательной композиции и второго сигнала во втором образце питательной композиции; и (b) сравнение первого сигнала и второго сигнала, при этом первый сигнал и второй сигнал (i) указывают на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц; (ii) ассоциированы с распределением олигосахаридов по степени полимеризации (DP); или (iii) ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-

(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β-гликозидными связями олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и/или второй сигнал указывают на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц.

В зависимости от их типов, сигнал (например, уровень сигнала), первый сигнал и/или второй сигнал могут быть определены или обнаружены любыми подходящими аналитическими методами, включая, помимо прочего, ЯМР, ВЭЖХ, SEC, ПФП, A4F, ГХ, ЖХ, ГХ-МС, ЖХ-МС/МС, MALDI-MS, ИК- или КД-спектроскопию, но не ограничиваясь ими. Уровень сигнала, первого сигнала и/или второго сигнала может быть определен или обнаружен путем очистки образца с использованием ЖХ и взвешивания образца. В некоторых вариантах осуществления сигнал описанного олигосахаридного препарата определяют или обнаруживают с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления сигнал описанного олигосахаридного препарата определяют или обнаруживают с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления сигнал описанного олигосахаридного препарата определяют или обнаруживают с помощью ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления сигнал описанного олигосахаридного препарата определяют или обнаруживают с помощью ЯМР, такого как 2D HSQC ЯМР. В некоторых вариантах осуществления относительную распространенность или концентрацию описанного олигосахаридного препарата, или то и другое рассчитывают на основе уровня сигнала олигосахаридного препарата, например, относительной распространенности одного или нескольких пиков в масс-спектре, или интенсивности одного или несколько пиков в спектре ЯМР.

Сигнал ангидро-субъединиц

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает детекцию сигнала олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь сигнал олигосахаридного препарата указывает на наличие олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает обнаружение двух или более сигналов, то есть первого сигнала, второго сигнала и т.д. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого сигнала и второго сигнала указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления как первый сигнал, так и второй сигнал являются показателем олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления сигнал, который указывает на

олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, может быть определен или обнаружен любым подходящим аналитическим оборудованием, включая жидкостную хроматографию (такую как ВЭЖХ), ПФП, A4F, ЯМР, SEC, масс-спектрометрию, такую как ЖХ-МС/МС, ГХ-МС и MALDI-MS, но не ограничиваясь ими. В контексте настоящего описания, в некоторых вариантах осуществления сигнал, который указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, может включать сигнал, характерный для олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления сигнал, который указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, включает один или несколько пиков в масс-спектре, ЯМР или жидкостной хроматографии (такой как ВЭЖХ) и/или при определении массы, которые характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько пиков в масс-спектре, ЯМР или жидкостной хроматографии (например, ВЭЖХ) и/или при определении массы характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, которые происходят из олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления один или несколько пиков в масс-спектре, ЯМР или жидкостной хроматографии (например, ВЭЖХ) и/или при определении массы характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в любой из фракций DP1-DPn в олигосахаридном препарате. В некоторых вариантах осуществления один или несколько пиков в масс-спектре, ЯМР или жидкостной хроматографии (например, ВЭЖХ) и/или при определении массы характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления один или несколько пиков в масс-спектре, ЯМР или жидкостной хроматографии (например, ВЭЖХ) и/или при определении массы характерны для левоглюкозана, 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления сигнал, который указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, включает один или несколько пиков в масс-спектре, ЯМР или жидкостной хроматографии (такой как ВЭЖХ) и/или при определении массы, которые характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления один или несколько пиков в масс-спектре, ЯМР или жидкостной хроматографии (например, ВЭЖХ) и/или при определении массы характерны для ангидроцеллобиозы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько пиков в масс-спектре, ЯМР или жидкостной хроматографии (такой как ВЭЖХ) и/или при определении массы характерны

для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP3, DP4, DP5 или DP6.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько пиков в масс-спектре, ЯМР или жидкостной хроматографии (такой как ВЭЖХ) и/или при определении массы характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из более чем одной фракции. Например, в некоторых вариантах осуществления сигнал характерен для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракций DP1 и DP2. В некоторых вариантах осуществления сигнал характерен для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракций DP1, DP2 и DP3.

Например, в некоторых вариантах осуществления сигнал, который указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, включает один или несколько пиков в масс-спектре, которые характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления сигнал, который указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, включает один или несколько пиков в масс-спектре, которые характерны для олигосахаридов, содержащим ангидро-субъединицы, во фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления сигнал, который указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, включает определение массы DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления определение массы выполняют по меньшей мере для части DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, выделенных и/или очищенных препаративной хроматографией.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает детекцию двух или более сигналов, то есть первого сигнала, второго сигнала, третьего сигнала и т.д. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй сигнал характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в той же фракции. Например, в некоторых вариантах осуществления первый сигнал характерен для левоглюкозана, а второй сигнал характерен для 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй сигнал характерны для одного и того же вида олигосахарида, содержащего ангидро-субъединицы. Например, в некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй сигнал характерны для 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй сигнал характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из разных фракций. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал и второй сигнал характерны для различных видов олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. Например, в некоторых вариантах осуществления первый сигнал характерен для

левоглюкозана, а второй сигнал характерен для ангидроцеллобиозы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого сигнала и второго сигнала, характерный для олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц, содержит один или несколько пиков в масс-спектре, которые характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого сигнала и второго сигнала, указывающих на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, содержит один или несколько пиков в масс-спектре, которые характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого сигнала и второго сигнала, указывающих на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, включает определение массы DP1 и/или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления как первый, так и второй сигнал, указывающие на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, включает один или несколько пиков в масс-спектре, которые характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP2, таких как ангидроцеллобиоза. В некоторых вариантах осуществления как первый сигнал, так и второй сигнал, которые указывают на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, включают один или несколько пиков в масс-спектре, которые характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP1, таких как левоглюкозан, 1,6-ангидро-β-D-глюкофураноза или их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицу, из фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для левоглюкозана, 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для левоглюкозана, 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления один или более из сигнала, первого сигнала и

второго сигнала характерны для ангидроцеллобиозы. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для ангидроцеллобиозы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракции DP3. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракции DP3.

В некоторых вариантах осуществления уровень описанного сигнала может быть определен с помощью любого подходящего аналитического оборудования, включая весы, жидкостную хроматографию (например, ВЭЖХ), ЯМР, SEC, масс-спектрометрию, такую как ЖХ-МС/МС, ГХ-ПИД, ГХ-МС и MALDI-MS, но не ограничиваясь ими. Например, в некоторых вариантах осуществления уровень сигнала представляет собой относительное содержание одного или нескольких видов олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, представленных сигналом. В некоторых вариантах осуществления уровень сигнала представляет собой концентрацию одного или нескольких видов олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, представленных сигналом. В некоторых вариантах осуществления уровень сигнала представляет собой массу по меньшей мере части изолированной фракции описанного олигосахаридного препарата (например, DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы).

Сигнал гликозидных связей

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке сигнал ассоциирован с одной или несколькими гликозидными связями. Например, в некоторых вариантах осуществления сигнал ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,4) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями или любой их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления сигнал ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями или β-(1,6) гликозидными связями.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает обнаружение двух или более сигналов, то есть первого сигнала, второго сигнала, третьего сигнала и т.д. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого сигнала и второго сигнала ассоциирован с одной или несколькими гликозидными связями. Например, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из

первого сигнала и второго сигнала ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,4) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями или любой их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого сигнала и второго сигнала ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями или β-(1,6) гликозидными связями.

В некоторых вариантах осуществления как первый сигнал, так и второй сигнал ассоциированы с одной или несколькими гликозидными связями. Например, в некоторых вариантах осуществления как первый сигнал, так и второй сигнал ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,4) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями или любой их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления как первый сигнал, так и второй сигнал связаны с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями или β-(1,6) гликозидными связями.

В некоторых вариантах осуществления сигнал, который связан с одной или несколькими гликозидными связями, может быть определен или обнаружен с помощью любого подходящего аналитического оборудования, такого как ЯМР, включая 1D ^{1}H ЯМР, 1D ^{13}C ЯМР, 2D ЯМР, например, 2D JRES, HSQC, DOSY, HMBC, CZY, ECOSY, TOCSY, NOESY или ROESY, или любую их комбинацию, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления сигнал, который ассоциирован с одной или несколькими гликозидными связями, может означать сигнал, характерный для одной или нескольких гликозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,6) гликозидными связями. В некоторых вариантах

осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с α-(1,6) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,4) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,4) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,6) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала ассоциированы с β-(1,6) гликозидными связями.

В некоторых вариантах осуществления сигнал, ассоциированный с одной или несколькими гликозидными связями, включает один или несколько пиков в спектре ЯМР, которые характерны для одной или нескольких гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления местоположение, интенсивность, форма и другие характеристики сигнала могут варьировать в зависимости от типа спектра ЯМР и условий выполнения ЯМР. В некоторых вариантах осуществления наличие или отсутствие сигнала, ассоциированного с одной или несколькими гликозидными связями, относится к наличию или отсутствию одного или нескольких пиков в спектре ЯМР, которые характерны для одной или нескольких гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления уровень сигнала относится к интенсивности одного или нескольких пиков в спектре ЯМР, которые характерны для одной или нескольких гликозидных связей, при этом относительное количество и/или концентрация одной или нескольких гликозидных связей может рассчитываться или не рассчитываться на основе интенсивности.

Сигнал распределения DP

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке сигнал связан с распределением DP олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает обнаружение двух или более сигналов, то есть первого сигнала, второго сигнала, третьего сигнала и т.д. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого сигнала и второго сигнала связан с распределением DP олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления как первый сигнал, так и второй

сигнал связаны с распределением DP олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления распределение DP олигосахаридов в основном связано с олигосахаридным препаратом.

В некоторых вариантах осуществления сигнал, который связан с распределением DP олигосахаридов, может быть определен или обнаружен с помощью любого подходящего аналитического оборудования, включая ВЭЖХ, SEC, ПФП, A4F, масс-спектрометрию, такую как ЖХ-МС/МС, ГХ-МС и MALDI-MS, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления сигнал, связанный с распределением DP олигосахаридов, может быть определен на основании молекулярно-массового распределения олигосахаридов.

В некоторых вариантах осуществления сигнал, который связан с распределением DP олигосахаридов, может относиться к сигналу, обеспеченному подходящим аналитическим прибором, характерному для любой одной или нескольких фракций DP1-DPn. В некоторых вариантах осуществления сигнал, ассоциированный с распределением DP олигосахаридов, характерен для олигосахаридов во фракции DP1, DP2, DP3, DP4 или DP5.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов во фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов во фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов во фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов во фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов во фракции DP3. В некоторых вариантах осуществления все из сигнала, первого сигнала и второго сигнала характерны для олигосахаридов во фракции DP3.

В зависимости от типа аналитического инструмента в некоторых вариантах осуществления концентрация и/или относительное содержание олигосахаридов, ассоциированных с сигналом, может быть определено на основе уровня сигнала. В некоторых вариантах осуществления сигнал, ассоциированный с распределением DP олигосахаридов, характерен для фракции DP2 и определяется или обнаруживается с помощью SEC, где количество фракции DP2 в олигосахаридах может быть определено с помощью SEC. В некоторых вариантах осуществления сигнал, ассоциированный с распределением DP олигосахаридов, характерен для фракции DP2 и определяется или

обнаруживается с помощью ВЭЖХ, где количество фракции DP2 в олигосахаридах может быть определено с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления сигнал, ассоциированный с распределением DP олигосахаридов, характерен для фракции DP2 и определяется или обнаруживается с помощью ЖХ-МС/МС, где количество фракции DP2 в олигосахаридах может быть определено с помощью ЖХ-МС/МС.

Следует понимать, что каждый из сигналов (например, первый сигнал и второй сигнал) может быть независимо выбран, определен и/или обнаружен. Например, в некоторых вариантах осуществления первый сигнал связан с распределением DP и определяется с помощью SEC, в то время как второй сигнал указывает на олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, во фракции DP2 и обнаруживается с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления первый сигнал ассоциирован с α-(1,6) гликозидными связями и обнаруживается посредством 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC, в то время как второй сигнал указывает на олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, во фракции DP1, и определяется или обнаруживается с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления как первый сигнал, так и второй сигнал указывают на олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, во фракции DP1, и характерны для них, и определяются или обнаруживаются с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления как первый сигнал, так и второй сигнал указывают на олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, во фракции DP2, и определяются или обнаруживаются масс-спектрометрией. В некоторых вариантах осуществления первый и второй сигнал указывают на олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, во фракции DP2, и определяются или обнаруживаются путем определения массы после выделения с помощью препаративной хроматографии.

Экстракция

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает экстракцию по меньшей мере части олигосахаридов из образца питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления экстрагент включает один или несколько растворителей, которые могут растворять или частично растворять олигосахариды. В некоторых вариантах осуществления экстрагент включает воду, спирт (например, этанол, метанол или пропанол), буферы, один или несколько органических растворителей или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления буферы, подходящие для экстракции, могут включать лимонную кислоту, уксусную кислоту, фосфат, CHES, борат, диэтилбарбитуровую кислоту, угольную кислоту, бикарбонат, соляную кислоту, гидроксид натрия, ацетат натрия, имидазол, карбонат натрия, любую их комбинацию или любые другие буферы, известные в данной области

техники. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет pH ниже 7. В других вариантах осуществления буфер имеет pH, равный 7 или более. В некоторых вариантах осуществления экстрагент содержит воду и этанол в соотношении примерно от 5 до 95, примерно от 10 до 90, примерно от 20 до 80, примерно от 30 до 70, примерно от 40 до 60, примерно от 50 до 50, примерно от 60 до 40, примерно от 70 до 30, примерно от 80 до 20, примерно от 90 до 10 или примерно от 95 до 5 по массе или по объему. В некоторых вариантах осуществления экстрагент содержит воду и этанол в соотношении примерно от 50 до 50 по массе. В некоторых вариантах осуществления экстрагент содержит воду и этанол в соотношении примерно от 50 до 50 по объему. В некоторых вариантах осуществления экстрагент содержит более 30 масс.%, более 40 масс.%, более 50 масс.%, более 60 масс.%, более 70 масс.%, более 80 масс.%, более 90 масс.%, более 95 масс.% или более 99 масс.% воды. В некоторых вариантах осуществления экстрагентом является вода.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает различное время экстракции и температуру экстракции. Специалист в данной области техники может выбрать подходящий экстрагент, время экстракции и температуру экстракции на основе химических и физических свойств олигосахаридов и питательной композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления температура экстракции составляет примерно от 20 до 100°C, примерно от 30 до 95°C, примерно от 40 до 95°C, примерно от 50 до 95°C, примерно от 60 до 95°C, примерно от 70 до 95°C, примерно от 80 до 95°C, примерно от 60 до 90°C, примерно от 70 до 90°C или примерно от 75 до 85°C. В некоторых вариантах осуществления температура экстракции составляет примерно от 60 до 90°C. В некоторых вариантах осуществления температура экстракции составляет приблизительно 80°C. Например, в некоторых вариантах осуществления экстрагент нагревают до необходимой температуры экстракции.

В зависимости от скорости растворения, для некоторых экстрагентов и/или олигосахаридов может потребоваться более длительное время экстракции. В некоторых вариантах осуществления время экстракции составляет примерно от 5 минут до 24 часов, от 5 минут до 10 часов, от 5 минут до 5 часов, от 5 минут до 2 часов, от 5 минут до 1 часа, от 10 минут до 10 часов, от 10 минут до 5 часов. часов, от 10 минут до 2 часов или от 10 минут до 1 часа. В некоторых вариантах осуществления время экстракции составляет примерно от 5 минут до 1 часа. В некоторых вариантах осуществления время экстракции составляет примерно 30 минут.

В некоторых вариантах осуществления экстракция включает физическое разрушение образца питательной композиции на более мелкие части, например, путем измельчения с помощью мельницы. В некоторых вариантах осуществления способ

включает фильтрацию экстрагированных олигосахаридов, например, для удаления твердых веществ из раствора. В некоторых вариантах осуществления стадию фильтрации можно выполнять с помощью фильтровальной бумаги, ультрафильтрации, микрофильтрации, центрифугирования, осаждения или любых других методов разделения. В некоторых вариантах осуществления способ включает осветление экстрагированных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления осветление экстрагированных олигосахаридов включает обеспечение контакта раствора экстрагированных олигосахаридов с материалом, поглощающим красящие вещества, таким как активированный уголь и ионообменная смола. В некоторых вариантах осуществления способ включает несколько стадий экстракции. Например, способ может включать стадию экстракции твердого тела жидкостью и одну или несколько стадий экстракции жидкости жидкостью и/или экстракции твердого тела жидкостью.

Концентрирование

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает концентрирование по меньшей мере части экстрагированных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления концентрация экстрагированных олигосахаридов увеличивается более чем в 1000 раз, более чем в 500 раз, более чем в 100 раз, более чем в 10 раз или более чем в 5 раз после стадии концентрирования. В некоторых вариантах осуществления концентрация экстрагированных олигосахаридов увеличивается более чем в 100 раз после стадии концентрирования.

В некоторых вариантах осуществления стадия концентрирования включает сублимационную сушку, вакуумную перегонку, мембранное разделение, экстракцию растворителем, выпаривание растворителя в растворе олигосахарида при температуре окружающей среды или повышенной температуре, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления стадия концентрирования включает лиофилизацию. В некоторых вариантах осуществления стадия концентрирования включает выпаривание растворителя в растворе олигосахарида в вакууме и/или при повышенной температуре. В некоторых вариантах осуществления стадия концентрирования включает нанофильтрацию. В некоторых вариантах осуществления стадия концентрирования включает использование нанофильтрации для концентрирования DP1 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления стадия концентрирования включает использование нанофильтрации для концентрирования DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления стадия концентрирования включает использование нанофильтрации для концентрирования DP3 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления экстрагированные и концентрированные олигосахариды имеют обогащенную фракцию DP1, DP2, DP3, DP4 или DP5. В некоторых вариантах осуществления экстрагированные и концентрированные олигосахариды имеют обогащенные олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает введение внутреннего стандарта в экстрагированные или концентрированные олигосахариды. Например, для количественной оценки MS может быть введен внутренний стандарт. В некоторых вариантах осуществления внутренний стандарт представляет собой меченый изотопом материал, такой как синтетический олигосахаридный препарат, содержащий ^{13}C. В некоторых вариантах осуществления внутренний стандарт представляет собой глюкоолигосахариды, синтезированные из ^{13}C-глюкозы.

Расщепление

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает стадию, на которой выборочно расщепляют источник углеводов в основной питательной композиции. Например, природный источник углеводов в основной питательной композиции может быть более восприимчивым к ферментативному гидролизу, чем синтетический олигосахаридный препарат. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает расщепление по меньшей мере части экстрагированных или концентрированных олигосахаридов одним или несколькими гидролитическими ферментами. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов могут содержать любой фермент, который способствует гидролизу натуральных полисахаридов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов могут включать любой фермент, который расщепляет одну или несколько встречающихся в природе гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов избирательно расщепляют α-(1,4) гликозидные связи или встречающиеся в природе α-(1,4) гликозидные связи. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов включают карбогидратазу, протеазу, липазу, амилазу (например, α-амилазу и β-амилазу), амилогликозидазу, инвертазу, α-галактозидазу, целлюлазу, ксиланазу, хитиназы, лизоцимы, глюкоамилазу, пуллуланазу или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов включают карбогидратазу, протеазу, липазу или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гидролитических ферментов включают α-амилазу,

амилогликозидазу, инвертазу, α-галактозидазу или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления концентрация одного или нескольких гидролитических ферментов составляет примерно от 0,1 до 40 Ед/мл, от 0,1 до 20 Ед/мл, от 0,5 до 20 Ед/мл, от 0,5 до 15 Ед/мл, от 0,5 до 10 Ед/мл, от 0,5 до 9 Ед/мл, от 0,5 до 8 Ед/мл, от 0,5 до 7 Ед/мл, от 0,5 до 6 Ед/мл, от 0,5 до 5 Ед/мл, от 0,5 до 4 Ед/мл, от 1 до 10 Ед/мл, от 1 до 9 Ед/мл, от 1 до 8 Ед/мл, от 1 до 7 Ед/мл, от 1 до 6 Ед/мл, от 1 до 5 Ед/мл, от 2 до 5 Ед/мл или от 3 до 4 Ед/мл для каждого фермента. В некоторых вариантах осуществления концентрация одного или нескольких гидролитических ферментов составляет примерно от 1 до 10 Ед/мл для каждого фермента. В некоторых вариантах осуществления концентрация одного или нескольких гидролитических ферментов составляет примерно от 3 до 4 Ед/мл для каждого фермента.

В зависимости от типа и концентрации ферментов и других условий расщепления время расщепления может варьировать. В некоторых вариантах осуществления время расщепления составляет примерно от 10 минут до 24 часов, от 30 минут до 12 часов, от 1 часа до 12 часов, от 2 часов до 11 часов, от 3 часов до 10 часов, от 4 часов до 12 часов, от 4 часов до 11 часов, от 4 часов до 10 часов, от 4 часов до 9 часов, от 2 часов до 10 часов, от 2 часов до 8 часов, от 2 часов до 6 часов, от 3 часов до 8 часов или от 3 часов до 5 часов. В некоторых вариантах осуществления время расщепления составляет примерно от 4 часов до 12 часов. В некоторых вариантах осуществления время расщепления составляет примерно 4 часа.

В некоторых вариантах осуществления изменение температуры расщепления может влиять на скорость расщепления ферментов. В некоторых вариантах осуществления температура расщепления составляет примерно от 20 до 100°C, от 30 до 90°C, от 40 до 80°C, от 50 до 70°C или от 55 до 65°C. В некоторых вариантах осуществления температура расщепления составляет примерно от 40 до 80°C. В некоторых вариантах осуществления температура расщепления составляет примерно 60°C.

В некоторых вариантах осуществления способ включает несколько стадий расщепления. Например, стадию расщепления можно повторять несколько раз до тех пор, пока все или практически все источники углеводов из основной питательной композиции не будут гидролизованы.

В некоторых вариантах осуществления способ включает восстановление экстрагированных или концентрированных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления восстановление олигосахаридов до соответствующих альдитов может привести к менее сложным хроматограммам, более резким пикам и, таким образом, более

чувствительной детекции. В некоторых вариантах осуществления экстрагированные или концентрированные олигосахариды восстанавливают одним или несколькими восстанавливающими агентами, такими как боргидрид натрия ($NaBH_4$), сульфат железа, диоксид серы, дитионаты, тиосульфаты, йодиды, гидразин и аскорбиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления экстрагированные или концентрированные олигосахариды восстанавливают боргидридом натрия.

Разделение, изоляция и количественная оценка

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает стадию разделения и/или изоляции. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает разделение по меньшей мере части экстрагированных, концентрированных, расщепленных или восстановленных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает разделение экстрагированных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает разделение концентрированных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает разделение расщепленных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает разделение восстановленных олигосахаридов.

Олигосахариды можно разделить любыми подходящими способами. Например, в некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют с помощью флэеш-хроматографии, жидкостной хроматографии низкого, среднего или высокого давления, ультрафильтрации, мембранного разделения, обратного осмоса или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют с помощью флэш-хроматографии. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют путем хроматографии. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют осаждением. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют с помощью нанофильтрации. В некоторых вариантах осуществления DP1 олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, или DP1 олигосахариды разделяют с помощью нанофильтрации. В некоторых вариантах осуществления DP2 олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, или DP1 олигосахариды разделяют с помощью нанофильтрации. В некоторых вариантах осуществления DP3 олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, или DP1 олигосахариды разделяют с помощью нанофильтрации.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ включает выделение по меньшей мере части экстрагированных, концентрированных, нерасщепленных, восстановленных или разделенных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает выделение нерасщепленных

олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает выделение разделенных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает выделение каждой фракции разделенных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение определенных фракций олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, таких как DP1 или DP2 олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления выделение олигосахаридов может включать концентрирование и/или объединение олигосахаридов с аналогичными характеристиками, такими как степень полимеризации.

В некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют и/или выделяют по степени полимеризации. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение и/или разделение олигосахаридов со степенью полимеризации 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов во фракции DP1 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов во фракции DP2 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов во фракции DP3 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов во фракции DP4 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов во фракции DP5 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления две или более фракций олигосахаридов выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды во фракциях DP1 и DP2 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды во фракциях DP1, DP2 и DP3 выделяют и/или разделяют.

В некоторых вариантах осуществления олигосахариды разделяют и/или выделяют в зависимости от того, содержат ли они ангидро-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение и/или разделение олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, со степенью полимеризации 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракции DP1 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракции DP2 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракции DP3 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-

субъединицы, из фракции DP4 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из фракции DP5 выделяют и/или разделяют. В некоторых вариантах осуществления выделяют и/или разделяют две или более фракции олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает стадию количественной оценки. В некоторых вариантах осуществления количественно определяют по меньшей мере часть расщепленных, нерасщепленных, экстрагированных, концентрированных, разделенных и/или выделенных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления количественно определяют разделенные и/или выделенные олигосахариды. В некоторых вариантах осуществления количественно определяют выделенные олигосахариды.

В некоторых вариантах осуществления олигосахариды количественно определяют по массе, концентрации и/или относительной распространенности. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды количественно определяют по массе. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов во фракции DP2 выделяют, а затем количественно определяют по массе. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP2 выделяют и затем определяют количественно по массе. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, в выделенных олигосахаридах определяют количественно, например, по относительной распространенности с помощью масс-спектрометрии. Например, DP2 олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, в выделенной фракции DP2 количественно определяют по относительной распространенности, показанной на масс-спектрометрии.

В некоторых вариантах осуществления большинство количественно определенных олигосахаридов получают из олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70%, более 80%, более 90%, более 95% или более 99% по массе количественно определенных олигосахаридов получают из олигосахаридного препарата. В некоторых вариантах осуществления более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70%, более 80%, более 90%, более 95% или более 99% количественно определенных олигосахаридов по относительной распространенности получают из олигосахаридного препарата.

Анализ сигналов

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает анализ по меньшей мере части экстрагированных, расщепленных,

нерасщепленных, разделенных или концентрированных олигосахаридов и получение сигнала. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ включает анализ разделенных олигосахаридов с помощью аналитических инструментов. В некоторых вариантах осуществления описанный здесь способ включает анализ выделенных олигосахаридов с помощью аналитических инструментов. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает анализ с помощью аналитических инструментов расщепленных олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает анализ с помощью аналитических инструментов количественно определенных олигосахаридов.

В некоторых случаях стадию дериватизации олигосахаридов проводят либо до, либо во время их анализа с помощью различных инструментов. Стадия дериватизации может быть проведена для изменения химических и/или физических свойств олигосахаридов и облегчения их количественного определения или разделения. Одна или несколько функциональных или маркирующих групп могут быть присоединены к олигосахаридам при дериватизации. Стадия дериватизации может включать химические реакции, которые добавляют полярные или неполярные группы к олигосахаридам; например, могут быть проведены химические реакции, такие как силилирование, ацилирование, алкилирование, этерификация и переэтерификация. Способы дериватизации описаны в данной области техники, например, Ruiz-Matute et al. J. Chromatography B, vol. 879 (17-18), 1226-1240, and S. Ahuja, J. Pharmaceutical Sciences, vol 65 (2), Feb 1976, 163-182, которые включены посредством ссылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления стадию дериватизации выполняют до детекции сигналов.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает анализ гликозидных связей олигосахаридов с помощью ЯМР, обеспечивающего определение или детекцию одного или нескольких описанных сигналов (таких, как уровень сигналов, первого сигнала и второго сигнала), ассоциированных с соответствующими гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ гликозидных связей с помощью 1D ^{1}H ЯМР, 1D ^{13}C ЯМР, 2D ЯМР, например, 2D JRES, HSQC, HMBC, COSY, ECOSY, TOCSY, NOESY и ROESY или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления анализируемые гликозидные связи представляют собой α-(1,2) гликозидные связи, α-(1,3) гликозидные связи, α-(1,6) гликозидные связи, β-(1,2) гликозидные связи, β-(1,3) гликозидные связи, β-(1,4) гликозидные связи, β-(1,6) гликозидные связи, α-(1,1)-α гликозидные связи, α-(1,1)-β гликозидные связи, β-(1,1)-α гликозидные связи или β-(1,1)-β гликозидные связи

олигосахаридов.

В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ α-(1,2) гликозидных связей олигосахаридов с помощью ЯМР, обеспечивающего определение или детекцию описанного сигнала, который ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ α-(1,3) гликозидных связей олигосахаридов с помощью ЯМР, обеспечивающего определение или детекцию описанного сигнала, который ассоциирован с α-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ α-(1,6) гликозидных связей олигосахаридов с помощью ЯМР, обеспечивающего определение или детекцию описанного сигнала, который ассоциирован с α-(1,6) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ β-(1,2) связей олигосахаридов с помощью ЯМР, обеспечивающего определение или детекцию описанного сигнала, который ассоциирован с β-(1,2) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ β-(1,3) связей олигосахаридов с помощью ЯМР, обеспечивающего определение или детекцию описанного сигнала, который ассоциирован с β-(1,3) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ β-(1,4) связей олигосахаридов с помощью ЯМР, обеспечивающего определение или детекцию описанного сигнала, который ассоциирован с β-(1,4) гликозидными связями. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ β-(1,6) связей олигосахаридов с помощью ЯМР, обеспечивающего определение или детекцию описанного сигнала, который ассоциирован с β-(1,6) гликозидными связями.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, обеспечивающий определение или детекцию описанного сигнала (такого как уровень сигналов, первого сигнала и второго сигнала), который указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, анализируют с помощью определения массы, ВЭЖХ, ЯМР, SEC, масс-спектрометрии, такой как ЖХ-МС/МС, ГХ-МС и MALDI-MS, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, анализируют с помощью ЖХ-МС/МС. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, анализируют с помощью ГХ-МС. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, анализируют с помощью MALDI-MS. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, анализируют с помощью ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления олигосахариды, содержащие

ангидро-субъединицы, анализируют путем определения массы фракций, выделенных и/или очищенных с помощью жидкостной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в любой одной или нескольких фракциях DP1-DPn. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в любой из фракций DP1-DP5. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP3. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP4. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, во фракции DP5.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящей заявке способ включает анализ распределения DP олигосахаридов, обеспечивающий определение или детекцию описанного сигнала (такого как уровень сигналов, первого сигнала и второго сигнала), который связан с распределением DP. В некоторых вариантах осуществления описанный сигнал получают с помощью ВЭЖХ или SEC.

