(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-502579
(P2024-502579A)
(43)公表日　令和6年1月22日(2024.1.22)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C08B	*31/00 (2006.01)*	C08B	31/00		4B018
A23L	*33/125 (2016.01)*	A23L	33/125		4B117
A23L	*2/52 (2006.01)*	A23L	2/52		4C090
		A23L	2/00	F	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全34頁）

(21)出願番号　特願2023-540551(P2023-540551)
(86)(22)出願日　令和3年12月28日(2021.12.28)
(85)翻訳文提出日　令和5年6月30日(2023.6.30)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/025518
(87)国際公開番号　WO2022/148523
(87)国際公開日　令和4年7月14日(2022.7.14)
(31)優先権主張番号　202110019000.6
(32)優先日　令和3年1月7日(2021.1.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(31)優先権主張番号　21305019.8
(32)優先日　令和3年1月8日(2021.1.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　591169401
ロケット フレール
ＲＯＱＵＥＴＴＥ　ＦＲＥＲＥＳ
フランス国、エフ－６２１３６　レスト
ロン、リュ・デ・ラ・オート・ロジュ　１
(74)代理人　100090398
弁理士　大渕 美千栄
(74)代理人　100090387
弁理士　布施 行夫
(72)発明者　ポーラ，　バーナード
フランス　５９１９０　アズブルック　リュ
ドゥ　ラ　ガール　１，　レジデンス　ラ　ポ
ステ　アパートメント　２０
(72)発明者　ハシム，　ジョバン
フランス　６２４００　オー－ド－フラン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　遅消化性分岐デンプン加水分解物の製造方法及びその使用

(57)【要約】
本発明は、遅消化性分岐デンプン加水分解物を含む組成物、上記組成物を製造するための方法、及び特に食品産業におけるその使用に関する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
分岐デンプン加水分解物を含む組成物を調製するための方法であって、デンプン加水分解物を含む組成物を、酵素活性単位比が９：５～１：２０、有利には９：５～１：１０、好ましくは１０：６～１：２、更により好ましくは約３：２～１：１である、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物とともにインキュベートする工程を含む、方法。
【請求項２】
前記デンプン加水分解物を含む組成物が、タピオカ、ワキシータピオカ、メイズ、ワキシーメイズ、米、もち米、コムギ、ワキシーコムギ、オオムギ、ワキシーオオムギ、ソルガム、ワキシーソルガム、ジャガイモ、ワキシージャガイモ、サツマイモ、ワキシーサツマイモ、サゴ、キビ、ヤエナリ、エンドウマメ、ファバ豆、ヒヨコマメ、クズウコン、ソバ、キノア、レンコン、好ましくはタピオカ、ワキシーメイズ、又はエンドウマメから選択されるデンプンから得られる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記デンプン加水分解物を含む組成物が、前記デンプン源を、熱安定性α－アミラーゼなどの１つ又は複数のアミラーゼとともにインキュベートすることによって得られる、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記デンプン加水分解物のＤＥが、１～３０、好ましくは５～２０、更により好ましくは８～１５である、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記デンプン加水分解物の遊離マルトース含有量が、１５重量％未満、好ましくは１０重量％未満、更により好ましくは５重量％未満である、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
インキュベーション前の前記デンプン加水分解物を含む組成物の粘度が、２５℃において５０％固形分で５０００ｃＰ未満、より好ましくは２０００ｃＰ未満である、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記マルトース生成アミラーゼが、麦芽生成α－アミラーゼ及び麦芽生成β－アミラーゼ、好ましくはβ－アミラーゼ、更により好ましくはコムギβ－アミラーゼからなる群から選択される、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記デンプン加水分解物を含む組成物を、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物とともにインキュベートする前記工程が、４０℃～７０℃、好ましくは５０℃～６０℃、更により好ましくは約５５℃に含まれる温度で実施される、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記デンプン加水分解物を含む組成物を、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物とともにインキュベートする前記工程が、１～７２時間、好ましくは２～２４時間、更により好ましくは４～８時間に含まれる期間にわたって実施される、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記デンプン加水分解物を含む組成物が、全組成物の３０重量％～７０重量％、好ましくは全組成物の４０重量％～６０重量％、更により好ましくは全組成物の４５重量％～５５重量％に含まれる固形分を有する、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記デンプン加水分解物を含む組成物を、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物とともにインキュベートする前記工程が、４～８、好ましくは４

．５～７、更により好ましくは５～６．５に含まれるｐＨ値で実施される、請求項１～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記トランスグルコシダーゼが、Ｄ－グルコシルトランスフェラーゼである、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
遊離マルトースの濃度が、インキュベーション中にモニターされ、前記組成物の好ましくは１２重量％未満、好ましくは８重量％未満、更により好ましくは５重量％未満である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる分岐デンプン加水分解物を含む組成物。
【請求項１５】
分岐デンプン加水分解物を含む組成物であって、
ａ）１０～５０、好ましくは１２～３０、更に好ましくは１５～２５のＤＥ値を有し、
ｂ）少なくとも７％、好ましくは少なくとも８％、少なくとも９％、少なくとも１０％、少なくとも１１％、少なくとも１２％、少なくとも１３％、少なくとも１４％、少なくとも１５％、少なくとも１６％、少なくとも１７％、少なくとも１８％、少なくとも１９％、好ましくは少なくとも２０％、少なくとも２１％、少なくとも２２％、少なくとも２３％、少なくとも２４％、少なくとも２５％、更により好ましくは少なくとも３０％のα－１，６結合のパーセンテージを有し、
ｃ）少なくとも３０重量％、好ましくは少なくとも３５％、好ましくは少なくとも４０重量％、更により好ましくは少なくとも４３重量％の、１０以上のＤＰを有する前記分岐デンプン加水分解物の分岐を含む、組成物。
【請求項１６】
請求項１４又は１５に記載の組成物を含む食料製品であって、糖尿病食及び代替食、エナジージェル、固形飲料、並びにスポーツ飲料などのための食料製品。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、遅消化性分岐デンプン加水分解物を含む組成物、上記組成物を製造するための方法、及び特に食品産業におけるその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
炭水化物は、ヒト及び動物の食物における主要なエネルギー源であり、バランスのとれた健康食の重要な構成要素である。
【０００３】
それらの中で、デンプンは、ヒトの栄養における重要な成分に相当する。デンプンは、エネルギー保存としてほとんどの緑色植物によって産生される多糖である。それは、ヒトの食事において最も一般的な炭水化物であり、ジャガイモ、メイズ（コーン）、米、コムギ、及びキャッサバなどの主食中に大量に含有される。
【０００４】
デンプンは、アミロース及びアミロペクチン分子から構成される複合炭水化物である。
【０００５】
アミロースは、いくつかの分岐を有するα－１，４グリコシド結合を介して互いに結合したα－Ｄ－グルコース単位からなる多糖である。それは、通常のデンプンの約２０～３０％を構成するが、その比は、デンプンの植物起源及び植物遺伝子上の変異に応じて０％～９９％と異なる。
【０００６】
アミロペクチンは、α－１，４グリコシド結合で直鎖状に結合したα－グルコース単位

の高度に分岐したポリマーである。分岐は、α－１，６結合で起こり、これは全グリコシド結合の約４～５％である。

【０００７】

栄養の観点から、デンプンは、３つの栄養画分：急速消化性デンプン（rapidly digestible starch、ＲＤＳ）、遅消化性デンプン（slowly digestible starch、ＳＤＳ）、及び難消化性デンプン（resistant starch、ＲＳ）に分類することができる。ＳＤＳを含有する食品は、低いグリセミック指数（glycemic index、ＧＩ）を有し、長時間持続するグルコース放出を提供すると考えられているので、ＳＤＳは、最近関心を集めている。これは、糖尿病患者又は前糖尿病患者など、血流中へのグルコース放出速度を制御することを望む個人にとって特に有用である。それはまた、高インスリン血症誘導性低血糖及び空腹感を予防するため、並びに１日を通して認知機能を改善するために使用され得る。

【０００８】

ＳＤＳの量は、一般的にＥｎｇｌｙｓｔ ｅｔ ａｌ．によって開発され、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ，ｖｏｌｕｍｅ ４６，ｐｐ．Ｓ３３－Ｓ５０に１９９２年に発表されたインビトロ方法を使用して決定される。

【０００９】

当該技術分野において、分岐密度を増加させることによって、すなわち、α－１，６グリコシド結合の数を増加させることによって、デンプン系組成物中のＳＤＳの量を増加させる試みがなされてきた。人体におけるデンプン消化のための２つの主要な酵素は、α－アミラーゼ及びグルコアミラーゼである。α－１，６グリコシド結合は、α－アミラーゼによって加水分解され得ず、加えて、分岐点は、デンプン基質のα－アミラーゼへの結合を妨げる。グルコアミラーゼは、α－１，６グリコシド結合を加水分解することができるが、それは、エキソ酵素であり、その加水分解速度は、細胞内酵素であるα－アミラーゼよりも遅い。したがって、α－１，６グリコシド結合の数が多いほど、デンプンの消化速度を低下させることができる。

【００１０】

Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．（ＰＬＯＳＯｎｅ，２０１３，８（４），ｅ５９７４５，「Ｅｎｚｙｍｅ－Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｄ Ｈｉｇｈｌｙ Ｂｒａｎｃｈｅｄ Ｍａｌｔｏｄｅｘｔｒｉｎｓ Ｈａｖｅ Ｓｌｏｗ Ｇｌｕｃｏｓｅ Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ａｔ ｔｈｅ Ｍｕｃｏｓａｌ α－Ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅ Ｌｅｖｅｌ ａｎｄ Ａｒｅ Ｓｌｏｗｌｙ Ｄｉｇｅｓｔｉｂｌｅ Ｉｎ Ｖｉｖｏ」）は、ワキシーコーンスターチに対するデンプン分岐酵素及びβ－アミラーゼの連続的作用を記載している。透析を使用して、小糖類及びオリゴ糖を除去した。

【００１１】

Ｓｈｉ ｅｔ ａｌ．（Ｆｏｏｄ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２０１４，１６４，ｐｐ ３１７－３２３「Ｐｅａ ｓｔａｒｃｈ（Ｐｉｓｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ Ｌ．）ｗｉｔｈ Ｓｌｏｗ Ｄｉｇｅｓｔｉｏｎ Ｐｒｏｐｅｒｔｙ Ｐｒｏｄｕｃｅｄ Ｕｓｉｎｇ β－Ａｍｙｌａｓｅ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅ」）は、トランスグルコシダーゼあり又はなしのβ－アミラーゼによるエンドウマメデンプンの処理を記載している。エタノール沈殿を使用して、小糖類及びオリゴ糖を除去した。

【００１２】

両方の紙において、より遅い消化特性が得られた。しかしながら、出発物質がデンプンであったので、これらの論文に記載されている方法は、デンプンの高粘度が十分な固形分での組成物の使用を妨げるので、工業プロセスへのスケールアップには費用効率が高くない。加えて、高い含水量は、酵素によるデンプンの高い加水分解反応をもたらし、低い生成物収率をもたらす。

【００１３】

特許文献ＵＳ２０１１／００２０４９６（Ａ１）には、β－アミラーゼなどのマルトー

ス生成アミラーゼとトランスグルコシダーゼとを、それぞれ２：１～４４：１の酵素単位比でデキストリン水溶液に作用させることによって分岐デキストリンを製造するための方法が記載されている。高い量／比のβ－アミラーゼ（６．３Ｕ／ｇの最適濃度を有する１１．９Ｕ／ｇ基質まで）は、デキストリンの外側α－１，４結合を加水分解し、α－１，４結合の数を減少させ、したがって分岐度を増加させることを意図した。しかしながら、インビトロ消化結果に基づくと、２時間の消化後に分岐デキストリンと対照デキストリン（基質）との間で放出されたグルコースの減少は１５％未満しかなかった。加えて、それらのトランスグルコシダーゼの量は、効果的な分岐反応のためには少なすぎる可能性があり、それらの高い量／比のβ－アミラーゼは、高い量の遊離マルトースを生成する可能性がある。

【００１４】

したがって、先行技術文献のいずれも、１～３の重合度（degree of polymerization、ＤＰ）を有する最小量の糖（又は高収率の分岐デンプン加水分解物）を含有する分岐遅消化性デンプン加水分解物の組成物を調製するための大規模な方法を提供していない。当該技術分野において、満腹感、持久力トレーニング、及び認知機能を延長するためのグルコースの徐放の必要性が依然として存在する。

【００１５】

したがって、本出願人は、その名誉のために、そのような組成物及びその製造方法を開発し、以下でより詳細に開示する。

【発明の概要】

【００１６】

本発明は、分岐デンプン加水分解物を含む組成物を調製するための方法であって、デンプン加水分解物を含む組成物を、単位比が９：５～１：２０、有利には９：５～１：１０、好ましくは１０：６～１：２、更により好ましくは約３：２～１：１である、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物とともにインキュベートする工程を含む、方法に関する。

