

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-131683  
(P2004-131683A)

(43) 公開日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int.C1. <sup>7</sup>	F 1	テーマコード (参考)
<b>C08B 30/12</b>	C08B 30/12	4 B018
<b>A23L 1/10</b>	A23L 1/10	4 B023
<b>A23L 1/30</b>	A23L 1/30	4 C086
<b>A61P 3/04</b>	A61P 3/04	4 C090
<b>A61P 3/06</b>	A61P 3/06	4 J002

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L 外国語出願 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-135928 (P2003-135928)	(71) 出願人	590000824 ナショナル スターチ アンド ケミカル インベストメント ホールディング コ ーポレイション アメリカ合衆国, デラウェア 19720 , ニューキャッスル, ユニケマ ブルバ ード 1000
(22) 出願日	平成15年5月14日 (2003.5.14)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	10/145186	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成14年5月14日 (2002.5.14)	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108110 弁理士 日野 あけみ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】低アミロース澱粉のイソアミラーゼによる枝切りにより製造された耐性澱粉

## (57) 【要約】 (修正有)

【課題】新規な短鎖 - グルカン組成物である耐性澱粉の提供。

【解決手段】イソアミラーゼを使用して低アミロース澱粉を完全に枝切りすることによって製造された耐性澱粉に関する。このような耐性澱粉は食用製品、例えば栄養サプリメントにおいて有用である。また、癌発生率の減少を包含する種々の結腸疾患への応用、インスリン耐性、高血糖症、高インスリン血症、異脂血症、異フィブリン溶解、糖尿病、高血圧症等にも応用される可能性がある。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

低アミロース澱粉を完全に枝切りすることによって製造された耐性澱粉組成物であって、高度に結晶状の完全に枝切りされた線状 - グルカンを含んでなり、

- a ) 少なくとも約 70 質量 % の耐性澱粉含量；
- b ) 約 4 . 0 より大きいデキストロース当量；
- c ) D S C により測定して、少なくとも約 90 のピーク融点温度、 T p ；および
- d ) D S C により測定して、少なくとも約 25 のエンタルピー、 H ；

を特徴とする耐性澱粉組成物。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の組成物を製造する方法であって、

- a ) イソアミラーゼを使用して低アミロース澱粉を完全に枝切りする工程；
- b ) 枝切りした澱粉を結晶化させる工程；および
- c ) 高度に結晶状の枝切りした澱粉を乾燥する工程；

を含んでなる方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の組成物を含む食用製品。

## 【請求項 4】

製品がプレバイオティックサプリメントである請求項 3 に記載の食用製品。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、低アミロース澱粉をイソアミラーゼで枝切りして完全に線状の短鎖 - グルカン組成物を形成することによって製造された耐性澱粉、およびその使用に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

複雑な炭水化物である澱粉は 2 タイプの多糖類分子、すなわち、 - 1 , 4 - D - グリコシド結合により連結された D - アンヒドログルコース単位のほとんど線状の柔軟性ポリマーであるアミロースと、 - 1 , 6 - D - グリコシド結合により連結された線状鎖の分枝鎖状ポリマーであるアミロペクチンとから構成されている。

30

澱粉は主として小腸において - アミラーゼ酵素により消化される。

## 【0003】

ある種の澱粉加工操作は、澱粉を小腸内の酵素加水分解に対して耐性である耐性澱粉として知られている澱粉に変換することが知られている。耐性澱粉は小腸における消化および吸収に抵抗し、そして大腸に入り、ここで結腸の微生物相により発酵されて短鎖脂肪酸、特にブチレートとガスとなる。

## 【0004】

研究文献において、結腸の微生物相によるこの耐性澱粉の発酵は多数の有益な作用を有し、こうして食品および薬剤の両方の用途に有用であることが示されている。

40

## 【0005】

耐性澱粉は、結腸の健康および粘膜の完全性を維持するために、医療用食品および食事サプリメントを含む食品において使用することができる。耐性澱粉はプレバイオティック物質として知られている。さらに、耐性澱粉は、大腸で短鎖脂肪酸に発酵され、大腸に到達するまで利用されないので、低いカロリー値を有する。小腸における利用可能なまたは血糖炭水化物の減少は、血液グルコースおよびインスリン調節を改良し、体重管理についての利点に関連する。また、研究において、耐性澱粉はヒトにおける健康な免疫系の維持に寄与することが示されている。

## 【0006】

また、耐性澱粉は薬剤として使用することができる。耐性澱粉は癌発生率の減少を包含する種々の結腸疾患の危険の減少に関係付けられてきている。さらに、耐性澱粉は、インス

50

リン耐性、高血糖症、高インスリン血症、異脂血症、異フィブリン溶解、糖尿病、高血圧症および心臓血管疾患を包含する症候群Xに関連する一群の代謝障害の危険を減少することができる。また、耐性澱粉は肥満症の治療に有効であろう。

### 【0007】

耐性澱粉 (RS) は文献において耐性の原因に依存して4つのカテゴリーに分類された。RS1はタンパク質基質内または植物細胞壁内への顆粒の閉じ込めのために、物理的にアクセス不可能な澱粉である。RS2は胰臓-アミラーゼによる消化に抵抗する粒状澱粉である。RS3は老化した、非粒状澱粉または澱粉食品である。RS4は-1,4-D-グリコシド結合および-1,6-D-グリコシド結合以外の結合を有する耐性澱粉である。

10

### 【0008】

種々のタイプの耐性澱粉を製造する種々の方法が報告されてきている。これらは下記の方法を包含する：粒状耐性澱粉を製造する方法は米国特許第5,593,503号（特許文献1）に記載されている；そしてRS3タイプの耐性澱粉を製造する方法は米国特許第5,281,276号（特許文献2）および米国特許第5,409,542号（特許文献3）に記載されている、すべて耐性澱粉はアミロース澱粉から製造される。澱粉の架橋およびリン酸化によりRS4タイプの耐性澱粉を製造する方法は、米国特許第5,855,946号（特許文献4）に記載されている。部分的に分解し、老化させた耐性澱粉は米国特許第6,043,229号（特許文献5）に開示されている。

20

### 【0009】

#### 【特許文献1】

米国特許第5,593,503号明細書

#### 【特許文献2】

米国特許第5,281,276号明細書

#### 【特許文献3】

米国特許第5,409,542号明細書

#### 【特許文献4】

米国特許第5,855,946号明細書

#### 【特許文献5】

米国特許第6,043,229号明細書

30

### 【0010】

#### 【課題を解決するための手段】

驚くべきことには、アミラーゼ消化に対して耐性である澱粉が、完全に線状であり、短鎖の、高度に結晶化した-1,4-グルカンから得られることが今回発見された。

本発明は、イソアミラーゼを使用して低アミロペクチン澱粉を完全に枝切りすることによって製造された耐性澱粉に関する。このような耐性澱粉は、栄養サプリメントを包含する、食用製品において有用である。

### 【0011】

デキストロース当量は、本明細書において使用するとき、加水分解物の還元力を意味することを意図する。各澱粉分子は1つの還元性末端を有し、したがってDEは分子量に逆比例する。アンヒトロD-グルコースのDEは100として定義され、そして非加水分解澱粉のDEは事実上ゼロである。

40

### 【0012】

完全に枝切りされた澱粉は、本明細書において使用するとき、理論的に100質量%の短鎖アミロースを含んでなること、実際には、酵素活性により短鎖アミロースのパーセントがそれ以上測定できるほど変化しないところまで、高度に枝切りされていることを意味することを意図する。

### 【0013】

本明細書において使用するとき、プレバイオティック物質（prebiotic）は、1つまたは制限された数の結腸中の細菌の増殖および/または活性を選択的に刺激すること

50

によって、宿主に有益に影響を与え、こうして宿主の健康を改善する耐性澱粉を意味することを意図する。

【0014】

本明細書において使用するとき、耐性澱粉という用語は、健康な個体の小腸において吸収されない、澱粉および澱粉分解生成物の合計を意味することを意図する。

本明細書において使用するとき、短鎖アミロースという用語は、-1,4-D-グリコシド結合で連結された約5～65アンヒドログルコース単位を含有する線状ポリマーを意味する。

【0015】

本発明は、イソアミラーゼを使用して低アミロペクチン澱粉を完全に枝切りすることによって製造された耐性澱粉に関する。このような耐性澱粉は、栄養サプリメントを包含する、食用製品において有用である。