В некоторых вариантах осуществления анализ распределения DP олигосахаридов включает определение, детекцию или количественную оценку олигосахаридов в любой одной или нескольких фракциях от DP1 до DPn. В некоторых вариантах осуществления анализ распределения DP олигосахаридов включает определение, детекцию или количественное определение олигосахаридов в любой из фракций DP1-DP5. В некоторых вариантах осуществления анализ распределения DP олигосахаридов включает определение, детекцию или количественную оценку олигосахаридов во фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления анализ распределения DP олигосахаридов включает определение, детекцию или количественную оценку олигосахаридов во фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления анализ распределения DP олигосахаридов включает определение, детекцию или количественную оценку олигосахаридов во фракции DP3.

В некоторых вариантах осуществления способ включает количественное определение по меньшей мере части олигосахаридов в любой из фракций от DP1 до DPn. В некоторых вариантах осуществления способ включает количественное определение по меньшей мере части олигосахаридов в любой из фракций DP1-DP5. В некоторых вариантах осуществления способ включает количественное определение по меньшей мере

части олигосахаридов во фракции DP1. В некоторых вариантах осуществления способ включает количественное определение по меньшей мере части олигосахаридов во фракции DP2. В некоторых вариантах осуществления способ включает количественное определение по меньшей мере части олигосахаридов во фракции DP3.

В зависимости от аналитического оборудования описанные в настоящей заявке способы могут включать различные варианты. В некоторых вариантах способ включает детекцию наличия или отсутствия сигнала. В некоторых вариантах осуществления детекция может быть выполнена вручную, автоматически, например, с помощью машины, или любой их комбинации. В некоторых вариантах способ включает определение характеристик сигнала, включая интенсивность, силу, форму и/или площадь сигнала, но не ограничиваясь этим. В некоторых вариантах осуществления определение характеристик сигнала включает определение наличия или отсутствия сигнала. В некоторых вариантах осуществления определение характеристик сигнала включает определение уровня сигнала.

Например, в некоторых вариантах осуществления отсутствие сигнала DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, при масс-спектрометрии указывает на то, что образец питательной композиции не содержит олигосахаридного препарата или не содержит обнаруживаемого уровня олигосахаридного препарата. В другом примере в некоторых вариантах осуществления присутствие и/или уровень сигнала DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, при масс-спектрометрии указывает на то, что образец питательной композиции может содержать уровень олигосахаридного препарата, соответствующий уровню сигнала. В качестве еще одного примера, в некоторых вариантах осуществления присутствие и/или уровень сигнала α-(1,6) гликозидных связей на ЯМР-спектрах указывает на то, что образец питательной композиции может содержать уровень олигосахаридного препарата, который соответствует уровню сигнала.

В некоторых вариантах осуществления способ включает корреляцию (например, расчет или оценку) концентрации олигосахаридного препарата в питательной композиции на основе описанного сигнала (такого как уровень сигнала, первого сигнала и второго сигнала). Например, относительную распространенность олигосахаридов можно коррелировать на основе сигнала масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления концентрация и/или относительное количество олигосахаридов могут быть коррелированы на основе сигнала SEC, ВЭЖХ и/или ЯМР.

В некоторых вариантах осуществления олигосахаридный препарат анализируют, чтобы рассчитать или оценить его концентрацию в питательной композиции. Например, в

некоторых вариантах осуществления уровень олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в препарате олигосахаридов вычисляют, когда на стадии контроля качества определяют или обнаруживают сигнал, который указывает на олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы. В другом примере в некоторых вариантах осуществления распределение DP олигосахаридного препарата определяют, когда на стадии контроля качества определяют или обнаруживают сигнал, который связан с распределением DP олигосахаридов. В качестве еще одного примера, в некоторых вариантах осуществления относительную распространенность α-(1,6) гликозидных связей определяют для олигосахаридного препарата, когда на стадии контроля качества определяют или обнаруживают сигнал, ассоциированный с α-(1,6) гликозидными связями.

В некоторых вариантах осуществления способ включает сравнение сигналов, при котором можно сравнивать любые характеристики сигнала. Например, в некоторых вариантах осуществления способ включает сравнение первого сигнала и второго сигнала. В некоторых вариантах осуществления способ включает сравнение уровня первого сигнала и уровня второго сигнала. В некоторых вариантах осуществления разница между первым сигналом и вторым сигналом указывает на то, что олигосахаридный препарат неравномерно распределен в питательной композиции. В других вариантах осуществления сходство между первым сигналом и вторым сигналом указывает на то, что олигосахаридный препарат равномерно распределен в питательной композиции.

Следует понимать, что способ контроля качества, как предусмотрено в настоящей заявке, может включать любую комбинацию стадий и вариантов осуществления. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления способ контроля качества повторяют. В определенном варианте осуществления способ контроля качества выполняют для нескольких образцов, взятых из одной или разных партий питательной композиции.

В некоторых вариантах осуществления первый образец и второй образец взяты из одной и той же партии питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления первый образец и второй образец взяты из разных партий питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления первый образец и второй образец взяты на одном или разных производственных объектах. В некоторых вариантах осуществления первый образец и второй образец взяты в одно и то же или в разное время. В некоторых вариантах осуществления второй образец отбирают более чем через 1 день, более чем 1 неделю, более чем 1 месяц, более чем 6 месяцев или более чем через 1 год после взятия первого образца. В некоторых вариантах осуществления первый образец и второй образец взяты в течение 1 дня, 1 недели, 1 месяца, 6 месяцев или 1 года. В некоторых вариантах осуществления первый образец и второй образец взяты из разных мест одного и того же

смесителя, где объединяют олигосахаридный препарат и основную питательную композицию. В некоторых вариантах осуществления первый образец отбирают во время смешивания олигосахаридного препарата и питательной композиции, а второй образец отбирают после смешивания.

В некоторых вариантах осуществления существует предел обнаружения для способа, описанного в настоящей заявке, при этом уровень олигосахаридного препарата вне предела может не определяться данным способом. В некоторых вариантах осуществления предел обнаружения для олигосахаридного препарата составляет более 1 ч./млн., более 5 ч./млн., более 10 ч./млн., более 50 ч./млн., более 100 ч./млн., более 200 ч./млн., более 300 ч./млн., более 400 ч./млн., более 500 ч./млн., более 600 ч./млн., более 700 ч./млн., более 800 ч./млн., более 900 ч./млн. или более 1000 ч./млн. по отношению к питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления предел обнаружения для олигосахаридного препарата составляет более 10 ч./млн., более 50 ч./млн., более 100 ч./млн. или более 500 ч./млн. по отношению к питательной композиции.

Дополнительные стадии

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает приемку и/или браковку партии питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления партию питательной композиции принимают или бракуют после стадии контроля качества (или после выполнения способа, описанного в настоящей заявке). В некоторых вариантах осуществления приемку или браковку выполняют вручную, автоматически, например, с помощью машины, или с помощью их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления браковка или приемка полностью или частично основаны на наличии или отсутствии описанного сигнала. В других вариантах осуществления браковка или приемка полностью или частично основаны на уровне описанного сигнала, на основании которого рассчитывают концентрацию олигосахаридного препарата в питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления браковка или приемка полностью или частично основаны на сравнении первого сигнала и второго сигнала.

В дополнительных вариантах осуществления браковка или приемка полностью или частично основаны на заранее определенном диапазоне концентрации олигосахаридного препарата в питательной композиции. Например, заранее определенный диапазон концентрации может варьировать в зависимости от конкретной кормовой композиции для животных. В качестве примера, в некоторых вариантах осуществления партия питательной композиции может быть забракована, если уровень сигнала указывает, что олигосахаридный препарат не находится в пределах от 10 до 1000 ч./млн., от 10 до 500

ч./млн. или от 50 до 500 ч./млн. по отношению к питательной композиции.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей заявке, включает корректировку уровня олигосахаридного препарата после определения или детекции, например, после стадии контроля качества. В некоторых вариантах осуществления корректировка уровня олигосахаридного препарата включает корректировку уровня основной питательной композиции, корректировку уровня олигосахаридного препарата, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления корректировка уровня олигосахаридного препарата включает добавление дополнительного олигосахаридного препарата в питательную композицию или удаление части олигосахаридного препарата из питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления корректировка уровня олигосахаридного препарата включает добавление дополнительной основной питательной композиции в питательную композицию или удаление части основной питательной композиции из питательной композиции. В некоторых вариантах осуществления корректировка уровня олигосахаридного препарата включает добавление дополнительного олигосахарида в питательную композицию. В некоторых вариантах осуществления корректировка уровня олигосахаридного препарата включает смешивание питательной композиции для повышения консистенции. В определенных вариантах осуществления способ включает корректировку уровня олигосахаридного препарата до заранее определенного диапазона, который может варьировать в зависимости от конкретной кормовой композиции для животных.

Хотя настоящее изобретение и его преимущества были подробно описаны, следует понимать, что в нем могут быть сделаны различные замены и изменения, не выходящие за рамки сущности и объема изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано в следующих примерах, которые даны только для целей иллюстрации и никоим образом не предназначены для ограничения изобретения.

Примеры

Пример 1. Синтез глюкогалактоолигосахаридного препарата

Синтез глюкогалактоолигосахаридного препарата проводили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температуры реакции, которые были выбраны для обеспечения подходящего производства в килограммовом масштабе.

D-глюкозы моногидрат (825,16 г), D-лактозы моногидрат (263,48 г) и 2-пиридинсульфоновую кислоту (1,0079 г, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) добавляли в

трехлитровую трехгорлую колбу с круглым дном и центральной горловиной из шлифованного стекла 29/42 и двумя боковыми горловинами из шлифованного стекла 24/40. Тефлоновая лопасть 133 мм для перемешивания была прикреплена к стеклянному стержню для перемешивания с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого блоком контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в одном из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько миллиметров над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к вспомогательному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об./мин. Когда реакционная смесь достигала 120°C, дефлегматор переводили в конфигурацию для перегонки, при этом дистиллированный продукт собирали в круглодонной колбе объемом 250 мл, помещенной на ледяную баню. Смесь выдерживали при 130°C при непрерывном перемешивании в течение 6 часов, после чего блок термопары отключали. Дистилляционный аппарат удаляли, и в трехгорлую колбу постепенно добавляли 390 г дистиллированной воды с температурой 60°C. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об./мин в течение 10 часов. Было собрано примерно 1250 г вязкого материала светло-янтарного цвета, и его концентрация составила 71,6° Брикса по показателю преломления.

Пример 2. Синтез глюкоолигосахаридного препарата

Синтез глюкоолигосахаридного препарата проводили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температуры реакции, которые были выбраны для обеспечения подходящего производства в килограммовом масштабе.

D-глюкозы моногидрат (1150 г) добавляли в трехлитровую трехгорлую круглодонную колбу с одной центральной горловиной из матового стекла 29/42 и двумя боковыми горловинами из матового стекла 24/40. 133-миллиметровую тефлоновую лопасть для перемешивания прикрепляли к стеклянному валу для перемешивания с помощью ленты из ПТФЭ. Шток для перемешивания закрепляли через центральное

отверстие колбы с помощью тефлонового несущего адаптера и присоединяли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого устройством контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в одном из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько миллиметров над смесительным элементом. Вторичный датчик температуры, подключенный к дополнительному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об./мин. Когда температура реакции повышалась до 120–130°C, в трехгорлую колбу добавляли (+)-камфор-10-сульфоновую кислоту (1,16 г, Sigma-Aldrich, Сент-Луис), и прибор переключали с обратного холодильника на конфигурацию перегонки с круглодонной колбой для сбора, помещенной в ледяную баню. Эту установку поддерживали в течение 1,5 часов, после чего отключали блок термопары, удаляли дистилляционный аппарат, и в трехгорлую колбу постепенно добавляли 390 г дистиллированной воды с температурой 23°C. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об./мин в течение 10 часов до момента сбора. Было собрано примерно 1300 г вязкого материала темно-янтарного цвета, и его концентрация составила 72,6° по Бриксу.

Пример 3. Синтез глюкогалактоманноолигосахаридного препарата

Синтез глюкогалактоманноолигосахаридного препарата проводили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температуры реакции, которые были выбраны для обеспечения подходящего производства в килограммном масштабе. MH47-32-A / MH46-35-B: 8/10/18.

Глюкогалактоманноолигосахаридный препарат получали в виде двух отдельных компонентов, синтезированных в отдельных реакционных сосудах, которые собирали независимо. В каждом синтезе использовали разные исходные реагенты, но следовали тем же процедурам и методам до завершения. Конечный глюкогалактоманноолигосахаридный препарат представлял собой гомогенный сироп, полученный в результате смешивания обоих продуктов синтеза.

Для синтеза первого компонента в трехлитровую трехгорлую круглодонную колбу с центральной шлифованной горловиной 29/42 и боковыми шлифованными горловинами

24/40 добавляли 990,54 г глюкозы моногидрата, 105,58 г лактозы моногидрата и 1,00 г 2-пиридинсульфоновой кислоты. 133-миллиметровую тефлоновую лопасть для перемешивания прикрепляли к стеклянной мешалке диаметром 440 мм с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была помещена в полусферический электронагревательный кожух, управляемый устройством контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в один из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько миллиметров над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к вспомогательному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об./мин. После того, как в камере контроля температуры достигалось значение от 120°C до 130°C, устройство переключали с обратного холодильника на конфигурацию дистилляции с круглодонной колбой для сбора, помещенной в ледяную баню. Эту установку поддерживали в течение примерно 6 часов и 10 минут, после чего нагревательный кожух отключали, дистилляционный аппарат удаляли, и 390 г дистиллированной воды с температурой 60°C постепенно добавляли в трехгорлую колбу. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об./мин в течение 10 часов до момента сбора. Было собрано примерно 1250 г вязкого материала светло-янтарного цвета, и при измерении по показателю преломления его концентрация составила 73,1° по шкале Брикса.

Для синтеза второго компонента 825,04 г глюкозы моногидрата, 251,16 г чистой маннозы из древесины, 25,10 г дистиллированной воды и 1,00 г 2-пиридинсульфоновой кислоты добавляли в трехлитровую трехгорлую круглодонную колбу с одной центральной шлифованой горловиной 29/42, по бокам которой расположены две шлифованных горловины 24/40. Остальную часть синтеза второго компонента проводили по той же процедуре и способам, что и для первого компонента, до момента сбора. Было собрано примерно 1250 г вязкого материала темно-янтарного цвета, и его концентрация составила 72,3° по шкале Брикса.

Первый и второй компоненты полностью переносили в контейнер из ПЭВП подходящего размера и тщательно перемешивали вручную до гомогенного состояния.

Конечная смесь сиропа имела массу примерно 2,5 кг, темно-янтарный цвет, была вязкой и имела концентрацию приблизительно 72° по шкале Брикса.

Пример 4. Синтез глюкоманноолигосахаридного препарата

Синтез глюкоолигосахаридного препарата проводили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температуры реакции, которые были выбраны для обеспечения подходящего производства в килограммовом масштабе.

Глюкоманноолигосахаридный препарат получали в виде двух отдельных компонентов, синтезированных в отдельных реакционных сосудах, которые собирали независимо. В каждом синтезе использовали разные исходные реагенты, но до завершения использовали одни и те же процедуры и способы. Конечный глюкоманноолигосахаридный препарат представлял собой гомогенный сироп, полученный в результате смешивания обоих продуктов синтеза.

Для синтеза первого компонента 1264,80 г глюкозы моногидрата добавляли в трехлитровую трехгорлую круглодонную колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, окруженной двумя шлифованными горловинами 24/40. 133-миллиметровую тефлоновую лопасть для перемешивания прикрепляли к стеклянной мешалке диаметром 440 мм с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была помещена в полусферический электрический нагревательный кожух, управляемый устройством контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в одном из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько миллиметров над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к вспомогательному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об./мин. После того, как в камере контроля температуры достигалось значение от 120°C до 130°C, в трехгорлую колбу добавляли 1,15 г (+)-камфор-10-сульфоновой кислоты, и устройство переключали с обратного холодильника на конфигурацию перегонки с круглодонной колбой для сбора, помещенной в ледяную баню. Эту установку поддерживали в течение примерно 1 часа,

после чего отключали блок термопары, удаляли дистилляционный аппарат, и 390 г дистиллированной воды с температурой 23°C постепенно добавляли в трехгорлую колбу. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об./мин в течение 10 часов до момента сбора. Было собрано приблизительно 1350 г вязкого материала светло-желтого цвета, и его концентрация составила 71,8° по шкале Брикса.

Для синтеза второго компонента 949,00 г глюкозы моногидрата, 288,00 г чистой маннозы из древесины, 27,94 г дистиллированной воды и 1,15 г 2-пиридинсульфоновой кислоты добавляли в трехлитровую трехгорлую колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, по бокам которой расположены две шлифованных горловины 24/40. Остальную часть синтеза второго компонента проводили по той же процедуре и способам, что и для первого компонента, до момента сбора, за исключением того, что (+)-камфор-10-сульфоновую кислоту не добавляли, поскольку дефлегматор был переключен на конфигурацию перегонки, и полученную установку поддерживали примерно 6 часов. Было собрано примерно 1350 г вязкого материала темно-янтарного цвета, и его концентрация составила 72,0° по шкале Брикса.

Первый и второй компоненты полностью переносили в контейнер из ПЭВП подходящего размера и тщательно перемешивали вручную до гомогенного состояния. Конечная смесь сиропа имела массу примерно 2,7 кг, темно-янтарный цвет, была вязкой и, как было определено по показателю преломления, имела концентрацию примерно 72° по шкале Брикса.

Пример 5. Синтез глюкоманноолигосахаридного препарата

Получение олигосахаридного препарата в килограммовом масштабе осуществляли в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температуры реакции, которые оказались подходящими для производства в масштабе 1 кг.

Глюкоманноолигосахаридный препарат получали в виде двух отдельных компонентов, синтезированных в отдельных реакционных сосудах, которые собирали независимо. В каждом синтезе использовали разные исходные реагенты, но до завершения применяли одни и те же процедуры и способы. Конечный глюкоманноолигосахаридный препарат представлял собой гомогенный сироп, полученный в результате смешивания обоих продуктов синтеза.

Для синтеза первого компонента 1261,00 г глюкозы моногидрата и 1,15 г 2-пиридинсульфоновой кислоты добавляли в трехлитровую трехгорлую круглодонную колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, окруженной двумя шлифованными горловинами 24/40. 133-миллиметровую тефлоновую лопасть для

перемешивания прикрепляли к стеклянной мешалке диаметром 440 мм с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого устройством контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в одном из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в реакционной смеси с зазором в несколько миллиметров над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к вспомогательному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об./мин. После того, как показания блока контроля температуры достигали от 120°C до 130°C, аппарат переключали с обратного холодильника на дистилляционную конфигурацию с круглодонной колбой для сбора, помещенной в ледяную баню. Эту установку поддерживали в течение примерно 6 часов, после чего блок термопары отключали, дистилляционный аппарат удаляли, и 390 г дистиллированной воды с температурой 23°C постепенно добавляли в трехгорлую колбу. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об./мин в течение 10 часов до момента сбора. Было собрано примерно 1250 г вязкого материала светло-желтого цвета, и его концентрация составила 73,5° по шкале Брикса.

Для синтеза второго компонента 949,00 г глюкозы моногидрата, 288,00 г чистой маннозы из древесины, 28,94 г дистиллированной воды и 1,15 г 2-пиридинсульфоновой кислоты добавляли в трехлитровую трехгорлую колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, по бокам которой расположены две шлифованных горловины 24/40. Остальную часть синтеза второго компонента проводили по той же процедуре и методам, что и для первого компонента, до момента сбора. Было собрано примерно 1250 г вязкого материала темно-янтарного цвета, и его концентрация составила 73,3° по шкале Брикса.

Первый и второй компоненты полностью переносили в контейнер из ПЭВП подходящего размера и тщательно перемешивали вручную до гомогенного состояния. Конечная смесь сиропа имела массу примерно 2,5 кг, была темно-янтарного цвета, вязкой и имела концентрацию приблизительно 73° по шкале Брикса.

Пример 6. Синтез глюкогалактоолигосахаридного препарата

Производство олигосахаридного препарата в килограммовом масштабе проводили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температур реакции, которые оказались подходящими для производства в масштабе 1 кг.

Трехгорлую колбу объемом 3 л оборудовали подвесным смесителем, соединенным через стеклянную мешалку диаметром 10 мм с 14 см серповидным смесительным элементом. Смесительный элемент располагали на расстоянии примерно 5 мм от стенок колбы. Колбу нагревали с помощью полусферического электронагревательного кожуха, управляемого блоком контроля температуры, подключенным к жезловидному зонду термопары, вставленному в реакционную колбу. Зонд термопары размещали так, чтобы над смесительным элементом оставался зазор 5-10 мм. В колбу загружали 576 г декстрозы моногидрата пищевого качества и 577 г D-галактозы моногидрата пищевого качества, и нагревали примерно до 115°C с получением расплавленного сахарного сиропа. После получения сиропа колбу снабжали обратным холодильником с кожухом, охлаждаемым до 4°C за счет циркуляции охлажденного гликоля/воды и температуры. К смеси добавляли 31 г смолы Dowex Marathon C (содержание влаги 0,48 г H_2O/г смолы) с получением перемешиваемой суспензии. Конденсатор переводили в конфигурацию для перегонки, и суспензию нагревали до 145°C.

Скорость перемешивания примерно 80 об./мин и температуру 145°C поддерживали в течение 3,8 часа, после чего температуру на блоке контроля температуры снижали до 80°C, и в колбу постепенно добавляли 119 мл деионизированной воды с температурой 60°C, чтобы получить темно-янтарный сироп, содержащий остаточную смолу Dowex. Полученную суспензию дополнительно разбавляли до 60° Брикса, охлаждали до комнатной температуры и фильтровали под вакуумом через фильтр 0,45 микрон для удаления смолы. Было получено 1200 г сиропа светло-янтарного цвета с концентрацией 60° Брикса.

Пример 7. Синтез глюкоолигосахаридного препарата

Производство олигосахаридного препарата в килограммовом масштабе производили в трехлитровом реакционном сосуде с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температур реакции, которые оказались подходящими для производства в масштабе 1 кг.

Трехгорлую колбу на 3 л оборудовали подвесным смесителем, соединенным через стеклянную мешалку диаметром 10 мм с серповидным смесительным элементом размером 14 см. Смесительный элемент размещали на расстоянии примерно 5 мм от стенок колбы. Колбу нагревали с помощью полусферического электронагревательного

кожуха, управляемого блоком контроля температуры, подключенным к жезловидному зонду термопары, вставленному в реакционную колбу. Зонд термопары размещали так, чтобы над смесительным элементом оставался зазор 5-10 мм. В колбу постепенно загружали 1148 г моногидрата декстрозы пищевого качества и нагревали примерно до 115°C с получением расплавленного сахарного сиропа. После получения сиропа колбу снабжали дистилляционным конденсатором с кожухом, охлаждаемым до 4°C путем циркуляции охлажденного гликоля/воды. Температуру реакции постепенно повышали до 145°C. После достижения и стабилизации температуры к смеси добавляли 31 грамм смолы Dowex Marathon C (содержание влаги 0,48 г H_2O/г смолы) и поддерживали скорость перемешивания примерно 80 об./мин и температуру 145°C в течение 3,8 часа.

Через 3,8 часа установку на блоке контроля температуры снижали до 80°C, и в колбу постепенно добавляли 119 мл деионизированной воды с температурой 60°C для получения сиропа темно-янтарного цвета, содержащего остаточную смолу Dowex. Полученную суспензию дополнительно разбавляли до 60° Брикса, охлаждали до комнатной температуры и фильтровали под вакуумом через фильтр 0,45 микрон для удаления смолы. Было получено 1113 г сиропа глюкоолигосахарида темно-янтарного цвета с концентрацией 60° Брикса.

Пример 8. Синтез олигосахаридных препаратов в одном резервуаре

Однореакторный (однокомпонентный) синтез олигосахарида из примера 3 был продемонстрирован в масштабе 300 грамм в реакционном сосуде объемом один литр с использованием загрузки катализатора, времени реакции и температур реакции, которые оказались подходящими для реакции в одном резервуаре.

272,30 г D-глюкозы моногидрата пищевого качества из кукурузы, 37,50 г D-маннозы пищевого качества из древесины, 15,60 г D-лактозы моногидрата пищевого качества, 3,96 г дистиллированной воды и 0,270 г 2-пиридинсульфоновой кислоты (Sigma-Aldrich, Сент-Луис) добавляли в однолитровую трехгорлую круглодонную колбу с одной центральной шлифованной горловиной 29/42, окруженной двумя шлифованными горловинами 24/40. Тефлоновую лопасть для перемешивания прикрепляли к 220-миллиметровому стеклянному валу для перемешивания с помощью ленты из ПТФЭ. Шток мешалки закрепляли через центральную точку с помощью тефлонового несущего адаптера и прикрепляли к подвесному механическому смесителю с высоким крутящим моментом через гибкий соединитель. Колба была закреплена внутри полусферического электронагревательного кожуха, управляемого устройством контроля температуры через стержневую термопару J-типа, вставленную через резиновую перегородку в одном из боковых портов. Наконечник термопары был отрегулирован так, чтобы он находился в

реакционной смеси с зазором в несколько миллиметров над смесительным элементом. Вторичный температурный зонд, подключенный к вспомогательному датчику температуры, также был вставлен и закреплен тем же способом. Второй боковой порт колбы был оборудован обратным холодильником, охлаждаемым водно-гликолевой смесью, поддерживаемой ниже 4°C с помощью охлаждающей ванны с рециркуляцией.

Реакционную смесь постепенно нагревали до 130°C при непрерывном перемешивании со скоростью перемешивания 80-100 об./мин. После того, как в камере контроля температуры достигалось значение от 120°C до 130°C, устройство переключали с обратного холодильника на конфигурацию дистилляции с круглодонной колбой для сбора, помещенной в ледяную баню. Смесь поддерживали при 130°C при непрерывном перемешивании в течение примерно 5 часов 40 минут, после чего нагревательный кожух и устройство для перегонки удаляли. В трехгорлую колбу постепенно добавляли примерно 40 г дистиллированной воды с температурой 23°C. Полученную смесь оставляли перемешиваться при 40 об./мин в течение 10 часов до момента сбора. Было собрано примерно 389 г вязкого материала темно-янтарного цвета, и его концентрация составила 67,0° Брикса. Соответствие олигосахаридному препарату из примера 3 подтверждали хроматографией SEC и 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР-спектроскопией.

Пример 9. Характеристика олигосахаридных препаратов

Способы и процедуры из примеров 1-8 использовали для приготовления повторяющихся партий и смесей олигосахаридов из примеров 1-7. Полученные материалы анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии ВЭЖХ (SEC) для характеристики распределения молекулярной массы, ЖХ-МС/МС анализа для количественного определения содержания ангидросахаров DP2, и 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР для определения молекулярной структуры соответствующих препаратов олигосахаридов.

Пример 9.1. Были приготовлены одиннадцать партий олигосахаридного препарата из примера 1 и смешаны в четыре отдельные серии.

Пример 9.2. Были приготовлены семь партий олигосахаридного препарата из примера 2 и смешаны в две отдельные серии.

Пример 9.3. Были приготовлены двенадцать партий олигосахаридного препарата из примера 3 и смешаны в пять отдельных серий.

Пример 9.4. Были приготовлены четыре партии олигосахаридного препарата из примера 4 и смешаны в одну серию.

Пример 9.5. Были приготовлены четыре партии олигосахаридного препарата из примера 5 и смешаны в одну серию.

Пример 9.6. Были приготовлены две партии олигосахаридного препарата из

примера 6 и смешаны в одну серию.

Пример 9.7. Были приготовлены две партии олигосахаридного препарата из примера 7 и смешаны в одну серию.

В партиях из примеров 9.1-9.7 были использованы как многореакторные (многокомпонентные), так и однореакторные (однокомпонентные) варианты соответствующих схем синтеза.

Дополнительные структурные варианты олигосахаридных препаратов из примеров 1-7 были синтезированы в масштабе 300 граммов с использованием способов из примеров 1-7, но с вариациями исходных сахарных композиций, кислоты, кислотной нагрузки, времени и температуры реакции. Олигосахаридные препараты были синтезированы следующим образом:

Пример 9.8. 300 г сахарозы, 3 г фосфорной кислоты и 27 г воды подвергали взаимодействию при 125°С в течение примерно одного часа с получением темно-коричневого олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° по Бриксу дистиллированной водой.

Пример 9.9. Проводили реакцию 270 г глюкозы, 30 г сахарозы, 0,3 г фенилфосфоновой кислоты и 27 г воды при 130°С в течение от одного до четырех часов с получением темно-коричневого олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.10. 225 г глюкозы, 75 г лактозы, 3 г бутилфосфоновой кислоты и 27 г воды подвергали реакции при 130°С в течение от одного до четырех часов с получением темно-янтарного сиропа олигосахарида, который затем разбавляли до 60° Брикса с дистиллированной водой.

Пример 9.11. 225 г глюкозы, 75 г лактозы, 3 г фенилфосфоновой кислоты и 27 г воды подвергали реакции при 130°С в течение от одного до пяти часов с получением темно-янтарного сиропа олигосахарида, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.12. Проводили реакцию 270 г глюкозы, 30 г лактозы, 3 г фенилфосфиновой кислоты и 27 г воды при 130°С в течение от трех до пяти часов с получением темно-коричневого олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.13. 300 г глюкозы, 3 г фенилфосфиновой кислоты и 27 г воды подвергали реакции при 130°С в течение от одного до трех часов с получением темно-янтарного сиропа олигосахарида, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.14. 300 г глюкозы, 2 г пропионовой кислоты и 27 г воды подвергали

реакции при 130°C в течение от одного до четырех часов с получением сиропа янтарного олигосахарида, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

Пример 9.15. 300 г глюкозы, 0,15 г 8-гидрокси-5-хинолинсульфоновой кислоты гидрата и 27 г воды подвергали реакции при 130°C в течение двух-четырех часов с получением янтарного олигосахаридного сиропа, который затем разбавляли до 60° Брикса дистиллированной водой.