【００１７】

本発明はまた、上記で定義した方法によって得ることができる分岐デンプン加水分解物を含む組成物に関する。

【００１８】

本発明は、分岐デンプン加水分解物を含む組成物であって、

ａ）１０～５０、好ましくは１２～３０、更に好ましくは１５～２５のＤＥ値を有し、

ｂ）少なくとも７％、好ましくは少なくとも８％、少なくとも９％、少なくとも１０％、少なくとも１１％、少なくとも１２％、少なくとも１３％、少なくとも１４％、少なくとも１５％、少なくとも１６％、少なくとも１７％、少なくとも１８％、少なくとも１９％、好ましくは少なくとも２０％、少なくとも２１％、少なくとも２２％、少なくとも２３％、少なくとも２４％、少なくとも２５％、更により好ましくは少なくとも３０％のα－１，６結合のパーセンテージを有し、

ｃ）少なくとも３０重量％、好ましくは少なくとも３５％、好ましくは少なくとも４０重量％、更により好ましくは少なくとも４３重量％の、１０以上のＤＰを有する分岐デンプン加水分解物の分岐を含む、組成物に更に関する。

【００１９】

本発明の別の目的は、食品配合物における、上記で定義した分岐デンプン加水分解物を含む組成物の使用である。

【００２０】

本発明はまた、上記で定義した分岐デンプン加水分解物を含む組成物を含有する食品配合物を提供する。

【００２１】

本発明はまた、単位比が９：５～１：２０、有利には９：５～１：１０、好ましくは１０：６～１：２、更により好ましくは約３：２～１：１である、マルトース生成アミラー

ゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物を含む、分岐デンプン加水分解物の組成物を調製するためのキットに関する。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１】Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ．の方法に従った未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのインビトロ消化曲線を示す。

【図２】未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンからの全分子サイズ及び鎖長分布の結果を示す。

【図３】未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンからの全分子サイズ及び鎖長分布の結果を示す。

【図４】シグナルの積分を示す。

【図５】分岐度とＲＤＳ含有量との相関を示す。

【発明を実施するための形態】

【００２３】

本発明の第１の目的は、分岐デンプン加水分解物を含む組成物を調製するための方法であって、デンプン加水分解物を含む組成物を、酵素活性単位比が９：５～１：２０、有利には９：５～１：１０、好ましくは１０：６～１：２、更により好ましくは約３：２～１：１である、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物とともにインキュベートする工程を含む、方法に関する。

【００２４】

本発明者らは、驚くべきことに、遅消化率若しくは低消化率、高溶解性、低粘度、良好な低温安定性、及び／又は少ないか若しくは全くない食物繊維を有する分岐デンプン加水分解物の大規模製造方法を実施することが可能であることを示した。

【００２５】

本発明者らは、β－アミラーゼとトランスグルコシダーゼとの間の特定の比を使用して、デンプン加水分解物を含む組成物を処理し、デンプン加水分解物中の分岐度を増加させ、それによって上記組成物の消化率を低下及び／又は遅延させることができることを示した。

【００２６】

本明細書で使用される場合、「分岐」という用語は、総グリコシド結合に対するα－１，６グリコシド結合のパーセンテージによって示される分岐度を指し、天然デンプン分子におけるものよりも高い（約４～５％）。

【００２７】

理論に束縛されるものではないが、酵素間の特定の比は、マルトースとマルトデキストリンとの間の分岐反応に有利に働くと考えられる。特に、少量のβ－アミラーゼは、少量の遊離マルトースが酵素的分岐プロセスを通して生成されることをもたらし、それによって、２つのマルトース分子間のトランスグルコシダーゼ反応を減少させ、イソマルトース、パノース、及び他のイソマルトオリゴ糖（isomaltooligosaccharide、ＩＭＯＳ）副生成物の量を減少させる。

【００２８】

高い固形分はまた、他の酵素反応（加水分解など）よりもトランスグルコシダーゼの分岐反応に有利であり、より少ない望ましくない生成物を有する分岐デンプン加水分解物のより効率的な生成をもたらす。

【００２９】

有利なことに、本発明の方法は、少量のＤＰ１～３の糖の産生をもたらす。これらの望ましくない副生成物を除去するためには、エタノール沈殿、膜濾過、透析、及びクロマトグラフィー分離などの追加の分子分離工程は必要とされず、組成物をそのまま使用することができる。しかしながら、これらの少量の糖は、上述の方法によって除去することができる。

【００３０】

本発明の目的のために、「食料製品」は、動物又はヒトによって摂取され得る配合物又は組成物を意味することが意図される。食料製品の例としては、ヒトの摂取用、動物飼料用、及び飲料用の食料品が挙げられる。

【００３１】

本発明において、「デンプン加水分解物」という用語は、豆類、穀類、又は塊茎類からのデンプンの酵素的又は酸、好ましくは酵素的加水分解によって得られる任意の生成物を指す。様々な加水分解プロセスが知られており、Ｋｉｒｋ－Ｏｔｈｍｅｒによる書籍Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、第３版、第２２巻、１９７８年の５１１頁及び５１２頁に一般的に記載されている。これらの加水分解生成物はまた、α－１，４グリコシド結合によって本質的に結合されたＤ－グルコースポリマーから構成される分子の精製及び濃縮混合物として定義される。これらの分子は、α－１，６グリコシド結合によって形成された約４～５％の分岐点を有し、広範囲の分子量を有し、水に完全に可溶性である。デンプン加水分解物は、非常によく知られており、Ｋｉｒｋ－ＯｔｈｍｅｒによるＥｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、第３版、２２巻、１９７８年、４９９～５２１頁に完全に記載されている。

【００３２】

好ましい実施形態では、本発明のデンプン加水分解物は、デンプンの酸処理によって得られない。

【００３３】

一実施形態では、本発明に有用なデンプン加水分解物は、デンプンをα－アミラーゼで酵素的処理することによって得られる。

【００３４】

したがって、本発明において、デンプン加水分解生成物は、デンプン、ゼラチン化デンプン、マルトデキストリン、グルコースシロップ、マルトース、及びそれらの任意の混合物から選択される。

【００３５】

デンプン加水分解生成物間の区別は、主に、「デキストロース当量」又はＤＥの概念によって慣習的に表される、それらの還元力の測定に基づく。ＤＥは、生成物の乾燥物１００ｇ当たりのデキストロース当量で表される還元糖の量に相当する。したがって、ＤＥは、デンプン加水分解の強度を測定する。なぜなら、生成物がより大きな程度まで加水分解されるからであり、それが含有する小分子（例えば、デキストロース及びマルトースなど）が多いほど、そのＤＥ値は高くなる。反対に、生成物がより大きな分子（多糖類）を含有するほど、そのＤＥ値は低くなる。

【００３６】

規制の観点から、また本発明の意味の範囲内で、マルトデキストリンは、１～２０のＤＥを有し、グルコースシロップは、２０を超えるＤＥを有する。

【００３７】

そのような生成物は、例えば、本出願人によってＧＬＵＣＩＤＥＸ（登録商標）（マルトデキストリンについては利用可能なＤＥ＝１、２、６、９、１２、１７、１９、グルコースシロップについてはＤＥ＝２１、２９、３３、３８、３９、４０、４７）の名称で販売されているマルトデキストリン及び脱水グルコースシロップである。本出願人によって「Ｒｏｑｕｅｔｔｅグルコースシロップ」の名称で販売されているグルコースシロップも挙げることができる。

【００３８】

一実施形態では、デンプン加水分解物を含む組成物は、タピオカ、ワキシータピオカ、メイズ、ワキシーメイズ、米、もち米、コムギ、ワキシーコムギ、オオムギ、ワキシーオオムギ、ソルガム、ワキシーソルガム、ジャガイモ、ワキシージャガイモ、サツマイモ、ワキシーサツマイモ、サゴ、キビ、ヤエナリ、エンドウマメ、ファバ豆、ヒヨコマメ、クズウコン、ソバ、キノア、レンコン、好ましくはタピオカ、ワキシーメイズ、又はエンド

ウマメから選択されるデンプンから得られる。

【００３９】

好ましい実施形態では、上記デンプンは、タピオカデンプンである。

【００４０】

好ましい実施形態では、デンプン加水分解物は、上記デンプン源を、１つ又は複数のアミラーゼ、例えば、α－アミラーゼ、好ましくは熱安定性α－アミラーゼとともにインキュベートすることによって得られる。

【００４１】

デンプン加水分解物のＤＥは、１～３０、好ましくは５～２０、更により好ましくは８～１５であり得る。一般に、２０未満のＤＥを有するデンプン加水分解物は、マルトデキストリンとみなされる。

【００４２】

当該技術分野において記載されている任意の好適な方法を使用して、生成物のＤＥ値を決定することができる。典型的には、ＤＥ値は、ベルトランの方法（Ｂｕｌｌｅｔｉｎ ｄｅ ｌａ Ｓｏｃｉｅｔｅ Ｃｈｉｍｉｑｕｅ ｄｅ Ｆｒａｎｃｅ，１９０６，３５ ｐｐ．１２８５－１２９９）に従って決定され得る。

【００４３】

好ましい実施形態では、デンプン加水分解物は、１０重量％未満、好ましくは９重量％未満、８重量％未満、７重量％未満、６重量％未満、５重量％未満、４重量％未満、更により好ましくは３重量％未満、２重量％未満の総食物繊維を含むか、又は食物繊維を含まない。

【００４４】

デンプン加水分解物の遊離マルトース含有量は、１５重量％未満、好ましくは１０重量％未満、更により好ましくは５重量％未満であり得る。典型的には、マルトース含有量は、高性能液体クロマトグラフィー（high-performance liquid chromatography、ＨＰＬＣ）及び高性能陰イオン交換クロマトグラフィー（high-performance anion-exchange chromatography、ＨＰＡＥＣ）などのクロマトグラフィーを使用して測定することができる。遊離マルトースの量を決定するための好ましい方法は、以下の実施例４～６に詳述されるようなＨＰＡＥＣである。

【００４５】

一実施形態では、分岐反応前のデンプン加水分解物を含む組成物の粘度は、２５℃において５０％固形分で５０００ｃＰ未満、より好ましくは２０００ｃＰ未満である。デンプン加水分解組成物の粘度を測定するための方法は、当技術分野において公知である。典型的には、粘度は、実験室粘度計（ＡＭＥＴＥＫ Ｂｒｏｏｋｆｉｅｌｄ）又はＲａｐｉｄ Ｖｉｓｃｏ Ａｎａｌｙｓｅｒ（ＲＶＡ，Ｐｅｒｔｅｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用して測定することができる。

【００４６】

有利には、本発明の一実施形態では、デンプン加水分解物を含む組成物は、全組成物の３０重量％～７０重量％、好ましくは全組成物の４０重量％～６０重量％、更により好ましくは全組成物の４５重量％～５５重量％に含まれる固形分を有する。

【００４７】

高い固形分はまた、他の酵素反応（加水分解など）よりもトランスグルコシダーゼの分岐反応に有利であり、より少ない望ましくない副生成物を有する分岐デンプン加水分解物のより効率的な生成ももたらす。

【００４８】

これはまた、高い生産効率を得るために、本発明の方法が工業規模で実施されることを可能にする。対照的に、当技術分野で記載されている方法の多く、特にデンプン加水分解物ではなくデンプンを基質として使用する方法は、実験室規模の実験にしか適していない。

【００４９】

本発明の方法によれば、デンプン加水分解物を含む組成物を、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物とともにインキュベートする工程は、４０℃～７０℃、好ましくは５０℃～６０℃、更により好ましくは約５５℃の温度で実施される。

【００５０】

この酵素的分岐反応工程は、好適な量の分岐デンプン加水分解物の生成を可能にするのに十分な時間実施される。典型的には、デンプン加水分解物を含む組成物を、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物とともにインキュベートする工程は、１～７２時間、好ましくは２～２４時間、更により好ましくは４～８時間に含まれる期間にわたって実施される。

【００５１】

典型的には、デンプン加水分解物を含む組成物を、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物とともにインキュベートする工程は、４～８、好ましくは４．５～７、更により好ましくは５～６．５に含まれるｐＨ値で実施され得る。

【００５２】

酵素的処理工程の後、９５℃で３０分間のインキュベーションなどの酵素的不活性化によって反応を停止させる。

【００５３】

本発明の方法は、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素による所定の単位比での同時処理を必要とする。

【００５４】

本明細書において、マルトース生成アミラーゼの１単位とは、ｐＨ５．５、反応温度５５℃の反応条件下で、基質として約１２のＤＥを有する５重量％のワキシーメイズデンプンマルトデキストリン水溶液（例えば、ＧＬＵＣＩＤＥＸ　１２Ｃ、Ｒｏｑｕｅｔｔｅ）を使用して、１分間に１μｍｏｌのマルトースを生成する酵素量と定義される。