10

【0016】

澱粉は、本明細書において使用するとき、本発明における使用に適当である、任意の天然源に由来するすべて澱粉を包含することを意図する。天然澱粉は、本明細書において使用するとき、天然に見出される澱粉である。また、標準的育種技術、例えば、交雑育種、転座、逆位、形質転換または遺伝子または染色体を操作する他の方法およびそれらの変型により得られた植物に由来する澱粉は適当である。さらに、上記遺伝的組成物の人工的突然変異および変異型から成長した植物に由来する澱粉は、既知の標準的突然変異育種法により生産され、また、本発明において適当である。

20

【0017】

典型的な澱粉源は、穀物、塊茎、根、豆果および果実である。天然源はトウモロコシ、エンドウマメ、ジャガイモ、サツマイモ、バナナ、オオムギ、コムギ、イネ、カラスムギ、サゴヤシ、アマランサス、タピオカ、クズウコン、カンナおよびモロコシ、特にトウモロコシ、ジャガイモ、カッサバおよびイネ、さらに特にトウモロコシまたはジャガイモ、カッサバおよびイネのワキシー品種であることができる。本明細書において使用するとき、用語「ワキシー」または「低アミロース」は約10質量%以下のアミロースを含有する澱粉を包含することを意図する。本発明において、約5質量%以下のアミロースを含有する澱粉は特に適当である。

30

【0018】

澱粉はイソアミラーゼにより完全に加水分解される。澱粉基材の酵素的加水分解は、この分野において知られている技術により実施される。酵素の使用量は、使用する酵素源および活性および基材材料に依存する。典型的には、酵素は澱粉の約0.05～約2質量%、特に約0.1～約0.4質量%である。

【0019】

酵素活性について最適なパラメーターは使用する酵素に依存して変化するであろう。酵素の分解速度は、この分野において知られている因子、例えば、酵素濃度、基質濃度、pH、温度、インヒビターの存在または不存在および、存在する場合、変性の程度およびタイプに依存する。これらはパラメーターを調節して、澱粉基材の分解速度を最適化することができる。

40

【0020】

イソアミラーゼによる加水分解前に、澱粉をこの分野において知られている技術により糊化する。この分野において知られている技術は、例えば、米国特許第4,465,702号、米国特許第5,037,929号、米国特許第5,131,953号、および米国特許第5,149,799号に開示されている技術を包含するが、これらに限定されない。また、下記の文献を参照のこと：R. L. WhistlerおよびE. F. Paschall編「Starch: Chemistry and Technology, Vol. III-Industrial Aspects」、Chapter XXI I-、『Production and Use of Pregelatinized Starch』、Academic Press、New York 1967。糊化

50

プロセスは、澱粉を粒状構造から広げ、これにより酵素が澱粉分子をいっそう容易にかつ均一に分解できるようにする。

【0021】

一般に、酵素処理は水性または緩衝化スラリー中で、処理する基材澱粉に依存して、約10～約40%の澱粉固形分レベルにおいて実施する。本発明において、約15～35%の固形分レベルは特に有用であり、約18～30%はいっそう特に有用である。別法において、このプロセスは固体支持体に固定化された酵素を利用することができる。

【0022】

典型的には、酵素消化は反応速度を低下させないで実行可能な最高の固形分含量において実施して、澱粉組成物の所望の引き続く乾燥を容易にする。高固形分含量において、攪拌は困難または非効率的となり、澱粉分散液は取扱いがいっそう困難となるので反応速度は低下することがある。

【0023】

スラリーのpHおよび温度を調節して、酵素による加水分解を有効にすべきである。これらのパラメーターは使用すべき酵素に依存し、この分野において知られている。一般に、約25～約70、特に約50～約60である。一般に、この分野において知られている技術により、pHは約3.0～約6.0、特に約3.5～約4.5に調節する。

【0024】

酵素反応は、澱粉が完全に枝切りされるまで続ける。一般に、酵素反応は約1～約24時間、特に約4～約12時間を必要とする。反応時間は使用する澱粉のタイプ、酵素の使用量並びに固形分%、pHおよび温度の反応パラメーターに依存する。

【0025】

この分野における周知の方法により -1,6-D-グルカノヒドラーーゼ活性により遊離される還元性基の濃度を測定することによって、加水分解の量をモニターし、規定することができる。他の技術、例えば、粘度変化、ヨウ素反応または分子量変化のモニターを使用して、反応の終点を定めることができる。澱粉が完全に枝切りされたとき、モニターした測定値はもはや変化しない。典型的には、澱粉は少なくとも約95%、より特に少なくとも約98質量%、最も特に少なくとも約99質量%が枝切りされたとき、完全に枝切りされる。典型的には、枝切りされた澱粉は14～25グルコース単位の平均連鎖長、および約0.2%より少ない、特に約0.1%より少ない -1,6-D-グリコシド結合(連結)を有するであろう。

【0026】

必要に応じて、酵素をこの分野において既知の任意の技術、例えば、熱、酸または塩基の不活性化により、不活性化することができる。例えば、pHを3.0より低く少なくとも30分間調整することによって、酸不活性化を達成することができるか、あるいは温度を約80から約90に上昇させ、その温度に少なくとも約20分間維持して酵素を完全に不活性化することによって、熱不活性化を達成することができる。

【0027】

澱粉はイソアミラーゼによる枝切りの前または後に変換することができ、そして酸化、酸加水分解、熱および/または酸デキストリン化により調製された流動性または低粘性変性澱粉を包含することを意図する。これらの方法はこの分野において周知である。

【0028】

酵素加水分解前または後に、澱粉をさらに変性することができる。このような変性は、物理的、酵素的または化学的であることができる。物理的変性は剪断または熱的阻害、例えば、米国特許第5,725,676号に記載されている方法による変性を包含する。

【0029】

澱粉は化学的に変性することができ、このような変性された誘導体は下記のものを包含するが、これらに限定されない：架橋、アセチル化および有機エステル化、ヒドロキシエチル化およびヒドロキシプロピル化、リン酸化および無機エステル化、カチオン性、アニオン性および両性イオン性並びにスクシネートおよび置換スクシネート誘導体。このような

10

20

30

40

50

変性法はこの分野において知られており、例えば、下記の文献に記載されている：Wurzburg 編、「Modified Starches: Properties and Uses」、CRC Press, Inc.、フロリダ州（1986）。

【0030】

本発明において使用するために適当な性質を有する任意の澱粉基材は、この分野において知られている任意の方法により精製して、多糖類に対して固有であるか、あるいは加工の間に発生する香味および色を除去することができる。澱粉を処理する適当な精製方法は、EP 554 818号（Kasicia、他）により代表される特許ファミリーに開示されている。また、アルカリ洗浄技術は有効であり、米国特許第4,447,480号（Seidel）および米国特許第5,187,272号（Bertalan他）により代表される特許ファミリーに記載されている。また、枝切りされた澱粉をこのような方法により精製することができる。10

【0031】

典型的には、生ずる溶液をその意図する最終用途に従い所望のpHに調整する。一般に、pHはこの分野において知られている技術を使用して約5.0～約7.5、特に約6.0～約7.0に調節する。さらに、澱粉分散液から沈殿した短鎖アミロースを再分散させることができる。枝切りされた澱粉組成物を精製する場合、反応不純物および副生物は透析、濾過、遠心または澱粉組成物を単離し、濃縮する分野において知られている任意の他の方法により除去することができる。例えば、澱粉分解物をこの分野において知られている技術により洗浄して、可溶性低分子量分画、例えば、オリゴ糖類を除去して、いっそう高度に結晶状の澱粉を得ることができる。20

【0032】

枝切りされた澱粉をこの分野において知られている方法により、例えば、澱粉を静置し、老化させることによって結晶化させる。次いで澱粉はこの分野において知られている方法を使用して、特に濾過または乾燥、例えば、噴霧乾燥、フラッシュ乾燥または空気乾燥により、より特に濾過またはフラッシュ乾燥により回収する。本発明に対して必須である高度の結晶性を得るために、典型的には老化および乾燥を調節することによって、結晶化を調節することが重要である。さらに、乾燥法および他の結晶化後のプロセスは結晶を実質的に破壊しないことが重要である。30