В вышеуказанных реакциях все массы относятся к массам чистых компонентов, и общая масса реагирующей воды включала любую дополнительную воду, обеспеченную влагосодержанием и/или водой от гидратации реагирующих сахаров.

Характеристика олигосахаридных препаратов

Полученные материалы анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии ВЭЖХ (SEC) для характеристики распределения молекулярной массы, анализа ЖХ-МС/МС для количественного определения содержания ангидросахаров DP2, и 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР для определения молекулярной структуры соответствующих олигосахаридных препаратов.

Анализ молекулярной массы полимеров с помощью ВЭЖХ

Среднечисленную молекулярную массу (MWn) и средневесовую молекулярную массу (MWw) олигосахаридных препаратов из примеров 9.1-9.7 определяли с помощью ВЭЖХ. SEC-анализ выполняли на ВЭЖХ Agilent серии 1100 с определением показателя преломления с использованием колонки Agilent PL aquagel-OH 20 при 40°C с дистиллированной водой в качестве подвижной фазы при 0,45 мл/мин. Калибровку времени удерживания до MW проводили с использованием стандартных растворов с известной молекулярной массой, и стандартные методы из уровня техники были использованы для определения различных свойств распределения по хроматограмме SEC.

Таблица 1. Молекулярная масса полимера (MW) для препаратов олигосахаридов с несколькими сериями

Пример	MWn (г/моль)	MWw (г/моль)
Пример 9.1	719 ± 11	1,063 ± 23
Пример 9.2	808 ± 30	1,336 ± 122
Пример 9.3	757 ± 15	1,186 ± 49
Пример 9.4	761	1,196
Пример 9.5	755	1,177
Пример 9.6	505	709
Пример 9.7	762 ± 12	1,154 ± 14

Анализ содержания ангидро-DP2 с помощью ЖХ-МС/МС

Содержание ангидроолигосахаридов DP2 в олигосахаридных препаратах определяли с помощью ЖХ-МС/МС с использованием колонки Capcell Pak NH2 (Shiseido; 250x4,6 мм, 5 мкм) при скорости потока 1 мл/мин в изократических условиях

вода/ацетонитрил 35/65. Перед МС поток разделяли 1:4 и добавляли подпитывающий поток 50 мкл 0,05% NH_4OH для усиления ионизации. Для детекции МС использовали зонд ESI в отрицательном режиме, а метод множественного мониторинга реакций (MRM) позволял проводить целенаправленный анализ.

Содержание ангидро-DP2 в препаратах олигосахаридов сначала определяли относительно содержания в олигосахаридном препарате из примера 9.7 в качестве эталонной композиции. Абсолютное содержание ангидро-DP2 в эталонном олигосахаридном препарате из примера 9.7 было затем определено с помощью ВЭЖХ-МС/МС и составило примерно 10%, и затем было рассчитано содержание ангидро-DP2 в олигосахаридных препаратах из примеров с 9.1 по 9.6. Относительное и абсолютное содержание DP2 определяли следующим образом:

Таблица 2. Содержание ангидро-DP2 в олигосахаридных препаратах с несколькими сериями

Пример	Относительное содержание ангидро-DP2, % по отношению к примеру 9.7	Содержание ангидро-DP2 (грамм ангидро-DP2/ грамм общих DP2)
Пример 9.1	53%	5,3%
Пример 9.2	14%	1,4%
Пример 9.3	57%	5,7%
Пример 9.4	53%	5,3%
Пример 9.5	33%	3,3%
Пример 9.6	50%	5,0%
Пример 9.7	100%	10,0%

Молекулярный фингерпринтинг методом 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР:

Молекулярные структуры препаратов олигосахаридов из Примера 9 были охарактеризованы с помощью 2D ^{1}H, ^{13}C-HSQC ЯМР спектроскопии. Образцы получали растворением 50 мг препарата сухого олигосахарида в D_2O. Спектры ЯМР получали при 300 К либо на ЯМР-спектрометре Bruker Avance, работающем с частотой протонов 400 МГц, либо на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III, работающем с частотой протонов 600 МГц, оборудованном криогенно охлаждаемым 5-миллиметровым зондом TCI. На фиг. 1 представлен иллюстративный 2D ^{1}H, ^{13}C HSQC ЯМР-спектр олигосахаридного препарата из примера 9.7.

Аномерная область спектра ^{1}H, ^{13}C-HSQC, F2 (^{1}H) = 4,2-6,0 м.д. и F1 (^{13}C) = 90-120 м.д. была использована для фингерпринтинга распределения связей олигосахаридных препаратов. Каждый пик в аномерной области был интегрирован, и его относительное содержание было определено по отношению к таковому всей аномерной области. 2D ^{1}H, ^{13}CHSQC фингерпринтинг проводили на четырех сериях олигосахаридного препарата из примера 9.1, в результате чего были получены следующие значения относительной распространенности, представленные в таблице 3.

Таблица 3. Относительная распространенность пиков 2D ^{1}H, ^{13}C HSQC ЯМР олигосахаридного препарата из примера 9.1

F2 (м.д.)	F1 (м.д.)	AUC (Среднее ± SEM)
5,43	92,42	0,4% ± 0,3%
5,44	102,07	0,4% ± 0,1%
5,43	90,05	0,5% ± 0,2%
5,40	100,22	1,6% ± 0,4%
5,37	98,33	0,7% ± 0,4%
5,35	99,70	2,7% ± 0,6%
5,33	96,53	0,3% ± 0,2%
5,24	100,86	0,5% ± 0,2%
5,22	92,71	20,2% ± 3,9%
5,21	102,45	0,5% ± 0,4%
5,18	93,86	0,9% ± 0,4%
5,17	96,01	0,4% ± 0,1%
5,09	96,88	0,6% ± 0,3%
5,03	108,49	0,4% ± 0,2%
5,02	109,16	0,4% ± 0,4%
4,98	99,19	0,6% ± 0,3%
4,95	98,51	30,6% ± 4,1%
4,86	98,53	0,7% ± 0,5%
4,79	96,84	0,6% ± 0,3%
4,71	103,48	2,5% ± 0,7%
4,64	103,56	0,8% ± 0,4%
4,63	102,49	0,7% ± 0,5%
4,62	104,56	1,4% ± 0,4%
4,57	97,07	1,6% ± 0,3%
4,50	103,30	25,9% ± 2,2%
4,45	103,56	2,4% ± 1,3%

Пример 10. Определение ангидро-субъединиц сахаров в олигосахаридном препарате

Относительное количество ангидро-субъединиц сахаров в олигосахаридных препаратах из примера 9 определяли с помощью MALDI-MS на приборе Bruker Ultraflex. Образцы растворяли в воде до концентрации 10 мг/мл, из которых 5 мкл смешивали с раствором матрицы (30 мг/мл DHB в 80% этаноле и воде в соотношении 1:10). Пластинки готовили путем нанесения 1 мкл раствора анализируемого вещества на целевую пластинку, и сушили на окружающем воздухе. В некоторых случаях образцы подвергали перекристаллизации, применяя 1 мкл этанола перед анализом МС.

Фиг. 2 представляет иллюстративный спектр MALDI олигосахаридного препарата из примера 9. Ангидро-субъединицы сахара четко наблюдаются в виде смещенных пиков, сдвинутых на -18 г/моль относительно его соответствующей основной исходной DP. Смещенные пики наблюдаются при всех значениях DP, указывая на то, что ангидро-субъединицы сахара обнаруживаются при всех размерах олигосахаридов. Относительная интенсивность пика ангидро-субъединицы составила примерно 10% от общей интенсивности пика для каждого значения DP.

Фиг. 20A и фиг. 20B иллюстрируют спектры MALDI олигосахаридного препарата из примера 2. Ангидро-субъединицы сахаров наблюдаются на каждом уровне DP с относительной интенсивностью в диапазоне 5-10%.

Пример 11. Характеристика ангидро-субъединиц олигосахаридного препарата

Ангидросахарные субъединицы олигосахаридных препаратов из примера 9 были охарактеризованы с использованием комбинации методов ЖХ-МС, ГХ-МС, ЖХ-МС/МС и ЯМР.

Характеристика ангидро-DP1 компонентов:

Ангидрокомпонент DP1 олигосахарида из олигосахаридного препарата из примера 9 выделяли с помощью препаративной жидкостной хроматографии. Выделенный ангидро-DP1 компонент получали для ЯМР растворением его в 0,75 мл D_2O. На фиг. 3 представлен иллюстративный 1D ^{1}H-ЯМР-спектр фракции ангидро DP1, выделенной из олигосахарида из примера 9, а на фиг. 4 представлен иллюстративный спектр АРТ ^{13}C-ЯМР той же выделенной фракции ангидро DP1. Назначения пиков ЯМР представлены в таблице 4 и на фиг. 5.

Таблица 4. Назначения пиков ЯМР

	1,6-ангидро-бета-D-глюкофураноза		1,6-ангидро-бета-D-глюкопираноза	
#	^{1}H (м.д.)	^{13}C (м.д.)	^{1}H (м.д.)	^{13}C (м.д.)
1	5,33	101,9	5,01	104,4
2	3,40	70,6	4,37	79,8
3	3,56 (ov)[a]	73,0	4,27	78,3
4	3,56 (ov)[a]	71,3	4,38	80,6
5	4,50	76,7	3,74	64,1
6	3,97; 3,64	65,7	4,14; 3,72	66,7

[a]Ov означает перекрывающийся сигнал.

Отношение 1,6-ангидро-бета-D-глюкофуранозы к 1,6-ангидро-бета-D-глюкопиранозе, определенное методом ЯМР, составило 2:1.

Пример 12. Характеристика ангидро-субъединиц олигосахаридного препарата

Ангидросахарные субъединицы олигосахаридных препаратов из примера 9 характеризовали с использованием комбинации методов ЖХ-МС, ГХ-МС, ЖХ-МС/МС и ЯМР.

Характеристика компонентов ангидро-DP2

Содержание ангидроолигосахаридов DP2 в олигосахаридных препаратах из примера 9 определяли с помощью анализа ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Газовую хроматографию выполняли с использованием колонки из плавленого диоксида кремния

30 м x 0,25 мм, содержащей неподвижную фазу HP-5MS, с гелием при постоянном давлении 21,57 фунт/кв.дюйм в качестве газа-носителя. Аликвоты предварительно дериватизировали ацетилированием путем растворения 20 мг образца в 0,5 мл пиридина с 0,5 мл уксусного ангидрида в течение 30 минут при 60°C. Образцы объемом 1 мкл вводили при 300°C с температурной программой печи, начиная с 70°C и постепенно повышая на 10°C в минуту до 315°C. Детекцию проводили на МСД Agilent 5975C с энергией электронов 70 эВ.

Фиг. 6 показывает увеличение хроматограммы ГХ-МС для олигосахаридного препарата из примера 9.7. Графики TIC и XIC (m/z 229) демонстрируют, что компоненты ангидро-DP2 элюируются раньше компонентов DP2.

Фиг. 25A-25B, 26A-26B, 27A-27B и 28A-28 иллюстрируют присутствие фракций DP1, ангидро-DP1, DP2 и ангидро-DP2, как определено с помощью ГХ-МС в олигосахаридном препарате из примера 1, примера 3, примера 4 и примера 7, соответственно. Как показано на фиг. 25A-25B, 26A-26B, 27A-27B и 28A-28B, фракции ангидро-DP1 и DP1 имеют время удерживания примерно 12-17 минут, а фракции ангидро-DP2 и DP2 имеют время удерживания примерно 2-25 минут.

Фиг. 30 иллюстрирует спектры MALDI-MS, сравнивающие олигосахаридный препарат из примера 9 при различных энергиях лазера. Относительное количество сигналов практически не изменилось, что свидетельствует о том, что лазерная ионизация не приводит к потере воды. Следовательно, доказано наличие ангидросахарных субъединиц в олигосахаридном препарате.

Пример 13. Сравнительный пример

Коммерческий 5 кДа декстран анализировали с помощью MALDI-MS на присутствие ангидросахарных субъединиц. Фиг. 7 иллюстрирует явное присутствие смещенного пика со сдвигом на –18 г/моль от основного пика DP (аддукт Na+ при 851,268 г/моль). В отличие от этого было обнаружено, что образец декстрана практически не содержит ангидросахарных субъединиц.

Пример 14. Количественное определение безводного компонента DP с помощью ЖХ-МС/МС

Образцы растворяли в воде и разделяли с использованием колонки Capcell Pak NH2 (Shiseido; 250 × 4,6 мм, 5 мкм) при скорости потока 1 мл/мин в изократических условиях вода/ацетонитрил 35/65. В некоторых случаях после хроматографического разделения добавляли 50 мкл 0,05% NH_4OH для усиления ионизации. Содержание ангидро-DP2 олигосахаридов определяли методом МС/МС. Для детекции МС использовали зонд ESI в отрицательном режиме, а метод MRM позволял проводить целенаправленный анализ.

Фиг. 8 иллюстрирует детекцию олигосахаридного препарата из примера 9 в диапазоне концентраций 1-80 мкг/мл в воде с линейной калибровочной кривой (показанной на фиг. 9) от площади под хроматограммой ЖХ-МС/МС до концентрации.

Фиг. 21A-21C, 22A-22C, 23A-23C и 24A-24C иллюстрируют присутствие разновидностей ангидро-DP2, ангидро-DP1 и DP2, обнаруженных с помощью ЖХ-МС/МС в олигосахаридном препарате из примера 1, примера 3, примера 4 и пример 7, соответственно.

Пример 15. Приготовление корма, содержащего олигосахаридные препараты

Рационы домашней птицы и свиней были приготовлены для демонстрации включения препаратов олигосахаридов в рацион. Контрольные корма, демонстрирующие различные составы ингредиентов, и соответствующие обработанные корма, полученные путем обогащения соответствующих контрольных кормов препаратами олигосахаридов из примера 9, были приготовлены следующим образом.

Примерный корм 15.1. Контрольный корм 15.1 (CTR) был приготовлен с использованием 62% кукурузной муки и 32% соевой муки. Обработанный корм 15.1 (TRT) был приготовлен путем добавления в контрольный корм 15.1 (CTR) 500 мг/кг олигосахаридного препарата из примера 9. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был обеспечен в форме порошка путем сушки олигосахарида на молотой рисовой шелухе в качестве носителя и добавления порошка в смеситель с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.2. Контрольный корм 15.2 (CTR) был приготовлен с использованием 62% кукурузной муки, 3% соевого концентрата и 26% соевой муки. Обработанный корм 15.2 (TRT) был приготовлен путем добавления в контрольный корм 15.2 (CTR) 500 мг/кг олигосахаридного препарата из примера 9. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был предоставлен в форме порошка путем сушки олигосахарида на молотой рисовой шелухе в качестве носителя и добавления порошка в смеситель с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.3. Контрольный корм 15,3 (CTR) был приготовлен с использованием 52% кукурузной муки, 6% кукурузного крахмала, 5% концентрата соевых бобов, 26% соевой муки и микроиндикатора оксида титана. Обработанный корм 15.3 (TRT) получали путем добавления в контрольный корм 15.3 (CTR) 500 мг/кг олигосахаридного препарата. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был обеспечен в форме порошка путем сушки олигосахарида на измельченной рисовой шелухе в качестве носителя и добавления порошка в смеситель с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.4. Контрольный корм 15.4 (CTR) был приготовлен с использованием 55% кукурузной муки и 39% соевой муки. Обработанный корм 15.4 (TRT) получали путем увеличения контрольного корма 15.4 (CTR) 1000 мг/кг олигосахаридного препарата. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был обеспечен в форме порошка путем сушки олигосахарида на измельченной рисовой шелухе в качестве носителя и добавления порошка в смеситель с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.5. Контрольный корм 15.5 (CTR) был приготовлен с использованием 62% кукурузной муки, 3% соевого концентрата и 26% соевой муки. Обработанный корм 15.5 (TRT) был приготовлен путем добавления в контрольный корм 15.5 (CTR) 500 мг/кг олигосахаридного препарата из примера 9. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был обеспечен в форме порошка, с добавлением порошка в миксер с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.6. Контрольный корм 15,6 (CTR) представлял собой коммерческий кукурузно-соевый стартовый корм для птицы из США. Обработанный корм 15,6 (TRT) представлял собой коммерческий стартовый корм для птицы из кукурузы и сои в США, содержащий 500 ч./млн. олигосахаридного препарата. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат был обеспечен в форме порошка, и порошок добавляли в смеситель с использованием весов для микро-ингредиентов перед гранулированием.

Примерный корм 15.7. Контрольный корм 15.7 (CTR) представлял собой исследуемый кукурузно-соевый корм для птицы со следующим составом рациона: кукурузная мука 62,39%, соевая мука 31,80%, карбонат кальция 0,15%, бикальцийфосфат 2,2%, хлорид натрия 0,15%, DL-метионин 0,15%, L-лизин 0,10%, соевое масло 2,00%, витаминно-минеральный премикс 1,00% и кокцидиостатик 0,06%. Обработанный корм 15,7 (TRT) получали путем добавления в контрольный корм 15.7 (CTR) 1000 ч./млн. олигосахаридного препарата из примера 9.1. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат обеспечивали в виде 60% сиропа в воде и наносили путем распыления сиропа на корм после гранулирования.

Примерный корм 15.8. Контрольный корм 15.8 (CTR) представлял собой исследуемый кукурузно-соевый корм для домашней птицы со следующим составом: пшеничная мука 48,45%, соевая мука 32,00%, рожь 12%, карбонат кальция 0,20%, бикальций-фосфат 2,00%, хлорид натрия 0,20%, DL-метионин 0,15%, соевое масло 4,00%, витаминно-минеральный премикс 1,00%. Обработанный корм 15.7 (TRT) получали путем добавления в контрольный корм 15.7 (CTR) 1000 ч./млн. олигосахаридного препарата из

примера 9.3. Для обработанного рациона олигосахаридный препарат обеспечивали в виде 60% сиропа в воде и наносили путем распыления сиропа на корм после гранулирования.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, 15.1-15.6 также содержат стандартные отраслевые уровни жиров, витаминов, минералов, аминокислот, других микроэлементов и кормовых ферментов. В некоторых случаях корма содержали. В соответствии со стандартной практикой корма обеспечивали в виде пюре, гранул или крошек.

Пример 16. Экстракция образцов корма

Рационы, приготовленные в соответствии с процедурами из примера 15, обрабатывали экстракцией. Образцы корма измельчали на мельнице. Готовили навеску из пяти граммов полученного измельченного корма в мерную колбу вместимостью 50 мл и добавляли горячую воду (примерно 80°C). После встряхивания смесь инкубировали на ультразвуковой водяной бане при 80°C в течение 30 минут. После охлаждения раствор центрифугировали в течение 20 минут при 3000 g, и надосадочную жидкость фильтровали через фильтр 1,2 мкм, а затем фильтр 0,45 мкм (и в некоторых случаях фильтр 0,22 мкм). Полученные отфильтрованные растворы упаривали досуха на роторном испарителе.

В некоторых случаях экстракцию проводили с использованием 50 масс.% этанола в воде в качестве альтернативного экстракционного растворителя. В некоторых случаях стадию фильтрации выполняли с использованием мембранного фильтра с отсечкой по молекулярной массе 5000 Дальтон. Список образцов кормов для экстракции и переваривания представлен в таблице 5.

Пример 17. Ферментативная обработка кормовых экстрактов

Кормовые экстракты из примера 16 подвергали одной или нескольким стадиям ферментативного гидролиза для расщепления олигосахаридов, естественно присутствующих в корме. Смесь α-амилазы и амилогликозидаз использовали для расщепления α-(1,4) связей глюкоолигосахаридов и крахмала. Инвертазу и α-галактозидазу использовали для удаления сахарозы, рафинозы и других распространенных сахаридов клетчатки.

Растворы ферментов готовили следующим образом: амилоглюкозидаза (A. niger) 36000 Ед./г, раствор 800 Ед./мл в ацетатаммонийном буфере (ацетат аммония 0,2 М, pH 5, содержащий 0,5 мМ $MgCl_2$ и 200 мМ $CaCl_2$), α-амилаза (из поджелудочной железы свиньи) 100000 Ед./г, Megazyme: раствор 800 Ед./мл в ацетате аммония, инвертаза из хлебопекарных дрожжей (S. cerevisiae) 300 Ед./мг, Sigma: раствор 600 Ед./мл в ацетатаммонийном буфере; α-Галактозидаза из A. Niger, Megazyme 1000 Ед/мл.

Сухие кормовые экстракты из примера 16 ресуспендировали в 10 мл буфера из

ацетата аммония. Добавляли 50 мкл α-амилазы (конечная концентрация 4 Ед./мл), 50 мкл амилоглюкозидазы (конечная концентрация 4 Ед./мл), 50 мкл инвертазы (конечная концентрация 3 Ед./мл). При необходимости добавляли 20 мкл α-галактозидазы (конечная концентрация 2 Ед./мл). Раствор инкубировали 4 часа при 60°C. Затем расщепленный экстракт фильтровали через ультрафильтрационный фильтр (Vivaspin Turbo 4, 5000 MWCO, Sartorius) перед выпариванием досуха в системе выпаривания азота. В вариантах ферментативного расщепления один или несколько из вышеуказанных ферментов использовали в комбинациях, и период расщепления варьировали от 4 часов до расщепления в течение ночи. Концентрации фермента изменяли до двухкратных по сравнению с вышеуказанными загрузками, и процедуру полного ферментативного расщепления повторяли несколько раз подряд на одном и том же корме.

Таблица 5. Список образцов кормов для экстракции и расщепления

Матрикс		Растворитель для экстракции	Фильтрация	Ферментативное расщепление
1	Контрольный корм	Вода	0,22 мкМ	–
2	Ангидроолигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,22 мкМ	–
3	Контрольный корм	Этанол/Вода 50/50	0,22 мкМ	–
4	Ангидроолигомерный корм 1000 мг/кг	Этанол/Вода 50/50	0,22 мкМ	–
5	Ангидроолигомеры	Вода	0,22 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
6	Контрольный корм	Вода	0,22 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
7	Ангидроолигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,22 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
10	Контрольный корм	Этанол/Вода 50/50	0,22 мкМ	–
11	Ангидроолигомерный корм 1000 мг/кг	Этанол/Вода 50/50	0,22 мкМ	–
12	Ангидроолигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,45 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
13	Ангидроолигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,22 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
14	Контрольный стартовый корм A	Вода	0,45 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
15	Ангидроолигомерный стартовый корм B 2000 мг/кг	Вода	0,45 мкМ	a + b (4 ч 60°C)
16	Контрольный корм	Вода	0,45 мкМ	a + b + c (4 ч 60°C)
17	Ангидроолигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,45 мкМ	a + b + c (4 ч 60°C)
18	Рис и спельта/ Ангидроолигомеры	Вода	0,45 мкМ	–
19	Рис и спельта/ Ангидроолигомеры	Этанол/Вода 50/50	0,45 мкМ	–
20	Контрольный корм	Вода	0,45 мкМ	a + b + c (4 ч 60°C)
21	Ангидроолигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,45 мкМ	a + b + c (4 ч 60°C)
22	Ростовой корм C (контроль)	Вода	0,45 мкМ	
23	Ростовой корм D (ангидро-	Вода	0,45 мкМ	

	олигомеры 2000 мг/кг)			
24	Предстартовый корм A (контроль)	Вода	0,45 мкМ	
25	Предстартовый корм D (Ангидроолигомеры 1000 мг/кг)	Вода	0,45 мкМ	
26	Ростовой корм C (контроль)	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
27	Ростовой корм D (Ангидроолигомеры 2000 мг/кг)	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
28	Предстартовый корм A (контроль)	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
29	Предстартовый корм D (Ангидроолигомеры 1000 мг/кг)	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
30	Кукуруза	Вода	0,45 мкМ	_
31	Пшеница	Вода	0,45 мкМ	_
32	Соя	Вода	0,45 мкМ	_
33	Кукуруза	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
34	Пшеница	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
35	Соя	Вода	0,45 мкМ	a + b + c + d (4 ч 60°C)
41	Контрольный корм	Вода	0,45 мкМ	
42	Ангидроолигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	0,45 мкМ	
43	Контрольный корм	Вода	ультра 5000 MWCO	a + b + c X2 (в течение ночи при 60°C)
44	Ангидроолигомерный корм 1000 мг/кг	Вода	ультра 5000 MWCO	a + b + c X2 (в течение ночи при 60°C)

Ангидроолигомеры относятся к олигосахаридам, содержащим ангидро-субъединицы.

Контрольные корма относятся к питательным композициям без добавленных ангидроолигомеров.

Фермент a = амилоглюкозидаза (A. niger) 36000 Ед./г Megazyme.

Фермент b = α-амилаза (из поджелудочной железы свиньи) 100000 Ед./г Megazyme.

Фермент c = инвертаза из пекарских дрожжей (S. cerevisiae) 300 Ед./мг Sigma.

Фермент d = α-галактозидаза из A. niger 620 Ед./г Megazyme.

Пример 18. Детекция олигосахаридных препаратов в корме

Контрольный и обработанный рационы в соответствии с примером 15 анализировали для детекции отсутствия или наличия олигосахаридных препаратов. После изготовления корма из конечного корма брали пробы массой 1 кг. Содержание экстрагируемых твердых веществ в корме получали путем водной экстракции с использованием процедуры из примера 16. Полученные экстракты анализировали на

присутствие ангидро-DP с помощью ЖХ-МС/МС в соответствии с процедурой из примера 14.

Фиг. 10 четко иллюстрирует отсутствие разновидностей ангидро-DP2 в контрольном корме из примеров 15.1 (CTR) - 15,6 (CTR) по сравнению с присутствием разновидностей ангидро-DP2 в обработанном корме из примеров 15.1 (TRT) - 15,6 (TRT). Интеграцию полученных хроматограмм ЖХ-МС/МС использовали для определения присутствия олигосахаридных композиций из примера 9 в конечном сырье. В частности, было определено, что корма содержали соответствующий олигосахаридный препарат, если площадь под пиком ангидро-DP2 превышала предел детекции (или любой другой подходящий порог, установленный в методе).

Пример 19. Количественная оценка олигосахаридных препаратов в кормах

Контрольный и обработанный рационы согласно примеру 15 анализировали для определения концентрации олигосахаридных препаратов в конечном корме. После изготовления корма из конечного корма брали пробы массой 1 кг. Содержание экстрагируемых твердых веществ в сырье было получено путем водной экстракции с использованием процедуры из примера 16. Полученные экстракты были проанализированы на присутствие ангидро-DP с помощью ЖХ-МС/МС в соответствии с процедурой из примера 14, и площади пика ангидро-DP2 сравнивали со стандартной калибровочной кривой для определения концентрации олигосахаридного препарата в корме.

Таблица 6. Количественное определение олигосахаридов в кормах

Корм	Содержание олигосахаридов (ч./млн.) в контрольном корме	Содержание олигосахаридов (ч./млн.) в обработанном корме
Пример 15.1	Не обнаружено	1642
Пример 15.2	Не обнаружено	953
Пример 15.3	Не обнаружено	1912
Пример 15.4	Не обнаружено	549
Пример 15.5	Не обнаружено	406
Пример 15.6	Следовое количество	401

Пример 20. ЯМР-характеристика глюкоолигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы

Глюкоолигосахаридные препараты, содержащие ангидро-субъединицы, характеризовали по (i) степени полимеризации и (ii) распределению гликозидных связей из глюкозных единиц.

Относительную молярную распространенность α-(1,1)-α, α-(1,1)-β, β-(1,1)-β, α-(1,2), β-(1,2), α-(1,3), β-(1,3), α-(1,4), β-(1,4), α-(1,6), и β-(1,6) связей идентифицировали методом ЯМР-спектроскопии. Для определения распределения сцепления использовали J-RES и ^{1}H, ^{13}C-HSQC. Для некоторых образцов метод HSQC показал превосходные

характеристики. Для каждого анализа приблизительно 50 мг лиофилизированного продукта растворяли в D_2O и переносили в 5-миллиметровую пробирку для ЯМР. Любой остаточный катализатор или твердые вещества удаляли фильтрацией. ЯМР-эксперименты проводили на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III, работающем на протонах 600 МГц, соответствующем частоте Лармора углерода 150 МГц. Инструмент был снабжен криогенно охлаждаемым датчиком TCI размером 5 мм. Все эксперименты проводили при 298 К. Спектры ^{1}H-ЯМР регистрировали и калибровали в дейтерированной воде (4,75 ч./млн.). Спектры ^{13}C-ЯМР калибровали ацетоном (30,9 ч./млн.). Данные были получены с помощью TopSpin 3.5 и обработаны с помощью ACD/Labs на персональном компьютере.

Фиг. 11 представляет типичный спектр ЯМР 2D-1H JRES для образца глюкоолигосахарида, содержащего ангидро-субъединицы, с предварительным насыщением растворителем.

Фиг. 12 представляет типичный 1H, 13C-HSQC ЯМР спектр глюкосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы.

Фиг. 13 иллюстрирует наложение спектров 1H DOSY трех олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. Диффузионно-упорядоченную ЯМР-спектроскопию (DOSY) выполняли для разделения сигналов ЯМР различных видов в соответствии с коэффициентом диффузии и, следовательно, гомологами MW. Сигналы в верхней части спектров DOSY на фиг. 13 соответствуют медленно диффундирующим видам, в то время как более быстро диффундирующие виды указаны ниже.

Пример 21. Полупрепаративное выделение фракций DP1 и DP2

Препаративное выделение фракции DP1 проводили с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием колонки Waters BEHAmide 19x150 мм. В качестве подвижной фазы использовали воду в качестве растворителя A и ацетонитрил в качестве растворителя B, каждый с 0,1% аммиака. Применяемый градиент показан в таблице 7. Собранную фракцию DP1 из 8 разделений объединяли, сушили и повторно солюбилизировали в 0,75 мл D_2O для анализа ЯМР, как описано ранее.