【００５５】

本発明の一実施形態では、マルトース生成アミラーゼは麦芽生成α－アミラーゼ及び麦芽生成β－アミラーゼ、好ましくはβ－アミラーゼ、更により好ましくはコムギβ－アミラーゼからなる群から選択される。

【００５６】

典型的には、コムギβ－アミラーゼは、デンプン加水分解物を含む組成物中の固形分１ｇ当たり１．８単位の濃度で使用することができる。

【００５７】

本明細書で使用される場合、トランスグルコシダーゼ１単位とは、１重量％メチル－α－Ｄ－グルコピラノシド水溶液を基質とし、ｐＨ５．５、温度５５℃の反応条件下で、１分間に１μｍｏｌのグルコースを生成する酵素能力と定義する。

【００５８】

本発明の好ましい実施形態によれば、トランスグルコシダーゼは、Ｄ－グルコシルトランスフェラーゼ（Ｅ．Ｃ．２．３．１．２４）である。一実施形態では、トランスグルコシダーゼは、トランスグルコシダーゼＬ「Ａｍａｎｏ」（登録商標）（Ａｍａｎｏ　Ｅｎｚｙｍｅによって市販されている）、トランスグルコシダーゼＬ－２０００（登録商標）（ＤｕＰｏｎｔによって市販されている）、及びＢｒａｎｃｈｚｙｍｅ（登録商標）（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓによって市販されている）からなる群から選択される。

【００５９】

マルトース生成アミラーゼとトランスグルコシダーゼとを所定の単位比で同時に使用することにより、反応を通じて生成される遊離マルトースの量を正確に制御することができる。遊離マルトースの濃度は、インキュベーション中及びインキュベーション後にモニターすることができる。典型的には、遊離マルトースの濃度は、糖組成の４０重量％未満、好ましくは３０重量％未満、更により好ましくは２０重量％未満であり得る。好ましい実施形態では、遊離マルトースの濃度は、組成物の１２重量％未満、好ましくは１１重量％

未満、１０重量％未満、９重量％未満、８重量％未満、更により好ましくは７重量％未満、６重量％未満、又は５重量％未満である。

【００６０】

本発明はまた、上記で定義したような方法によって得ることができる分岐デンプン加水分解物を含む組成物に関する。

【００６１】

一態様では、本発明は、分岐デンプン加水分解物を含む組成物であって、

ａ）１０～５０、好ましくは１２～３０、更に好ましくは１５～２５のＤＥ値を有し、

及び／又は、

ｂ）少なくとも７％、好ましくは少なくとも８％、少なくとも９％、少なくとも１０％、少なくとも１１％、少なくとも１２％、少なくとも１３％、少なくとも１４％、少なくとも１５％、少なくとも１６％、少なくとも１７％、少なくとも１８％、少なくとも１９％、好ましくは少なくとも２０％、少なくとも２１％、少なくとも２２％、少なくとも２３％、少なくとも２４％、少なくとも２５％、更により好ましくは少なくとも３０％のα－１，６結合のパーセンテージを有し、

及び／又は、

ｃ）少なくとも３０重量％、好ましくは少なくとも３５％、好ましくは少なくとも４０重量％、更により好ましくは少なくとも４３重量％の、１０以上のＤＰを有する分岐デンプン加水分解物の分岐を含む、組成物に更に関する。

【００６２】

典型的には、ＤＥ値又は「デキストロース等価」値は、ベルトランの方法に従って決定される（Ｂｕｌｌｅｔｉｎ ｄｅ ｌａ Ｓｏｃｉｅｔｅ Ｃｈｉｍｉｑｕｅ ｄｅ Ｆｒａｎｃｅ，１９０６，３５ｐｐ．１２８５－１２９９）。

【００６３】

本明細書で使用する場合、「α－１，６結合のパーセンテージ」という表現は、分岐デンプン加水分解物の分岐度を指す。それは、α－１，４及びα－１，６グリコシド結合の合計で割ったα－１，６グリコシド結合の量として計算される。

【００６４】

任意の好適な方法を使用して、α－１，６結合のパーセンテージを決定することができる。典型的には、α－１，４及びα－１，６グリコシド結合の量は、以下の「実施例」セクションの実施例４に記載されているように、プロトン核磁気共鳴（^{1}Ｈ ＮＭＲ）を使用して分析することができる。

【００６５】

本発明による組成物は、少なくとも１０の重合度（ＤＰ）を有する分岐のパーセンテージ（重量による）も特徴とする。このＤＰは、直鎖デンプン加水分解物の総重量に基づいて、すなわち、デンプン加水分解物がイソアミラーゼ（α－１，６グリコシド結合を加水分解する）による酵素的処理によって脱分岐された後に計算される。

【００６６】

分岐（又は直鎖分子）のＤＰは、当該技術分野における任意の好適な方法によって計算することができる。典型的には、直鎖デンプン加水分解物のＤＰは、Ｌｉｕｅｔ ａｌ．の方法（Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，２０１０，４３，ｐｐ．２８５５－２８６４）に従ってマルク－ホウインクの式を使用して流体力学的半径から推定することができる。

【００６７】

有利なことに、本発明者らは、本発明による分岐デンプン加水分解物を含む組成物が遅消化性であることを実証した。本明細書で使用される「遅消化性」という用語は、本発明の酵素的処理工程に供されていないデンプン加水分解組成物よりも、Ｅｎｇｌｙｓｔ方法によって測定されるＳＤＳ及びＲＳのよりも高い画分を含有する分岐デンプン加水分解組成物を指す。

【００６８】

典型的には、Ｅｎｇｌｙｓｔ ｅｔ ａｌ．（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏ

ｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ，１９９２，４６，ｐｐ．Ｓ３３－Ｓ５０）の方法に従って測定されたＳＤＳ画分及びＲＳ画分の合計が、トランスグルコシダーゼ及びマルトース生成アミラーゼとのインキュベーション前のデンプン加水分解物のＳＤＳ及びＲＳの元の合計に対して、５０％の増加、好ましくは１００％の増加、更により好ましくは１５０％の増加を示す場合、組成物は、「遅消化性」であるとみなされる。

【００６９】

代替的に、Ｙｕ ｅｔ ａｌ．（Ｆｏｏｄ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２０１８，２６４，ｐｐ．２８４－２９２）の方法に従って測定されるような消化速度が、トランスグルコシダーゼ及びマルトース生成アミラーゼとのインキュベーション前のデンプン加水分解物の消化速度の８０％未満、好ましくは６０％未満、更により好ましくは５０％未満である場合、組成物は「遅消化性」であるとみなされる。

【００７０】

Ｅｎｇｌｙｓｔ ｅｔ ａｌ．及びＹｕ ｅｔ ａｌ．の方法は、以下の「実施例」の節の実施例１に記載されるように実施される。

【００７１】

好ましい実施形態では、本発明による分岐デンプン加水分解物を含む組成物は、劣化に対して安定である。

【００７２】

「劣化に対して安定」という用語は、糊化デンプンペースト内の分子が再会合してより規則的な構造を形成する劣化として知られる再組織化プロセスを受けない（又はより少ない程度で受ける）組成物を指す。この劣化に対する安定性は、本発明の酵素的分岐処理工程に供されていないデンプン加水分解組成物と比較して、冷蔵後の粘度の増加がより小さく、冷蔵後のゲル透明度の変化がより小さいことによって反映される。

【００７３】

好ましい実施形態では、本発明による分岐デンプン加水分解物を含む組成物は、食物繊維を含まないか、又は少量しか含まない。

【００７４】

組成物は、１０重量％未満、好ましくは９重量％未満、８重量％未満、７重量％未満、６重量％未満、５重量％未満、４重量％未満、更により好ましくは３重量％未満、２重量％未満の食物繊維を含む場合、「低食物繊維」を含むと見なされる。

【００７５】

食物繊維の量は、当技術分野で公知の任意の好適な方法によって決定することができる。典型的には、当業者は、ＡＯＡＣ方法２００９．０１を実施して、総食物繊維の量を決定することができる。

【００７６】

本発明はまた、マルトース生成アミラーゼ及びトランスグルコシダーゼ酵素の混合物を含む、分岐デンプン加水分解物の組成物を調製するためのキットに関する。

【００７７】

本発明は、以下の実施例を読むことでより明確に理解され、これらの実施例は純粋に例示的であることが意図され、保護の範囲を決して限定するものではない。「マルトデキストリン」という用語は、それらのＤＥにかかわらず、デンプン加水分解物を表すために実施例において大まかに使用される。

【実施例】

【００７８】

トランスグルコシダーゼＬ－２０００（登録商標）（ＤｕＰｏｎｔ製）：活性は、上記の方法を使用して定量化され、１５９８Ｕ／ｍＬ（約１．６Ｕ／μＬ）に等しい。

【００７９】

トランスグルコシダーゼＬ「Ａｍａｎｏ」（登録商標）（Ａｍａｎｏ Ｅｎｚｙｍｅ製）：活性は、上記の方法を使用して定量化され、１０７７Ｕ／ｍＬ（約１．１Ｕ／μＬ）に等しい。

【００８０】
コムギβ－アミラーゼ（Ｒｏｑｕｅｔｔｅ）：活性は、上記の方法を使用して定量化され、１７９０６Ｕ／ｍＬ（約１．８Ｕ／０．１μＬ）に等しい。
【００８１】
実施例１：トランスグルコシダーゼＬ－２０００（登録商標）（ＤｕＰｏｎｔ製）を使用したタピオカマルトデキストリンの酵素的分岐変性
調製物
タピオカマルトデキストリン
Ｓｐｅｚｙｍｅ（登録商標）Ｃａｓｓａｖａ（ＤｕＰｏｎｔ製の熱安定性α－アミラーゼ）を、０．２１又は０．４２μＬ／ｇ乾燥デンプンの濃度で４０％タピオカデンプンスラリー（脱イオン水を使用）に添加した。混合物を５分間オートクレーブ処理し、オートクレーブ中で追加の３０分間冷却した。５％ＨＣｌ溶液を使用してスラリーのｐＨを３．０～３．５に調整することによって、酵素を最終的に失活させた。３０分後、１Ｍ及び０．１ＭのＮａＯＨ溶液を使用してｐＨを６．０に中和して戻した。次いで、溶液を噴霧乾燥して、マルトデキストリン粉末を製造した。得られたマルトデキストリン試料をそれぞれＴＭ２１Ｎ及びＴＭ４２Ｎと標識し、本発明による更なる酵素的分岐反応に使用した。
【００８２】
分岐タピオカマルトデキストリン
５％ｗ／ｖグリセロールを含有する４５％ｗ／ｖタピオカマルトデキストリン溶液を調製した。グリセロールは、ＨＰＬＣを使用する糖組成分析のための内部標準として役立った。５５℃の水浴中で６０分間絶えず撹拌することによって、マルトデキストリンを可溶化した。トランスグルコシダーゼＬ－２０００（登録商標）（ＤｕＰｏｎｔ製）及びコムギβ－アミラーゼ（Ｒｏｑｕｅｔｔｅ）を、それぞれ乾燥マルトデキストリン１グラム当たり１μＬ（又は１．６Ｕ）及び０．１μＬ（又は１．８Ｕ）の濃度で添加した。混合物を５５℃でインキュベートした。４時間の反応後（それぞれ、ＴＭ２１Ｎ及びＴＭ４２Ｎに由来するＴＭ２１Ｈ４及びＴＭ４２Ｈ４と標識）並びに２４時間の反応後（それぞれ、ＴＭ２１Ｎ及びＴＭ４２Ｎに由来するＴＭ２１Ｈ２４及びＴＭ４２Ｈ２４と標識）に試料を収集した。試料を沸騰水中で２０分間加熱することによって、酵素を失活させた。
【００８３】
分析
デキストロース等価物
未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのＤＥ値を分析し、表１に提示した。
【００８４】
【表１】
表１．未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのＤＥ値並びにマルトース含有量。

試料	DE値	マルトース含有量（重量%）
TM21N	12	2.69
TM21H4	13	9.14
TM21H24	16	4.90
TM42N	17	4.73
TM42H4	17	11.27
TM42H24	21	5.78

【００８５】
０．２１及び０．４２μＬ／ｇ乾燥デンプンの濃度でＳｐｅｚｙｍｅ　Ｃａｓｓａｖａを使用して生成されたタピオカマルトデキストリン試料は、それぞれ１２及び１７のＤＥ値を有した。本発明による酵素的分岐反応は、ＤＥ値をそれぞれ１６及び２１まで増加させた。