【0033】

得られた枝切りされた澱粉は高度に結晶状の短鎖アミロースの形態であり、耐性澱粉として独特に機能的である。澱粉は、後述する方法に従い、少なくとも約70質量%、特に少なくとも約75質量%の耐性澱粉含量により特徴づけられる。

【0034】

また、澱粉は、後述する手順に従いDSCにより測定して、少なくとも約90、より特に少なくとも約100、最も特に少なくとも約110のピーク融点温度、Tp、により特徴づけられる。また、澱粉は、後述する手順に従いDSCにより測定して、少なくとも約25 J/g、特に少なくとも約30 J/gのエンタルピー、H、により特徴づけられる。このようなDSC値は生成物の高度に結晶状の特質を示す。40

【0035】

さらに、枝切りされた澱粉は少なくとも約5.0、特に少なくとも約6.0、最も特に少なくとも約7.0のデキストロース当量（DE）により特徴づけられる。しかしながら、より低いデキストロース当量（例えば、少なくとも約4.0のDE）は、加工条件を変更することによって、特に低分子量加水分解生成物を除去することによって達成することができる。

熱を包含する加工の間に耐性レベルが有意に低下しないことにおいて、澱粉は加工許容性である。

【0036】

澱粉は耐性澱粉として独特に機能的であり、種々の食用製品において使用することができる。食用製品は下記のものを包含するが、これらに限定されない：シリアル、棒型の物、50

ピザ、パスタ、ドレッシング、例えば、注ぐことができるドレッシングおよびスプーンですくい取ることができるドレッシング；パイの中身、例えば、果実およびクリームの中身；ソース、例えば、ホワイトソースおよび乳製品をベースとするソース、例えば、チーズソース；グレービー；カロリーの少ないシロップ；ブディング；カスター；ヨーグルト；サワークリーム；飲料、例えば、乳製品をベースとする飲料；グレーズ；焼いた製品、例えば、クラッカー、パン、マフィン、ベーグル、ビスケット、クッキー、パイ皮およびケーキ；香辛料、砂糖菓子およびガム並びにスープ。

## 【0037】

また、食用製品は、栄養および医療用食品および飲料、例えば、食事療法または減量製品、糖尿病製品、持続エネルギー放出製品、例えば、スポーツドリンクおよびエネルギー棒型製品、食事代替物および栄養サプリメントを包含する。このような栄養製品は、食事療法製品、糖尿病製品、およびプレバイオティックス物質を包含する。

10

## 【0038】

本発明の澱粉は、組成物の機能性を得るために所望のまたは必要な量で添加することができる。一般に、澱粉は組成物の約0.01質量%～約100質量%、特に約1～約50質量%の量で添加することができる。澱粉は任意の他の澱粉と同じ方法で、典型的には製品中に直接混入するか、あるいはゾルの形で添加することによって、食品または飲料に添加することができる。

## 【0039】

## 【発明の実施の形態】

20

下記の態様は本発明の例示であるが、本発明をいずれに関しても限定するものと解釈すべきでない。

態様1. 低アミロース澱粉を完全に枝切りすることによって製造され、高度に結晶状の完全に枝切りされた線状-グルカンを含んでなり、

- a) 少なくとも約70質量%の耐性澱粉含量；
- b) 約4.0より大きいデキストロース当量；
- c) DSCにより測定して、少なくとも約90のピーク融点温度、Tp；および
- d) DSCにより測定して、少なくとも約25のエンタルピー、H；を特徴とする耐性澱粉組成物。

## 【0040】

30

態様2. 低アミロース澱粉が約5質量%以下のアミロースを含む、態様1の組成物。

態様3. 組成物のデキストロース当量が約5.0より大きい、態様1の組成物。

態様4. 組成物のデキストロース当量が約6.0より大きい、態様1の組成物。

態様5. 組成物の耐性澱粉含量が少なくとも約75質量%である、態様1の組成物。

## 【0041】

35

態様6. 組成物のピーク融点温度が少なくとも約100である、態様1の組成物。

態様7. 組成物のピーク融点温度が少なくとも約110である、態様1の組成物。

態様8. エンタルピーが少なくとも約30J/gである、態様1の組成物。

態様9. 低アミロース澱粉がトウモロコシ、ジャガイモ、カッサバおよびイネから成る群から選択される、態様1の組成物。

40

## 【0042】

態様10. 工程：

- a) イソアミラーゼを使用して低アミロース澱粉を完全に枝切りし；
- b) 枝切りされた澱粉を結晶化させ；そして
- c) 高度に結晶状の枝切りされた澱粉を乾燥する；を含んでなる、態様1の組成物を製造する方法。

態様11. 低アミロース澱粉が少なくとも約95質量%のアミロペクチンを含んでなる、態様10の方法。

## 【0043】

態様12. 組成物のデキストロース当量が約5.0より大きい、態様10の方法。

50

態様 13 . 組成物のデキストロース当量が約 6 . 0 より大きい、態様 10 の方法。

態様 14 . 組成物が少なくとも約 75 質量 % の耐性澱粉を含んでなる、態様 10 の方法。

態様 15 . 組成物のピーク融点温度が少なくとも約 100 である、態様 10 の方法。

【 0044 】

態様 16 . 組成物のピーク融点温度が少なくとも約 110 である、態様 10 の方法。

態様 17 . 組成物のエンタルピーが少なくとも約 30 J / g である、態様 10 の方法。

態様 18 . 低アミロース澱粉がトウモロコシ、ジャガイモ、カッサバ、およびイネから成る群から選択される、態様 10 の方法。

【 0045 】

態様 19 . 態様 1 の組成物を含んでなる食用製品。

態様 20 . 製品がプレバイオティックサプリメントである、態様 19 の食用製品。

態様 21 . 組成物のデキストロース当量が約 5 . 0 より大きい、態様 1 または 2 の組成物。

態様 22 . 組成物のデキストロース当量が約 6 . 0 より大きい、態様 21 の組成物。

態様 23 . 組成物の耐性澱粉含量が少なくとも約 75 質量 % である、態様 1 ~ 4 または 21 ~ 22 のいずれか 1 つの組成物。

【 0046 】

態様 24 . 組成物のピーク融点温度が少なくとも約 100 である、態様 1 ~ 5 または 21 ~ 23 のいずれか 1 つの組成物。

態様 25 . 組成物のピーク融点温度が少なくとも約 110 である、態様 24 の組成物。

態様 26 . 組成物のエンタルピーが少なくとも約 30 J / g である、態様 1 ~ 7 または 21 ~ 25 のいずれか 1 つの組成物。

【 0047 】

態様 27 . 低アミロース澱粉がトウモロコシ、ジャガイモ、カッサバおよびイネから成る群から選択される、態様 1 ~ 8 または 21 ~ 26 のいずれか 1 つの組成物。

態様 28 . 工程 :

d ) イソアミラーゼを使用して低アミロース澱粉を完全に枝切りし ;

e ) 枝切りされた澱粉を結晶化させ ; そして

f ) 高度に結晶状の枝切りされた澱粉を乾燥する ;

を含んでなる、態様 1 ~ 9 または 21 ~ 27 のいずれか 1 つの組成物を製造する方法。

【 0048 】

態様 29 . 低アミロース澱粉が少なくとも約 95 質量 % のアミロペクチンを含んでなる、態様 28 の方法。

態様 30 . 態様 1 ~ 9 または 21 ~ 27 のいずれか 1 つの組成物を含んでなる食用製品。

態様 31 . 製品がプレバイオティックサプリメントである、態様 30 の食用製品。

【 0049 】

【 実施例 】

下記の実施例により本発明をさらに例示し、説明するが、これらの実施例によりいずれの点においても本発明は限定されるものと解釈すべきでない。すべてのパーセントは質量 / 質量に基づく。

【 0050 】

実施例全体を通じて、下記の試験手順を使用する。

示差走査熱量測定 - 示差走査熱量測定を Perkin - Elmer DSC - 7 (米国コネチカット州ノーウォーク) 中で実施した。計器をインジウムで較正した。1 :