Для характеристики фракции DP2 была проведена 2-ступенчатая очистка. Первая стадия была выполнена в системе флэш-хроматографии с использованием ELSD (испарительного детектора светорассеяния). 2 мл (2,65 г) олигосахаридного препарата разбавляли 1 мл ДМСО, 0,5 мл воды и 0,5 мл ацетонитрила. Раствор перемешивали и обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут. 1 мл раствора вводили в колонку YMC DispoPackAT, NH2, сферическую, 25 мкм, 120 г. Олигосахаридный препарат разделяли методом изократического градиента с 75% ацетонитрила в воде со скоростью 40 мл/мин. Фракцию, содержащую DP2, сушили азотом и повторно растворяли в ДМСО/воде (80:20,

об./об.).

Для второй стадии очистки использовали аналитическую систему UPLC с колонкой YMC NH2 4,6x250 мм (5 мкм) при 40°C. Фракцию DP2 очищали изократическим градиентом (таблица 8) и скоростью потока 1 мл/мин. Деление после колонки 1:5 использовали для запуска сбора ELSD. Фракцию DP2 из 12 хроматографических циклов объединяли, ацетонитрил удаляли нагретым азотом, а остаточную воду - лиофилизацией. Сухую фракцию повторно солюбилизировали для последующего анализа ЖХ-МС/МС и ЯМР.

Таблица 7. Градиентный метод

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	Растворитель A	Растворитель B
0	25	10	90
2,5	25	10	90
23	25	25	75
23,1	25	10	90
47	25	10	90

Таблица 8. Изократический метод

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	Вода (%)	Ацетонитрил (%)
0	1	25	75
15	1	25	75

Второй подход, метод UPLC, был основан на разделении в режиме HILIC с использованием амидной колонки.

Подробности метода: система Waters UPLC-SQ MS/ELSD; растворитель A, 30/70 ацетонитрил/вода: 0,1% аммиака; растворитель B, ацетонитрил/вода 80/20: 0,1% аммиака; слабое промывание иглы: ацетонитрил/вода 80/20; сильное промывание иглы: 20/80 ацетонитрил/вода; колонка: Waters BEH Amide 2,1x100 мм, 1,7 мкм; раствор для ввода: 0,5 мкл в воде.

Таблица 9. Градиент

Время (мин)	Поток (мл/мин)	A (%)	B (%)	Наклон
Исходно	0,17	0	100	Исходно
13	0,17	60	40	6
14,5	0,17	100	0	6
16,5	0,17	100	0	6
16,6	0,17	0	100	6
30	0,17	0	100	6

Этот метод обеспечил хорошее разделение ряда контрольных сахарных соединений. Однако совместно элюируются только глюкоза и галактоза с разной формой пика.

Анализ 1,6-ангидро-ß-D-глюкозы (DP1-18) и 1,6-ангидро-ß-D-целлобиозы (DP2-18) показан на фиг. 14 по сравнению с образцом олигосахаридов, содержащим ангидро-субъединицу.

Препаративное выделение с помощью препаративной ВЭЖХ-ELSD/MC:

оптимизацию разделения препаративной ВЭЖХ обычно проводят, начиная с аналитической колонки. Как только разделение становится оптимальным, проводят эксперимент по загрузке колонки. Во время последующего масштабирования все параметры колонки, такие как размер частиц, длина, размер пор, фаза, линейная скорость потока (см/мин), остаются неизменными, изменяется только диаметр колонки.

Пример 22. Анализ расщепленных образцов корма

Интерференцию встречающихся в природе олигосахаридов в экстракте корма в анализе олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, уменьшали путем селективного расщепления фоновых компонентов корма без разрушения олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы. Фиг. 15 иллюстрирует масс-хроматограммы олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы (вверху), и расщепленных олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы (внизу), при выбранном MRM. Фиг. 16 иллюстрирует масс-хроматограммы (1) корма, включающего олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы; (2) расщепленного корма, включающего олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы; и (3) контрольного расщепленного корма при выбранном MRM. Например, как показано на фиг. 16, второй пик на уровне DP3 был по существу удален, а на уровне DP2 оба пика были значительно уменьшены.

Пример 23. Технологический процесс для количественного определения олигосахаридного препарата

Фиг. 17 иллюстрирует технологический процесс, используемый для количественного определения олигосахаридных препаратов. Он состоит из стадии экстракции водорастворимого олигосахаридного препарата из корма с последующим удалением воды выпариванием или лиофилизацией. Полученный экстракт будет исследован, если возможен прямой анализ препаратов олигосахаридов с помощью ЖХ-МС или ЯМР. Если это не так, мешающие олигосахариды из кормового матрикса должны быть удалены ферментативным гидролизом. Можно использовать тот факт, что большинство гликозидных связей в олигосахаридном препарате имеют связи и стереохимию, которые не встречаются в природе в основной питательной композиции. Таким образом, ожидается, что олигосахаридный препарат будет стабильным во время расщепления. В случае гликозидных связей, присутствующих в олигосахаридном препарате, которые в принципе могут быть расщеплены ферментами [в основном α-(1,4), α-(1,6), β-(1,6)], стерические препятствия из-за разветвления могут предотвратить расщепление для большинства молекул. После ферментативного расщепления перед количественным определением потребуется стадия концентрирования.

Олигосахариды с низким значением DP, в частности ангидро-DP1, ангидро-DP2 и

олигосахариды DP2, обычно состоят из относительно небольшого числа химических соединений и имеют относительно высокую концентрацию. Эти фракции можно определить количественно. Кроме того, небольшие олигомеры могут демонстрировать гораздо более высокую чувствительность при обнаружении ЖХ-МС, чем более крупные олигомеры.

Для количественной оценки с помощью МС в качестве внутреннего стандарта можно использовать обычно меченый изотопами материал. При необходимости можно использовать синтезированный олигосахаридный препарат, меченный ^{13}C. После количественной оценки будут выполнены ЯМР и/или МС для анализа количественно определенных олигосахаридов.

Пример 24. Дополнительные типичные рабочие процессы

В некоторых вариантах осуществления способ включает следующий технологический процесс:

(a) получение или изготовление образца питательной композиции; (b) экстракция из образца растворимых частиц с использованием растворителя (воды, водно-спиртовой смеси); (c) (при необходимости) введение внутреннего стандарта в экстракт; (d) (при необходимости) фильтрация или осветление экстракта (например, для удаления мелких частиц); (e) (при необходимости) концентрирование экстракта; (f) (при необходимости) расщепление части фоновых углеводов с использованием смеси гидролитических ферментов (углеводов, протеаз, липаз и т.д.); (g) (при необходимости) выполнение грубого разделения компонентов (расщепленного, концентрированного) экстракта, например, осаждением, нанофильтрацией и т.д.; (h) хроматографическое разделение некоторых или всех видов, содержащихся в экстракте, в частности углеводов DP2; (i) (при необходимости) количественное определение видов, содержащих главным образом гликозидные связи, которых обычно не бывает в самой питательной композиции; (j) (при необходимости) обнаружение и количественное определение присутствия конкретных ангидро DP1 и DP2 видов; и (k) вычисление концентрации углеводного препарата в корме, например, по стандартной кривой, полученной путем проведения анализа набора первичных стандартов, включающих питательные композиции, к которым было добавлено известное количество углеводного препарата.

Питательные композиции могут представлять собой корм для домашней птицы, корм для свиней, корм для рыбы или корм для жвачных животных.

Пример 25. Показатели роста коммерческих цыплят-бройлеров, получавших олигосахаридную композицию

Цыплят-бройлеров выращивали на рационах из примера 15.6, чтобы определить

влияние олигосахаридного препарата на показатели роста животных. В частности, коммерческие корма для птицы из кукурузной и соевой муки, содержащие раствор остатка после ферментации зерна (DDGS), кокцидиостатик и стандартную смесь питательных микроэлементов, производили в соответствии с отраслевыми практиками и трехфазной программой кормления. Путем предварительного анализа составы кормов были определены следующим образом (таблица 10).

Таблица 10. Определение состава корма.

Компонент	Стартовый корм	Ростовой корм	Корм для отвыкания	Метод
Влажность	13,0%	13,0%	12,9%	AOAC 930,15 (вытяжная печь)
Неочищенный белок (CP)	24,1%	21,5%	19,6%	AOAC 992,15; AOAC 990,03
Жир (EE)	3,2%	3,8%	3,9%	AOAC 920,39 (экстракция эфиром)
Неочищенные волокна (CF)	2,7%	2,4%	2,4%	AOAC 962,09 (гидролиз)
Минеральный остаток (AR)	5,2%	4,3%	4,3%	AOAC 942,05 (муфельная печь)
NFE, по разнице	51,9%	55,1%	56,9%	Рассчитано: 1-CP-EE-CF-AR
Всего	100,0%	100,0%	100,0%	

Контрольный (CTR) и обработанный (TRT) рационы готовили для каждой фазы, как описано в примере 15.6, где обработанные рационы готовили путем обогащения контрольного рациона одним фунтом на обработанную американскую тонну с использованием олигосахаридного препарата из примера 9.7. Всего было изготовлено примерно 50 американских тонн каждого рациона.

Цыплят Hubbard M99 × Cobb 500 в день вывода получали из коммерческого инкубатория и случайным образом размещали в загоны 36 футов × 40 футов, построенные в туннельно вентилируемом птичнике с земляным полом. Всего было размещено примерно 30 000 птиц, причем в каждом загоне было одинаковое количество птиц. Подстилка в помещении состояла из насыпной подстилки, засыпанной свежей древесной стружкой. Использовали стандартную коммерческую программу по окружающей среде и освещению. Животных и жилые помещения проверяли ежедневно, включая регистрацию общего состояния здоровья, потребления корма, подачи воды и температуры в помещении. Летальные исходы регистрировали ежедневно.

Птиц в загонах с нечетными номерами кормили обработанным рационом (т.е. содержащим кормовую добавку в количестве 2 фунта/тонну), а птицы в загонах с четными номерами получали контрольный рацион. Все рационы обеспечивали без ограничения через автоматические кормушки в каждом загоне и загрузочные лотки с первого по 7-й день. Воду подавали без ограничения из ниппельной линии поения.

Стартовая фаза проходила с 0 дня по 13 день, фаза выращивания с 14 дня по 27 день и фаза прекращения выращивания с 28 дня до конца исследования, день 31. Вес птицы в загоне регистрировали по дням 0 и 31. Для каждого загона регистрировали общую массу израсходованного корма. Затем для каждого загона определяли прибавку в весе и FCR в соответствии со стандартной отраслевой практикой.

На 31 день из каждого загона случайным образом выбирали шесть самцов птиц для отбора проб крови и слепой кишки. Регистрировали живую массу каждой отобранной птицы. Образец крови собирали путем прокола крыла в пробирки Vacutainer и замораживали после коагуляции и отделения сыворотки. Затем каждую отобранную птицу умерщвляли путем цервикальной дислокации с последующим извлечением слепой кишки стандартными ветеринарными методами. После рассечения содержимое слепой кишки переносили в конические пробирки на 15 мл, регистрировали массу содержимого слепой кишки, и содержимое мгновенно замораживали до -80°C. Исходя из массы отобранных птиц, экспериментальная группа показала увеличение на 11 пунктов по массе тела, значимое при $P < 0,05$ (по ANOVA).

Пример 26. Состав продукта в форме сиропа

В олигосахаридном препарате из примера 9.7 значение pH доводили до 4,2 гидроксидом натрия пищевого качества в соответствии с процедурой из примера 21. Полученный сироп был упакован в 20-литровую бутыль с крышкой, устойчивой к несанкционированному доступу. Непосредственно перед герметизацией контейнера был взят образец массой 500 г, который подвергали проверке качества. Было подтверждено, что общее содержание твердых веществ в сиропе превышает 70 масс.% согласно методам FCC, ПРИЛОЖЕНИЕ X: Углеводы (крахмалы, сахара и родственные вещества): Общее содержание твердых веществ. Было подтверждено, что содержание восстанавливающих сахаров составляет менее 50% в виде D-глюкозы в пересчете на массу сухого вещества в соответствии с методом FCC, ПРИЛОЖЕНИЕ X: Углеводы (крахмалы, сахара и родственные вещества): Анализ восстанавливающих сахаров. Было подтверждено, что содержание сульфатной золы составляет менее 1% от массы сухого вещества с использованием метода FCC, ПРИЛОЖЕНИЕ II: Физические испытания и определения: C. ДРУГОЕ: Остаток при минерализации (сульфатная зола), Метод II (для жидкостей). Содержание диоксида серы составило менее 40 мг/кг при использовании оптимизированного метода Монье-Вильямса. Содержание свинца составило менее 1 мг/кг при использовании официального международного метода AOAC 2013.06. Было подтверждено, что общее количество аэробных микроорганизмов при анализе чашечным способом ниже 1000 КОЕ/г, с использованием методов, описанных в Главе 7 CMMEF.

Общее количество дрожжевых и плесневых грибов составило менее 100 КОЕ/г при использовании международного метода, утвержденного AACC 42-50. Было подтверждено, что содержание колиформных бактерий составляет менее 10 MPN/г, при использовании метода, описанного в главе 4 FDA BAM. Было подтверждено, что содержание E. coli составляет менее 3 MPN/г, при использовании метода из главы 4 FDA BAM. Было подтверждено, что сальмонелла не обнаруживается в 25-граммовой пробе в соответствии с методом, указанным в главе 5 FDA BAM. Содержание Staphylococcus aureus было ниже 10 КОЕ/г при использовании метода FDA BAM, Глава 12. Окраска при визуальном анализе была определена как карамельная.

Контейнер герметизировали, оставшийся для хранения образец замораживали и сохраняли для дальнейшего использования, и на полученную партию был выдан сертификат анализа.

Пример 27. Приготовление очищенной питьевой воды

Питьевая вода, содержащая 250 ч./млн. олигосахаридного препарата из примера 9.7, была приготовлена следующим образом. 37 мл олигосахаридного сиропа из примера 33 и 40 граммов сорбата калия постепенно добавляли к 50 галлонам питьевой водопроводной воды в 55-галлонной бочке из синего полимера. Раствор перемешивали вручную с помощью лопастной мешалки в течение 10 минут при комнатной температуре.

Хотя здесь были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Не предполагается, что изобретение ограничивается конкретными примерами, представленные в описании. Хотя изобретение было описано со ссылкой на вышеупомянутую спецификацию, описания и иллюстрации вариантов осуществления в данном документе не предназначены для толкования в ограничивающем смысле. Многочисленные вариации, изменения и замены будут понятны для специалистов в данной области техники без отделения от изобретения. Кроме того, следует понимать, что все аспекты изобретения не ограничиваются конкретными изображениями, конфигурациями или относительными пропорциями, изложенными в настоящей заявке, которые зависят от множества условий и переменных. Необходимо понять, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящей заявке, могут быть использованы при практическом применении изобретения. Следовательно, предполагается, что изобретение также будет охватывать любые такие альтернативы, модификации, вариации или эквиваленты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ корреляции синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции,

где питательная композиция включает синтетический олигосахаридный препарат и натуральную олигосахаридную композицию,

где способ включает:

(a) обеспечение образца питательной композиции;

(b) детекцию сигнала по меньшей мере части олигосахаридов в образце питательной композиции; и

(c) корреляцию концентрации синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции,

где сигнал (i) указывает на один или несколько олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, или (ii) ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов.

2. Способ выполнения контроля качества питательной композиции, включающий:

(a) обеспечение партии питательной композиции, включающей синтетический олигосахаридный препарат и натуральную олигосахаридную композицию;

(b) получение образца питательной композиции из партии;

(c) детекцию сигнала по меньшей мере части олигосахаридов в образце питательной композиции с помощью аналитических приборов; и

(d) приемку или браковку партии питательной композиции;

где сигнал (i) указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц; или (ii) ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидные связи, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов.

3. Способ по пп. 1 или 2, где сигнал указывает на наличие олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц.

4. Способ по п. 3, где олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, имеют степень полимеризации 2 (DP2).

5. Способ выполнения контроля качества питательной композиции, включающий:

(a) обеспечение образца питательной композиции, включающей натуральную олигосахаридную композицию; и

(b) детекцию сигнала по меньшей мере части олигосахаридов в образце питательной композиции с помощью аналитических приборов, где сигнал указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, имеющие степень полимеризации 2 (DP2).

6. Способ по п. 5, где питательная композиция включает синтетический олигосахаридный препарат.

7. Способ по п. 2 или 6, включающий корреляцию концентрации синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где сигнал обнаруживают с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии (ГХ), масс-спектрометрии (МС), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), эксклюзионной хроматографии (SEC), проточного фракционирования в силовом поле (ПФП), проточного фракционирования под влиянием асимметричного силового поля (A4F), определения массы фракций с помощью препаративной хроматографии, или любой их комбинации.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где питательная композиция включает основную питательную композицию.

10. Способ по п. 9, где основная питательная композиция включает натуральную олигосахаридную композицию.

11. Способ по пп. 9 или 10, где в основной питательной композиции отсутствует определяемый уровень олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы.

12. Способ по любому из пп. 9-11, где основная питательная композиция по существу не включает олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы.

13. Способ по любому из пп. 1-4 или 6-12, где олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, происходят из синтетического олигосахаридного препарата.

14. Способ по любому из пп. 1-3 или 8-13, где сигнал является показателем олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеющих степень полимеризации 1 (DP1).

15. Способ по п. 14, где сигнал характерен для левоглюкозана, 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы или их комбинации.

16. Способ по любому из пп. 1-3 или 8-13, где сигнал указывает на наличие

олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, со степенью полимеризации 3 (DP3).

17. Способ по любому из пп. 1-3 или 8-13, где сигнал указывает на наличие DP1, DP2 или DP3 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, или их комбинации.

18. Способ по любому из пп. 1-13, где сигнал характерен для ангидроцеллобиозы.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где детекция включает определение массы одной или нескольких фракций олигосахаридов по степени полимеризации (DP).

20. Способ по любому из пп. 1-19, где детекция включает определение массы по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца.

21. Способ по п. 20, где по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеет степень полимеризации 1, 2 или 3.

22. Способ по любому из пп. 19-21, где одну или несколько фракций DP олигосахаридов или по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, выделяют препаративной хроматографией.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где сигнал обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS).

24. Способ по любому из пп. 1-22, где сигнал обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (ЖХ-МС)/МС.

25. Способ по любому из пп. 1-22, где сигнал обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью ГХ с детектором пламенной ионизации (ГХ-ПИД) или ГХ-МС.

26. Способ по любому из пп. 1-22, где сигнал обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью ЯМР-спектроскопии.

27. Способ по любому из пп. 1-2 или 8-12, где сигнал ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями или β-(1,6) гликозидными связями олигосахаридов.

28. Способ по п. 27, где детекция включает получение спектра ЯМР.

29. Способ по пп. 27 или 28, где сигнал ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями.

30. Способ по пп. 27 или 28, где сигнал ассоциирован с α-(1,3) гликозидными связями.

31. Способ по пп. 27 или 28, где сигнал ассоциирован с α-(1,6) гликозидными связями.

32. Способ по пп. 27 или 28, где сигнал ассоциирован с β-(1,2) гликозидными связями.

33. Способ по пп. 27 или 28, где сигнал ассоциирован с β-(1,3) гликозидными связями.

34. Способ по пп. 27 или 28, где сигнал ассоциирован с β-(1,4) гликозидными связями.

35. Способ по пп. 27 или 28, где сигнал ассоциирован с β-(1,6) гликозидными связями.

36. Способ по любому из пп. 1-35, где детекция включает определение наличия или отсутствия сигнала.

37. Способ по п. 36, где детекция включает определение наличия или отсутствия DP1 или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, или обоих типов.

38. Способ по любому из пп. 1-37, где детекция включает определение или корреляцию уровня сигнала.

39. Способ по п. 38, где детекция включает корреляцию уровня DP1 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в питательной композиции.

40. Способ по пп. 38 или 39, где детекция включает корреляцию уровня DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в питательной композиции.

41. Способ выполнения контроля качества питательной композиции, содержащей синтетический олигосахаридный препарат и натуральную олигосахаридную композицию, включающий:

(a) обеспечение первого образца питательной композиции;

(b) обеспечение второго образца питательной композиции;

(c) детекцию первого сигнала по меньшей мере части олигосахаридов в первом образце;

(d) детекцию второго сигнала по меньшей мере части олигосахаридов во втором образце; и

(e) сравнение первого сигнала и второго сигнала;

где первый сигнал и второй сигнал независимо (i) указывают на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц; или (ii) ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов.

42. Способ по п. 41, включающий корреляцию концентрации синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции из первого образца, концентрации

синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции из второго образца, или того и другого.

43. Способ по пп. 41 или 42, где каждый из первого сигнала и второго сигнала независимо указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц.

44. Способ по п. 43, где первый сигнал и второй сигнал характерны для одного и того же вида олигосахарида, содержащего ангидро-субъединицы.

45. Способ по п. 43, где первый сигнал и второй сигнал характерны для разных видов олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы.

46. Способ по любому из пп. 41-45, где первый образец и второй образец взяты из разных партий питательной композиции.

47. Способ по любому из пп. 41-46, где первый сигнал и второй сигнал независимо обнаруживают с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии (ГХ), масс-спектрометрии (МС), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), эксклюзионной хроматографии (SEC), проточного фракционирования в силовом поле (ПФП), проточного фракционирования под влиянием асимметричного силового поля (A4F), определения массы фракций с помощью препаративной хроматографии, или любой их комбинации.

48. Способ по любому из пп. 41-47, где питательная композиция включает основную питательную композицию.

49. Способ по п. 48, где основная питательная композиция включает натуральную олигосахаридную композицию.

50. Способ по пп. 48 или 49, где в основной питательной композиции отсутствует определяемый уровень олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы.

51. Способ по любому из пп. 48-50, где основная питательная композиция по существу не включает олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы.

52. Способ по любому из пп. 41-51, где олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, происходят из синтетического олигосахаридного препарата.

53. Способ по любому из пп. 41-52, где первый сигнал, второй сигнал или оба независимо характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеющих степень полимеризации 1 (DP1).

54. Способ по п. 53, где первый сигнал, второй сигнал или оба независимо характерны для левоглюкозана, 1,6-ангидро-β-D-глюкофуранозы или их комбинации.

55. Способ по любому из пп. 41-52, где первый сигнал, второй сигнал или оба

независимо характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеющих степень полимеризации 2 (DP2).

56. Способ по п. 55, где сигнал характерен для ангидроцеллобиозы.

57. Способ по любому из пп. 41-52, где первый сигнал, второй сигнал или оба независимо характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеющих степень полимеризации 3 (DP3).

58. Способ по любому из пп. 41-52, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо характерны для олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеющих степень полимеризации DP1, DP2 или DP3, или их комбинации.

59. Способ по любому из пп. 41-58, где детекция включает определение массы одной или нескольких фракций, имеющих степени полимеризации (DP), из первого образца или второго образца.

60. Способ по любому из пп. 41-59, где детекция включает определение массы по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из первого или второго образца.

61. Способ по п. 60, где по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеет степень полимеризации 1, 2 или 3.

62. Способ по любому из пп. 59-61, где одну или несколько DP фракций олигосахаридов или по меньшей мере часть олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, выделяют препаративной хроматографией.

63. Способ по любому из пп. 41-62, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS).

64. Способ по любому из пп. 41-62, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (ЖХ-МС)/МС.

65. Способ по любому из пп. 41-62, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД) или ГХ-МС.

66. Способ по любому из пп. 41-62, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо обнаруживают, по меньшей мере частично, с помощью ЯМР-спектроскопии.

67. Способ по любому из пп. 41 или 47-66, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала независимо ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3)

гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями или β-(1,6) гликозидными связями олигосахаридов.

68. Способ по п. 67, где детекция включает проведение ЯМР-спектроскопии.

69. Способ по пп. 67 или 68, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с α-(1,2) гликозидными связями.

70. Способ по пп. 67 или 68, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с α-(1,3) гликозидными связями.

71. Способ по пп. 67 или 68, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с α-(1,6) гликозидными связями.

72. Способ по пп. 67 или 68, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с β-(1,2) гликозидными связями.

73. Способ по пп. 67 или 68, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с β-(1,3) гликозидными связями.

74. Способ по пп. 67 или 68, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с β-(1,4) гликозидными связями.

75. Способ по пп. 67 или 68, где первый сигнал, второй сигнал или оба сигнала ассоциированы с β-(1,6) гликозидными связями.

76. Способ по любому из пп. 41 или 47-66, где первый сигнал указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, а второй сигнал ассоциирован с α-(1,2) гликозидными связями, α-(1,3) гликозидными связями, α-(1,6) гликозидными связями, β-(1,2) гликозидными связями, β-(1,3) гликозидными связями, β-(1,4) гликозидными связями, β-(1,6) гликозидными связями, α-(1,1)-α гликозидными связями, α-(1,1)-β гликозидными связями, β-(1,1)-α гликозидными связями или β-(1,1)-β гликозидными связями олигосахаридов.

77. Способ по любому из пп. 41-76, где детекция включает определение наличия или отсутствия первого сигнала и второго сигнала.

78. Способ по п. 77, где детекция включает определение наличия или отсутствия DP1 или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, или обоих из них.

79. Способ по любому из пп. 41-76, где детекция включает определение или корреляцию уровня первого сигнала и второго сигнала.

80. Способ по п. 79, где детекция включает корреляцию уровня DP1 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в питательной композиции.

81. Способ по пп. 79 или 80, где детекция включает корреляцию уровня DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в питательной композиции.

82. Способ по любому из пп. 1 или 3-81, дополнительно включающий приемку или браковку партии питательной композиции.

83. Способ по любому из пп. 1-4 или 6-82, дополнительно включающий регуляцию уровня синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции после детекции.

84. Способ по любому из пп. 9-40 или 48-83, где основная питательная композиция содержит множество олигосахаридов.

85. Способ по п. 84, где основная питательная композиция содержит крахмал или растительные волокна.

86. Способ по любому из пп. 9-40 или 48-85, где уровень α-(1,2) гликозидной связи, α-(1,3) гликозидной связи, β-(1,2) гликозидной связи, β-(1,3) гликозидной связи или β-(1,4) гликозидной связи в основной питательной композиции по меньшей мере на 10% ниже уровня такой же гликозидной связи в синтетическом олигосахаридном препарате.

87. Способ по любому из пп. 1-86, включающий стадию дериватизации перед детекцией.

88. Способ по любому из пп. 1-87, дополнительно включающий экстракцию олигосахаридов из образца питательной композиции.

89. Способ по п. 88, дополнительно включающий фильтрацию или осветление экстрагированных олигосахаридов.

90. Способ по пп. 88 или 89, дополнительно включающий концентрирование экстрагированных олигосахаридов.

91. Способ по п. 90, где концентрирование включает нанофильтрацию.

92. Способ по п. 90, где концентрирование включает лиофилизацию.

93. Способ по любому из пп. 88-92, дополнительно включающий введение внутреннего стандарта в экстрагированные или концентрированные олигосахариды.

94. Способ по любому из пп. 88-93, дополнительно включающий восстановление экстрагированных или концентрированных олигосахаридов.

95. Способ по любому из пп. 88-93, дополнительно включающий расщепление экстрагированных или концентрированных олигосахаридов одним или несколькими гидролитическими ферментами.

96. Способ по п. 95, где один или несколько гидролитических ферментов включают карбогидратазу, протеазу, липазу или любую их комбинацию.

97. Способ по пп. 95 или 96, где один или несколько гидролитических ферментов включают α-амилазу, амилогликозидазу, инвертазу, α-галактозидазу или любую их комбинацию.

98. Способ по любому из пп. 95-97, где один или несколько гидролитических ферментов расщепляют одну или несколько натуральных гликозидных связей.

99. Способ по любому из пп. 95-98, дополнительно включающий выделение нерасщепленных олигосахаридов.

100. Способ по любому из пп. 88-98, дополнительно включающий разделение экстрагированных, концентрированных, расщепленных или восстановленных олигосахаридов.

101. Способ по п. 100, где олигосахариды разделяют хроматографически.

102. Способ по п.100, где олигосахариды разделяют нанофильтрацией.

103. Способ по пп. 101 или 102, дополнительно включающий выделение разделенных олигосахаридов.

104. Способ по любому из пп. 100-103, где олигосахариды разделяют или выделяют по степени их полимеризации.

105. Способ по п. 104, включающий выделение или разделение олигосахаридов со степенью полимеризации 1, 2, 3, 4 или 5.

106. Способ по п. 105, где выделяют или разделяют DP1 олигосахариды.

107. Способ по п. 105, где выделяют или разделяют DP2 олигосахариды.

108. Способ по п. 105, где выделяют или разделяют DP3 олигосахариды.

109. Способ по любому из пп. 1-105, включающий выделение по меньшей мере части DP1 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца.

110. Способ по любому из пп. 1-105, включающий выделение по меньшей мере части DP2 олигосахаридов, содержащей ангидро-субъединицы, из образца.

111. Способ по любому из пп. 1-105, включающий выделение по меньшей мере части DP3 олигосахаридов, содержащей ангидро-субъединицы, из образца.

112. Способ по любому из пп. 99-111, где выделенные или разделенные олигосахариды определяют количественно.

113. Способ по п. 112, где большинство количественно определенных олигосахаридов происходит из синтетического олигосахаридного препарата.

114. Способ по пп. 112 или 113, где более 50%, более 60%, более 70%, более 80%, более 90%, более 95% или более 99% по массе количественно определенного олигосахарида происходит из синтетического олигосахаридного препарата.

115. Способ корреляции синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции,

где питательная композиция включает (i) синтетический олигосахаридный препарат, включающий олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы, и (ii)

натуральную олигосахаридную композицию;

включающий:

(a) обеспечение образца питательной композиции;

(b) выделение олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц, из образца;

(c) детекцию сигнала, который указывает на олигосахариды, содержащие одну или несколько ангидро-субъединиц, включающую (i) определение массы по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца или (ii) анализ по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, в образце, с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS), жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (ЖХ)/МС или газовой хроматографии (ГХ)-МС; и

(d) корреляцию концентрации синтетического олигосахаридного препарата в питательной композиции.

116. Способ по п. 115, где детекция включает определение массы по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеющих степень полимеризации 1 (DP1), из образца.

117. Способ по п. 115, где детекция включает определение массы по меньшей мере части олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, имеющих степень полимеризации 2 (DP2) из образца.

118. Способ по п. 115, где детекция включает определение массы по меньшей мере части DP1 или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца с помощью MALDI-MS.