【００８６】
マルトース含有量
試料を、超純水を使用して約１％の固形分に希釈し、次いで、０．４５μmシリンジフィルターを通して濾過した後、屈折率（refractive index、ＲＩ）検出器（２４１４、Ｗａｔｅｒｓ）を備えたＨＰＬＣシステム（Ａｌｌｉａｎｃｅ ｅ２６９５ Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓ Ｍｏｄｕｌｅ，Ｗａｔｅｒｓ）に注入した。注入容量は、１００μＬであった。カラムは、プレカラム（ＴＳＫガードカラムＰＷＸＬ、内径６０mm、長さ４ｃｍ）及び２本のＬＣカラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ Ｇ２５００ＰＷＸＬ、内径７．８mm、長さ３０ｃｍ）が直列に接続されて構成されていた。カラムを８０℃のカラムオーブン内に置いた。０．５ｍＬ／分の流速で、移動相として超純水を使用した。

【００８７】
表１は、タピオカマルトデキストリン試料中のマルトースの量が、トランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用する４時間の酵素的分岐反応後に増加し、次いで、２４時間の分岐反応後に減少したことを示す。この増加は、β－アミラーゼの加水分解反応によるものであり、ＤＥ値を増加させた。２４時間の分岐反応後のマルトース含有量の減少は、マルトースを基質として使用したトランスグルコシダーゼの反応によるものであった。

【００８８】
粘度
マルトデキストリン溶液を蒸発させて、固形分を約５０％とした。溶液を沸騰水浴中で加熱し、冷蔵庫に保存した。２日目に、各溶液（２５ｇ）の粘度を、ＲＶＡ（ＲＶＡ ４５００，Ｐｅｒｔｅｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用して、表２に要約した加熱プロファイルで分析した。溶液を冷蔵庫に４℃で追加の１ヶ月間保存し、次いで、同じ加熱プロファイルに従ってＲＶＡを使用して再分析した。

【００８９】
【表２】
表２．異なる温度での粘度測定のためのＲＶＡ加熱プロファイル。

時間	温度(℃)	速度(rpm)
00:00:00	20	960
00:00:10	20	160
00:01:00	20	160
00:36:00	90	160
00:40:00	90	160

【００９０】

【表３】

表３．粘度は、未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンの１日冷蔵後と１ヶ月冷蔵後との間に増加する。

試料	固形分（%）	条件	粘度		
			20℃	30℃	40℃
TM21N	49.3	1日保存後	1367cP	1059cP	677cP
		1ヶ月保存後	1988cP	1466cP	904cP
		増加	45%	38%	34%
TM21H4	52.7	1日保存後	613cP	462cP	290cP
		1ヶ月保存後	793cP	579cP	359cP
		増加	29%	25%	24%
TM21H24	53.1	1日保存後	344cP	258cP	171cP
		1ヶ月保存後	459cP	336cP	218cP
		増加	33%	30%	27%
TM42N	50.7	1日保存後	834cP	cP cP	343cP
		1ヶ月保存後	1706cP	1168cP	741cP
		増加	105%	116%	116%
TM42H4	53.1	1日保存後	370cP	283cP	190cP
		1ヶ月保存後	610cP	458cP	296cP
		増加	65%	62%	56%
TM42H24	51.2	1日保存後	205cP	143cP	107cP
		1ヶ月保存後	255cP	195cP	137cP
		増加	24%	36%	28%

【００９１】

１日冷蔵後と１ヶ月冷蔵後との間の粘度の増加は、低温でより明白である。表３は、２０、３０、及び４０℃で測定された２つの冷蔵期間（１日及び１ヶ月）の間の粘度増加を示す。この差は、本発明による酵素的分岐反応後により小さくなった。加えて、ＴＭ２１Ｈ２４は、約１６～１７であったＴＭ４２Ｎ及びＴＭ４２Ｈ４と同様のＤＥ値を有していたが、ＴＭ２１Ｈ２４の粘度増加はより小さかった。より小さい粘度増加は、本発明による酵素的分岐反応が、冷蔵中の劣化に対してタピオカマルトデキストリン溶液を安定化させたことを示した。分岐タピオカマルトデキストリン溶液はまた、冷蔵後、未変性タピオカマルトデキストリン溶液よりも透明であった（データは示さず）。

【００９２】

インビトロデンプン消化率

２つのインビトロ消化方法を使用して、分岐タピオカマルトデキストリンの消化率を評価した。

【００９３】

第１の方法は、Ｅｎｇｌｙｓｔ ｅｔ ａｌ．の以下の（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ，１９９２，４６，ｐｐ．Ｓ３３－Ｓ５０）の方法に基づいていた。

【００９４】

１３．６ｇの酢酸ナトリウム三水和物を２５０ｍＬの飽和安息香酸溶液に溶解し、それを脱イオン水で１Ｌに希釈し、０．１Ｍ酢酸を使用してｐＨを５．２に調整し、緩衝液１リットル当たり４ｍＬの１Ｍ $CaCl_2$ を添加することによって、酢酸緩衝液（０．１Ｍ）を調製した。

【００９５】

酵素溶液は、実験前に新しく調製した。各々が２０ｍＬの水と混合した３．０ｇのブタ

パンクレアチン（Ｐ１７５０、Ｓｉｇｍａ）を含有する４つの５０ｍＬ遠心分離管を調製した。混合物を１０分間撹拌し、１５００×ｇで１０分間遠心分離した。上清（各チューブから１３．５ｍＬ）を、２．８ｍＬのアミログルコシダーゼ（Ａ７０９５、Ｓｉｇｍａ）及び７．９５ｍＬの脱イオン水と組み合わせ、混合した。

【００９６】

各試料（１．００ｇ、乾燥基準）を、２０ｍＬの０．１Ｍ酢酸緩衝液及び５０ｍｇのグアーガムと、５０ｍＬチューブ中で混合した。試料なしで、２０ｍＬの０．１Ｍ酢酸緩衝液及び５０ｍｇのグアーガムを使用して、ブランクを調製した。試料及びブランクを水浴中で振盪しながら３７℃で平衡化した。１分当たり１本のチューブを用いて、５ｍＬの酵素溶液を試料及びブランクに添加した。混合直後に、チューブを振盪しながら３７℃の水浴に１２０分間戻した。アリコート（０分で０．２５ｍＬ並びに２０分及び１２０分で０．２０ｍＬ）を、各チューブから、１０ｍＬの６６％ｖ／ｖエタノール溶液を含有する１５ｍＬチューブに移し、十分に混合した。エタノール溶液を１，５００×ｇで遠心分離して、透明な上清を得て、各上清（０．１ｍＬ）中のグルコース含有量を、Ｄ－グルコースアッセイキットＧＯＰＯＤフォーマット（Ｍｅｇａｚｙｍｅ）を使用して分析した。０、２０、及び１２０分インビトロ消化後に放出されたグルコースの重量パーセントを、それぞれ遊離グルコース（free glucose、ＦＧ）、$Ｇ_{２０}$、及び$Ｇ_{１２０}$として標識した。ＲＤＳ、ＳＤＳ、及びＲＳは以下のように計算された。

$ＲＤＳ＝（Ｇ_{２０}－ＦＧ）×０．９$

$ＳＤＳ＝（Ｇ_{１２０}－Ｇ_{２０}）×０．９$

$ＲＳ＝１００％－（ＦＧ＋ＲＤＳ＋ＳＤＳ）＝１００％－（Ｇ_{１２０}×０．９）$

【００９７】

【表４】

表４．Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法に従う未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのインビトロ消化率。

試料	遊離グルコース（%）	急速消化性デンプン（%）	遅消化性デンプン（%）	難消化性デンプン（%）
TM21N	0.3	91.8	2.1	5.9
TM21H4	5.8	66.0	5.5	22.7
TM21H24	13.6	50.0	3.0	33.4
TM42N	0.33	93.3	0.1	6.4
TM42H4	4.8	69.1	3.1	23.0
TM42H24	13.6	51.4	6.2	28.7

【００９８】

Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法によって測定された分岐タピオカマルトデキストリンのインビトロ消化率は、本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼによる酵素的分岐処理が、ＲＤＳのパーセンテージを減少させ、一方、ＳＤＳ及びＲＳの合計のよりも大きな割合をもたらしたことを示した（表４）。

【００９９】

第２のインビトロ消化方法は、非線形最小二乗法（non-linear least-square、ＮＬＬＳ）によるフィッティングを用いたＹｕ　ｅｔ　ａｌ．（Ｆｏｏｄ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２０１８，２６４，ｐｐ．２８４－２９２）の方法に基づいた。簡単に説明すると、各試料を１５ｍＬの遠心分離管中で５０ｍｇまで正確に秤量し、２ｍＬの脱イオン水及び８ｍＬの酵素溶液と混合した。９６ｍＬの０．２Ｍ酢酸ナトリウム緩衝液（２００ｍＭ塩化カルシウム、０．４９ｍＭ塩化マグネシウム、及び０．０２％アジ化ナトリウムを含有するｐＨ６．０）中で４ｍｇのパンクレアチン（Ｐ１７５０、Ｓｉｇｍａ）及び０．２ｍＬのアミログルコシダーゼ（Ｅ－ＡＭＧＤＦ、Ｍｅｇａｚｙｍｅ）を混合することによっ

て、酵素溶液をその日に新しく調製した。試料を３７℃の水浴中で３００ｒｐｍの撹拌速度でインキュベートした。アリコート（０．１ｍＬ）を０～３００分の異なる時点で収集し、各々を０．９ｍＬの無水エタノールを含有する１．５ｍＬの微量遠心分離管に移した。エタノール溶液を１，５００×ｇで遠心分離して、透明な上清を得て、各上清（０．１ｍＬ）中のグルコース含有量を、Ｄ－グルコースアッセイキットＧＯＰＯＤフォーマット（Ｍｅｇａｚｙｍｅ）を使用して分析した。インビトロ消化中に放出されたグルコースの重量パーセンテージを、０．９の係数を掛けることによってデンプン加水分解のパーセンテージに変換した。ＮＬＬＳを使用して消化プロファイルを適合させて、消化速度及び総消化率を得た。前者は、消化曲線の傾きであり、後者は、消化時間を無限大に外挿することによって得た。

【０１００】

【表５】

表５．Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ．の方法に従う未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのインビトロ消化速度及び総消化率。

試料	消化速度（1／分）	総消化率（%）
TM21N	0.0509	98.9
TM21H4	0.0163	78.4
TM21H24	0.0236	67.4
TM42N	0.0462	96.1
TM42H4	0.0145	72.3
TM42H24	0.0165	68.8

【０１０１】

図１は、Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ．の方法に従った未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのインビトロ消化曲線を示し、表５は、消化速度及び総消化率を要約する。本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用して調製された分岐タピオカマルトデキストリンは、それらの未変性タピオカマルトデキストリン対応物よりも低い消化速度及び低い総消化率を有していた。分岐タピオカマルトデキストリンの消化速度は、それらの未変性タピオカマルトデキストリン対応物の消化速度の５０％未満であった。加えて、分岐タピオカマルトデキストリンの総消化率は、それらの未変性タピオカマルトデキストリン対応物の８０％未満であった。

【０１０２】

食物繊維含有量

未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンの食物繊維含有量を、ＨＰＬＣ分析を含むＡＯＡＣ方法２００９．０１に従って分析し、難消化性デキストリン（ＮＵＴＲＩＯＳＥ　ＦＢ０６、Ｒｏｑｕｅｔｔｅ）と比較した。

【０１０３】

結果は、ＮＵＴＲＩＯＳＥ　ＦＢ０６、ＴＭ４２Ｈ４、及びＴＭ２１Ｈ２４がそれぞれ８６．６５％、１．６５％、及び１．９６％の食物繊維を有したが、他の分岐タピオカマルトデキストリンが、無視できる量の食物繊維を含有したことを示した。本質的に分岐したタピオカマルトデキストリンは、低い食物繊維を含有するか、又は食物繊維を全く含有せず、表４のＥｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法を使用して観察されたＲＳ画分及び表５のＹｕ　ｅｔ　ａｌ．の方法を使用して観察された難消化性デンプンは、超遅消化性であるデンプンの画分であり得る。

【０１０４】

分子構造

本発明による分岐タピオカマルトデキストリンの分子構造（全分子サイズ分布及び鎖長

分布）を、未変性タピオカマルトデキストリン及びＩＭＯＳ（Ｂａｏｌｉｎｇｂａｏ製のＩＭＯ５０及びＩＭＯ９０、それぞれ４３及び４２のＤＥ値を有する）のものと比較した。ＩＭＯＳは通常、トランスグルコシダーゼを使用してデンプンから製造される。全分子サイズ及び鎖長分布分析を、Ｇｕ ｅｔ ａｌ．（Ｆｏｏｄ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２０１９，２９５，ｐｐ．４８４－４９２）の方法に従って行った。全分子サイズ分布分析のために、２ｍｇの試料を、５％ＬｉＢｒを含有する１ｍＬのＤＭＳＯ溶液に直接溶解した。鎖長分布のために、まず、イソアミラーゼ（Ｅ－ＩＳＡＭＹ、Ｍｅｇａｚｙｍｅ）を使用して４ｍｇの試料を脱分岐した後、５％ＬｉＢｒを含有する１ｍＬのＤＭＳＯ溶液に溶解した。溶離液として５％ＬｉＢｒを含有するＤＭＳＯ溶液を用いて、ＲＩＤ－１０Ａ屈折率検出器（Ｓｈｉｍａｄｚｕ）と連結されたＬＣ－２０ＡＤシステム（Ｓｈｉｍａｄｚｕ）において一連のＳＥＣカラム（ＧＲＡＭプレカラム、ＧＲＡＭ １００及びＧＲＡＭ １０００、ＰＳＳ）を連続して使用して、分子を分離した。ＳＥＣカラムをカラムオーブン内側で８０℃に維持した。分子の重量パーセンテージは、曲線下面積に基づいて推定した。