10

20

30

40

50

3の澱粉：水の比においてほぼ10 mgの澱粉の試料を調製し、5から160に10 / 分で加熱する。空のステンレス鋼のパンを参照として使用する。

【0051】

連鎖長および線形性 - 枝切り澱粉の試料をNMRにより分析して、平均連鎖長および-1,4-結合/-1,6-結合の比を決定した。5~6 mgの澱粉を2.5 mLのD<sub>2</sub>O/TSP(ナトリウムトリメチルシリルプロピオネート)中に懸濁させ、この懸濁液をほぼ1時間圧力調理することによって、NMR試料を調製した。生ずる透明な溶液を5 mmのNMR管に移し、NMRスペクトルが得られるまで水蒸気浴上で熱いままに保持する。試料を取扱うこの手順は、結晶質澱粉材料が溶液で維持されることを保証する。Bruker DPX-400スペクトロメーターにより90、400 MHzにおいて、プロトンNMRスペクトルを得た。

【0052】

問題の共鳴についての化学シフトの割り当て(90においてTSPに関して)は次の通りであった。-1,4-中間連鎖結合は5.38 ppm、-1,6-中間連鎖結合(分岐点)は4.96 ppm、還元性末端基の-型は5.23 ppmおよび還元性末端基の-型は4.65 ppmの化学シフトを有した。

【0053】

還元性末端基/中間連鎖共鳴の比から、澱粉試料についての平均連鎖長を計算した。-1,6-結合/-1,4-結合の量から、-1,6-結合(分岐点)のパーセントを計算した。

【0054】

デキストロース当量(DE) - 加工中のDE測定のために、フェーリング容量滴定法を使用した。500 mLのエルレンマイヤーフラスコを脱イオン(D.I.)水ですすいだ。次いで50 mLのD.I.水を添加した。フェーリング溶液AおよびBの各々の5 mLを添加し、次いで2滴のメチレンブルーを2つの沸騰チップとともに添加した。屈折計を使用して反応固形分を測定した後、D.I.水を使用してビーカー内で反応溶液を希釀することによって、2~4%の澱粉固形分を含有する澱粉溶液を調製した。次の工程前に、固形分を屈折計で検査して、溶液が正しく調製されていることを確認した。澱粉溶液を含有するビーカーを秤量し、質量を記録した。調製したフェーリング溶液を含むエルレンマイヤーフラスコ中に、15 gの澱粉溶液を添加した。それらを攪拌しながらホットプレート上で2分間沸騰させた後、青がかかった色合いが通常出現した。青がかかった色合いが消失し、独特な赤みがかかった酸化第一銅が形成するまで、澱粉溶液をビーカーからピペットで徐々に添加した。澱粉溶液をプラスチックピペットで連続的に攪拌して、溶液を均一に維持した。赤みがかかった終点に到達したとき、澱粉溶液を含有するビーカーを再び秤量して、消費した澱粉の質量を測定した。下記の方程式から、DEを計算することができる：

【0055】

DE = [フェーリング係数 × 100] / [(必要な澱粉溶液のグラム数) × (澱粉溶液の濃度)]

【0056】

模擬消化 - (Englyst他、「European Journal of Clinical Nutrition」1992、46:S33-S50) - かむように、食品試料を粉碎/細かく切る。粉末状澱粉試料を250ミクロン以下の粒度に篩がけする。500~600 mg ± 0.1 mgの試料を秤量し、試料管に添加する。10 mLのペプシン(0.5%)、グーガム(0.5%)およびHCl(0.05M)の溶液を各管に添加する。

【0057】

プランクおよびグルコース標準の管を調製した。プランクは20 mLの0.25 Mの酢酸ナトリウムおよび0.02%の炭酸カルシウムを含有する緩衝液である。グルコース標準は、10 mLの酢酸ナトリウム緩衝液(前述)および10 mg/mLのグル

10

20

30

40

50

コース溶液を混合することによって調製する。標準は二重反復実験において調製する。

【0058】

酵素混合物は、18 gのブタ臍臍（Sigma P-7545）を120 mlの脱イオン水に添加し、十分に混合し、次いで3000 gにおいて10分間遠心することによって調製する。上清を収集し、48 mgの乾燥インベルターゼ（Sigma I-4504）および0.5 mlのAMG 400（Novo Nordisk）を添加する。

【0059】

試料管を37において30分間前インキュベートし、10 mlの酢酸ナトリウム緩衝液をガラス球／ビー玉（震盪間の試料の物理的破壊を促進するために）と一緒に添加する。

【0060】

5 mlの酵素混合物を試料、プランクおよび標準に添加する。管を37の水浴中でほぼ180回／分で水平に震盪する。時間「ゼロ」は酵素混合物を第1管に最初に添加することを表す。

【0061】

20および120分後、インキュベートしている試料から0.5 mlのアリコートを取り出し、20 mlの66%エタノール（反応を停止するために）の別の管に注入する。1時間後、アリコートを3000 gにおいて10分間遠心する。

【0062】

グルコースオキシダーゼ／ペルオキシダーゼ法（Megazyme Glucose Assay Procedure GLC9/96）に従い、各管におけるグルコース濃度を測定する。これは比色法である。また、この実験を使用する従来の文献に開示されているように、HPLCを使用してグルコースを検出することができる。

【0063】

0.9の変換係数を使用して、グルコース標準に対してグルコース濃度を計算することによって、澱粉消化度を決定する。結果を20および120分後の「消化澱粉%」（乾燥質量基準）として記載する。RS（耐性澱粉）は100% - 120分の値である。

【0064】

すべて試料分析バッチは、調理していないコーンスタークの参照試料を含む。コーンスタークの消化値%の受け入れられている範囲は次の通りである：

【0065】

【表1】

試料	s20	s120	RS
コーンスターク	17.5±2.5	80±5	約37.5

20

30

30

40

<sup>1</sup> Melogel（商標）澱粉、National Starch and Chemical Company（米国ニュージャージー州ブリッジウォーター）から商業的に入手可能である。

【0066】

調理したモデル - モデルを使用して低水分における商業的食品の加工をまねる。モデルは50%の固形分で水中の澱粉を使用し、このペーストをオープン中で190においてほぼ20分間焼く。次いで試料を粉碎し、250ミクロン以下の小さい粒度に篩がける。

【0067】

50

## 実施例 1 - 耐性トウモロコシ澱粉の製造

A. 10 kg のワキシートウモロコシ澱粉を 30 リットルの水中でスラリー化した。このスラリーを十分な水蒸気で 154.4 ~ 157.2 (310 ~ 315 °F) および  $5.52 \times 10^5$  Pa (80 psi) の背圧においてジェット調理した。次いで調理した澱粉を反応がまの中に入れ、55 に冷却した。この溶液の pH を 3:1 の水: HCl の添加により 4.0 に調節した。澱粉の質量に基づいて 0.2% のイソアミラーゼを添加して、枝切り反応を開始した。pH 4.0 および 55 で 24 時間反応させた後、3% NaOH を使用して pH を 6.0 に調整し、試料を 85 に 20 分間加熱して、酵素を変性した。次いで、加熱を停止し、試料を室温に冷却し、一夜結晶化させた (16 時間)。濾過後、試料のケーキが得られ、生成物を空気乾燥した。

10

## 【0068】

B. 4 kg の Amioca (商標) 50 澱粉 (ワキシートウモロコシ澱粉の酸変換物、National Starch and Chemical Company 、米国ニュージャージー州プリッジウォーター、から商業的に入手可能) を 6 リットルの水中でスラリー化した。このスラリーの pH を 3:1 の水: HCl の添加により 4.0 に調節した。次いで試料をジェット調理し、反応容器の中に入れ、温度を 55 に低下させた。0.2% のイソアミラーゼを添加し、反応を 24 時間進行させた。pH を 3:1 の水: HCl の添加により 2.0 に調整し、20 分間保持して酵素を殺した。3% NaOH を使用して pH を 6.0 に中和した。試料を室温に冷却し、一夜結晶化させた (16 時間)。濾過後、試料のケーキが得られ、試料を空気乾燥した。

20

## 【0069】

C. 実施例 1 B の方法を反復したが、ただし澱粉は Flomax Amioca (商標) 5 澱粉 (ワキシートウモロコシ澱粉の酸変換物、National Starch and Chemical Company から商業的に入手可能) であった。