119. Способ по п. 115, где детекция включает определение массы по меньшей мере части DP1 или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца с помощью ЖХ-МС/МС.

120. Способ по п. 115, где детекция включает определение массы по меньшей мере части DP1 или DP2 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца с помощью ГХ/МС.

121. Способ по п. 115, где детекция включает определение массы по меньшей мере части DP3 олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, из образца путем определения массы, MALDI-MS, ЖХ-МС/МС или ГХ-МС.

122. Способ по любому из пп. 115-121, где выделение включает разделение олигосахаридов, содержащих одну или несколько ангидро-субъединиц, с помощью препаративной хроматографии.

123. Способ по любому из пп. 1-4 или 6-122, где синтетический олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации примерно от 1 до 5000 ч./млн., примерно от 1 до 1000 ч./млн., примерно от 1 до 500 ч./млн., примерно от 10 до 5000 ч./млн., примерно от 10 до 2000 ч./млн., примерно от 10 до 1000 ч./млн., примерно от 10 до 500 ч./млн., примерно от 10 до 250 ч./млн., примерно от 10 до 100 ч./млн., примерно от 50 до 5000 ч./млн., примерно от 50 до 2000 ч./млн., примерно от 50 до 1000 ч./млн., примерно от 50 до 500 ч./млн., примерно от 50 до 250 ч./млн. или примерно от 50 до 100 ч./млн.

124. Способ по любому из пп. 1-4 или 6-122, где синтетический олигосахаридный препарат присутствует в питательной композиции в концентрации более 10 ч./млн., более 50 ч./млн., более 100 ч./млн., более 200 ч./млн., более 300 ч./млн., более 400 ч./млн., более 500 ч./млн., более 600 ч./млн., более 1000 ч./млн. или более 2000 ч./млн.

125. Способ по любому из пп. 1-124, где питательная композиция представляет собой кормовую композицию для животных.

126. Способ производства питательной композиции, включающий:

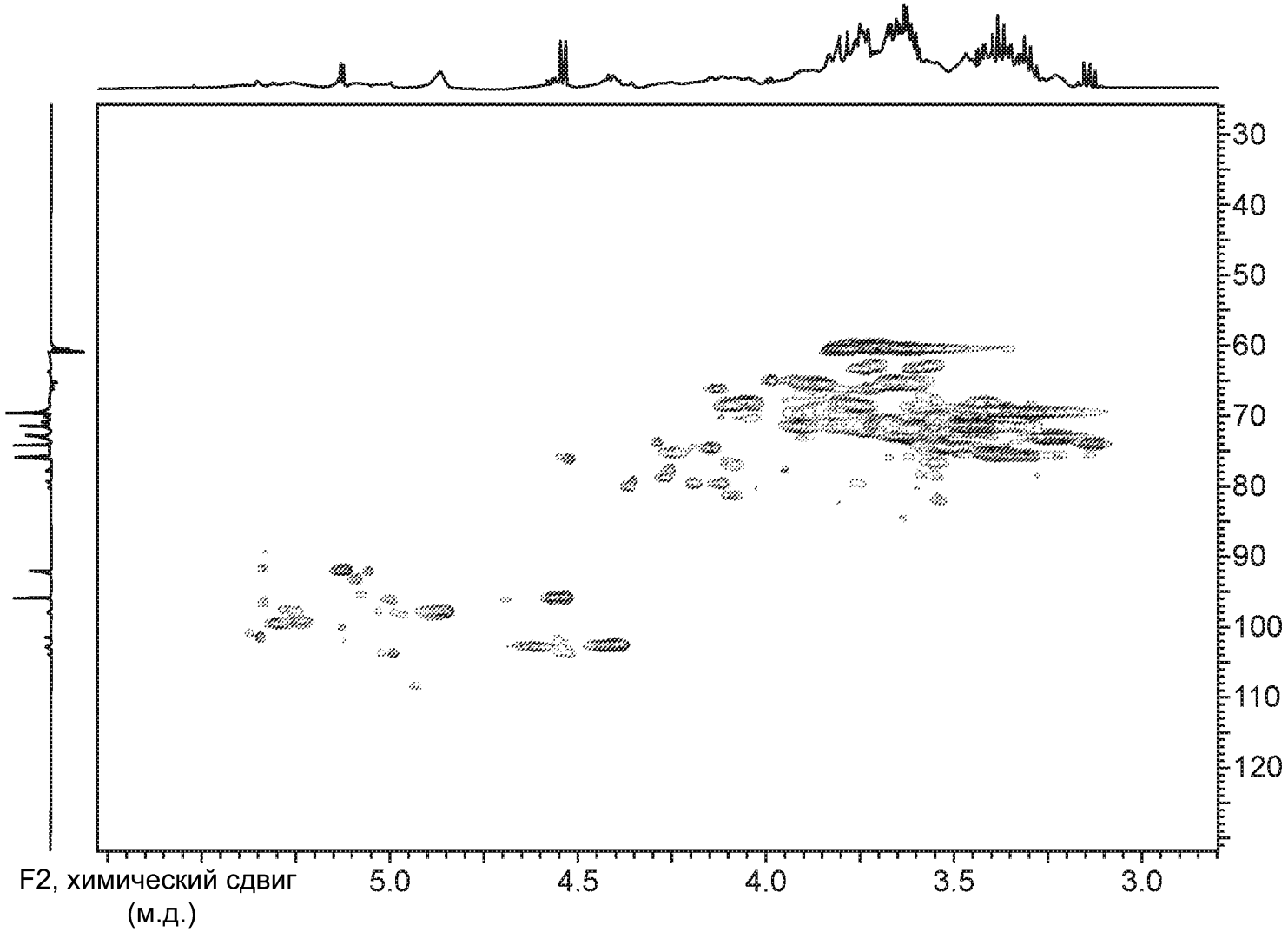
(a) объединение основной питательной композиции с синтетическим олигосахаридным препаратом, включающим олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы; и

(b) выполнение способа контроля качества по любому из пп. 1-125.

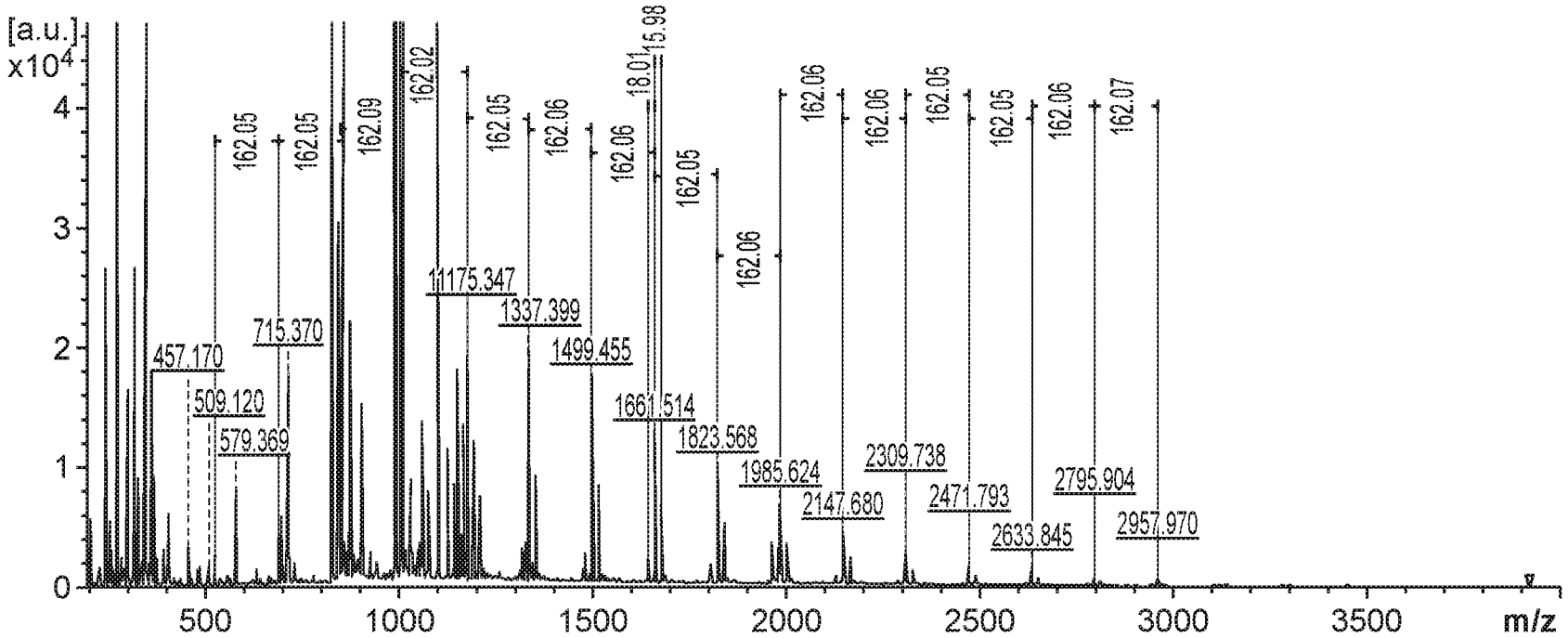
127. Способ по п. 126, где синтетический олигосахаридный препарат содержит по меньшей мере n фракций олигосахаридов, каждая из которых имеет различную степень полимеризации, выбранную от 1 до n (фракции от DP1 до DPn), где n представляет собой целое число, равное 3 или более, и где каждая фракция DP1 и DP2 независимо включает примерно от 0,1% до 15% олигосахаридов, содержащих ангидро-субъединицы, по относительной распространенности, измеренной с помощью масс-спектрометрии (МС).

128. Способ по п. 127, где относительную распространенность определяют с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (ЖХ-МС)/МС.

129. Способ по пп. 127 или 128, где относительная распространенность олигосахаридов в каждой из n фракций монотонно уменьшается со степенью полимеризации.

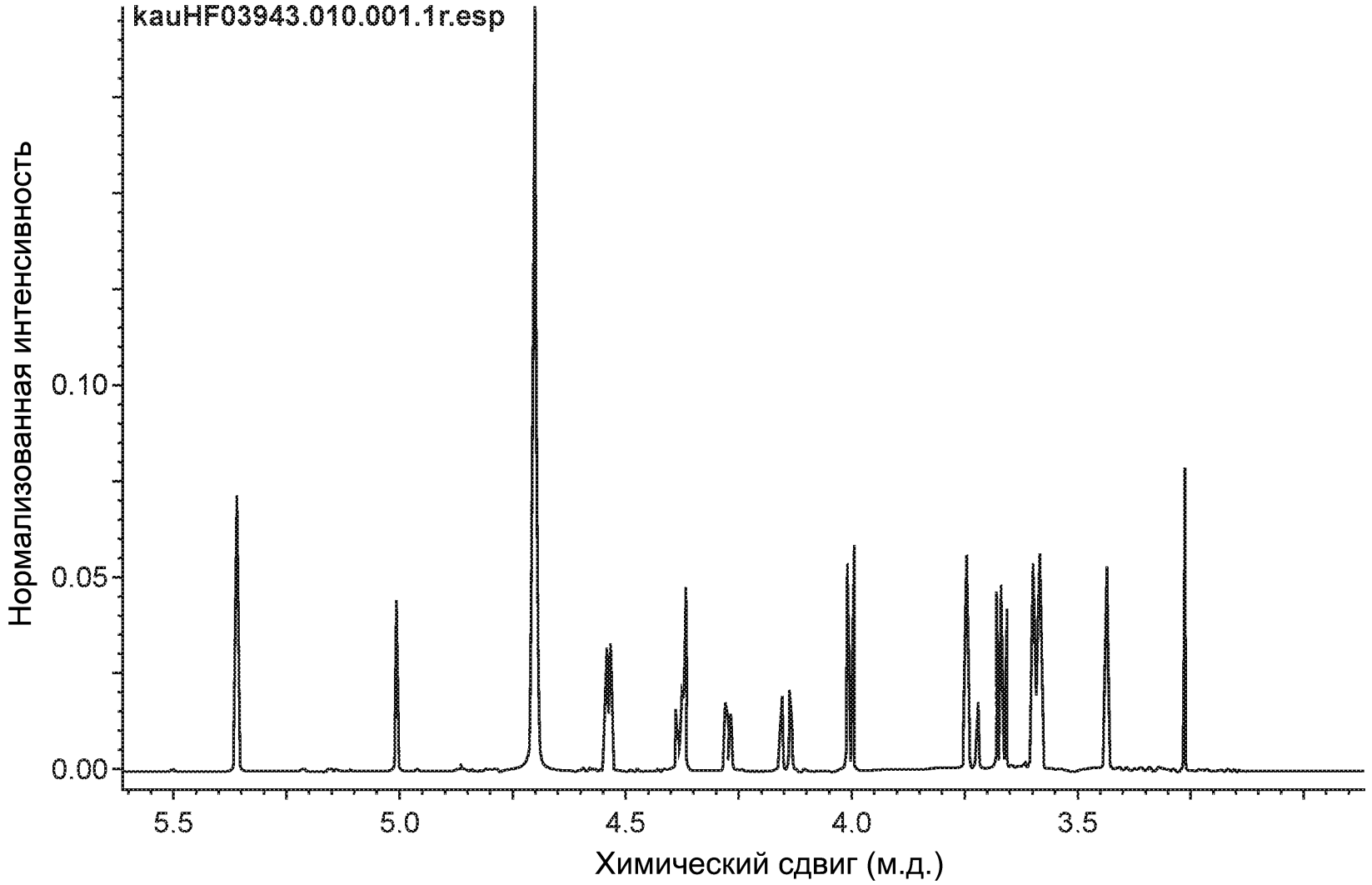

30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
F2, химический сдвиг
(м.д.)
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0

Фиг. 1

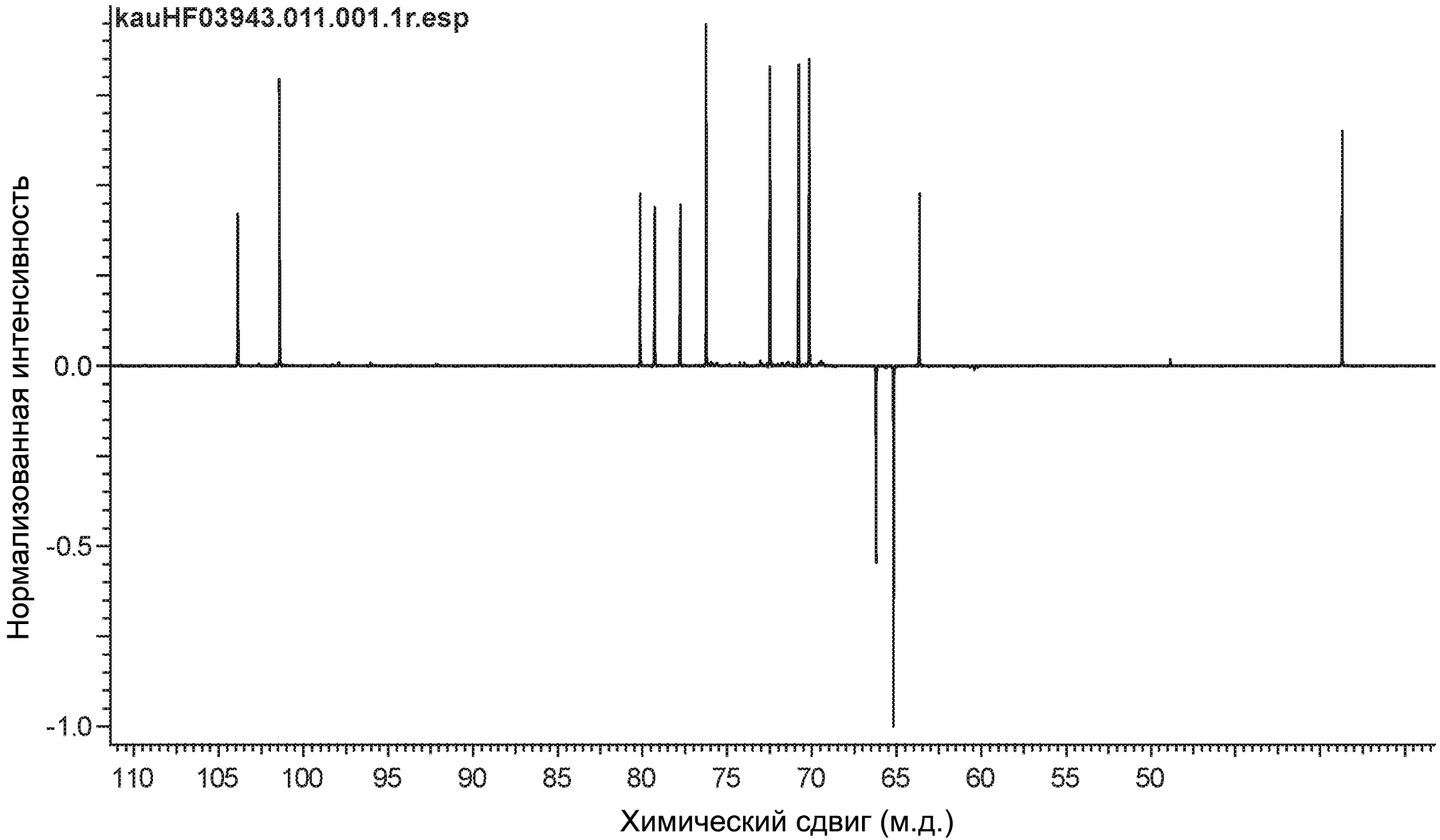

[a.u.]
x10^4
4
3
2
1
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
m/z
457.170
509.120
579.369
715.370
11175.347
1337.399
1499.455
1661.514
1823.568
1985.624
2147.680
2309.738
2471.793
2633.845
2795.904
2957.970
162.05
162.05
162.09
162.02
162.05
162.06
162.06
18.01
15.98
162.05
162.06
162.06
162.06
162.05
162.05
162.06
162.07

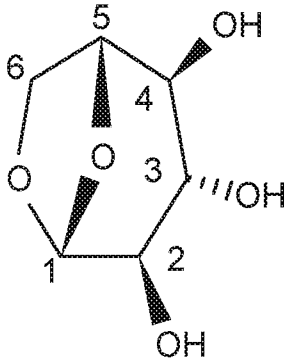
Фиг. 2

Фиг. 3

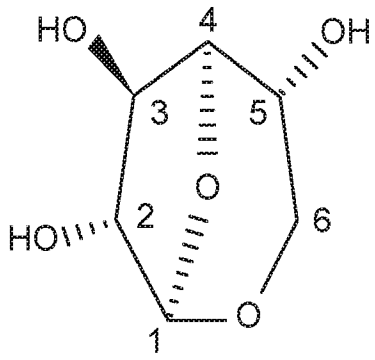

kauHF03943.010.001.1r.esp
Нормализованная интенсивность
0.10
0.05
0.00
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
Химический сдвиг (м.д.)

Фиг. 4


kauHF03943.011.001.1r.esp
Нормализованная интенсивность
0.0
-0.5
-1.0
110
105
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
Химический сдвиг (м.д.)

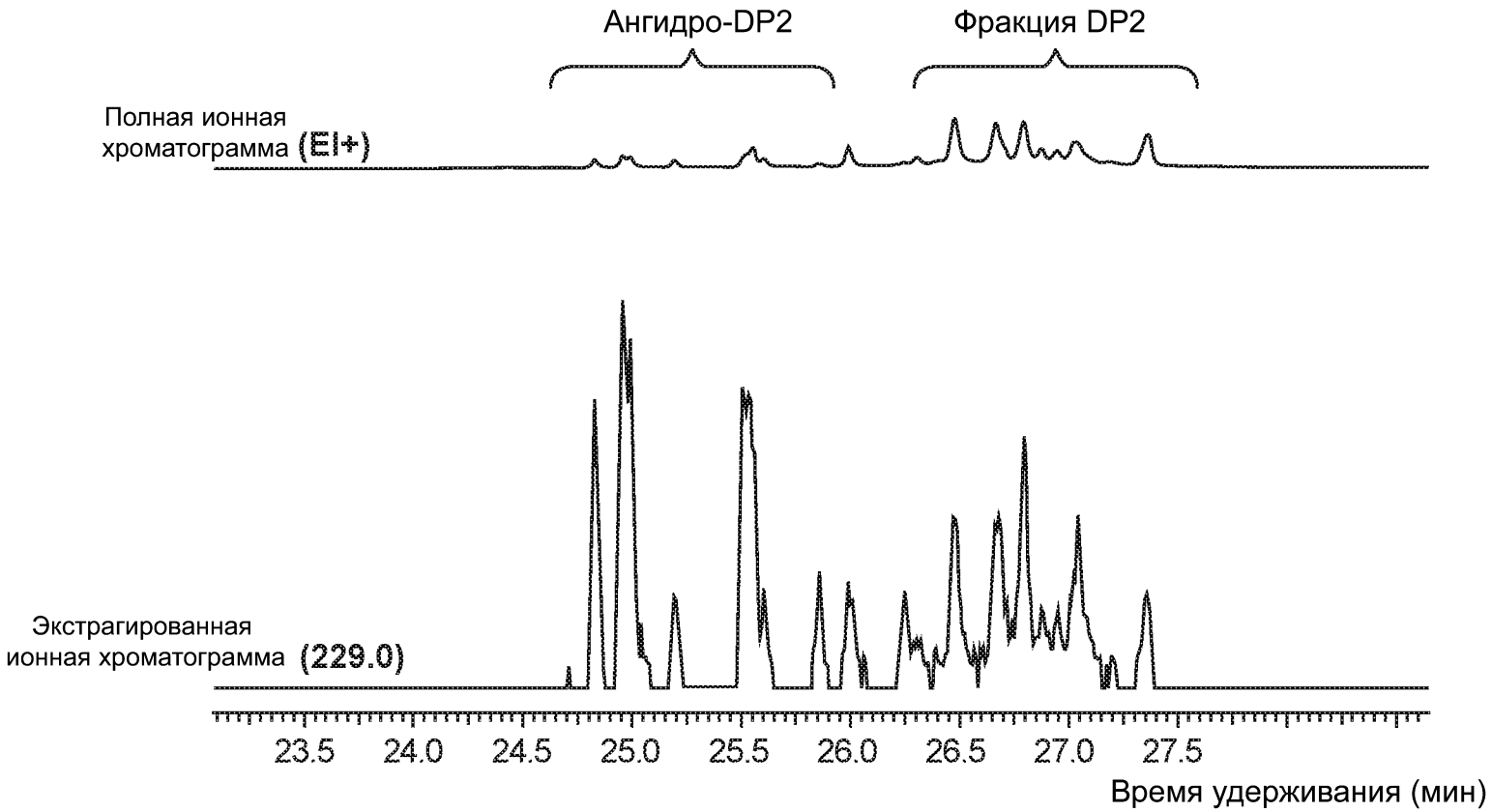


1,6-ангидро-бета-
D-глюкофураноза

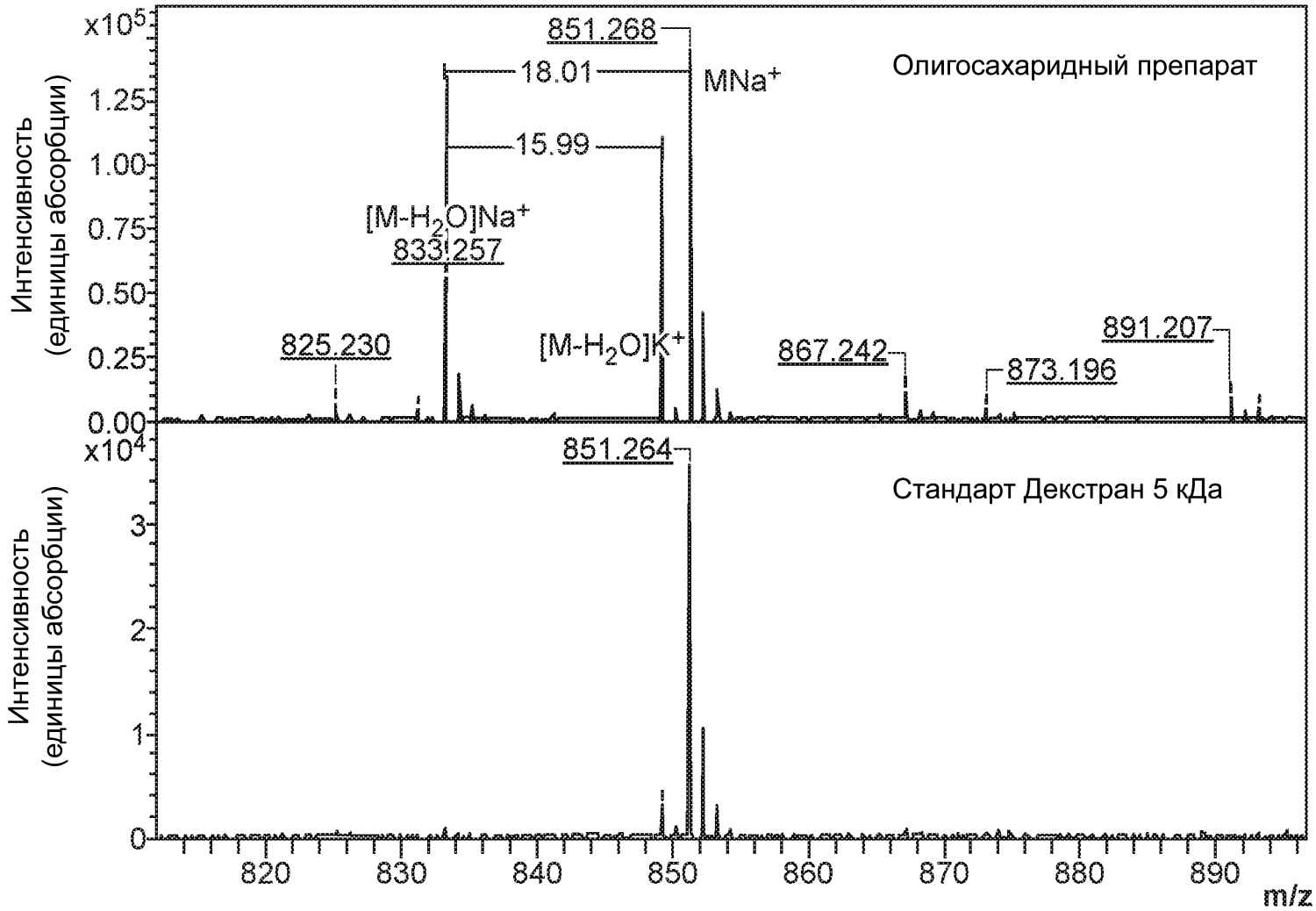


1,6-ангидро-бета-
D-глюкопираноза

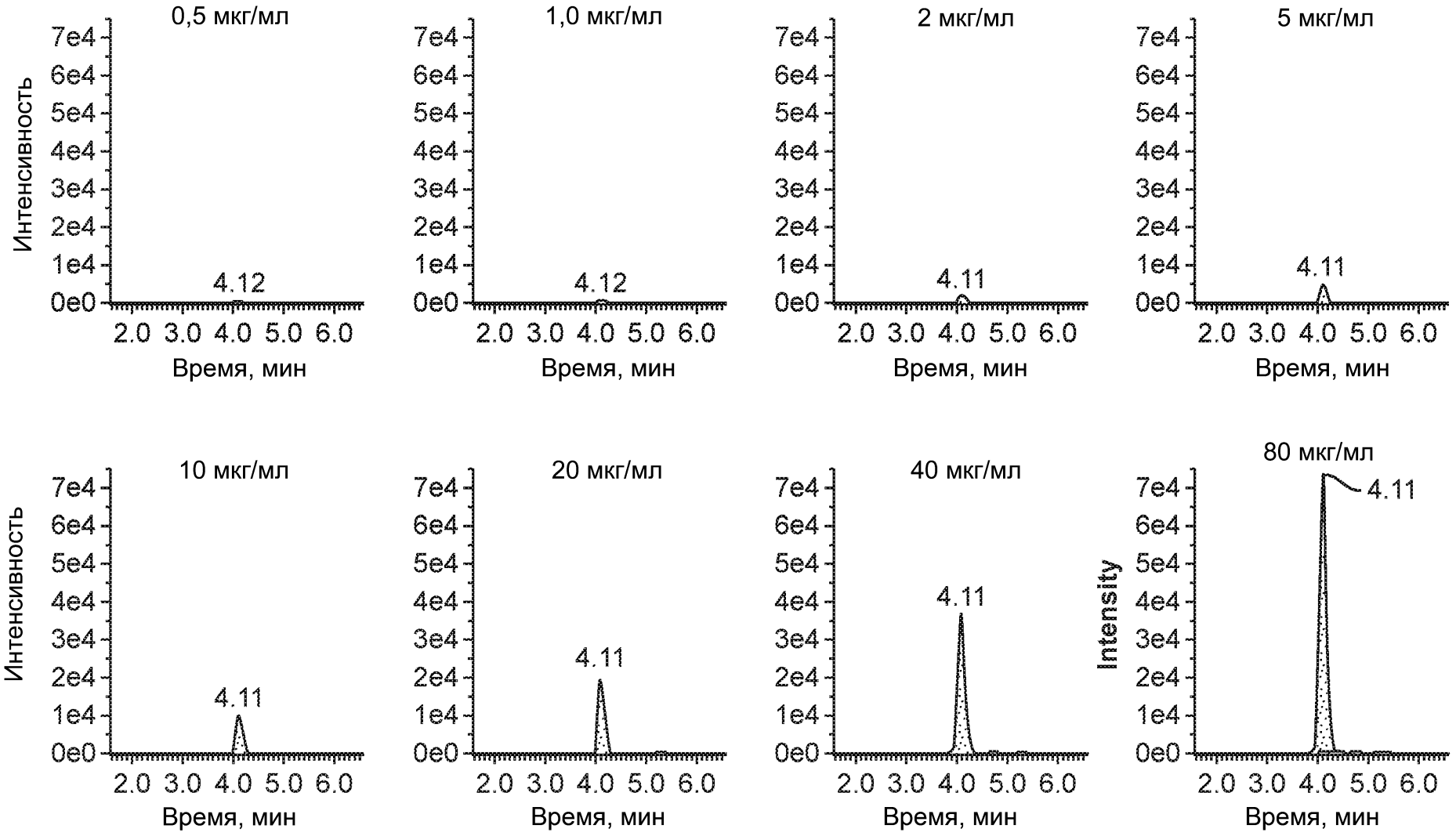
Фиг. 5


Ангидро-DP2
Фракция DP2
Полная ионная хроматограмма (EI+)
Экстрагированная ионная хроматограмма (229.0)
23.5
24.0
24.5
25.0
25.5
26.0
26.5
27.0
27.5
Время удерживания (мин)