【０１０５】

図２及び図３は、未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンからの全分子サイズ及び鎖長分布（それぞれ上部及び下部）の結果を示す。表６は、１ｎｍよりも大きい及び小さい流体力学的半径（R_h）を有する全分子、並びに１０よりも大きい及び小さいＤＰを有する分岐の重量パーセンテージを要約する。分岐（又は直鎖分子）のＤＰは、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．の方法（Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，２０１０，４３，ｐｐ．２８５５－２８６４）に従ってマルクーホウインクの式を使用して流体力学的半径から推定した。

【０１０６】

【表６】

表６．１ｎｍよりも大きい及び小さい流体力学的半径（R_h）を有する全分子、並びに１０よりも大きい及び小さいＤＰを有する分岐の推定重量パーセンテージ。

試料	全分子サイズ分布		鎖長分布	
	R_h＜1nm、	R_h＞1nm、	R_h＜1nm、DP＜10	R_h＞1nm、DP＞10
TM21N	11%	89%	39%	61%
TM21H4	10%	90%	41%	59%
TM21H24	12%	88%	44%	56%
TM42N	20%	80%	56%	44%
TM42H4	11%	89%	49%	51%
TM42H24	15%	85%	57%	43%
IMO50	61%	43%	87%	13%
IMO90	76%	24%	96%	4%

【０１０７】

未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンの両方は、１ｎｍよりも大きいR_hを有するそれらの全分子の８０％超を有したが、ＩＭＯ５０及びＩＭＯ９０中の分子の５０％未満は、１ｎｍよりも大きいR_hを有した。これらの結果は、それらのＤＥ値と一致する。

【０１０８】

未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンの分岐はまた、ＩＭＯＳの分岐よりも長かった。未変性マルトデキストリン及び分岐マルトデキストリン中の分岐の４０％超がＤＰ１０よりも大きかったが、ＩＭＯ５０及びＩＭＯ９０中の分岐の１５％未満のみがＤＰ１０よりも大きかった。加えて、ＩＭＯ５０及びＩＭＯ９０は、脱分岐前後の分子サイズ分布においてわずかな差しか示さず、ＩＭＯＳ試料がほとんど直鎖であり、かつ／又はイソ

アミラーゼに感受性ではないが、分岐タピオカマルトデキストリンは、分子が脱分岐後に小さくなるにつれて、イソアミラーゼ加水分解に感受性であるいくつかの分岐を依然として含有していたことを示した。

【０１０９】

分岐分子の流体力学的サイズとその分子量との間に直接的な関係は存在しないが、分子サイズ分布全体における小分子（ＤＰ＜１０）の大部分は直鎖であり、したがって１ｎｍにおけるＲｈはＤＰ１０に近かったと仮定することができる。したがって、本発明による酵素的分岐反応は、タピオカマルトデキストリンの全体的な分子サイズをＲｈ＜１ｎｍ又はＤＰ＜１０に減少させず、生成物はＩＭＯＳと同じではなかった。

【０１１０】

結論

本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用する酵素的分岐反応は、２４時間の反応時間後にタピオカマルトデキストリンのＤＥ値を約３増加させ、これは、小糖類の量の増加に起因し得る。分岐タピオカマルトデキストリンは、長期冷蔵後の溶液粘度及び不透明度の増加がより小さいことによって示されるように、冷蔵中の劣化に対してより安定であった。加えて、分岐タピオカマルトデキストリンは、Ｅｎｇｌｙｓｔ ｅｔ ａｌ．の方法を使用して分析した場合、より多量のＳＤＳ及びＲＳを示し、Ｙｕ ｅｔ ａｌ．の方法を使用して分析した場合、より低い消化速度及び総消化率を示した。しかしながら、分岐タピオカマルトデキストリンは、本質的に低食物繊維を含有するか、又は全く含有しなかった（２％未満）。分岐タピオカマルトデキストリンは、イソアミラーゼ加水分解を受けやすいいくつかの分岐を依然として維持しており、それらの分子の大部分はＤＰ１０よりも大きかった。したがって、分岐タピオカマルトデキストリンは、同様にトランスグルコシダーゼを使用して製造されるＩＭＯＳとは異なる。

【０１１１】

実施例２：トランスグルコシダーゼＬ－２０００（登録商標）（ＤｕＰｏｎｔ製）を使用したワキシーメイズマルトデキストリンの酵素的分岐変性

調製物

分岐ワキシーメイズマルトデキストリン

Ｇｌｕｃｉｄｅｘ ８Ｃ（Ｒｏｑｕｅｔｔｅ）を使用して、５％ｗ／ｖグリセロールを含有する４５％ｗ／ｖワキシーメイズマルトデキストリン溶液（脱イオン水で調製）を調製した。グリセロールは、ＨＰＬＣを使用する糖組成分析のための内部標準として役立った。５５℃の水浴中で６０分間絶えず撹拌することによって、マルトデキストリンを可溶化した。トランスグルコシダーゼＬ－２０００（登録商標）（ＤｕＰｏｎｔ製）及びコムギβ－アミラーゼ（Ｒｏｑｕｅｔｔｅ）を、それぞれ乾燥マルトデキストリン１グラム当たり１μＬ（又は１．６Ｕ）及び０．１μＬ（又は１．８Ｕ）の濃度で添加した。混合物を５５℃でインキュベートした。１時間、２時間、４時間、及び２４時間の反応後に試料を収集した（それぞれＧ８ＣＨ１、Ｇ８ＣＨ２、Ｇ８ＣＨ４、及びＧ８ＣＨ２４と標識し、未変性Ｇｌｕｃｉｄｅｘ ８ＣをＧ８ＣＮと標識した）。試料を沸騰水中で２０分間加熱することによって、酵素を失活させた。

【０１１２】

分析

デキストロース等価物

未変性及び分岐ワキシーメイズマルトデキストリンのＤＥ値を分析し、表７に提示した。

【０１１３】

【表７】

表７．未変性及び分岐ワキシーメイズマルトデキストリンのＤＥ値並びにマルトース含有量。

試料	DE値	マルトース含有量（重量％）
G8CN	8	1．46
G8CH1	6	2．94
G8CH2	7	2．90
G8CH4	7	2．88
G8CH24	8	3．03

【０１１４】

ＤＥ値は、本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用した酵素的分岐反応の後に明らかな変化を示さなかった。

【０１１５】

マルトース含有量

実施例１と同じＨＰＬＣ方法を使用して、未変性及び分岐ワキシーメイズマルトデキストリンのマルトース含有量を分析した。

【０１１６】

表７は、トランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用した酵素的分岐反応の後に増加したワキシーメイズマルトデキストリン試料中のマルトースの量を示す。これはβ－アミラーゼの加水分解反応によるものであったが、マルトース含有量の増加は、ワキシーメイズマルトデキストリンのＤＥ値の明らかな増加を示さなかった。

【０１１７】

粘度

実施例１と同じＲＶＡ方法を用いて、未変性及び分岐ワキシーメイズマルトデキストリンの冷蔵後の粘度を分析した。

【０１１８】

【表８】

表８．未変性及び分岐のワキシーメイズマルトデキストリンの１日冷蔵後と１ヶ月冷蔵後との間の粘度増加。

試料	固形分（％）	条件	粘度		
			20℃	30℃	40℃
G8CN	51．5	1日保存後	598cP	450cP	264cP
		1ヶ月保存後	2503cP	1896cP	1079cP
		増加	319％	321％	309％
G8CH1	51．6	1日保存後	767cP	460cP	268cP
		1ヶ月保存後	2877cP	1949cP	1104cP
		増加	275％	324％	312％
G8CH2	51．7	1日保存後	629cP	458cP	267cP
		1ヶ月保存後	2440cP	1818cP	1040cP
		増加	288％	297％	290％
G8CH4	52．8	1日保存後	700cP	505cP	289cP
		1ヶ月保存後	2536cP	1865cP	1065cP
		増加	262％	269％	269％
G8CH24	53．0	1日保存後	434cP	322cP	194cP
		1ヶ月保存後	795cP	603cP	336cP
		増加	83％	87％	73％

【０１１９】

１日冷蔵後と１ヶ月冷蔵後との間の粘度の増加は、本発明の酵素的分岐反応時間の増加とともにより小さくなった（表８）。より小さい粘度増加は、酵素的分岐反応が、冷蔵中の劣化に対してワキシーメイズマルトデキストリン溶液を安定化させたことを示した。分岐ワキシーメイズマルトデキストリン溶液はまた、冷蔵後、未変性ワキシーメイズマルトデキストリン溶液よりも透明であった（データは示さず）。

【０１２０】

インビトロデンプン消化率

実施例１に記載したように、Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法を使用して、未変性及び分岐ワキシーメイズマルトデキストリンのインビトロ消化率を分析した。

【０１２１】

【表９】

表９．Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法に従う未変性及び分岐ワキシーメイズマルトデキストリンのインビトロ消化率。

試料	遊離グルコース及び急速消化性デンプン（％）	遅消化性デンプン（％）	難消化性デンプン（％）
G8CN	90.4	4.7	4.9
G8CH1	84.9	8.7	6.4
G8CH2	80.1	5.9	14.0
G8CH4	79.3	6.5	14.2
G8CH24	70.3	4.6	25.1

【０１２２】

表９では、未変性及び分岐ワキシーメイズマルトデキストリンのインビトロ消化率試験は、本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼによる酵素的分岐処理が、酵素的分岐反応の時間の増加ともにＳＤＳ及びＲＳの合計の割合を増加させ、一方で、ＦＧ及びＲＤＳの合計を減少させることを示した。

【０１２３】

結論

ＤＥ値は、本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用した酵素的分岐反応の後に明らかな変化を示さなかったが、ワキシーメイズマルトデキストリン試料中のマルトースの量は増加した。分岐ワキシーメイズマルトデキストリンは、長期冷蔵後の溶液粘度及び不透明度の増加がより小さいことによって示されるように、冷蔵中の劣化に対してより安定であった。分岐ワキシーメイズマルトデキストリンのインビトロ消化性は、本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼによる酵素的分岐処理が、酵素的分岐反応時間の期間の増加ともにＳＤＳ及びＲＳの合計の割合を増加させ、一方で、ＦＧ及びＲＤＳの合計を減少させることを示した。

【０１２４】

実施例３：トランスグルコシダーゼＬ「Ａｍａｎｏ」（登録商標）（Ａｍａｎｏ　Ｅｎｚｙｍｅ製）を使用したマルトデキストリンの酵素的分岐変性

調製物

分岐マルトデキストリン

実施例１で述べたタピオカマルトデキストリンＴＭ４２Ｎ及び実施例２で述べたＧｌｕｃｉｄｅｘ　８Ｃ（Ｒｏｑｕｅｔｔｅ）を使用して、固形分濃度５７％～６７％のマルトデキストリン溶液（脱炭酸水を用いて調製）を調製した。５５℃の水浴中で３０分間絶えず撹拌することによって、マルトデキストリンを可溶化した。トランスグルコシダーゼＬ「Ａｍａｎｏ」（登録商標）（Ａｍａｎｏ　Ｅｎｚｙｍｅ製）及びコムギβ－アミラーゼ（Ｒｏｑｕｅｔｔｅ）を、それぞれ乾燥マルトデキストリン１グラム当たり１μＬ（又は１．１Ｕ）及び０．１μＬ（又は１．８Ｕ）の濃度で添加した。混合物を５５℃で６時間インキュベートした。試料を沸騰水中で２０分間加熱することによって、酵素を失活させた。固形分５７％及び６７％で調製した分岐タピオカマルトデキストリンは、それぞれＴ

Ｍ４２Ｓ５７及びＴＭ４２Ｓ６７と標識された。一方、５７％及び６２％で調製された分岐ワキシーメイズマルトデキストリンは、それぞれＧ８ＣＳ５７及びＧ８ＣＳ６２と標識された。