## 【0070】

D. 1.8 kg のワキシートウモロコシ澱粉を 5.4 リットルの水中でスラリー化した。このスラリーを十分な水蒸気で 154.4 ~ 157.2 (310 ~ 315 °F) および  $5.52 \times 10^5$  Pa (80 psi) の背圧においてジェット調理した。一定条件下に、調理した澱粉溶液を固形分 10% に調節し、55 の水浴中の反応容器に入れた。この試料の pH を 3:1 の水: HCl の添加により 4.0 に調節した。乾燥澱粉質量に基づいて 0.2% のイソアミラーゼを添加して枝切り反応を開始し、試料を 55 に維持した。

30

試料の DE が 7.5 に到達した (約 8 時間の反応) 後、pH を 2.0 に 20 分間低下させて酵素を変性し、次いで 3% 水酸化ナトリウムで 6.0 に増加させた。次いで、試料を室温に冷却し、一夜結晶化させた (16 時間)。濾過後、試料のケーキが得られ、試料を空気乾燥した。

## 【0071】

DS C および耐性澱粉含量をこれらの試料について決定した。表 1 に結果を要約する。

## 【0072】

## 【表 2】

40

表1

試料	RS%	DSC			
		T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH (J/g)
1 A	84.9	120.5	127.7	134.3	26.6
1 B	75.2	76.6	110.9	131.8	39.7
1 C	76.6	87.7	111.9	131.8	35.5
1 D	81.9	70.8	97.7	112.1	35.0

10

20

30

40

表2

試料	RS%	DP	DSC			
			T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH (J/g)
2	85.6	17	96.6	112.4	126.7	32.7

## 【0076】

枝切りし、結晶化させた低アミロースジャガイモ試料は、DSCにより70%より高いRSを示し、そして110%より高いピーク温度を有した。

## 【0077】

実施例3 - 耐性澱粉の加工許容性

低水分モデルを使用して、いくつかの枝切り耐性澱粉を加工し、各耐性澱粉を未加工澱粉のそれと比較した。結果を下記表3に示す。

## 【0078】

## 【表4】

表3

試料	加工前のRS%	加工後のRS%
3 A	75.2	81.5
3 B	74.2	81.0
3 C	76.6	79.7

## 【 0 0 7 9 】

表3から理解できるように、本発明の澱粉は耐性澱粉含量が破壊されない点で加工許容性である。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 5/50	A 6 1 P 5/50	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/12	
C 0 8 L 3/00	C 0 8 L 3/00	
// A 6 1 K 31/718	A 6 1 K 31/718	

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ヨン・チェン・シ

アメリカ合衆国, ニュージャージー 08844, ヒルズボロー, テルヒュン レーン 133

(72)発明者 シャオユアン・クイ

アメリカ合衆国, ニュージャージー 08502, ベル ミード, ハットフィールド コート 4

(72)発明者 アン・エム・ビルケット

アメリカ合衆国, ニュージャージー 08876, サマービル, ブルックサイド アベニュー 11  
, アパートメント 7エー

(72)発明者 マイケル・ジー・サッチャー

アメリカ合衆国, ニュージャージー 08807, ブリッジウォーター, コロンビア ドライブ  
8, アパートメント 2エー

F ターム(参考) 4B018 MD34 ME11 MF12

4B023 LE30 LG10 LP20

4C086 EA20 NA06 NA07 ZA70 ZC03 ZC33 ZC35

4C090 AA05 BA24 BB02 BB12 BB32 BB36 BB52 BC01 BD41 CA42

DA23 DA27

4J002 AB04X AB05W

## 【外国語明細書】

## 1. Title of Invention

**Resistant Starch Prepared by Isoamylase Debranching of Low Amylose Starch**

## 2. Detailed Description of the Invention

(Technical Field of the Invention)

~~BACKGROUND OF THE INVENTION~~

The present invention relates to a resistant starch prepared by isoamylase debranching of low amylose starches to form a completely linear short chain  $\alpha$ -glucan composition, and its use.

(Prior Art and Problems to be Solved by the Invention)

Starch, a complex carbohydrate, is composed of two types of polysaccharide molecules, amylose, a mostly linear and flexible polymer of D-anhydroglucose units that are linked by alpha-1,4-D-glucosidic bonds, and amylopectin, a branched polymer of linear chains that are linked by alpha-1,6-D-glucosidic bonds. Starch is digested predominantly in the small intestine by the enzyme alpha-amylase.

It is known that certain starch processing operations result in the transformation of starch into starch that is resistant to enzymatic hydrolysis within the small intestine, known simply as resistant starch. Resistant starch resists digestion and absorption in the small intestine, and passes into the large intestine where it is fermented by colonic microflora to short chain fatty acids, particularly butyrate, and gases.

Research literature indicates that this fermentation of resistant starch by colonic bacteria has numerous beneficial effects and thus would be useful for both food and drug applications.

Resistant starch may be used in foods, including medical foods and dietary supplements, to maintain colonic health and mucosal integrity. Resistant starch is known as a prebiotic. Further, as it is not utilized until it reaches the large intestine where it is fermented to short chain fatty acids, resistant starch has a reduced caloric value. The reduction in available or glycemic carbohydrate in the small intestine has been linked to improved

blood glucose and insulin control, with associated benefits for weight management. Research also indicates that resistant starches may contribute to maintaining a healthy immune system in humans.

Resistant starch may also be used as a drug. It has been linked to a decreased risk for various colonic diseases, including a decreased incidence of cancer. In addition, resistant starch may reduce the risk of the cluster of metabolic disorders associated with Syndrome X including insulin resistance, hyperglycemia, hyperinsulinemia, dyslipidemia, dysfibrinolysis, diabetes, hypertension and cardiovascular disease. It may also be useful for treating obesity.

Resistant starch (RS) has been classified in the literature into four categories depending on the causes of resistance. RS1 is a physically inaccessible starch due to entrapment of granules within a protein matrix or within a plant cell wall. RS2 is a granular starch that resists digestion by pancreatic alpha-amylase. RS3 is a retrograded, nongranular starch or starch food. RS4 is a resistant starch that has linkages other than alpha-1,4- and alpha-1,6-D-glucosidic bonds.

Various methods have been reported for producing the various types of resistant starch. These include US 5,593,503 which describes a method of making a granular resistant starch; and US Patent Nos. 5,281,276 and 5,409,542 which describe methods of making resistant starches of the RS3-type, all from high amylose starches. US 5,855,946 describes a method of making a resistant starch of the RS4-type by crosslinking and phosphorylating starch. US 6,043,229 discloses a partially degraded and retrograded resistant starch.

[Patent document 1]  
USP No. 5,593,503  
[Patent document 2]  
USP No. 5,281,276  
[Patent document 3]  
USP No. 5,409,542  
[Patent document 4]  
USP No. 5,855,946  
[Patent document 5]  
USP No. 6,043,229

#### [Means for Solving the Problems]

Surprisingly, it has now been discovered that completely linear, short chain alpha-1,4-glucans which are highly crystallized result in a starch which is resistant to amylase digestion.

~~SUMMARY OF THE INVENTION~~

This patent pertains to a resistant starch prepared by fully debranching a low amylopectin starch using isoamylase. Such resistant starch is useful in edible products, including nutritional supplements.

Dextrose equivalent, as used herein, is intended to mean the reducing power of the hydrolysate. Each starch molecule has one reducing end; therefore DE is inversely related to molecular weight. The DE of anhydrous D-glucose is defined as 100 and the DE of unhydrolyzed starch is virtually zero.

Fully or completely debranched starch, as used herein, is intended to mean that which theoretically comprises 100%, by weight, of short chain amylose and, in practice, that which is so highly debranched that further enzyme activity produces no measurable change in the percentage of short chain amylose.

As used herein, a prebiotic is intended to mean a resistant starch that beneficially affects the host by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacteria in the colon, and thus improves host health.

As used herein, the term resistant starch is intended to mean the sum of starch and products of starch degradation not absorbed in the small intestine of healthy individuals.

As used herein, the term short chain amylose refers to linear polymers containing from about 5 to 65 anhydroglucose units linked by alpha-1,4-D-glucoside bonds.

~~DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION~~

This patent pertains to a resistant starch prepared by fully debranching a low amylopectin starch using isoamylase. Such resistant starch is useful in edible products, including nutritional supplements.