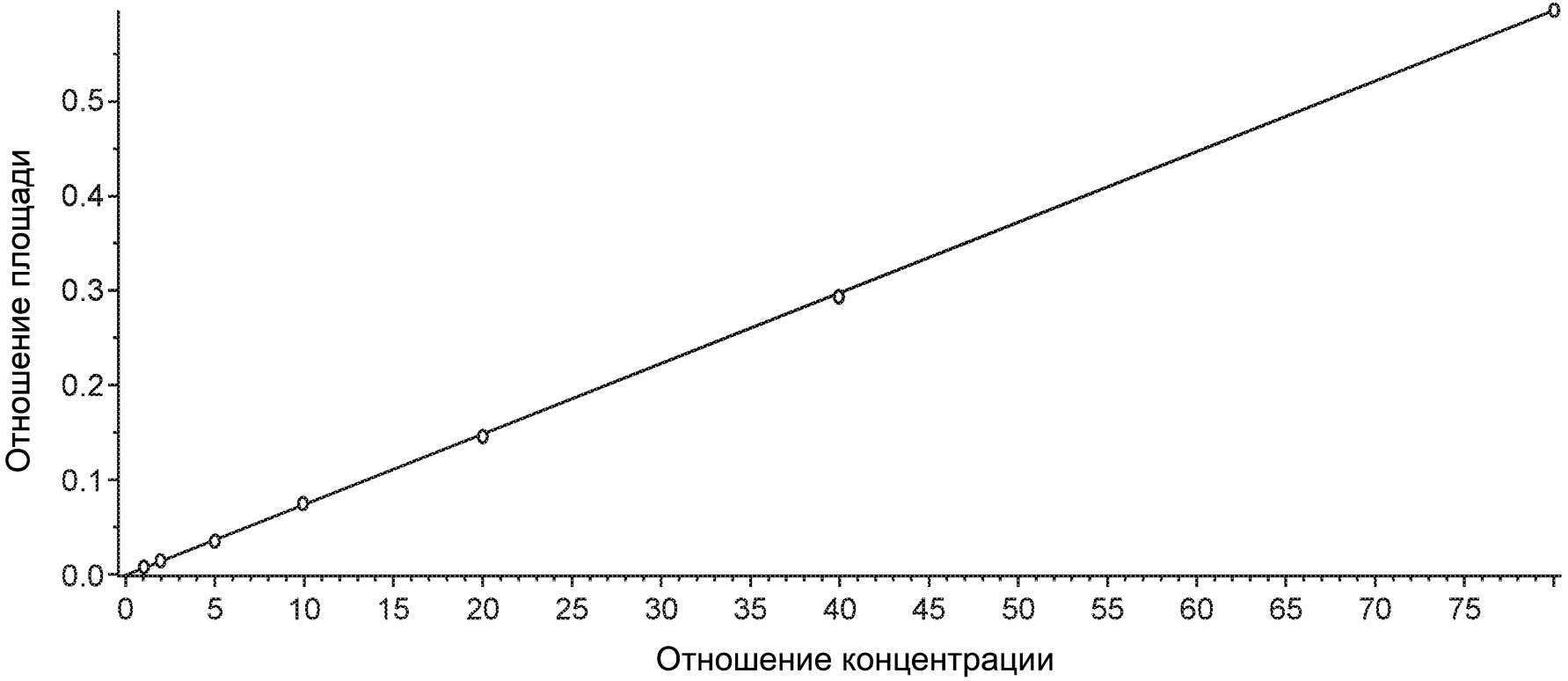
Фиг. 6


x10^5
Интенсивность (единицы абсорбции)
851.268
18.01
MNa+
Олигосахаридный препарат
15.99
[M-H2O]Na+
833.257
825.230
[M-H2O]K+
867.242
873.196
891.207
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
x10^4
851.264
Стандарт Декстран 5 кДа
3
2
1
0
820
830
840
850
860
870
880
890
m/z

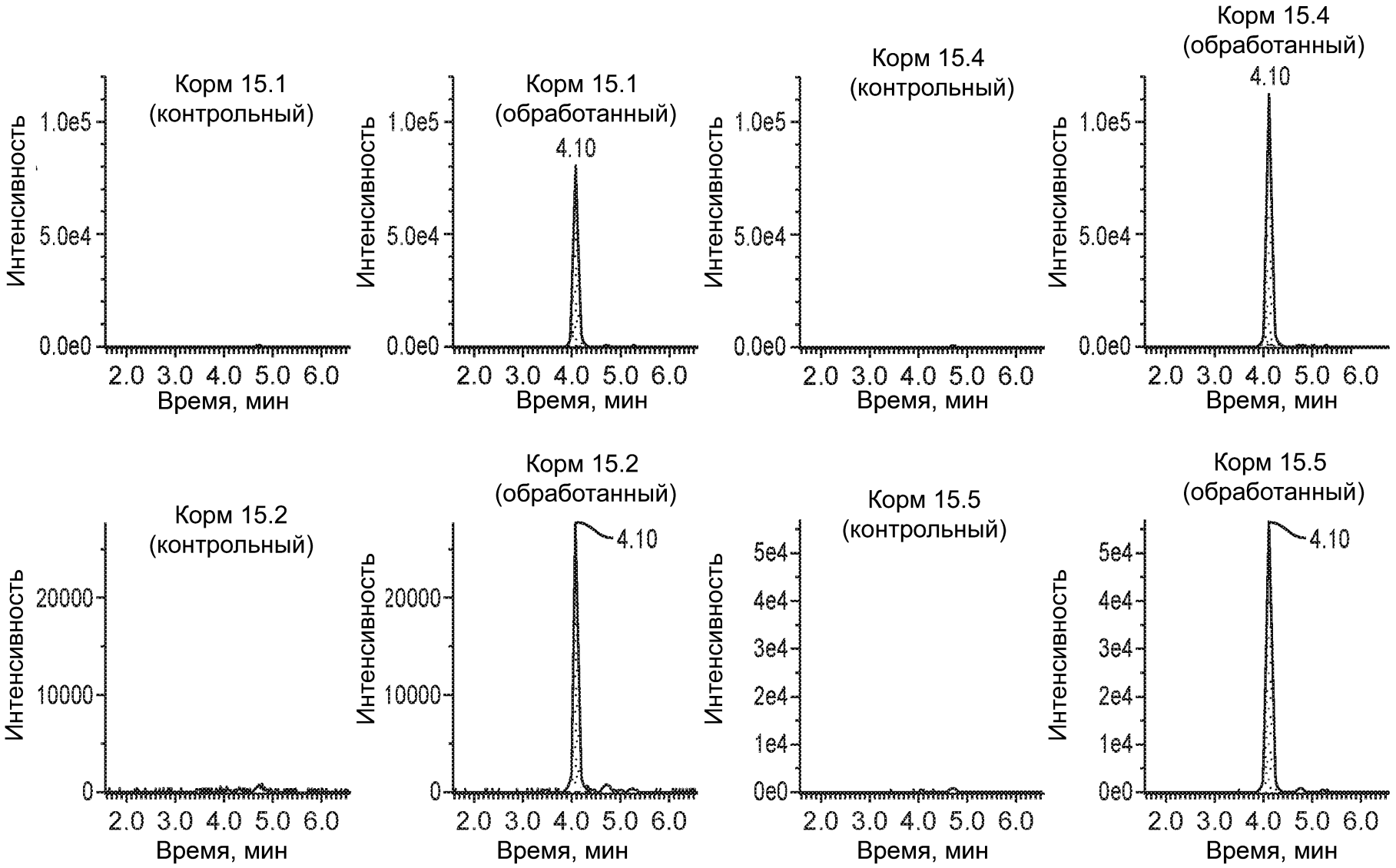
Фиг. 7


0,5 мкг/мл
1,0 мкг/мл
2 мкг/мл
5 мкг/мл
10 мкг/мл
20 мкг/мл
40 мкг/мл
80 мкг/мл
Интенсивность
Intensity
7e4
6e4
5e4
4e4
3e4
2e4
1e4
0e0
4.12
4.11
2.0 3.0 4.0 5.0 6.0
Время, мин

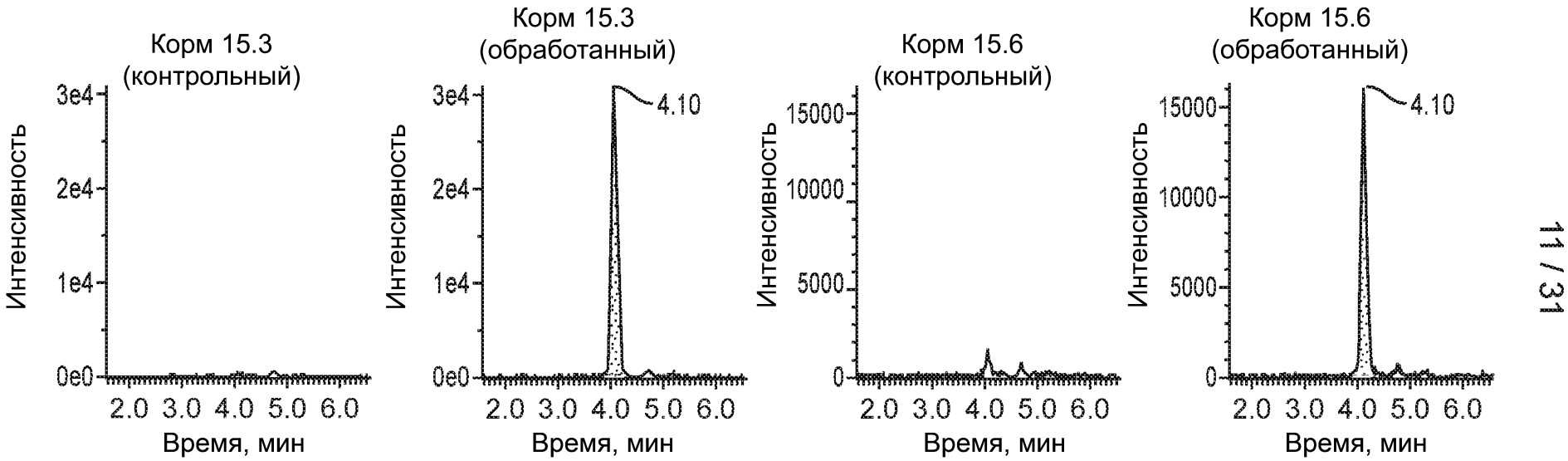
Фиг. 8


Отношение площади
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
Отношение концентрации

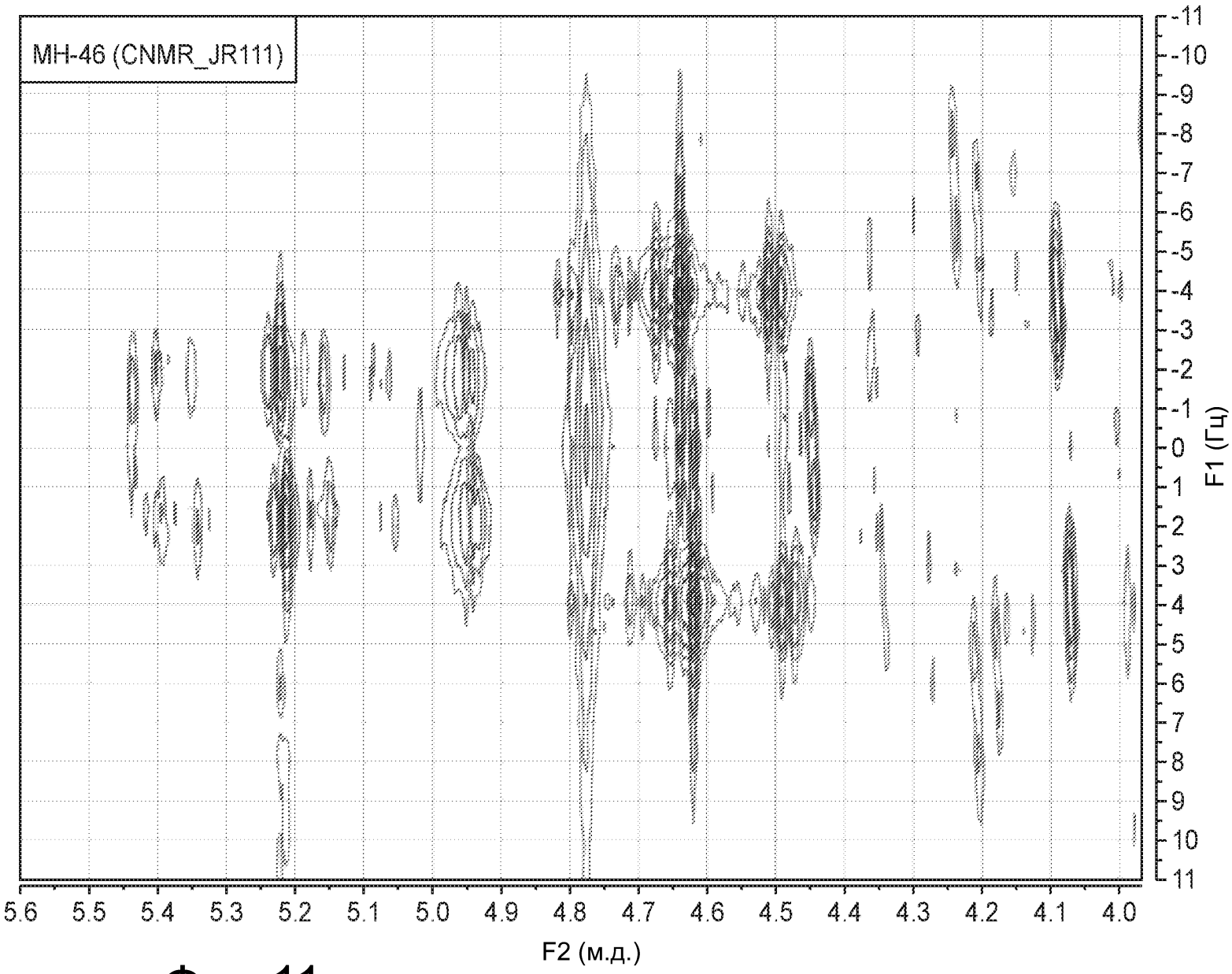
Фиг. 9


Корм 15.1
(контрольный)
Корм 15.1
(обработанный)
4.10
Корм 15.4
(контрольный)
Корм 15.4
(обработанный)
4.10
Корм 15.2
(контрольный)
Корм 15.2
(обработанный)
4.10
Корм 15.5
(контрольный)
Корм 15.5
(обработанный)
4.10
Интенсивность
Время, мин
1.0e5
5.0e4
0.0e0
20000
10000
0
5e4
4e4
3e4
2e4
1e4
0e0
2.0 3.0 4.0 5.0 6.0

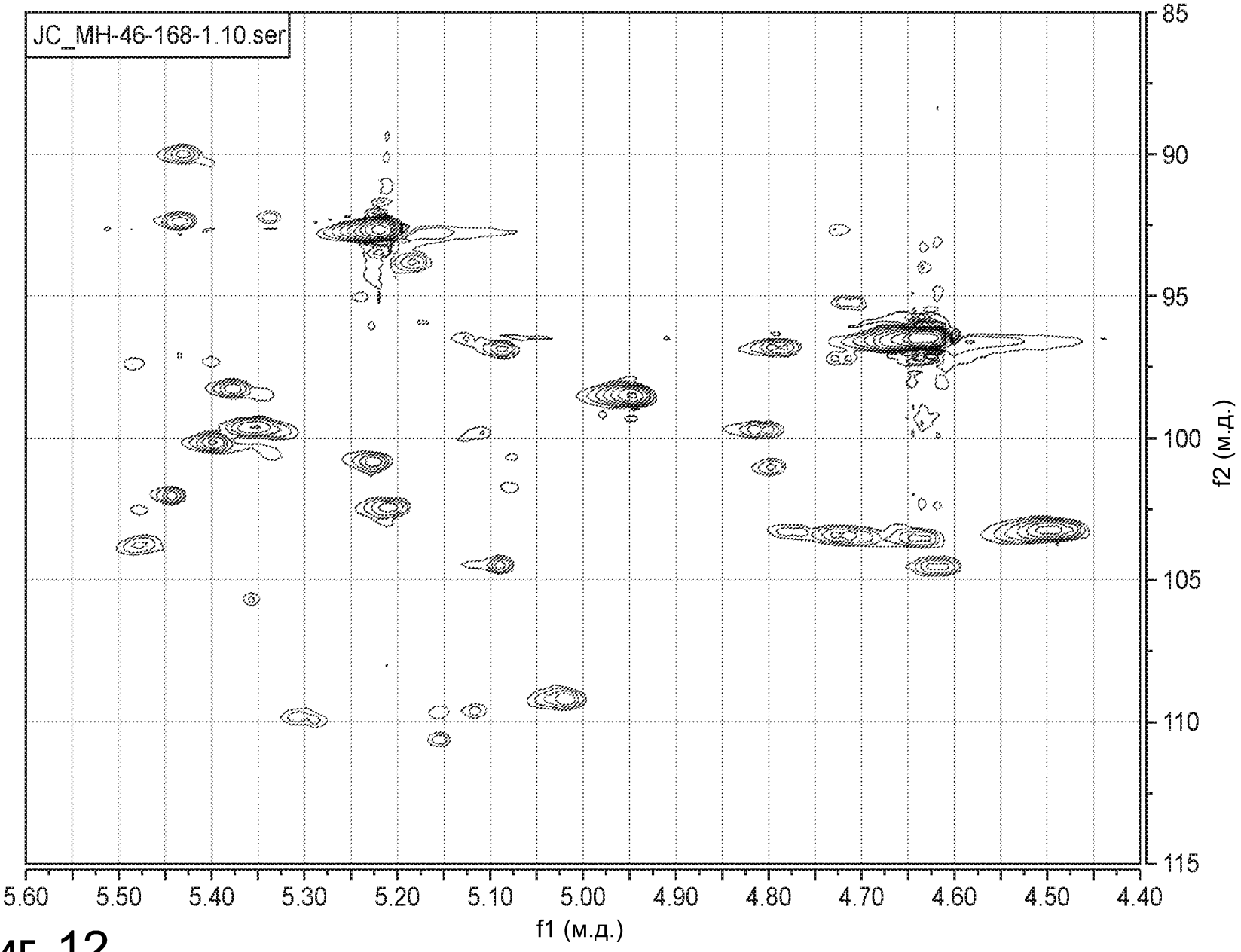
Фиг. 10



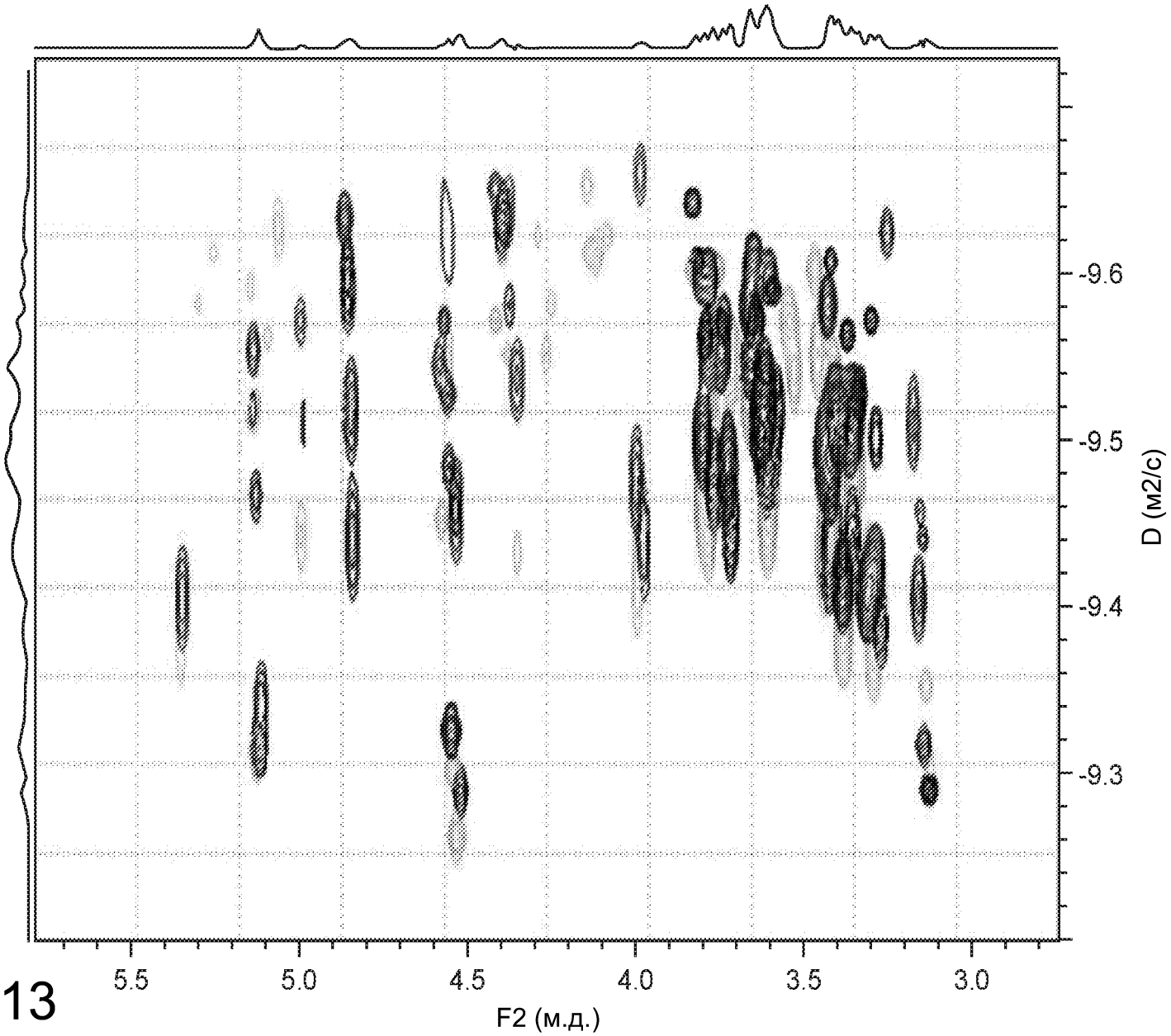
Фиг. 10 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)


MH-46 (CNMR_JR111)
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
F1 (Гц)
5.6
5.5
5.4
5.3
5.2
5.1
5.0
4.9
4.8
4.7
4.6
4.5
4.4
4.3
4.2
4.1
4.0
F2 (м.д.)

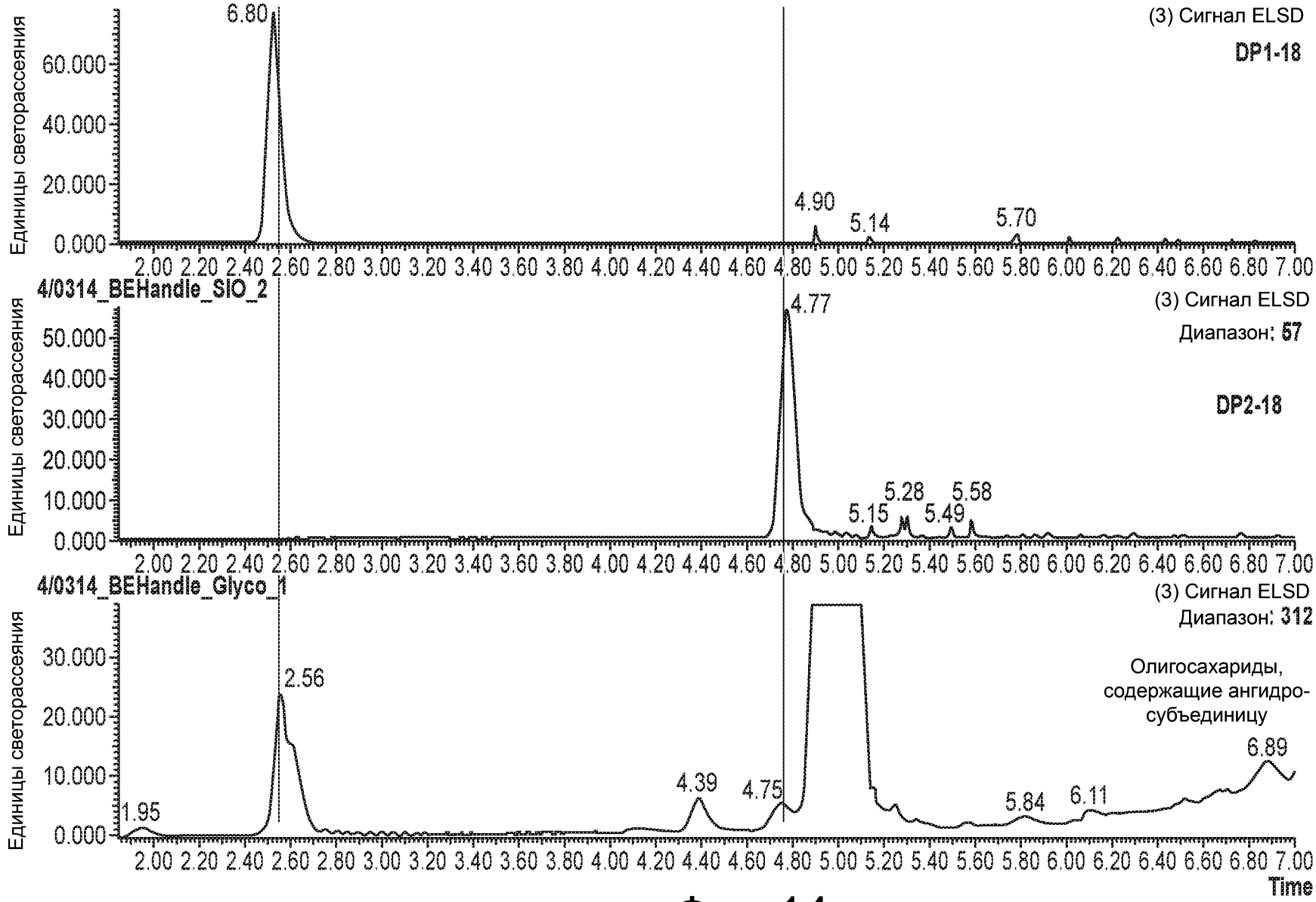
Фиг. 11


JC_MH-46-168-1.10.ser
85
90
95
100
105
110
115
f2 (м.д.)
5.60
5.50
5.40
5.30
5.20
5.10
5.00
4.90
4.80
4.70
4.60
4.50
4.40
f1 (м.д.)