【０１２５】

分析

固形分及びデキストロース当量

本発明に従う酵素的分岐反応のために調製されたマルトデキストリン溶液の固形分を、１１０℃のオーブン中で一晩乾燥させる前後の重量差に基づいて分析した。

【０１２６】

得られた分岐マルトデキストリンのＤＥ値を分析し、表１０に提示した。

【０１２７】

【表１０】

表１０．酵素的分岐反応のためのマルトデキストリン溶液の固形分、並びに得られる分岐マルトデキストリンのＤＥ値及びマルトース含有量。

試料	酵素的分岐反応中の固形分	DE値	マルトース含有量（重量%）
TM42N	－	17	3.51
TM42S57	56.95%	24	4.86
TM42S67	67.42%	21	5.18
G8C	－	8	1.38
G8CS57	56.52%	17	3.74
G8CS62	61.89%	16	1.99

【０１２８】

分岐マルトデキストリンのＤＥ値は、本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用した酵素的分岐反応の後に増加した（表１０）。しかしながら、＞６０％固形分で調製された分岐マルトデキストリンのＤＥ値は、＜６０％固形分で調製されたそれらの対応物のＤＥ値よりも低かった。

【０１２９】

マルトース含有量

実施例１と同じＨＰＬＣ方法を使用して、未変性及び分岐マルトデキストリンのマルトース含有量を分析した。各試料溶液を０．２％グリセロール溶液を使用して５０倍に希釈した後、０．４５μｍの膜フィルターで濾過してからＨＰＬＣシステムに注入した。

【０１３０】

表１０は、分岐マルトデキストリン試料中のマルトースの量が、それらの未変性マルトデキストリン対応物よりも高かったことを示す。これは、ＤＥ値を増加させるβ－アミラーゼの加水分解反応によるものであった。ワキシーメイズマルトデキストリンについては、マルトースの量は、Ｇ８ＣＳ６２よりもＧ８ＣＳ５７の方が高かった。β－アミラーゼは、おそらくより高い粘度のために、より高い固形分ではあまり有効でなかったようである。

【０１３１】

インビトロデンプン消化率

実施例１に記載したように、Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法を使用して、未変性及び分岐マルトデキストリンのインビトロ消化率を分析した。

【０１３２】

【表１１】

表１１．Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法に従う未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのインビトロ消化率。

試料	遊離グルコース（％）	急速消化性デンプン（％）	遅消化性デンプン（％）	難消化性デンプン（％）
TM42N	０．４	９１．０	１．６	７．０
TM42S57	４．０	７４．２	７．８	１４．０
TM42S67	１．６	８３．７	０．５	１４．３
G8C	０．３	８７．１	５．５	７．２
G8CS57	３．９	８１．３	５．８	９．１
G8CS62	５．０	７５．８	９．６	９．６

【０１３３】

表１１では、未変性及び分岐マルトデキストリンのインビトロ消化率試験は、本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用した酵素的分岐反応が、ＲＤＳの量を減少させ、一方、ＳＤＳ及びＲＳの合計の割合の増加をもたらすことを示した。ＴＭ４２Ｓ５７は、ＴＭ４２Ｓ６７よりも大きいＳＤＳ及びＲＳの合計の割合を有した。更に、酵素的分岐反応後のワキシーメイズマルトデキストリンのインビトロ消化率の変化は、タピオカマルトデキストリンの変化よりも小さかった。これは、タピオカマルトデキストリンよりも低いＤＥ値を有する、ワキシーメイズマルトデキストリンのより高い粘度に起因し得る。より低いＤＥ又はより高い固形分などのより高い粘度では、酵素は、より低い移動度を有し、したがって、分岐反応に対してより効果的でない。

【０１３４】

結論

タピオカ及びワキシーメイズマルトデキストリンのＤＥ値は、本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用した酵素的分岐反応の後に増加し、これは、小糖類の増加に起因し得る。インビトロ消化率の結果は、本発明によるトランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用した酵素的分岐反応が、ＳＤＳ及びＲＳの合計を増加させ、一方、ＲＤＳの量を減少させることを示した。

【０１３５】

酵素的分岐反応に対するマルトデキストリンの濃度の影響に関して、加水分解は、水分子を必要とするので、固体のより高い濃度は、その加水分解反応よりもトランスグルコシダーゼの分岐（又は縮合）反応に有利に働くはずである。しかしながら、固形分で観察された明確な傾向は存在しなかった。これは、マルトデキストリン溶液の粘度に起因する可能性がある。より高い粘度は、移動度が低下するので、酵素の効率を低下させる。加えて、変化は、タピオカマルトデキストリンよりもワキシーメイズマルトデキストリンの方が明らかではなく、これは、タピオカマルトデキストリンよりも低いＤＥ値を有する、ワキシーメイズマルトデキストリンのより高い粘度に起因し得る。

【０１３６】

実施例４：トランスグルコシダーゼＬ「Ａｍａｎｏ」（登録商標）（Ａｍａｎｏ　Ｅｎｚｙｍｅ製）を使用したタピオカ及びエンドウマメマルトデキストリンの酵素的分岐変性調製物

タピオカ及びエンドウマメマルトデキストリン

Ｌｉｑｕｏｚｙｍｅ　Ｓｕｐｒａ（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ製の熱安定性α－アミラーゼ）を使用して２種類のデンプンを液化して、マルトデキストリンを生成した。タピオカ及びエンドウマメデンプンを使用して、脱塩水（ｐＨ６．０及び５．５）を用いて３５％及び３０％デンプンスラリーを調製し、酵素をそれぞれ３．０及び３．５μＬ／ｇ乾燥デンプンでスラリーに添加した。各混合物を、１１０℃で、約３５ｍＬ／分の平均流速で、特注

の実験用調理器内で加熱し、これは約１７分の液化時間であった。次いで、酵素を１４０℃で失活させ、得られたマルトデキストリン溶液を室温まで冷却した。タピオカマルトデキストリン（tapioca maltodextrin、ＴＭ１８）は、１８のＤＥを有し、エンドウマメマルトデキストリン（pea maltodextrin、ＰＭ１９）は、１９のＤＥを有した。両方のマルトデキストリン溶液は約５．５のｐＨを有し、それらをロータリーエバポレーター（Ｒｏｔａｖａｐｏｒ　Ｒ－３００、Ｂｕｃｈｉ）を使用して蒸発させて、＞５０％の固形分を得て、本発明による更なる酵素的分岐反応に使用した。マルトデキストリンは、微生物の増殖を防ぐために冷蔵庫で保存した。

【０１３７】

分岐マルトデキストリン

各マルトデキストリン溶液（ｐＨ約５．５）の固形分を調整し、温水ジャケット付きビーカー中、９０℃で３０分間加熱した。蒸発による過剰な水分損失を避けるために、ビーカーをアルミニウム箔で覆った。マルトデキストリン溶液を５５℃に冷却した後、それをトランスグルコシダーゼＬ「Ａｍａｎｏ」（登録商標）（Ａｍａｎｏ　Ｅｎｚｙｍｅ製）及びコムギβ－アミラーゼ（Ｒｏｑｕｅｔｔｅ）とともに５５℃でインキュベートした。反応条件を表１２に要約する。得られた分岐マルトデキストリンを３０分間９０℃に加熱して戻すことにより、酵素を失活させた。

【０１３８】

【表１２】

表１２．タピオカ及びエンドウマメマルトデキストリンの酵素的分岐反応の条件。

試料	植物由来	固形分（%）	βーアミラーゼ（U／g乾燥マルトデキストリン）	トランスグルコシダーゼ（U／g乾燥マルトデキストリン）	単位比βーアミラーゼ:トランスグルコシダーゼ	反応時間（時間）
TM（22:1）	タピオカ	50%	7．2（0．4μL）	0．3（0．3μL）	22:1	3
TM（221:1）	タピオカ	50%	72．0（4μL）	0．3（0．3μL）	221:1	3
TM（1:10）	タピオカ	45%	0．2（0．01μL）	1．6（1．5μL）	1:10	24
TM（1:1）	タピオカ	50%	1．8（0．1μL）	1．6（1．5μL）	1:1	6
PM（1:1）	エンドウマメ	50%	1．8（0．1μL）	1．6（1．5μL）	1:1	6

【０１３９】

分析

デキストロース当量及び分岐度

未変性マルトデキストリン及び分岐マルトデキストリンのＤＥ値を、ベルトランの方法（Ｂｕｌｌｅｔｉｎ　ｄｅ　ｌａ　Ｓｏｃｉｅｔｅ　Ｃｈｉｍｉｑｕｅ　ｄｅ　Ｆｒａｎｃｅ，１９０６，３５ｐｐ．１２８５－１２９９）に従って分析した。

【０１４０】

未変性及び分岐マルトデキストリン中のα－１，４及びα－１，６グリコシド結合の量を、４００ＭＨｚ及び６０℃で動作するＡｖａｎｃｅ　ＩＩＩフーリエ変換分光計（Ｂｒｕｋｅｒ　Ｓｐｅｃｔｒｏｓｐｉｎ）を備えた5mm　ＮＭＲ管を使用した^{1}Ｈ　ＮＭＲ技術によって分析した。手順は以下のとおりである。各試料（１０ｍｇ）を、水浴中で０．７５mLのＤ$_2$Ｏ（最低９９％、Ｅｕｒｉｓｏｔｏｐ）に溶解した。室温に冷却した後、３－トリメチルシリル－１－プロパンスルホン酸（Ａｌｄｒｉｃｈ）のナトリウム塩の５０μＬ溶液（１０ｍｇ／ｇ）を各試料に添加した。溶媒抑制なしで、少なくとも１０秒の緩和時間で、回転なしで取得を行った。フーリエ変換、位相補正、及び手動モードでのベースラインの減算（指数乗算なし、ＬＢ＝ＧＢ＝０）の後に、スペクトルを収集した。

【０１４１】

シグナルの積分（図４及び表１３を参照）を以下のように行った。Ｓ５シグナルを６００に正規化した。このシグナルは、アンヒドログルコース単位の非交換性プロトン（Ｈ$_2$、Ｈ$_3$、Ｈ$_4$、Ｈ$_5$、及び２Ｈ$_6$）に対応した。シグナルＳ１は、α－１，４結合のＨ$_1$

に、シグナルＳ２は、α配座の還元末端のH_1に、シグナルＳ３は、α－１，６結合のH_1にそれぞれ対応した。β配座を有する還元末端に対応するＳ４シグナルを、Ｓ２に１．５を掛けることによって推定した。Ｓ６信号は、減算方法Ｓ６＝１００－（Ｓ１＋Ｓ２＋Ｓ３＋Ｓ４）によって推定された。

【０１４２】

【表１３】

表１３．^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルのシグナル決定。

積分表面積	積分の限界(ppm)		結合のタイプ
S1	5．45	5．26	H_1α－(1，4)
S2	5．26	5．19	H_1α－還元剤
S3	5．04	4．88	H_1α－(1，6)
S5	4．32	3．10	他のプロトン(H_2、H_3、H_4など) すなわち、6個のプロトン

【０１４３】

α－１，４及びα－１，６結合の割合を、Ｓ１及びＳ３シグナルの表面積から決定し、２つの結合の合計を１００に正規化して、それらをパーセンテージで表した。したがって、分岐度は、α－１，４及びα－１，６グリコシド結合の合計で割ったα－１，６グリコシド結合の量として計算された。

【０１４４】

【表１４】

表１４．未変性及び分岐マルトデキストリンのＤＥ値並びに分岐度。

試料	DE値	分岐度(%)
TM18	18	5．0
PM19	19	4．8
TM(22:1)	30	7．3
TM(221:1)	38	8．2
TM(1:10)	35	38．8
TM(1:1)	25	14．0
PM(1:1)	22	16．7

【０１４５】

表１４では、ＴＭ（２２：１）、ＴＭ（２２１：１）、及びＴＭ（１：１０）のＤＥ値は、３０を超える高いＤＥ値を有していたが、最初の２つの試料は、３時間しかインキュベートされなかったが、ＴＭ（１：１０）は、２４時間インキュベートされた。これは、ＴＭ（２２：１）及びＴＭ（２２１：１）を産生するために使用される基質に対するβ－アミラーゼの高い比によって説明され得、これにより、多量のマルトースを放出し、かつ溶液中の還元糖の数を増加させ得る。ＴＭ（１：１）及びＰＭ（１：１）のＤＥ値は、ＴＭ（１：１０）よりも低かったが、これはおそらく、ＴＭ（１：１）及びＰＭ（１：１）の反応時間がより短く、より低い加水分解度をもたらすことに起因しただろう。

【０１４６】

表１４はまた、未変性及び分岐マルトデキストリンの分岐度を要約する。高濃度のβ－アミラーゼのみが、ＴＭ（２２：１）及びＴＭ（２２１：１）の分岐度を、非変性タピオカマルトデキストリン中の５％から８％に増加させた。低濃度のβ－アミラーゼを使用すると、タピオカマルトデキストリンの分岐度は、３９％まで増加したが、ＤＥ値は、ＴＭ（２２１：１）よりも低かった。結果は、より多い量のトランスグルコシダーゼを有するより少ない量のβ－アミラーゼが分岐反応に有利であるのに対して、反対に加水分解反応に有利であることを示す。