Starch, as used herein, is intended to include all starches derived from any native source, any of which may be suitable for use herein. A native starch as used herein, is one as it is found in nature. Also suitable are starches derived from a plant obtained by standard breeding techniques including crossbreeding, translocation, inversion, transformation or any other method of gene or chromosome engineering to include variations thereof. In addition, starch derived from a plant grown from artificial mutations and variations of the above generic composition, which may be produced by known standard methods of mutation breeding, are also suitable herein.

Typical sources for the starches are cereals, tubers, roots, legumes and fruits. The native source can be the waxy variety of corn (maize), pea, potato, sweet potato, banana, barley, wheat, rice, oat, sago, amaranth, tapioca, arrowroot, canna, and sorghum, particularly maize, potato, cassava, and rice, more particularly maize or potato, cassava, and rice. As used herein, the term "waxy" or "low amylose" is intended to include a starch containing no more than about 10% by weight amylose. Particularly suitable in the invention are those starches which contain no more than about 5% amylose by weight.

The starch is completely hydrolyzed by isoamylase. The enzymatic hydrolysis of the starch base is carried out using techniques known in the art. The amount of enzyme used is dependent upon the enzyme source and activity and base material used. Typically, the enzyme is used in an amount of from about 0.05 to about 2%, particularly from about 0.1 to about 0.4%, by weight of the starch.

The optimum parameters for enzyme activity will vary depending upon the enzyme used. The rate of enzyme degradation depends upon factors known in the art, including the enzyme concentration, substrate concentration, pH, temperature, the presence or absence of inhibitors, and

the degree and type of modification if any. These parameters may be adjusted to optimize the digestion rate of the starch base.

The starch is gelatinized using techniques known in the art before isoamylase hydrolysis. Techniques known in the art include without limitation those disclosed for example in U.S. Patent Nos. 4,465,702, 5,037,929, 5,131,953, and 5,149,799. Also see, Chapter XXII- "Production and Use of Pregelatinized Starch", Starch: Chemistry and Technology, Vol. III- Industrial Aspects, R.L. Whistler and E.F. Paschall, Editors, Academic Press, New York 1967. The gelatinization process unfolds the starch molecules from the granular structure, thereby permitting the enzyme to more easily and uniformly degrade the starch molecules.

Generally the enzyme treatment is carried out in an aqueous or buffered slurry at a starch solids level of about 10 to about 40%, depending upon the base starch being treated. A solids level of from about 15 to 35% is particularly useful, from about 18 to 30% more particularly useful, in the instant invention. In the alternative, the process may utilize an enzyme immobilized on a solid support.

Typically, enzyme digestion is carried out at the highest solids content feasible without reducing reaction rates in order to facilitate any desired subsequent drying of the starch composition. Reaction rates may be reduced by high solids content as agitation becomes difficult or ineffective and the starch dispersion becomes more difficult to handle.

The pH and temperature of the slurry should be adjusted to provide effective enzyme hydrolysis. These parameters are dependent upon the enzyme to be used and are known in the art. In general, a temperature of about 25 to about 70°C is used, particularly from about 50 to about 60°C. In general, the pH is adjusted to about 3.0 to about 6.0, particularly from about 3.5 to about 4.5, using techniques known in the art.

The enzyme reaction is continued until the starch is completely debranched. In general, the enzyme reaction will take from about 1 to about 24 hours, particularly about 4 to about 12 hours. The time of the reaction is dependent upon the type of starch used, the amount of enzyme used, and the reaction parameters of solids percent, pH, and temperature.

The amount of hydrolysis may be monitored and defined by measuring the concentration of reducing groups which are freed by alpha-1,6-D-glucanohydrolase activity by methods well known in the art. Other techniques such as monitoring the change in viscosity, iodine reaction, or the change in molecular weight may be used to define the reaction end point. When the starch is completely debranched, the monitored measurement will no longer change. Typically, the starch will be completely debranched when it has been at least about 95%, more particularly at least about 98%, most particularly at least about 99% debranched by weight. The debranched starch will typically have an average chain length of 14-25 glucose units and less than about 0.2%, particularly less than about 0.1% alpha-1,6-D-glucosidic bonds (linkages).

Optionally, the enzyme may be deactivated (denatured) by any technique known in the art such as heat, acid or base deactivation. For example, acid deactivation may be accomplished by adjusting the pH to lower than 3.0 for at least 30 minutes or heat deactivation may be accomplished by raising the temperature to from about 80 to about 90°C and maintaining it at that temperature for at least about 20 minutes to fully deactivate the enzyme.

The starches may be converted either prior to or after isoamylase debranching, and is intended to include fluidity or thin-boiling starches prepared by oxidation, acid hydrolysis, heat and or acid dextrinization. These processes are well known in the art.

The starch may be further modified, either before or after the enzymatic hydrolysis. Such modification may be physical, enzymatic, or

chemical. Physical modification includes by shearing or thermal inhibition, for example by the process described in U.S. Patent No. 5,725,676.

The starch may be chemically modified, including without limitation, crosslinked, acetylated and organically esterified, hydroxyethylated and hydroxypropylated, phosphorylated and inorganically esterified, cationic, anionic, nonionic, and zwitterionic, and succinate and substituted succinate derivatives thereof. Such modifications are known in the art, for example in Modified Starches: Properties and Uses, Ed. Wurzburg, CRC Press, Inc., Florida (1986).

Any starch base having suitable properties for use herein may be purified by any method known in the art to remove starch off flavors and colors that are native to the polysaccharide or created during processing. Suitable purification processes for treating starches are disclosed in the family of patents represented by EP 554 818 (Kasica, et al.). Alkali washing techniques are also useful and described in the family of patents represented by U.S. 4,477,480 (Seidel) and 5,187,272 (Bertalan et al.). The debranched starch may also be purified by such methods.

The resultant solution is typically adjusted to the desired pH according to its intended end use. In general, the pH is adjusted to from about 5.0 to about 7.5, particularly from about 6.0 to about 7.0, using techniques known in the art. Further, any short chain amylose which precipitated out of the starch dispersion may be redispersed. If purification of the debranched starch composition is desired, reaction impurities and by-products may be removed by dialysis, filtration, centrifugation or any other method known in the art for isolating and concentrating starch compositions. For example, the degraded starch may be washed using techniques known in the art to remove soluble low molecular weight fractions, such as oligosaccharides, resulting in more highly crystalline starch.

The debranched starch is allowed to crystallize by methods known in the art, for example by allowing the starch to stand and retrograde. The

starch is then recovered using methods known in the art, particularly by filtration or by drying, including spray drying, freeze drying, flash drying or air drying, more particularly by filtration or flash drying. It is important to control the crystallization, typically by controlling retrogradation and drying, in order to obtain the high degree of crystallinity essential to the present invention. It is further important that the method of drying and other post-crystallization processes do not substantially destroy the crystals.

The resultant debranched starch is in the form highly crystalline short chain amylose from the debranched starch and is uniquely functional as a resistant starch. The starch is characterized by a resistant starch content of at least about 70%, particularly at least about 75%, by weight using the methodology described, *infra*.

The starch is also characterized by a peak melting point temperature,  $T_p$ , as measured by DSC using the procedure described *infra*, of at least about 90°C, more particularly at least about 100°C, most particularly at least about 110°C. The starch is also characterized by an enthalpy,  $\Delta H$ , as measured by DSC using the procedure described *infra*, of at least about 25 J/g, particularly at least about 30 J/g. Such DSC values are indicative of the highly crystalline nature of the product.

The debranched starch is further characterized by a dextrose equivalent (DE) of at least about 5.0, more particularly of at least 6.0, most particularly at least about 7.0. However, a lower dextrose equivalent (e.g. a DE of at least about 4.0) may be achieved by altering the processing conditions, particularly by removing the low molecular weight hydrolysis products.

It is process tolerant in that the level of resistance does not significantly decrease during processing, including heat.

The starch is uniquely functional as a resistant starch and may be used in a variety of edible products. Edible products is intended to include,

without limitation: cereal, bars, pizza, pasta, dressings, including pourable dressings and spoonable dressings; pie fillings, including fruit and cream fillings; sauces, including white sauces and dairy-based sauces such as cheese sauces; gravies; lite syrups; puddings; custards; yogurts; sour creams; beverages, including dairy-based beverages; glazes; baked goods, including crackers, breads, muffins, bagels, biscuits, cookies, pie crusts, and cakes; condiments, confectioneries and gums, and soups.