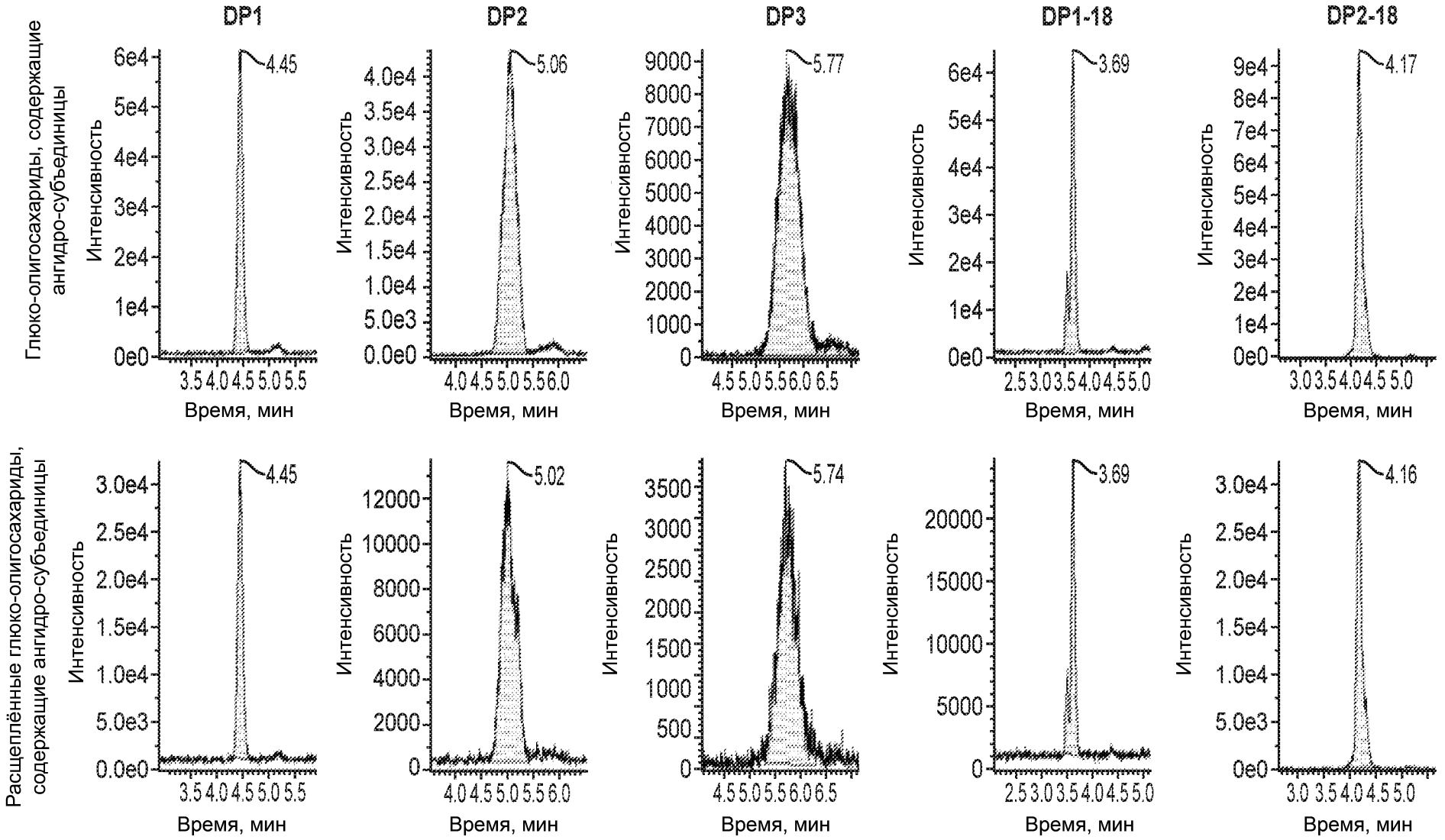
Фиг. 12



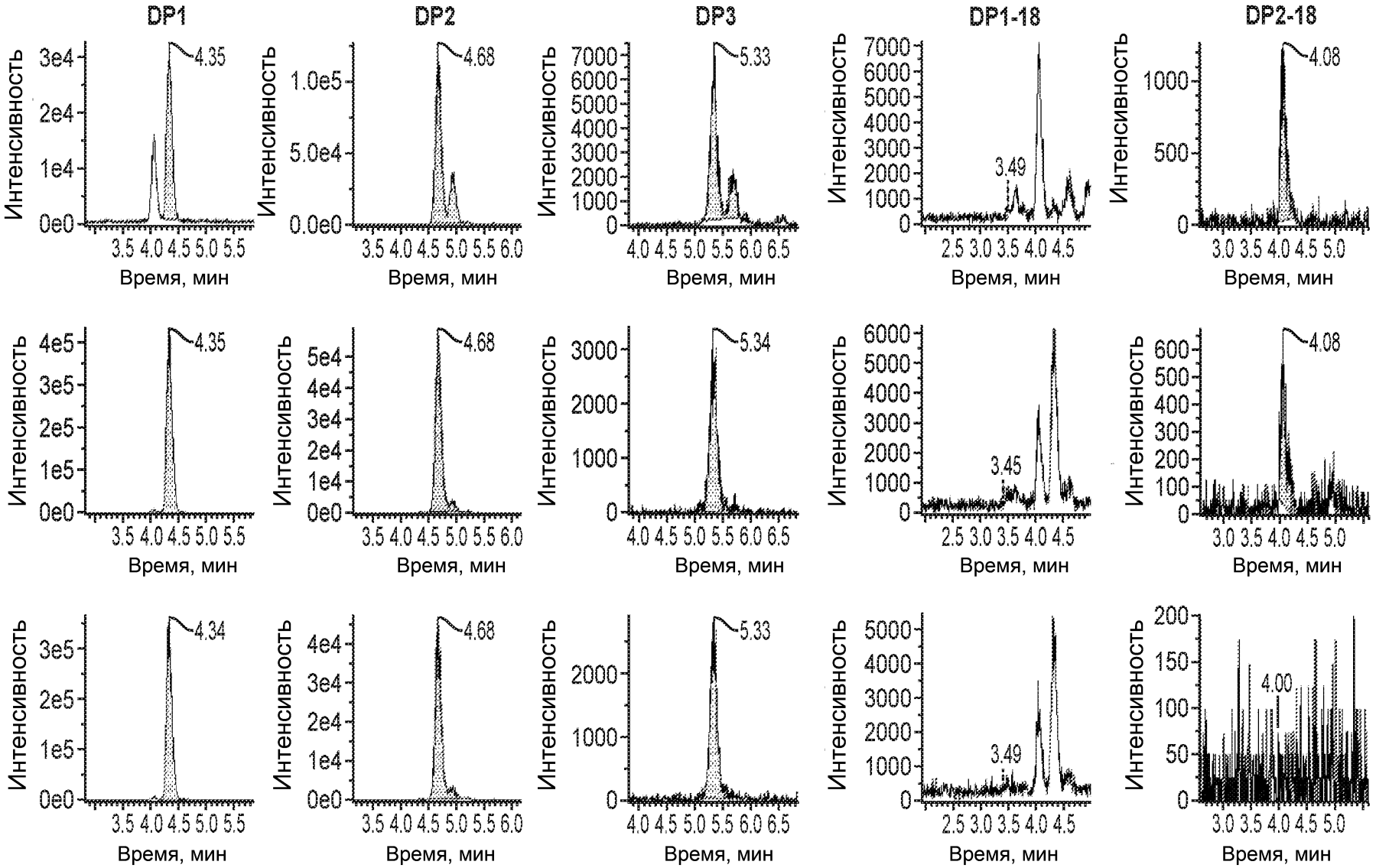
Фиг. 13


Единицы светорассеяния
6.80
(3) Сигнал ELSD
DP1-18
4.90
5.14
5.70
4/0314_BEHandle_SIO_2
4.77
(3) Сигнал ELSD
Диапазон: 57
DP2-18
5.15
5.28
5.49
5.58
4/0314_BEHandle_Glyco_1
(3) Сигнал ELSD
Диапазон: 312
Олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицу
2.56
1.95
4.39
4.75
5.84
6.11
6.89
2.00 2.20 2.40 2.60 2.80 3.00 3.20 3.40 3.60 3.80 4.00 4.20 4.40 4.60 4.80 5.00 5.20 5.40 5.60 5.80 6.00 6.20 6.40 6.60 6.80 7.00
Time

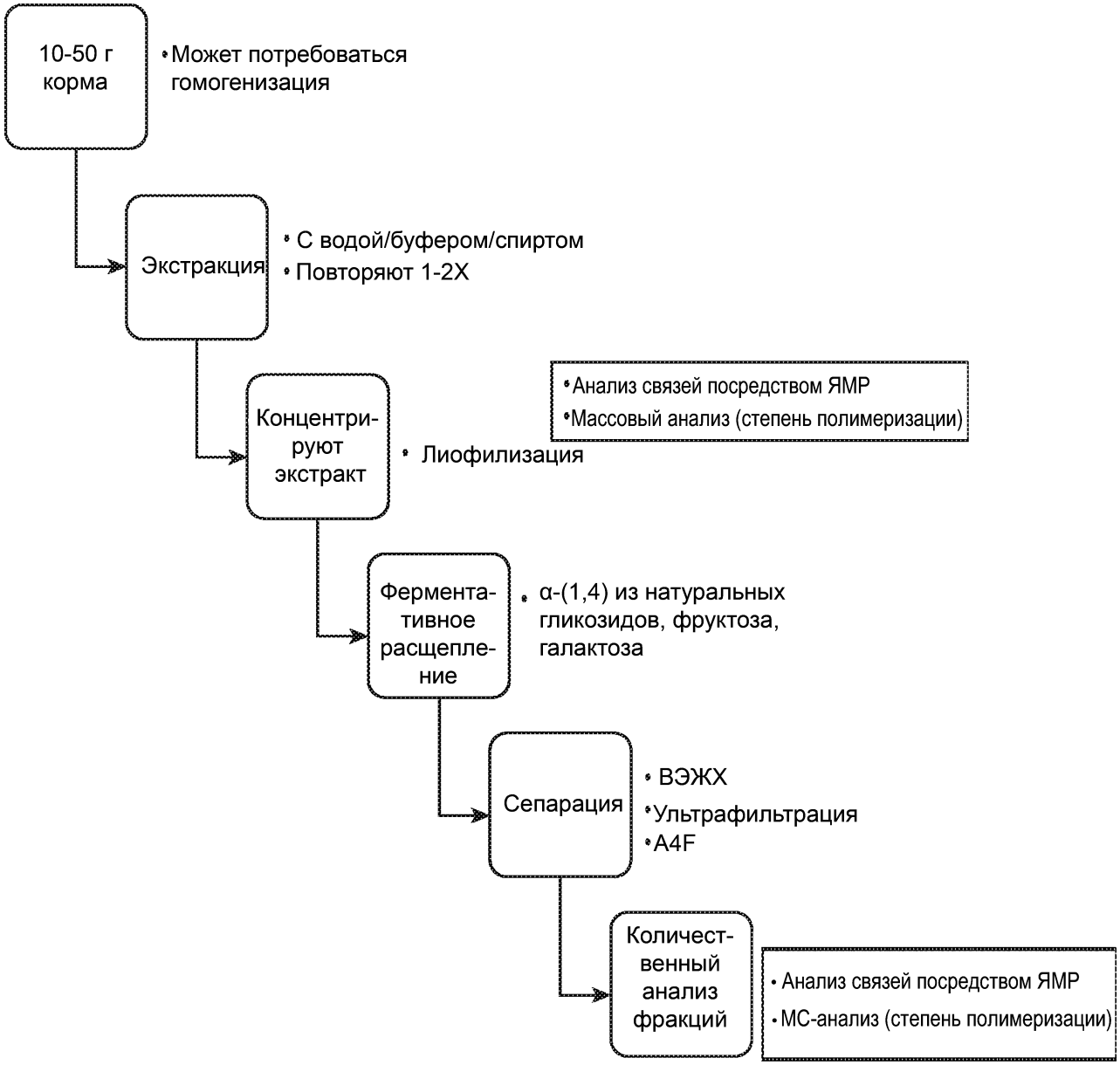
Фиг. 14


DP1
DP2
DP3
DP1-18
DP2-18
Глюко-олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы
Расщеплённые глюко-олигосахариды, содержащие ангидро-субъединицы
Интенсивность
Время, мин
4.45
5.06
5.77
3.69
4.17
5.02
5.74
4.16

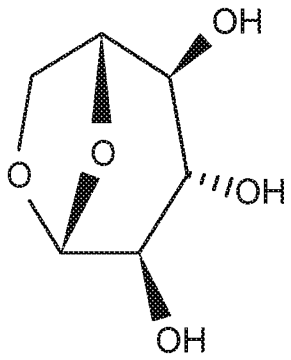
Фиг. 15


DP1
DP2
DP3
DP1-18
DP2-18
1
2
3
Интенсивность
Время, мин
4.35
4.68
5.33
3.49
4.08
5.34
3.45
4.34
4.00

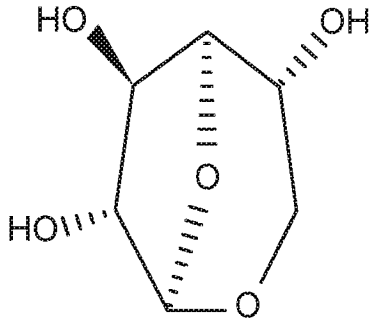
Фиг. 16


10-50 г корма
Может потребоваться гомогенизация
Экстракция
С водой/буфером/спиртом
Повторяют 1-2X
Концентри-руют экстракт
Анализ связей посредством ЯМР
Массовый анализ (степень полимеризации)
Лиофилизация
Фермента-тивное расщепле-ние
α-(1,4) из натуральных гликозидов, фруктоза, галактоза
Сепарация
ВЭЖХ
Ультрафильтрация
A4F
Количест-венный анализ фракций
Анализ связей посредством ЯМР
МС-анализ (степень полимеризации)

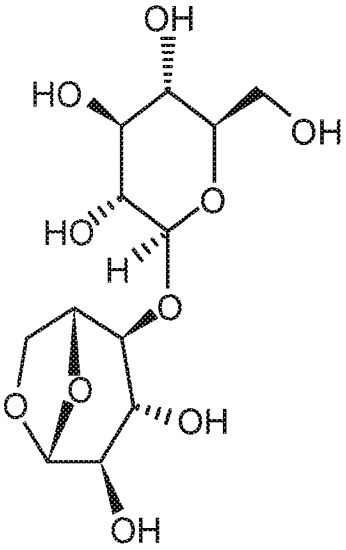
Фиг. 17



Левоглюкозан
CAS 498-07-7

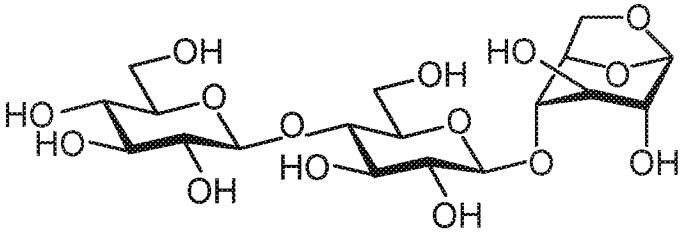


1,6-ангидро-β-D-глюкофураноза
CAS 7425-74-3,

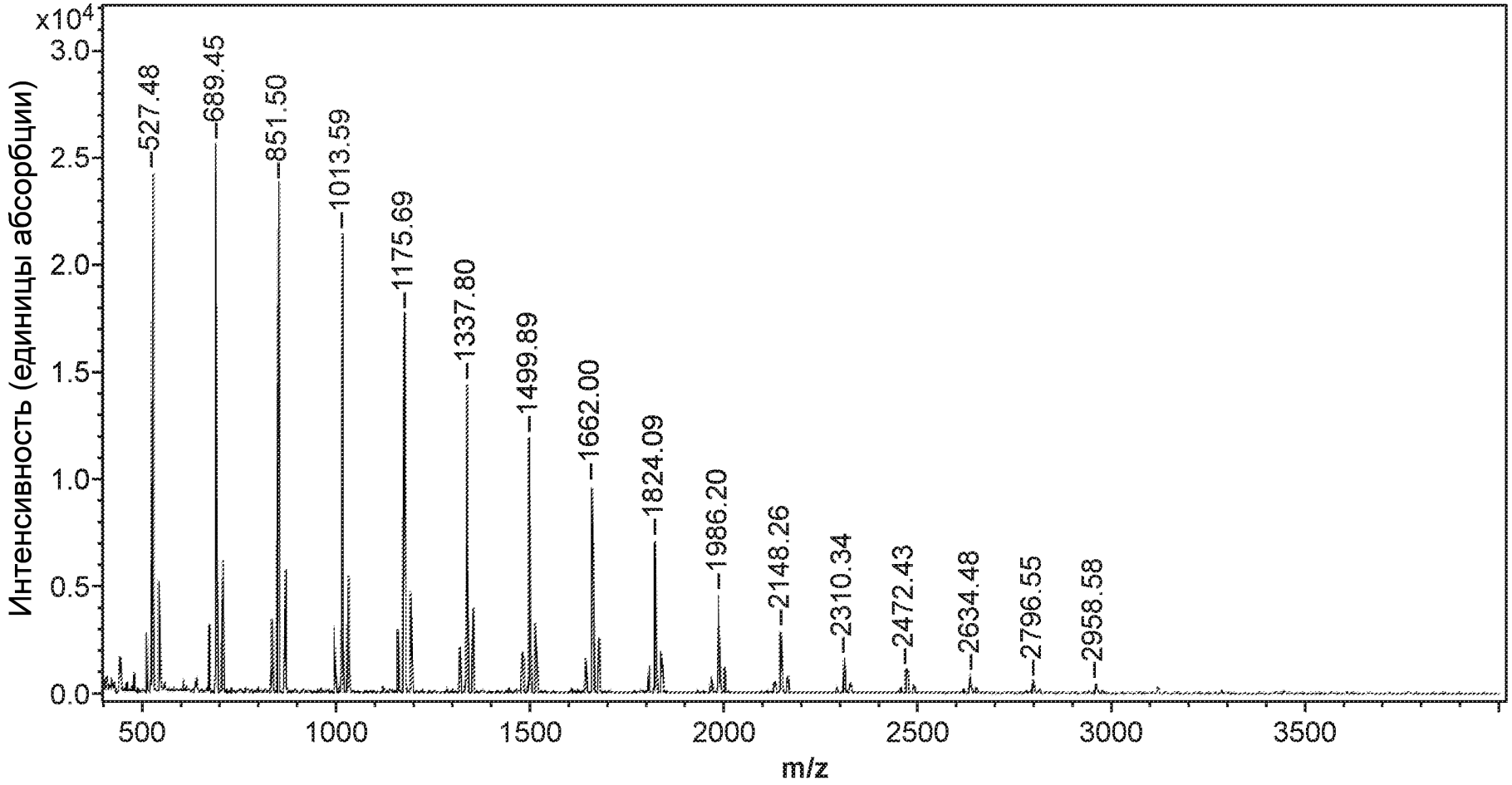


Ангидроцеллобиоза

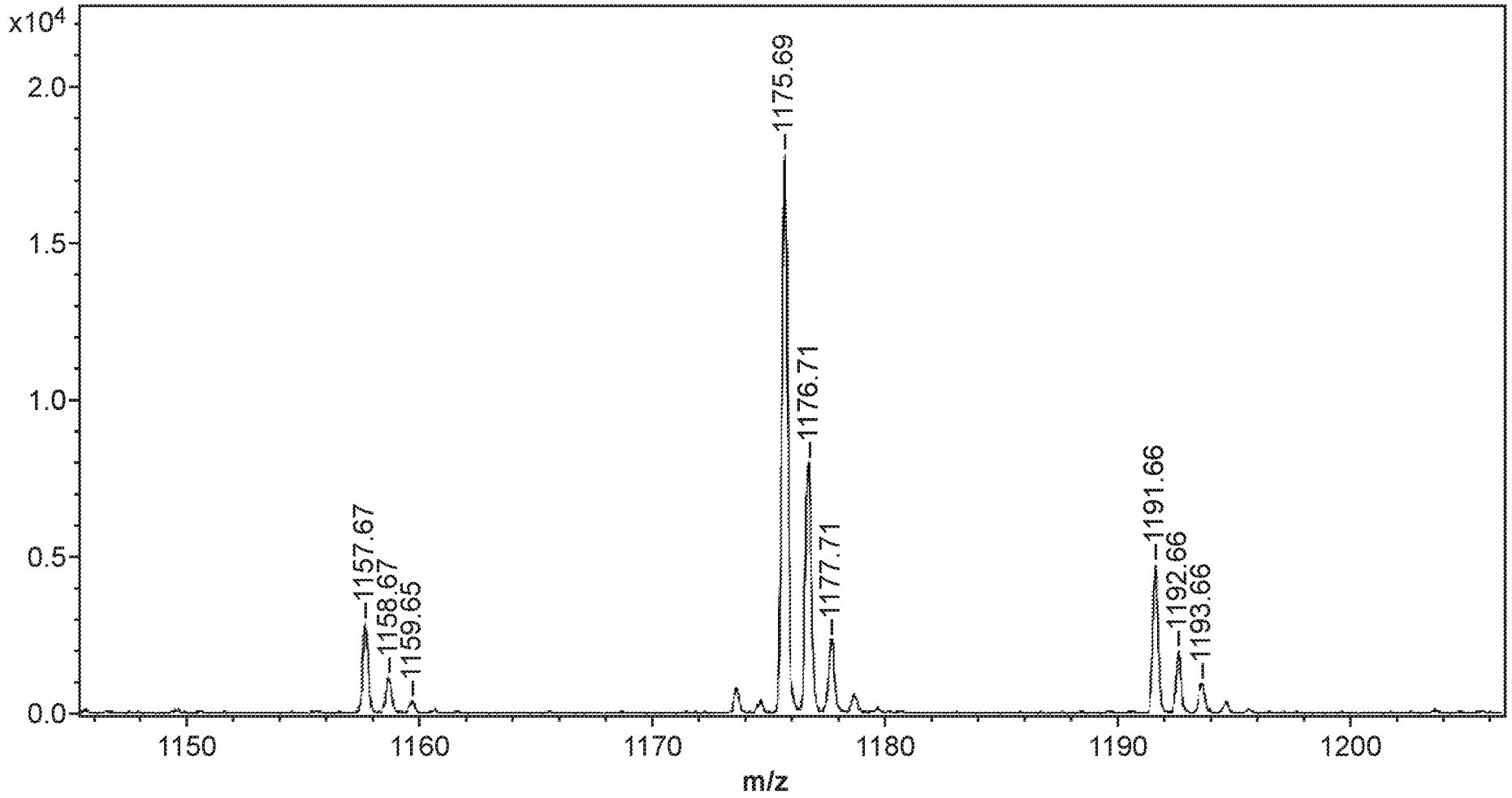
Фиг. 18



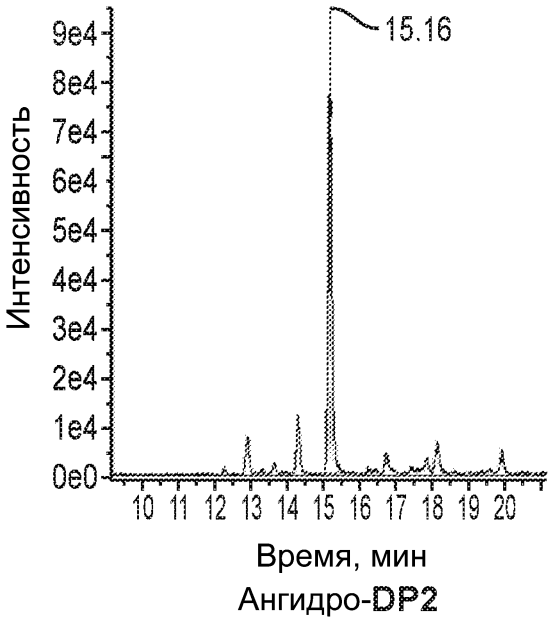
Фиг. 19


x10^4
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Интенсивность (единицы абсорбции)
527.48
689.45
851.50
1013.59
1175.69
1337.80
1499.89
1662.00
1824.09
1986.20
2148.26
2310.34
2472.43
2634.48
2796.55
2958.58
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
m/z

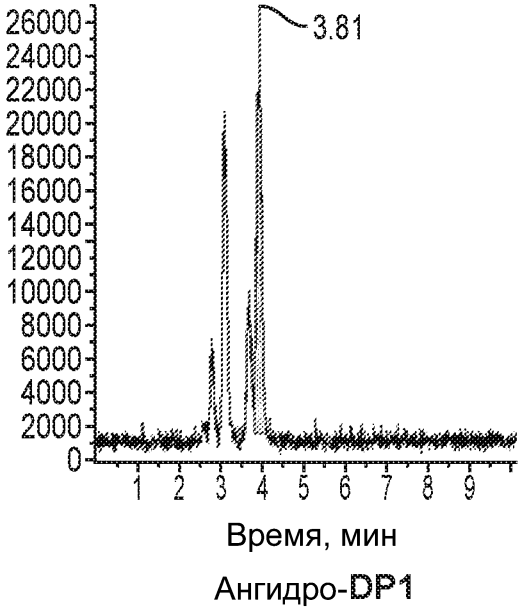
Фиг. 20A


x10^4
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1150
1160
1170
1180
1190
1200
m/z
1157.67
1158.67
1159.65
1175.69
1176.71
1177.71
1191.66
1192.66
1193.66