【０１４７】

インビトロデンプン消化率

実施例１に記載したように、Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法を使用して、未変性及び分岐マルトデキストリンのインビトロ消化率を分析した。

【０１４８】

【表１５】

表１５．Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法に従う未変性及び分岐マルトデキストリンのインビトロ消化率。

試料	遊離グルコース（％）	急速消化性デンプン（％）	遅消化性デンプン（％）	難消化性デンプン（％）
TM18	2	85	6	7
PM19	2	91	0	7
TM(22:1)	3	96	7	0
TM(221:1)	3	87	4	6
TM(1:10)	15	46	9	30
TM(1:1)	6	83	10	1
PM(1:1)	4	74	5	17

【０１４９】

表１５は、未変性及び分岐マルトデキストリンのインビトロ消化率結果を要約する。ＴＭ（２２：１）及びＴＭ（２２１：１）は、未変性タピオカデンプン（ＴＭ１８）よりも高いＲＤＳ含有量を有し、このことは、基質に対するβ－アミラーゼの高い比が、未変性タピオカマルトデキストリン（ＴＭ１８）中の分子よりも急速消化性の小分子をもたらしたことを示唆している。一方、ＴＭ（１：１０）は、全ての処置の中で最も低いＲＤＳを含有した。一方、ＴＭ（１：１）及びＰＭ（１：１）は、それらの未変性マルトデキストリン対応物と比較して、ＲＤＳ含有量のわずかな減少を示した。他の実施例と同様に、ＲＤＳ含有量は、ＳＤＳ及びＲＳの合計と負に相関した。ＲＤＳ含有量はまた、分岐度と負に相関し（図５Ａ）、分岐マルトデキストリンの遅い消化特性は、膵臓α－アミラーゼによって加水分解され得ず、かつ分岐マルトデキストリン基質が膵臓α－アミラーゼと結合するための立体障害をもたらし得る、α－１，６グリコシド結合のより高い量に起因することを示唆した。

【０１５０】

遊離糖プロファイル

遊離糖プロファイルを、パルスアンペロメトリック検出（pulsed amperometric detection、ＰＡＤ）を備えたＨＰＡＥＣシステム（Ｄｉｏｎｅｘ（商標）ＩＣＳ－５０００、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（商標））を使用して分析した。分析に使用したカラムは、ＣａｒｂｏＰａｃ（商標）ＰＡ１（４×２５０ｍｍ）であり、ガードカラムＣａｒｂｏＰａｃ（商標）ＰＡ１（４×５０ｍｍ）が先行していた。各試料を正確に秤量し、１．０ｍＬの内部標準（メリビオース）と混合し、２０ｍＬの蒸留水で希釈した。混合物を１０分間撹拌し、０．４５μｍ膜を通して濾過した。注入体積は５μＬであった。以下のようにプログラムされたＮａＯＨ　１００ｍＭ（Ａ）及びＮａＯＨ　１００ｍＭ＋CH_3COONa　５００ｍＭ（Ｂ）の勾配モードにおいて、３０℃で試料を溶出した。０．０分で２％Ｂ、６０．０分で５％Ｂ、６５．０分で３０％Ｂ、６５．０５分で１００％Ｂ、７５．０分で１００％Ｂ、７５．０５分で２％Ｂ、及び９０．０分で２％Ｂ。

【０１５１】

【表１６】

表１６．未変性及び分岐マルトデキストリンの遊離糖プロファイル。

試料	グルコース（%）	マルトース（%）	イソマルトース（%）	マルトトリオース（%）
TM18	０．８	４．１	＜０．１	６．５
PM19	１．１	４．２	＜０．１	４．４
TM(22:1)	１．４	１９．２	＜０．１	１０．６
TM(221:1)	１．６	２６．５	＜０．１	１０．６
TM(1:10)	７．２	１．１	５．５	０．４
TM(1:1)	３．３	４．９	１．３	３．６
PM(1:1)	３．９	３．０	１．９	２．５

【０１５２】

未変性及び分岐マルトデキストリンの遊離糖プロファイルを表１６に要約する。α－アミラーゼは、主にデンプンをグルコースではなくマルトース及びマルトトリオースに加水分解するので、マルトデキストリンは通常、グルコースよりもマルトースとマルトトリオースの量が多い。ＴＭ（２２：１）及びＴＭ（２２１：１）は、非還元末端０からデンプンを加水分解し、それぞれの成功した加水分解がマルトースを放出するβ－アミラーゼの反応に起因して、最高量のマルトースを有した。これは、それらの高いＤＥ値と一致する（表１４）。一方、ＴＭ（１：１）及びＰＭ（１：１）のマルトース含有量は、それらの未変性マルトデキストリン対応物のものと同様であるか、又はそれよりわずかに低かった。加えて、ＴＭ（１：１０）は、最低量のマルトースを有した。これらの結果は、β－アミラーゼによって製造されたマルトースが、分岐反応のためにトランスグルコシダーゼによってほとんど使用されたことを確認する。トランスグルコシダーゼの分岐反応もグルコースを放出し、トランスグルコシダーゼの別の生成物であるイソマルトースとともにこれらの試料中のグルコース含有量を増加させた。

【０１５３】

結論

タピオカ及びエンドウマメマルトデキストリンのＤＥ値は、トランスグルコシダーゼ及びβ－アミラーゼを使用した酵素的分岐反応の後に増加し、これは、小糖類の増加に起因し得る。マルトデキストリン基質に対するβ－アミラーゼの高い比及びトランスグルコシダーゼに対するβ－アミラーゼの高い酵素単位比は、非還元末端からのマルトデキストリンの加水分解に有利であり、多量のマルトースを放出した。その結果、ＤＥ値は短時間で急激に上昇したが、分岐度はわずかに上昇しただけであった。β－アミラーゼ加水分解の生成物は、未変性マルトデキストリン中の分子よりも急速消化性であるようであった。

【０１５４】

一方、本発明に従って、β－アミラーゼ対トランスグルコシダーゼの低い酵素活性単位比と組み合わされたβ－アミラーゼ対マルトデキストリン基質の低い比は、α－１，６グリコシド結合の増加した量によって示されるマルトデキストリンの分岐反応に有利であった。α－１，６グリコシド結合は、膵臓α－アミラーゼによって加水分解され得ず、分岐マルトデキストリン基質が膵臓α－アミラーゼと結合するための立体障害をもたらし得、Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法を使用して得られた試験結果によって示されるように、より低い消化速度又はより少ない量のＲＤＳをもたらし得る。

【０１５５】

実施例５：タピオカマルトデキストリンの酵素的分岐変性のための２つのトランスグルコシダーゼの比較

調製物

タピオカマルトデキストリン

タピオカマルトデキストリン（ＴＭ１７）を実施例４と同様に調製した。タピオカデンプンスラリー（脱塩水中３５％固形分、ｐＨ６．０）を、Ｌｉｑｕｏｚｙｍｅ　Ｓｕｐｒａ（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、２．９μＬ／ｇ乾燥デンプン）を使用して、特注の実験用調理

器において１１０℃及び約３５ｍＬ／分の平均流速で液化し、これは約１７分の液化時間であった。次いで、酵素を１４０℃で失活させ、得られたマルトデキストリン溶液を室温まで冷却した。タピオカマルトデキストリンは、１７のＤＥ及びｐＨ５．６を有し、次いで、ロータリーエバポレーター（Ｒｏｔａｖａｐｏｒ　Ｒ－３００、Ｂｕｃｈｉ）を使用して蒸発させて、＞５０％の固形分を得て、本発明による更なる酵素的分岐反応に使用した。マルトデキストリンは、微生物の増殖を防ぐために冷蔵庫で保存した。

【０１５６】

分岐マルトデキストリン

マルトデキストリン溶液（ｐＨ約５．５）の固形分を約４７％に調整し、温水ジャケット付きビーカー中、９０℃で３０分間加熱した。蒸発による過剰な水分損失を避けるために、ビーカーをアルミニウム箔で覆った。マルトデキストリン溶液を５５℃に冷却した後、２つの酵素系とともにインキュベートした。第１の系は、ＤｕＰｏｎｔ製のトランスグルコシダーゼＬ－２０００（登録商標）を用い、第２の系は、Ａｍａｎｏ　Ｅｎｚｙｍｅ製のトランスグルコシダーゼＬ「Ａｍａｎｏ」（登録商標）を用いた。反応を５５℃で６又は２４時間実施し、これを表１７に要約する。得られた分岐マルトデキストリンを３０分間９０℃に加熱して戻すことにより、酵素を失活させた。

【０１５７】

【表１７】

表１７．タピオカマルトデキストリンの酵素的分岐反応の条件。

試料	βーアミラーゼ（U／g乾燥マルトデキストリン）	トランスグルコシダーゼ（U／g乾燥マルトデキストリン）		単位比βーアミラーゼ:トランスグルコシダーゼ	反応時間（時間）
		Amano	DuPont		
TMーA6	0.2（0.01μL）	1.6（1.5μL）	0.0	1:10	6
TMーA24	0.2（0.01μL）	1.6（1.5μL）	0.0	1:10	24
TMーD6	1.8（0.1μL）	0.0	1.6（1.0μL）	1:1	6
TMーD24	1.8（0.1μL）	0.0	1.6（1.0μL）	1:1	25

【０１５８】

分析

デキストロース当量及び分岐度

未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのＤＥ値を、実施例４に記載のベルトラン方法に従って分析した。未変性及び分岐タピオカマルトデキストリン中のα－１，４及びα－１，６グリコシド結合の量を、実施例４に記載の^{1}Ｈ　ＮＭＲ技法によって分析した。

【０１５９】

【表１８】

表１８．未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのＤＥ値並びに分岐度。

試料	DE値	分岐度（%）
TM17	17	4.9
TMーA6	24	18.4
TMーA24	37	35.5
TMーD6	29	20.2
TMーD24	39	39.7

【０１６０】

表１８は、タピオカマルトデキストリンのＤＥ値及び分岐度の両方が反応時間とともに増加したことを示し、酵素的分岐反応が６時間よりも長く起こったことを示す。ＤＥ値の増加は、β－アミラーゼによるマルトースの生成によるものであり、これは、次いで、分岐反応のためにトランスグルコシダーゼによって使用され、副生成物としてグルコースを放出した。トランスグルコシダーゼＬ－２０００（登録商標）（ＤｕＰｏｎｔ製）がわず

かに高いＤＥ値及び分岐度を示したにもかかわらず、同じ反応時間で、両方の酵素系が同等のＤＥ値及び分岐度を生じた。これらの結果は、両酵素系がタピオカマルトデキストリンの分岐に有効であったことを示唆している。

【０１６１】

インビトロデンプン消化率

実施例１に記載したように、Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法を使用して、未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのインビトロ消化率を分析した。

【０１６２】

【表１９】

表１９．Ｅｎｇｌｙｓｔ　ｅｔ　ａｌ．の方法に従う未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのインビトロ消化率。

試料	遊離グルコース（%）	急速消化性デンプン（%）	遅消化性デンプン（%）	難消化性デンプン（%）
TM17	2	91	4	3
TM－A6	7	75	8	10
TM－A24	14	50	7	29
TM－D6	7	75	10	8
TM－D24	16	49	13	22

【０１６３】

表１９は、未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンのインビトロ消化率結果を要約する。ＲＤＳの量は反応時間とともに減少したが、ＦＧの量並びにＳＤＳ及びＲＳの合計は増加し、分岐反応がマルトデキストリンの消化速度を減少させたことを示した。実際、分岐度とＲＤＳ含有量との間に強い負の相関が存在する（図５Ｂ）。

【０１６４】

ＤＥ及び分岐度（表１８）と同様に、同じ反応時間で、２つの酵素系は、匹敵するインビトロ消化プロファイルを有する分岐マルトデキストリンを生成し、これは、両方のトランスグルコシダーゼがタピオカマルトデキストリンを分岐させ、かつその消化速度を低下させるのに有効であったことを示す。

【０１６５】

遊離糖プロファイル

未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンの遊離糖プロファイルを実施例４に記載のように分析した。

【０１６６】

【表２０】

表２０．未変性及び分岐マルトデキストリンの遊離糖プロファイル。

試料	グルコース（%）	マルトース（%）	イソマルトース（%）	マルトトリオース（%）	パノース（%）
TM17	0.5	3.9	＜0.1	5.7	＜0.1
TM－A6	3.2	2.6	1.7	1.5	3.3
TM－A24	7.6	1.3	5.7	0.3	2.2
TM－D6	3.5	6.8	1.6	3.4	6.0
TM－D24	8.3	2.3	6.3	0.3	3.9