Edible products also is intended to include nutritional and medical foods and beverages, including dietetic or weight loss products, diabetic products, products for sustained energy release such as sports drinks and power bars, meal replacements, and nutritional supplements. Such nutritional products is intended to include dietetic products, diabetic products, and prebiotics.

The present starch may be added in any amount desired or necessary to obtain the functionality of the composition. In general, the starch may be added in an amount of from about 0.01% to about 100%, particularly from about 1 to about 50%, by weight of the composition. The starch may be added to the food or beverage in the same manner as any other starch, typically by mixing directly into the product or adding it in the form of a sol.

#### (Embodiment)

The following embodiments are presented to further exemplify the present invention and should not be taken as limiting in any regard.

*Embodiment 1.* A resistant starch composition prepared by completely debranching a low amylose starch comprising highly crystalline, fully debranched linear  $\alpha$ -glucans, wherein the composition is characterized by

- a) a resistant starch content of at least about 70% by weight;
- b) a dextrose equivalent greater than about 4.0;
- c) a peak melting point temperature,  $T_p$  as measured by DSC, of at least about 90; and

d) an enthalpy,  $\Delta H$  as measured by DSC of at least about 25.

*Embodiment 2.* The composition of embodiment 1, wherein the low amylose starch comprises no more than about 5% amylose by weight.

*Embodiment 3.* The composition of embodiment 1, wherein the dextrose equivalent of the composition is greater than about 5.0.

*Embodiment 4.* The composition of embodiment 1, wherein the dextrose equivalent of the composition is greater than about 6.0.

*Embodiment 5.* The composition of embodiment 1, wherein the resistant starch content of the composition is at least about 75% by weight.

*Embodiment 6.* The composition of embodiment 1, wherein the peak melting point temperature of the composition is at least about 100°C.

*Embodiment 7.* The composition of embodiment 1, wherein the peak melting point temperature of the composition is at least about 110°C.

*Embodiment 8.* The composition of embodiment 1, wherein the enthalpy is at least about 30 J/g.

*Embodiment 9.* The composition of embodiment 1, wherein the low amylose starch is selected from the group consisting of maize, potato, cassava, and rice.

*Embodiment 10.* A method of making the composition of embodiment 1 comprising:

- a) fully debranching a low amylose starch using isoamylase;
- b) allowing the debranched starch to crystallize; and
- c) drying the highly crystalline debranched starch.

*Embodiment 11.* The method of embodiment 10, wherein the low amylose starch comprises at least 95% amylopectin by weight.

*Embodiment 12.* The method of embodiment 10, wherein the dextrose equivalent of the composition is greater than about 5.0.

*Embodiment 13.* The method of embodiment 10, wherein the dextrose equivalent of the composition is greater than about 6.0.

*Embodiment 14.* The method of embodiment 10, wherein the composition contains at least about 75% resistant starch by weight.

*Embodiment 15.* The method of embodiment 10, wherein the peak melting point temperature of the composition is at least about 100°C.

*Embodiment 16.* The method of embodiment 10, wherein the peak melting point temperature of the composition is at least about 110°C.

*Embodiment 17.* The method of embodiment 10, wherein the enthalpy of the composition is at least about 30J/g.

*Embodiment 18.* The method of embodiment 10, wherein the low amylose starch is a maize, potato, cassava, and rice.

*Embodiment 19.* An edible product comprising the composition of embodiment 1.

*Embodiment 20.* The edible product of embodiment 19, wherein the product is a prebiotic supplement.

*Embodiment 21.* The composition of embodiment 1 or 2, wherein the dextrose equivalent of the composition is greater than about 5.0.

*Embodiment 22.* The composition of embodiment 21, wherein the dextrose equivalent of the composition is greater than about 6.0.

*Embodiment 23.* The composition of any one of embodiment 1-4 or 21-22, wherein the resistant starch content of the composition is at least about 75% by weight.

*Embodiment 24.* The composition of any one of embodiments 1-5 or 21-23, wherein the peak melting point temperature of the composition is at least about 100°C.

*Embodiment 25.* The composition of embodiment 24, wherein the peak melting point temperature of the composition is at least about 110°C.

*Embodiment 26.* The composition of any one of embodiments 1-7 or 21-25, wherein the enthalpy is at least about 30 J/g.

*Embodiment 27.* The composition of any one of embodiments 1-8 or 21-26, wherein the low amylose starch is selected from the group consisting of maize, potato, cassava, and rice.

*Embodiment 28.* A method of making the composition of any one of claims 1-9 or 21-27 comprising:

- a) fully debranching a low amylose starch using isoamylase;
- b) allowing the debranched starch to crystallize; and
- c) drying the highly crystalline debranched starch.

*Embodiment 29.* The method of embodiment 28, wherein the low amylose starch comprises at least 95% amylopectin by weight.

*Embodiment 30.* An edible product comprising the composition of any one of embodiments 1-9 or 21-27.

*Embodiment 31.* The edible product of embodiment 30, wherein the product is a prebiotic supplement.

## EXAMPLES

The following examples are presented to further illustrate and explain the present invention and should not be taken as limiting in any regard. All percents used are on a weight/weight basis.

The following test procedures are used throughout the examples:

Differential scanning calorimetry - Differential scanning calorimetry measurements were performed in a Perkin-Elmer DSC-7 (Norwalk, CT, USA). The instrument was calibrated with indium. Samples of approximately 10mg starch at a starch:water ratio of 1:3 are prepared and heated at 10°C/min from 5°C to 160°C. An empty stainless steel pan is used as a reference.

Chain Length and Linearity - The debranched starch samples were analyzed using NMR to determine the average chain length and alpha-1,4

to alpha-1,6 linkage ratios. The NMR samples were prepared by suspending 5-6 mg of the starch in 2.5 mL of D<sub>2</sub>O/TSP (sodium trimethyl silyl propionate) and pressure cooking the suspensions for approximately 1 hour. The resulting clear solutions were transferred to 5mm NMR tubes and kept hot on a steam bath until the NMR spectra were acquired. This procedure for the handling of the samples insured that the crystalline starch material remained in solution. The proton NMR spectra were acquired at 90°C on a Bruker DPX-400 spectrometer at 400 MHz.

The chemical shift assignments (relative to TSP at 90°C) for the resonance of interest were as follows. The alpha-1,4 mid-chain linkages had a chemical shift of 5.38 ppm, the alpha-1,6 mid-chain (branch points) at 4.96 ppm, the alpha-form of the reducing end groups at 5.23 ppm, and the beta-form of the reducing end groups at 4.65 ppm.

The average chain length for the starch samples was calculated from the ratio of the reducing end groups to the mid-chain resonance. The percentage of alpha-1,6 linkages (branch points) were calculated from the amount of alpha-1,6 linkages versus alpha-1,4 linkages.

Dextrose Equivalent (DE) - For in-process DE measurement, the Fehling Volumetric Titration Method was used. A 500 ml Erlenmeyer flask was rinsed with deionized (D.I.) water. 50 ml of D.I. water was then added. The addition of 5 ml each of Fehling Solutions A and B, and 2 drops of methylene blue with two boiling chips followed. After determination of the reaction solids using a Refractometer, a starch solution containing 2-4 percent starch solids was prepared using D.I. water by diluting the reaction solution in a beaker. Before proceeding to the next step, the solids were checked by a Refractometer to make sure the solution was prepared correctly. The beaker with starch solution was weighed and the weight recorded. 15 grams of the starch solution was added into the Erlenmeyer flask with prepared Fehlings solution. After they were boiled under agitation

for 2 minutes on a hot plate, a bluish tint normally appeared. Starch solution from the beaker was added using a pipette gradually until the bluish tint disappeared and a distinctive reddish cuprous oxide formed. The starch solution was continuously stirred with a plastic pipette to keep the solution uniform. When the reddish endpoint was reached, the beaker containing starch solution was weighed again to determine the weight of starch consumed. The calculation of D.E. can be seen from following equation:

$$D.E. = \frac{[\text{Fehling factor} \times 100]}{[(\text{grams required from starch solution}) \times (\text{conc. of starch solution})]}$$

Simulated Digestion - (Englyst et al, European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46,S33-S50) - Food samples are ground/minced as if masticated. Powder starch samples are screened to a particle size of 250 microns or less. A 500-600 mg  $\pm$  0.1 mg of sample is weighed and added to the sample tube. 10 ml of a pepsin (0.5%), guar gum (0.5%), and HCl (0.05 M) solution is added to each tube.