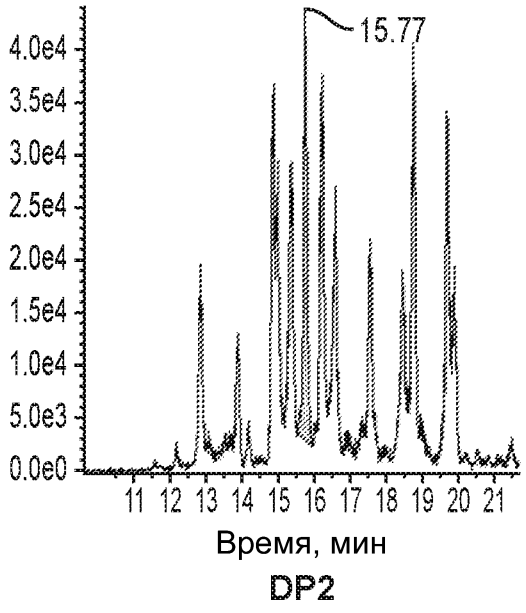
Фиг. 20B



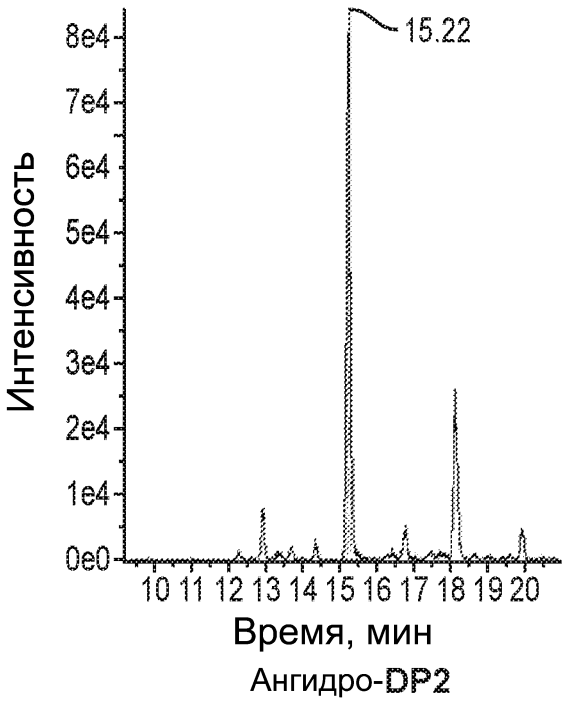
Фиг. 21A



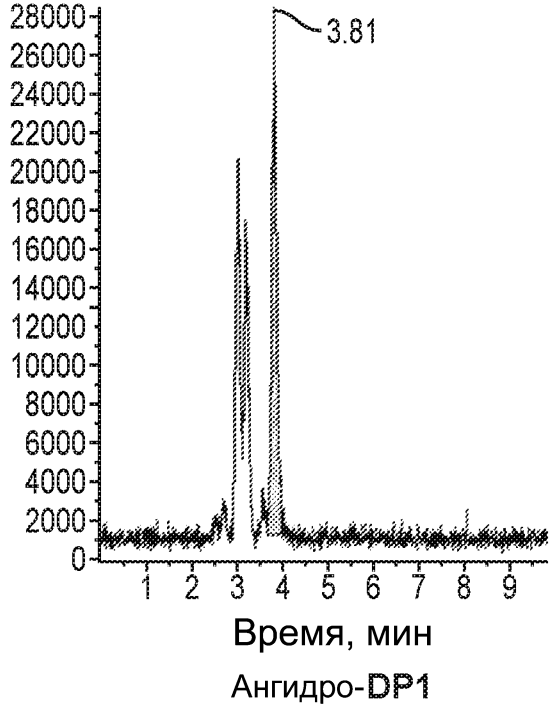
Фиг. 21B



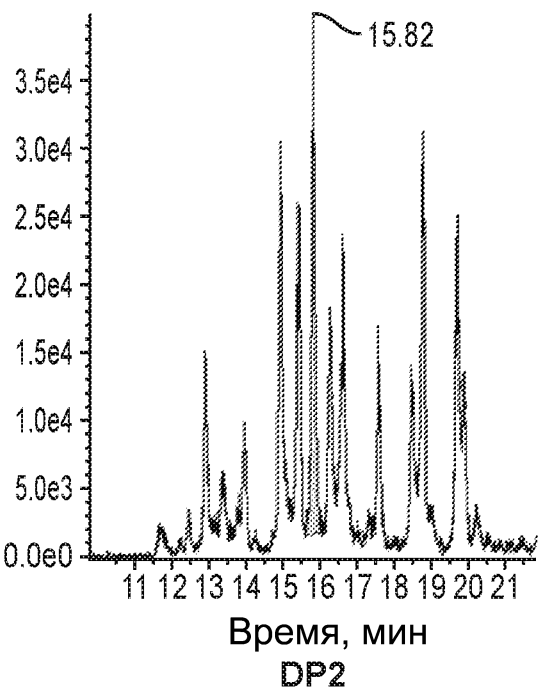
Фиг. 21C



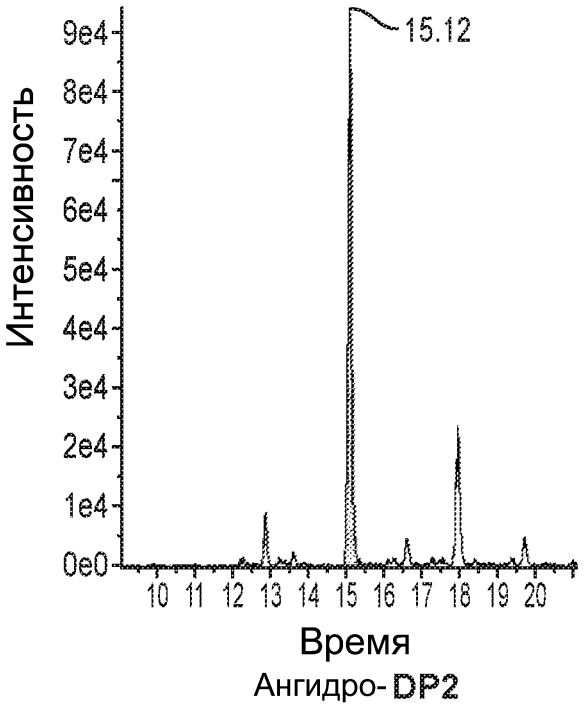
Фиг. 22A



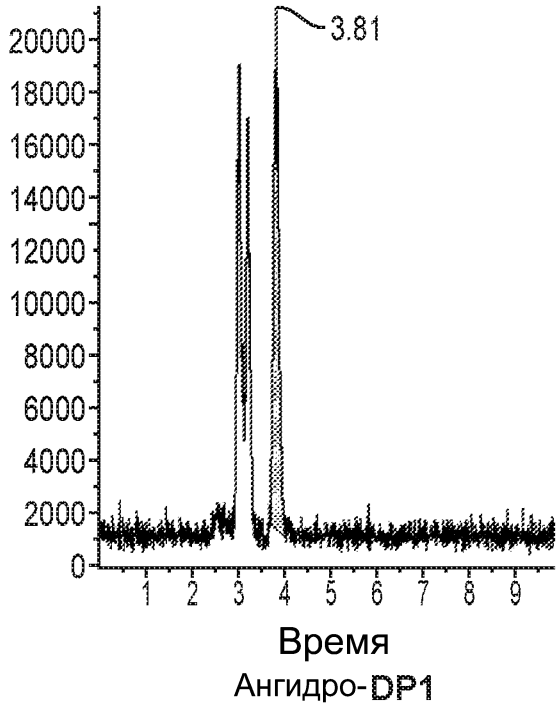
Фиг. 22B



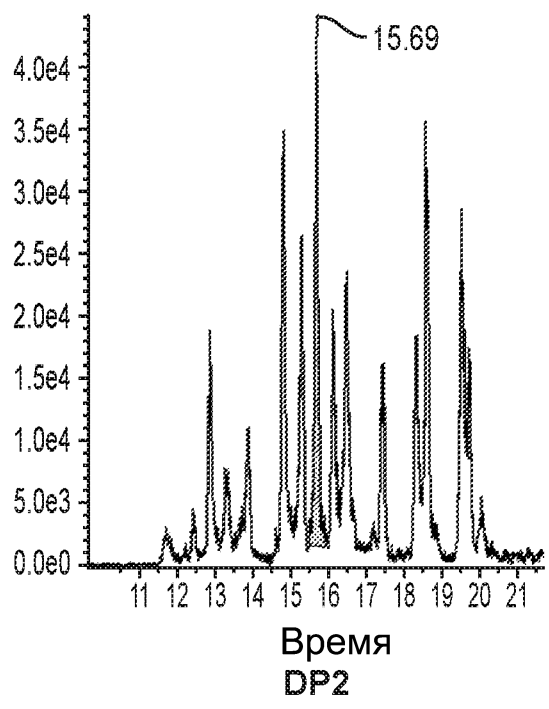
Фиг. 22C



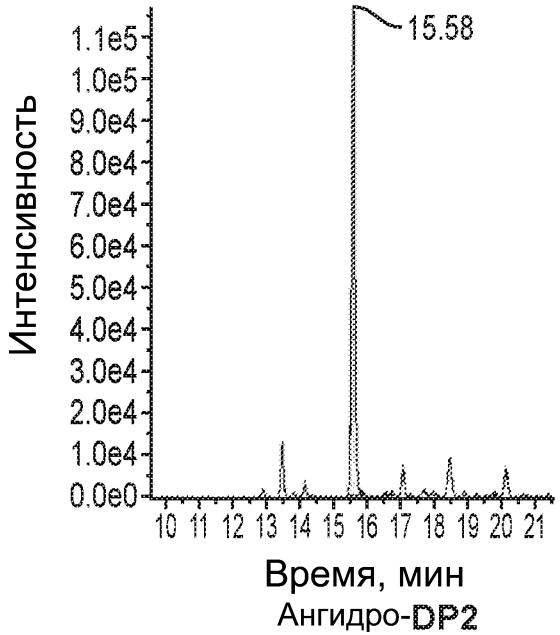
Фиг. 23A



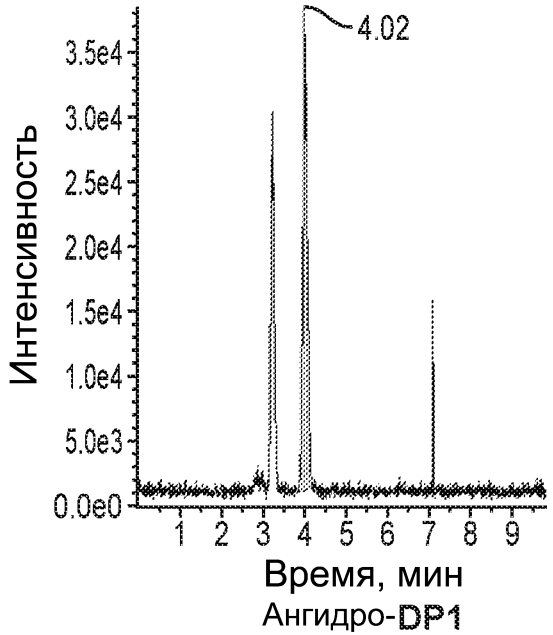
Фиг. 23B



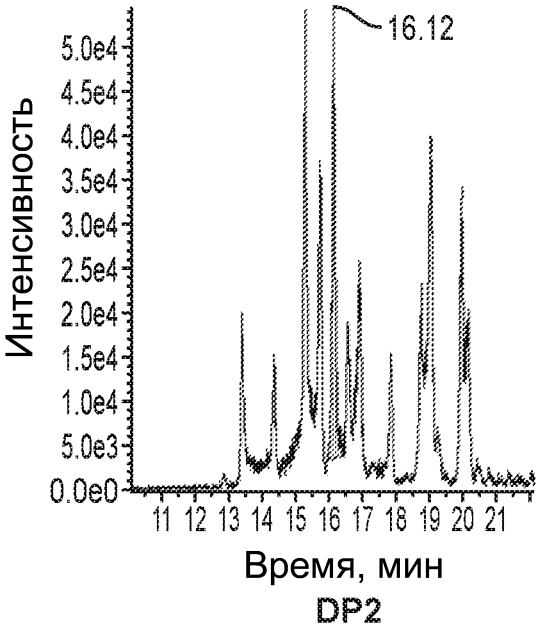
Фиг. 23C



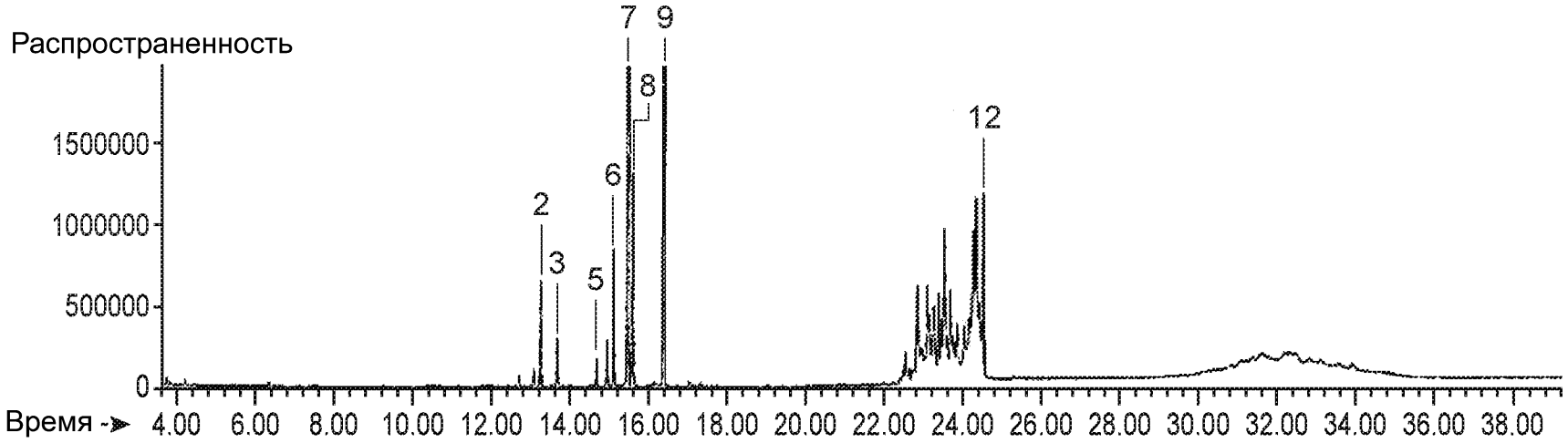
Фиг. 24A



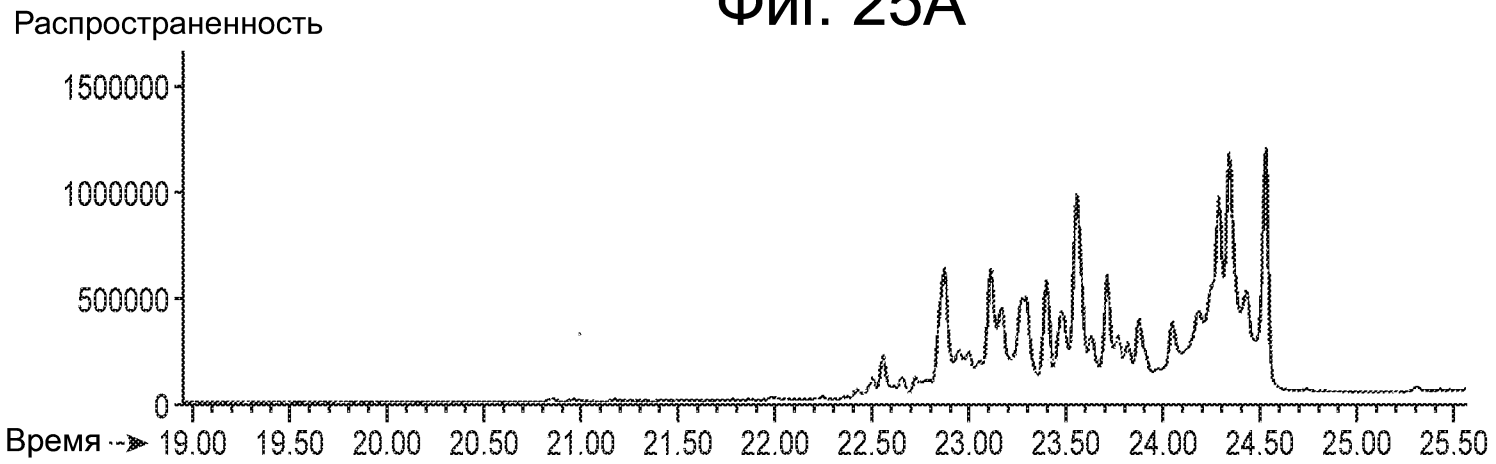
Фиг. 24B



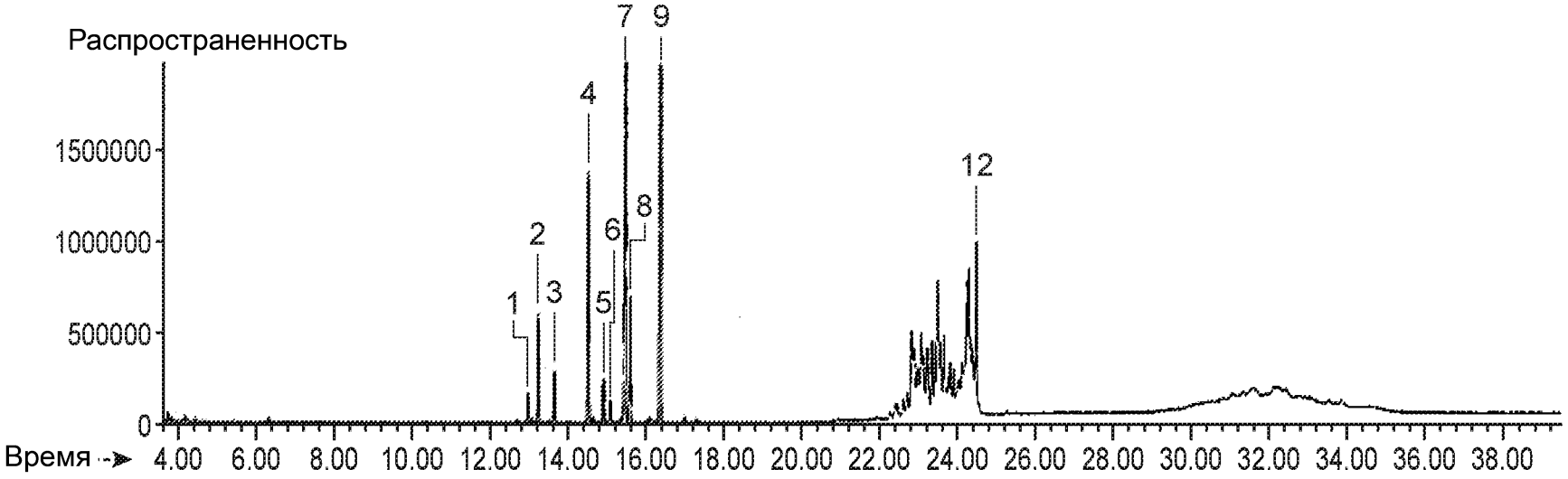
Фиг. 24C



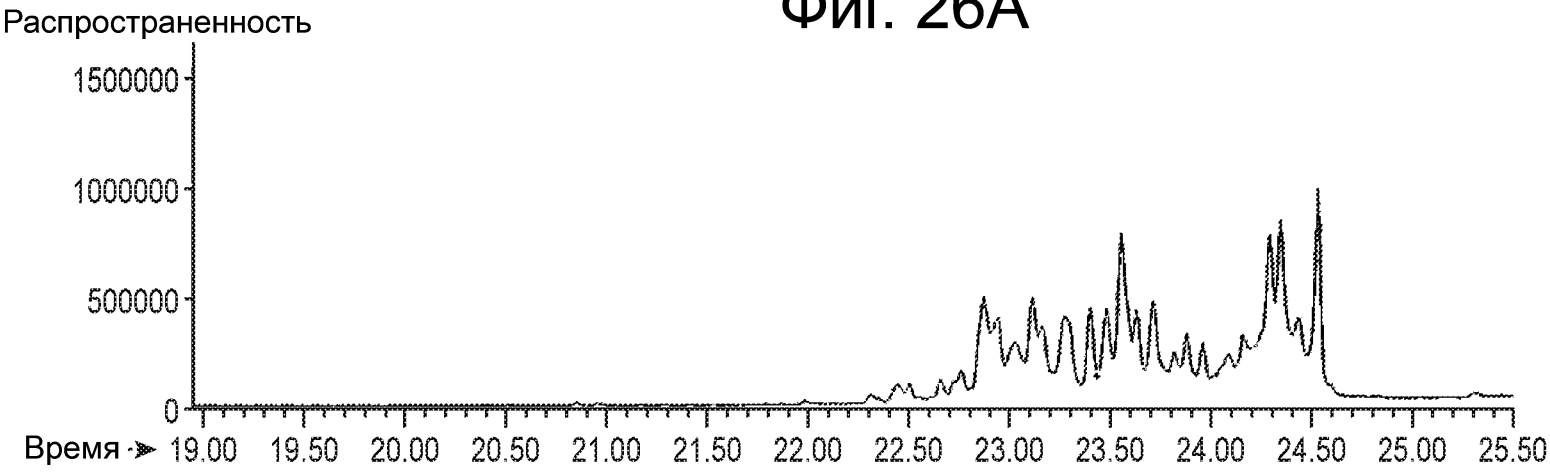
Фиг. 25A



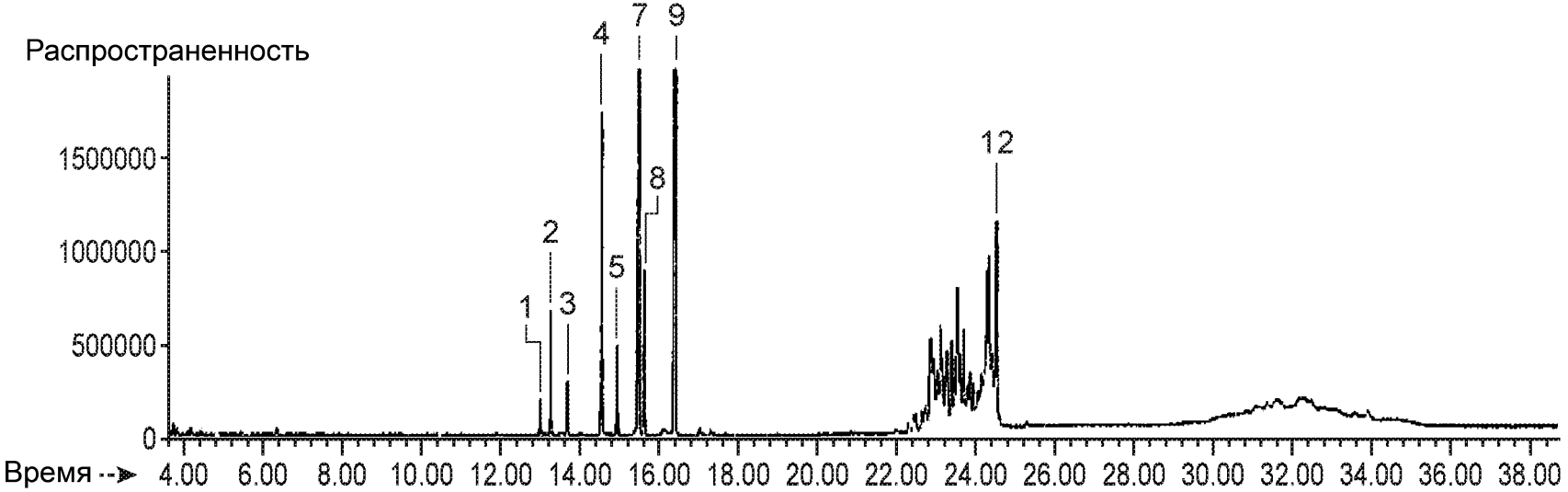
Фиг. 25B



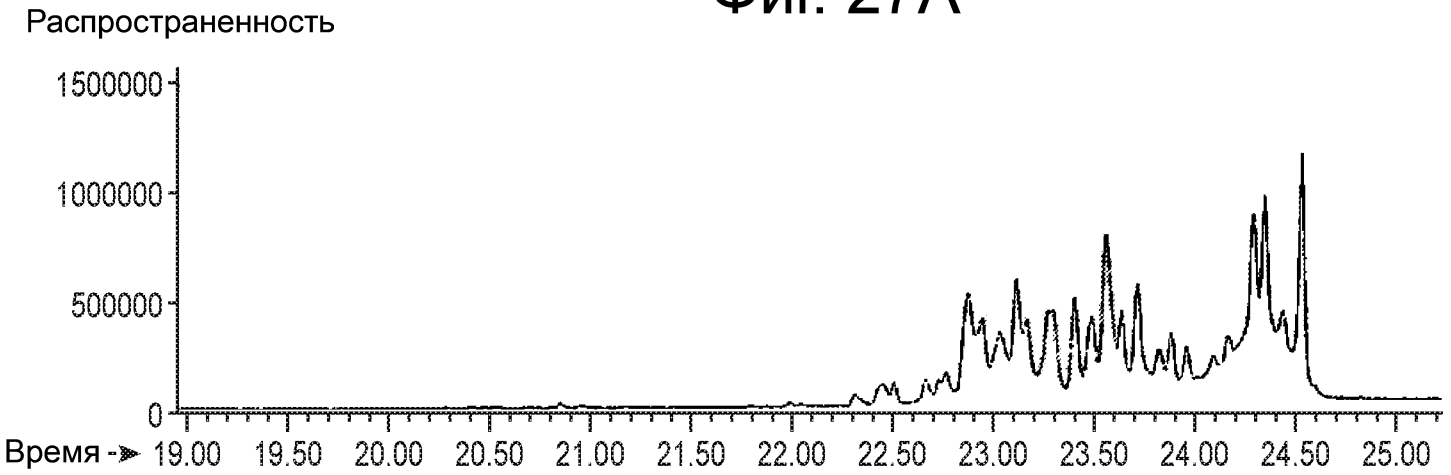
Фиг. 26A



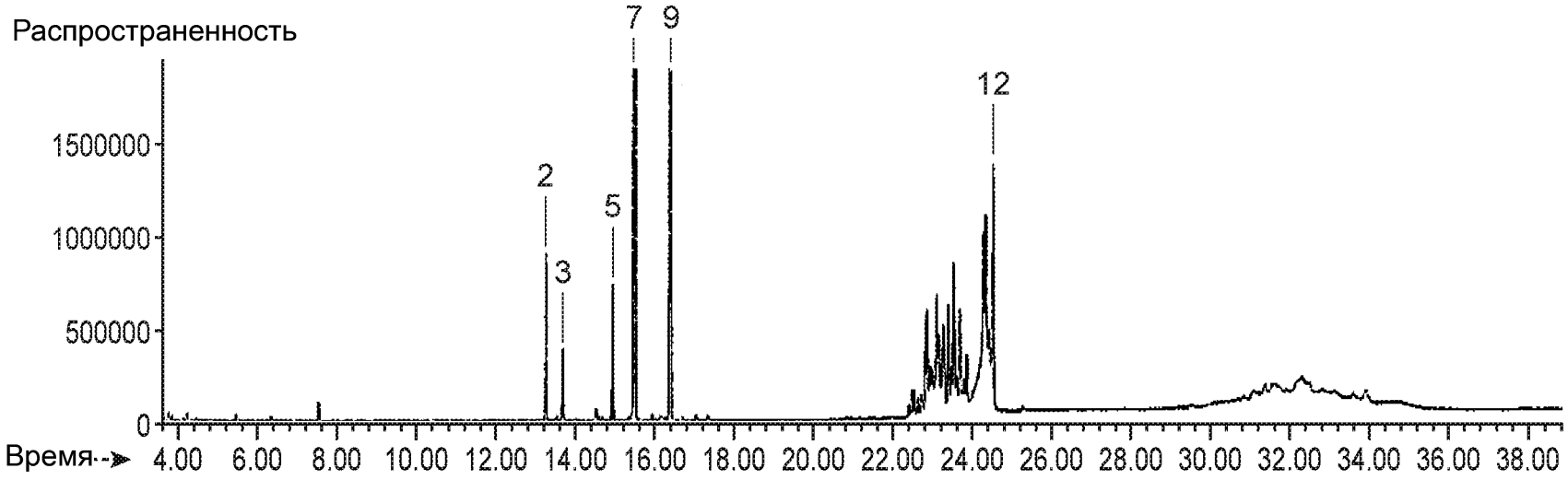
Фиг. 26B



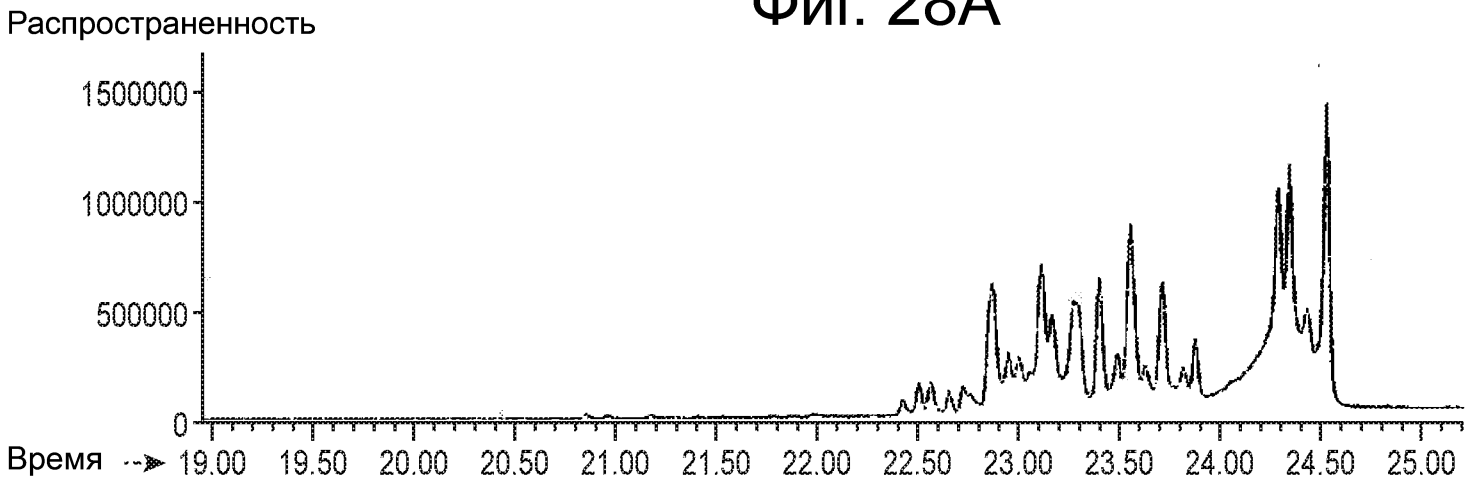
Фиг. 27A



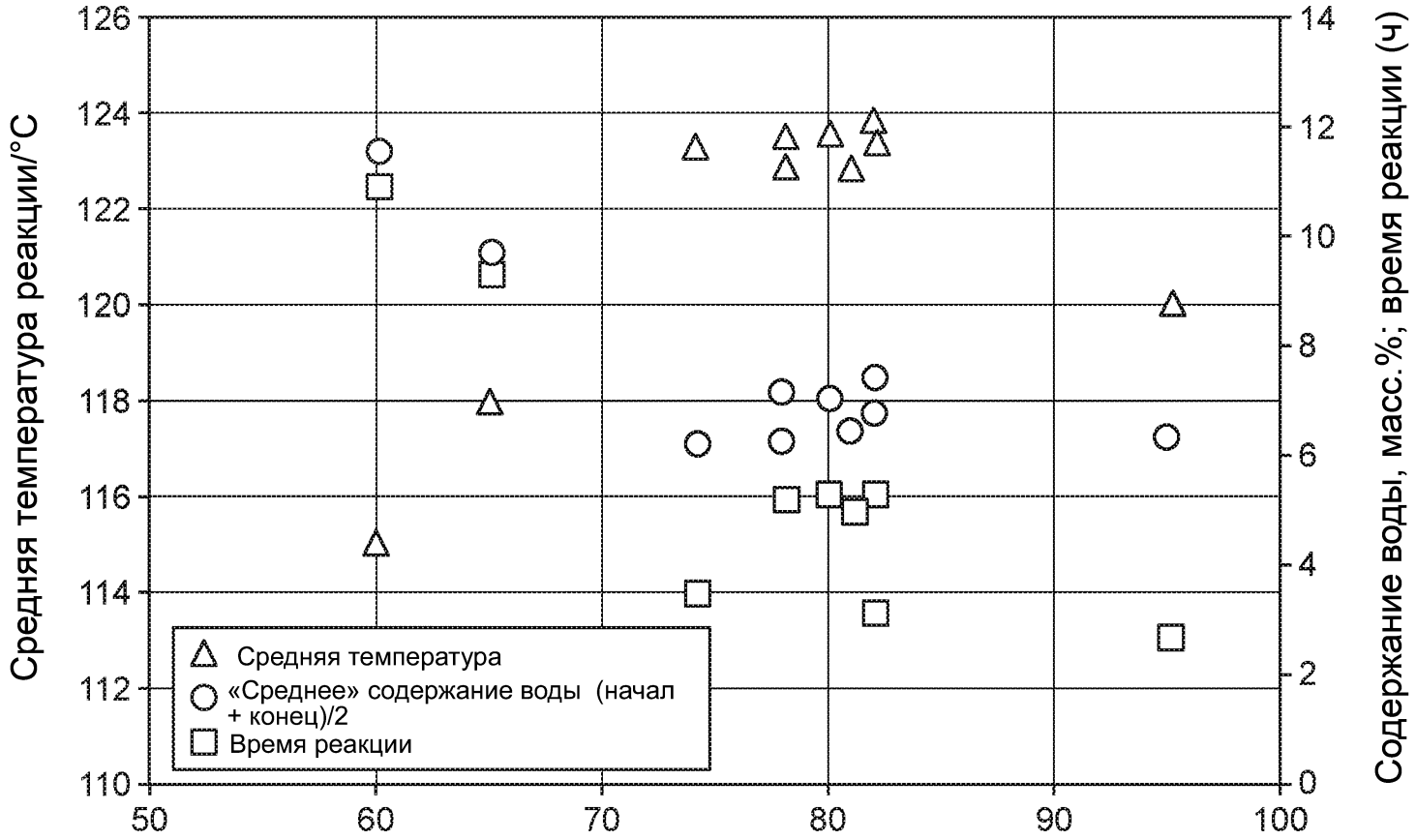
Фиг. 27B



Фиг. 28A

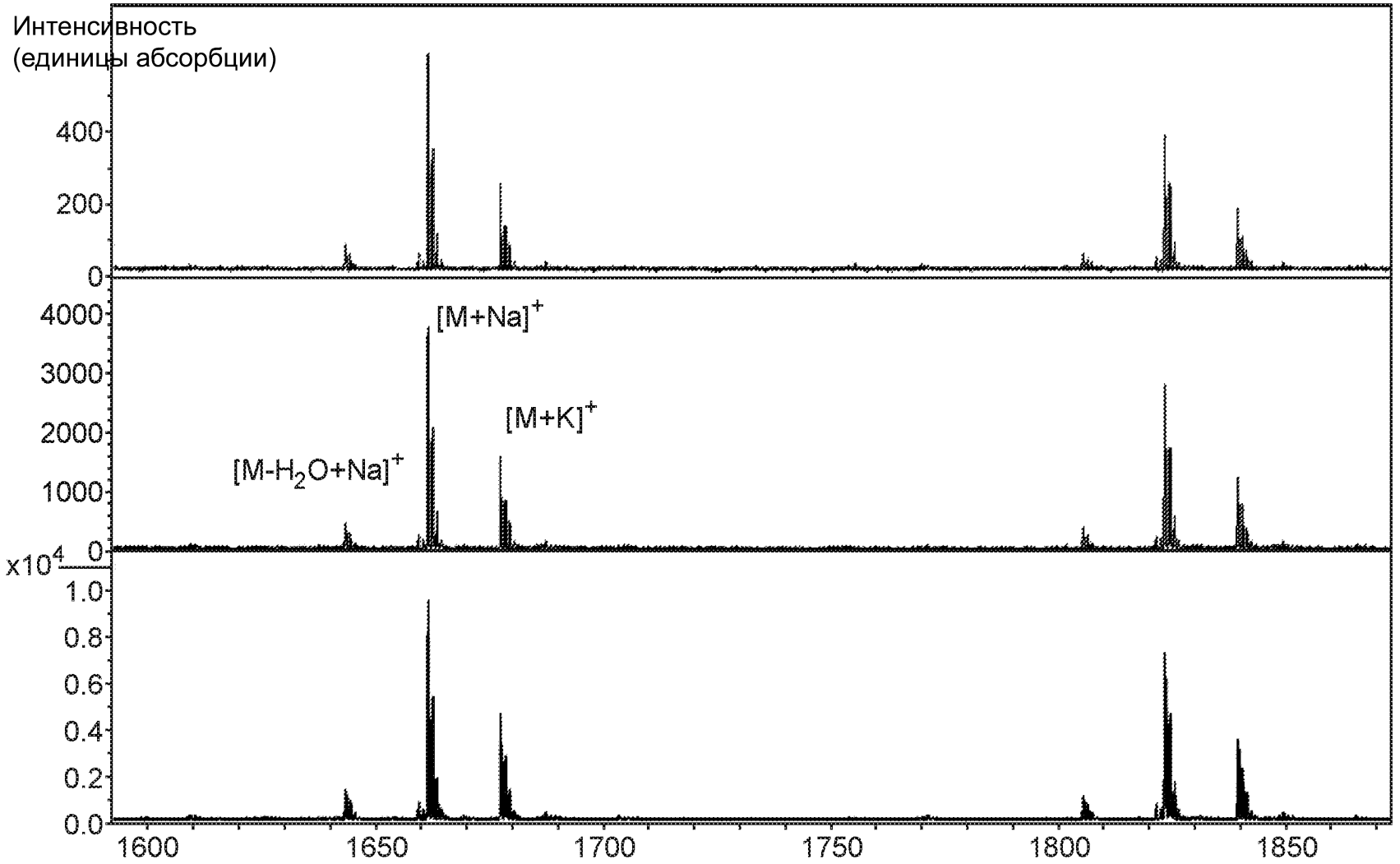


Фиг. 28B



Содержание ангидро-DP2 по отношению к олигосахаридному препарату из Примера 2

Фиг. 29


Интенсивность
(единицы абсорбции)
400
200
0
4000
3000
2000
1000
0
x10^4
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
[M+Na]+
[M+K]+
[M-H2O+Na]+
1600
1650
1700
1750
1800
1850

Фиг. 30