【０１６７】

未変性及び分岐タピオカマルトデキストリンの遊離糖プロファイルを表２０に要約する。グルコース及びイソマルトース含有量は、これらがトランスグルコシダーゼの生成物であるので、インキュベーション時間とともに増加した。マルトース、マルトトリオース、及びパノースの含有量は、６時間～２４時間のインキュベーションの間に減少し、このことは、トランスグルコシダーゼがこれらの分子をその基質として使用し得ることを示す。

加えて、イソマルトースの含有量は、２４時間のインキュベーション後の分岐タピオカマルトデキストリン試料において依然として７％未満であり、したがって、イソマルトースは、遅い消化特性に関与する主要な分子ではなかった。全体として、これらの小糖類の量は、２４時間のインキュベーション後に低いままであり、これは、本発明をＩＭＯＳと区別する。

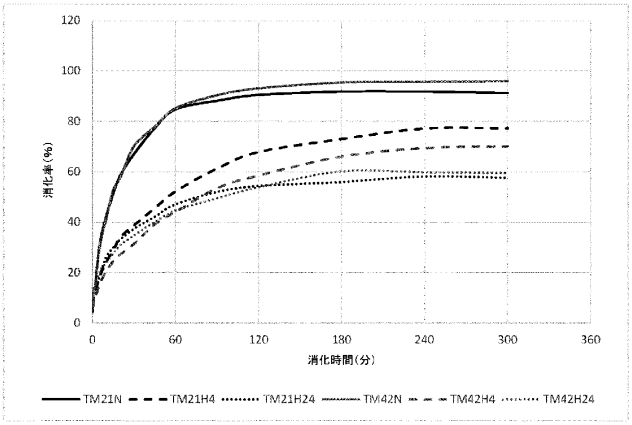
【０１６８】

結論

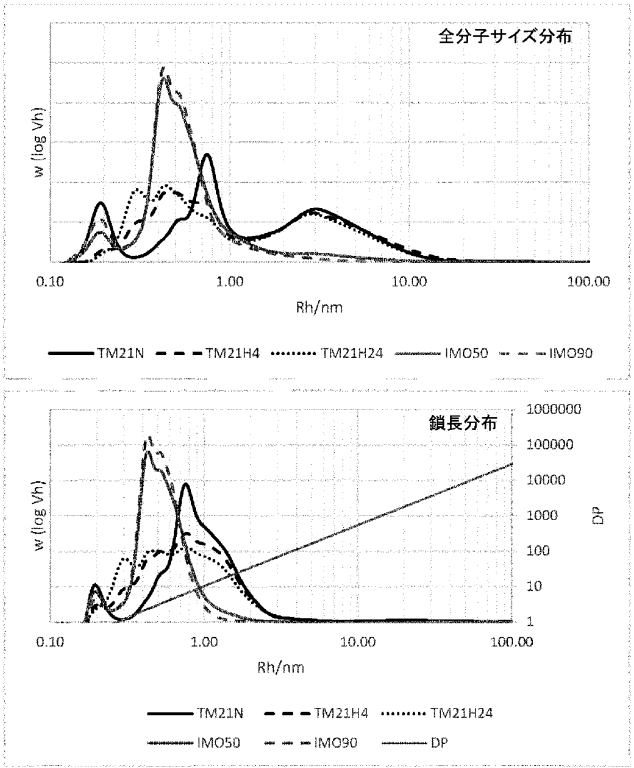
タピオカマルトデキストリンを、ＤｕＰｏｎｔ製のＴｒａｎｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅ Ｌ－２０００（登録商標）又はＡｍａｎｏ Ｅｎｚｙｍｅ製のトランスグルコシダーゼＬ「Ａｍａｎｏ」（登録商標）のいずれかをコムギβ－アミラーゼと組み合わせて使用して分岐させた。反応を６時間又は２４時間行った。タピオカマルトデキストリンのＤＥ値、分岐度、グルコース量、並びにＳＤＳ及びＲＳの合計は、反応時間の増加とともに増加したが、ＲＤＳの量は減少した。グルコース、マルトース、イソマルトース、マルトトリオース、及びパノースの量は、２４時間のインキュベーション後も低いままであった。結果は、分岐度の増加がマルトデキストリンの消化速度を減少させたことを示した。ＤＥ値の増加は、β－アミラーゼによるマルトースの放出によるものであり、これは、次いで、分岐反応のためにトランスグルコシダーゼによって使用され、副生成物としてグルコースを放出した。また、トランスグルコシダーゼはマルトトリオース及びパノースをその基質として使用できるようである。同じ反応時間で、両方の酵素系は、匹敵するＤＥ値、分岐度、及び消化プロファイルを有する分岐タピオカマルトデキストリンを生成したが、これは、両方の酵素系が、タピオカマルトデキストリンを分岐させ、かつその消化速度を低下させるのに有効であったことを示している。

【図面】

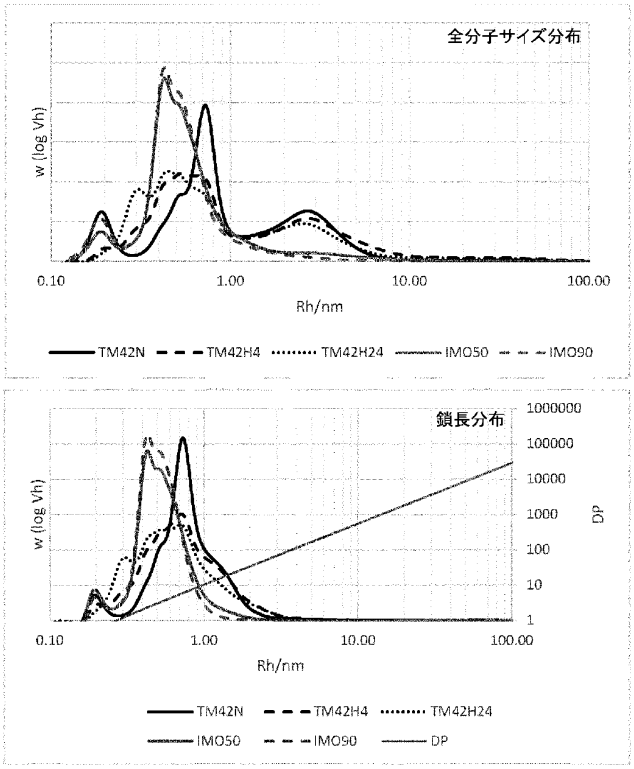
【図１】



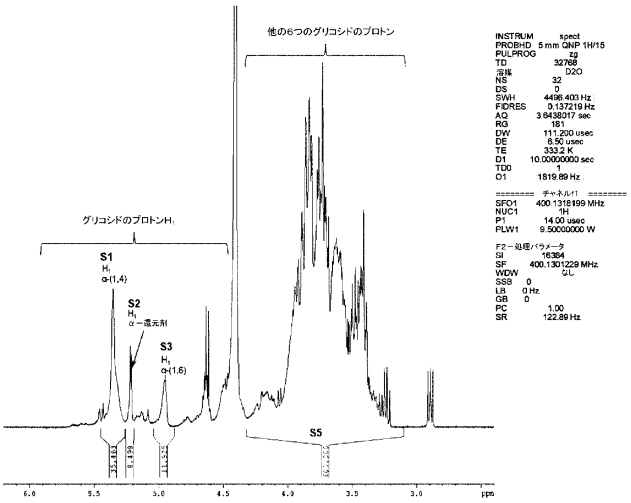
【図２】



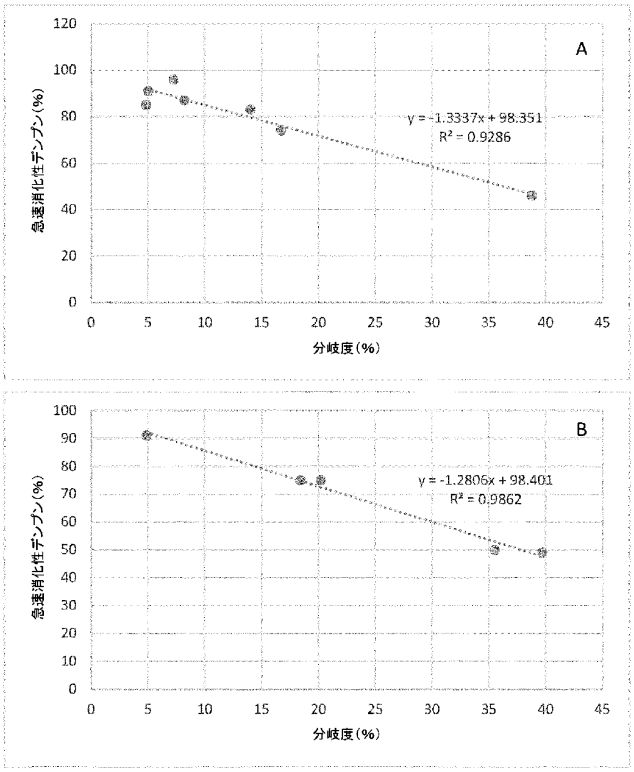
【図３】


全分子サイズ分布
w (log Vh)
0.10
1.00
10.00
100.00
Rh/nm
TM42N
TM42H4
TM42H24
IMO50
IMO90
鎖長分布
w (log Vh)
DP
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0.10
1.00
10.00
100.00
Rh/nm
TM42N
TM42H4
TM42H24
IMO50
IMO90
DP

【図４】


他の6つのグリコシドのプロトン
グリコシドのプロトンH1
S1
H1
α-(1,4)
S2
H1
α－還元剤
S3
H1
α-(1,6)
S5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
ppm

【図５】


A
急速消化性デンプン(%)
y = -1.3337x + 98.351
R² = 0.9286
分岐度(%)
B
急速消化性デンプン(%)
y = -1.2806x + 98.401
R² = 0.9862
分岐度(%)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/025518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23L29/212 A23L29/30 A23L33/125 A23L33/21 C08B30/18
C12P19/14 C12P19/18 C12P19/22
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A23L C09J C12P C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 368 451 A2 (MATSUTANI KAGAKU KOGYO KK [JP]) 16 May 1990 (1990-05-16) examples 4, 6	1-14,16
X	WO 2004/081022 A2 (GENENCOR INT [US]; LI FENG [CN] ET AL.) 23 September 2004 (2004-09-23) claims 1-16; example 8	1-14,16

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 March 2022	07/04/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	van Klompenburg, Wim

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/025518

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BYUNG-HOO LEE ET AL: "Enzyme-Synthesized Highly Branched Maltodextrins Have Slow Glucose Generation at the Mucosal [alpha]-Glucosidase Level and Are Slowly Digestible In Vivo", PLOS ONE, vol. 8, no. 4, 2 April 2013 (2013-04-02), page e59745, XP055518299, DOI: 10.1371/journal.pone.0059745 cited in the application figures 1-4; tables 1-3 -----	1-14,16
X	US 2005/159329 A1 (FUERTES PATRICK [FR] ET AL) 21 July 2005 (2005-07-21) claims 1-20; tables 1-6 -----	1-16

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/025518

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0368451 A2	16-05-1990	DE 68914401 T2	25-08-1994
		EP 0368451 A2	16-05-1990
		KR 900006521 A	08-05-1990
		US 5620873 A	15-04-1997
WO 2004081022 A2	23-09-2004	AU 2004220052 A1	23-09-2004
		CA 2518404 A1	23-09-2004
		CN 102613450 A	01-08-2012
		EP 1601699 A2	07-12-2005
		JP 4728950 B2	20-07-2011
		JP 2006519612 A	31-08-2006
		KR 20050106110 A	08-11-2005
		MX PA05009353 A	04-11-2005
		NZ 541813 A	22-12-2006
		US 2005031734 A1	10-02-2005
		US 2010056472 A1	04-03-2010
		US 2012135108 A1	31-05-2012
		WO 2004081022 A2	23-09-2004
US 2005159329 A1	21-07-2005	AT 516309 T	15-07-2011
		AU 2004240206 A1	07-07-2005
		CA 2491278 A1	19-06-2005
		CN 1654480 A	17-08-2005
		EP 1548033 A2	29-06-2005
		ES 2369692 T3	05-12-2011
		FR 2864088 A1	24-06-2005
		JP 4851709 B2	11-01-2012
		JP 2005213496 A	11-08-2005
		KR 20050062462 A	23-06-2005
		MX PA04012979 A	18-10-2005
		NO 333059 B1	25-02-2013
		US 2005159329 A1	21-07-2005

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ス ベテューヌ， グラン プラス ４１， アパートメント ２

(72)発明者 ユ， シヤオ

中華人民共和国 シャンハイ， プトゥオ ディストリクト カオヤン ロード レーン ８５９， ユニット １１０５， ナンバー ５

Ｆターム（参考） 4B018 LB08 LB10 MD28 MD29 MD31 MD34 MD36 MD49 MD53 MD57 MD90 ME03 ME14 MF12
4B117 LC04 LG07 LG11 LG12 LG13 LK12 LK13 LK15 LP06
4C090 AA05 BA97 BC01 BD31 CA31 CA43