Blank and glucose standard tubes are prepared. The blank is 20 ml of a buffer containing 0.25 M sodium acetate and 0.02% calcium chloride. Glucose standards are prepared by mixing 10 ml sodium acetate buffer (described above) and 10ml of 50 mg/ml glucose solution. Standards are prepared in duplicate.

The enzyme mix is prepared by adding 18 g of porcine pancreatin (Sigma P-7545) to 120 ml of deionized water, mixing well, then centrifuging at 3000g for 10 minutes. The supernatant is collected and 48mg of dry invertase (Sigma I-4504) and 0.5 ml AMG 400 (Novo Nordisk) are added.

The sample tubes are pre-incubated at 37°C for 30 min, then removed from the bath and 10 ml of sodium acetate buffer is added along

with glass balls/marbles (to aid in physical breakdown of the sample during shaking).

5 ml of enzyme mixture is added to the samples, blank, and standards. The tubes are shaken horizontally in a 37°C waterbath at approximately 180 strokes/min. Time "zero" represents the first addition of the enzyme mixture to the first tube.

After 20 and 120 minutes, 0.5-ml aliquots are removed from the incubating samples and placed into a separate tube of 20ml 66% ethanol (to stop the reaction). After 1 hour, an aliquot is centrifuged at 3000g for 10 minutes.

The glucose concentration in each tube is measured using the glucose oxidase/peroxidase method (*Megazyme Glucose Assay Procedure GLC9/96*). This is a colorimetric procedure. HPLC may also be used to detect glucose as disclosed in previous literature using this experiment.

The degree of starch digestion is determined by calculating the glucose concentration against the glucose standards, using a conversion factor of 0.9. Results are given as "% starch digested" (dry weight basis) after 20 and 120 minutes. RS (resistant starch) is 100% minus the 120 minute value.

Every sample analysis batch includes a reference sample of uncooked cornstarch. The accepted range of % digestion values for cornstarch are:

Sample	s20	s120	RS
Cornstarch <sup>1</sup>	17.5 ± 2.5	80 ± 5	approx. 37.5

<sup>1</sup>Melogel® starch, commercially available from National Starch and Chemical Company, Bridgewater, NJ, USA.

Cooked models – A model is used to mimic commercial food processing at low moisture. The model uses starch in water at 50% solids and bakes

the paste in an oven at 190°C for approximately 20 minutes. The sample is then ground and screened to a particle size of 250 microns or less.

Example 1 – Preparation of Resistant Corn Starch

A. 10 kg of waxy maize starch was slurried in 30 liters of water. The slurry was jet-cooked with full steam at 310-315°F (154.4-157.2°C) and 80 psi ( $5.52 \times 10^5$  Pa) back-pressure. The cooked starch was then put into a reaction kettle and cooled to 55°C. The pH of the solution was adjusted to 4.0 by adding 3:1 water:HCl. 0.2% isoamylase based on starch weight was added to start the debranching reaction. After 24 hour's reaction at pH 4.0 and 55°C, the pH was adjusted to 6.0 using 3% NaOH, and the sample was heated to 85°C for 20 minutes to denature the enzyme. Then, the heat was shut off, and the sample was cooled to room temperature and crystallized overnight (16 hours). A sample cake was obtained following filtration and the product was air-dried.

B. 4 kg of Amioca™ 50 starch (acid converted waxy maize starch commercially available from National Starch and Chemical Company, Bridgewater, NJ, USA) was slurried in 6 liters of water. The slurry pH was adjusted to 4.0 by adding 3:1 water:HCl. The sample was then jet-cooked and placed in a reaction container and the temperature was cooled to 55°C. 0.2% isoamylase was added and the reaction was allowed to proceed for 24 hours. The pH was adjusted to 2.0 by adding 3:1 water:HCl and held for 30 minutes to kill the enzyme. The pH was neutralized to 6.0 using 3% NaOH. The sample was cooled to room temperature and crystallized overnight (16 hours). A sample cake was obtained by filtration and the sample was air-dried.

C. The method of Example 1B was repeated with the exception that the starch was FloMax™ 5 starch (acid converted waxy maize starch commercially available from National Starch and Chemical Company).

D. 1.8 kg of waxy maize starch was slurried in 5.4 liters of water. The slurry was jet-cooked with full steam at 310-315°F (154.4-157.2°C) and 80 psi ( $5.52 \times 10^5$  Pa) back-pressure. Under constant agitation, the cooked starch solution was diluted to 10% solids and put into a reaction container in a 55°C waterbath. The sample pH was adjusted to 4.0 by adding 3:1 water:HCl. 0.2% isoamylase based on the dry starch weight was added to start the debranching reaction, maintaining the sample temperature at 55°C. After the sample DE reached 7.5 (about 8 hours reaction), pH was dropped to 2.0 for 30 minutes to denature the enzyme, and then increased to 6.0 using 3% sodium hydroxide. The sample was then cooled to room temperature and crystallized overnight (16 hours). A sample cake was obtained by filtration and the sample was air-dried.

DSC and resistant starch content were obtained for these samples. Table 1 summarizes the results.

**Table 1:**

Sample	RS%	DSC			
		To(°C)	Tp(°C)	Tc(°C)	ΔH (J/g)
1A	84.9	120.5	127.7	134.3	26.6
1B	75.2	76.6	110.9	131.8	39.7
1C	76.6	87.7	111.9	131.8	35.5
1D	81.9	70.8	97.7	112.1	35.0

All samples showed more than 70% RS. All samples have higher than 110°C peak temperature by DSC.

**Example 2 – Preparation of Resistant Potato Starch**

Three kilograms of low amylose potato starch (commercially available from Lyckeby in Germany) was slurried in 9 liters of water and the

sample was jet-cooked with full steam. The cooked starch solution was cooled to 55°C and the pH was adjusted to 4.0 using 3:1 water:HCl. 0.2% isoamylase based on starch weight was added to start the debranching reaction. After 24 hours reaction time, the sample pH was increased to 5.5 with 3% NaOH, and heated to 85°C in a boiling water bath for 20 minutes to denature the enzyme. The sample was cooled to room temperature overnight (16 hours) to crystallize the product. A sample cake was obtained by filtration and the sample was air-dried. Table 2 summarizes the resistant starch content and DSC results.

**Table 2:**

Sample	RS%	DP	DSC			
			T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH (J/g)
2	85.6	17	96.6	112.4	126.7	32.7

The debranched and crystallized low amylose potato sample showed more than 70% RS and had a peak temperature of greater than 110°C by DSC.

#### Example 3 – Process Tolerance of Resistant Starch

Several of the debranched resistant starches were processed using the low moisture model and the resistant starch of each is shown compared to that of the unprocessed starch. The results are shown in Table 3, below.

**Table 3**

Sample	%RS pre-processing	%RS post-processing
3A	75.2	81.5
3B	74.2	81.0
3C	76.6	79.7

As can be seen from Table 3, the starches of the present invention are process tolerant in that the resistant starch content is not destroyed.

### 3. Claims

~~CLAIMS~~

~~We claim:~~

1. A resistant starch composition prepared by completely debranching a low amylose starch comprising highly crystalline, fully debranched linear  $\alpha$ -glucans, wherein the composition is characterized by
  - a) a resistant starch content of at least about 70% by weight;
  - b) a dextrose equivalent greater than about 4.0;
  - c) a peak melting point temperature,  $T_p$  as measured by DSC, of at least about 90; and
  - d) an enthalpy,  $\Delta H$  as measured by DSC of at least about 25.
2. A method of making the composition of claim 1 comprising:
  - a) fully debranching a low amylose starch using isoamylase;
  - b) allowing the debranched starch to crystallize; and
  - c) drying the highly crystalline debranched starch.
3. An edible product comprising the composition of claim 1.
4. The edible product of claim 3, wherein the product is a prebiotic supplement.

## 1. Abstract

### ~~ABSTRACT~~

This patent pertains to a resistant starch prepared by fully debranching a low amylose starch using isoamylase. Such resistant starch is useful in edible products, including nutritional supplements.

## 2. Representative Drawing

None