(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** **3 126 229**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **21 08822**

(51) Int Cl[8] : ***C 12 P 19/04*** *(2020.12), A 23 L 33/125, A 23 L 33/21, A 61 K 31/716*

(12) **BREVET D'INVENTION** **B1**

# (54) Procédé d'obtention de fibres solubles par voie enzymatique.

(22) **Date de dépôt :** 23.08.21.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 24.02.23 Bulletin 23/08.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 29.11.24 Bulletin 24/48.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :**

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

◯ **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *ROQUETTE FRERES Société anonyme* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** LANOS Pierre, RAMETTE Matthieu et REMAUD-SIMEON Magali.

(73) **Titulaire(s) :** ROQUETTE FRERES Société anonyme.

(74) **Mandataire(s) :** Plasseraud IP.

FR 3 126 229 - B1

# Description

## Titre de l'invention : Procédé d'obtention de fibres solubles par voie enzymatique

### Domaine technique

[0001] La présente invention est relative à un procédé de préparation d'un mélange d'α-glucanes faiblement digestibles à partir d'un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides.

[0002] L'invention concerne également un mélange d'α-glucanes faiblement digestibles.

[0003] La présente invention est également relative à l'utilisation séquentielle d'une glucanotransférase capable de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) et d'une glucanotransférase capable de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) pour diminuer la digestibilité d'un mélange d'α-glucanes.

### Etat de l'art antérieur

[0004] Les fibres alimentaires ont un rôle important dans l'alimentation humaine. Parmi les fibres alimentaires, on distingue les fibres solubles, qui sont solubles dans l'eau et ont une capacité gélifiante, et les fibres insolubles. Les fibres solubles, dont les maltodextrines branchées, sont particulièrement intéressantes car elles sont faiblement digestibles. De ce fait, leur incorporation dans l'alimentation permet de diminuer l'indice glycémique d'un aliment et de prolonger la sensation de satiété. Elles sont également dotées de propriétés prébiotiques sur la flore intestinale, c'est-à-dire qu'elles sont capables de promouvoir de façon sélective la croissance de certaines bactéries de type probiotique ou l'activité du microbiote, en apportant un bénéfice à la santé.

[0005] Jusqu'à présent, les fibres solubles, dont les maltodextrines branchées, étaient principalement obtenues par voie physico-chimique.

[0006] C'est le cas notamment de la maltodextrine commercialisée par la société Demanderesse sous le nom de marque NUTRIOSE® FM10 en tant que fibre soluble dans l'eau.

[0007] Il existe d'autres fibres solubles obtenues par voie physico-chimique, telles que le PROMITOR® commercialisé par la société Tate and Lyle, le FIBERSOL® ou le LITESSE® commercialisé par la société Dupont Nutrition and Biosciences.

[0008] De nombreuses études ont démontré que les propriétés de digestibilité étaient directement liées aux pourcentages des différents types de liaisons osidiques au sein des fibres solubles.

[0009] En effet, les maltodextrines standards sont rapidement digestibles et se définissent comme des mélanges purifiés et concentrés de glucose et de polymères de glucose essentiellement lié en 1 → 4 avec seulement de 4 à 5 % de liaisons glucosidiques 1 →

6, de poids moléculaires extrêmement variés, complètement solubles dans l'eau et à faible pouvoir réducteur.

[0010] En augmentant le pourcentage de liaisons 1 → 6 ou 1 → 3, on augmente le degré de branchement des maltodextrines, ce qui les rend plus résistants à la digestion.

[0011] L'approche enzymatique, qui utilise des enzymes capables de favoriser la création des liaisons de type « "branchées » présente de nombreux avantages, en termes de sécurité, de préservation de l'environnement, et offre également une meilleure spécificité.

[0012] Jusqu'à présent, la plupart des procédés enzymatiques de production de fibres solubles sont réalisées en utilisant du saccharose comme substrat de l'enzyme, afin de créer de nouvelles liaisons. Par exemple, la demande WO2015183714 décrit une réaction enzymatique à partir d'un mélange de saccharose et de substrat de type α-glucane.

[0013] Il est souhaitable d'obtenir des fibres solubles par voie enzymatique à partir de substrat, en l'absence de saccharose.

## Description détaillée de l'invention

[0014] La société Demanderesse a alors trouvé qu'il était possible, à partir d'un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides, d'obtenir des fibres d'intérêt en alimentation humaine et animale, par voie enzymatique. La société Demanderesse a ainsi développé un procédé qui utilise deux enzymes particulières, l'une capable de créer des liaisons α(1-3) et l'autre capable de créer des liaisons α(1-6), de façon séquentielle.

[0015] Dans un premier aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un mélange d'α-glucanes comprenant les étapes suivantes :

- la fourniture d'un substrat, ledit substrat étant un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides ayant un indice de polydispersion compris entre 5 et 10, de préférence entre 6 et 9,5, de manière encore plus préférée entre 7 et 9, entre 8 et 8,5,de manière préférée entre toutes environ 8,4,
- une première incubation en présence d'une première enzyme,
- une deuxième incubation avec une deuxième enzyme,

lesdites première et deuxième enzymes étant une α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) et une α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6).

[0016] Selon la présente invention, les termes «α-glucane », « fibre soluble », « fibre soluble alimentaire » sont utilisées de manière interchangeable. Ils définissent des oligosaccharides composés d'au moins 3 unités de glucose reliées entre elles par des liaisons α-glycosidiques (ou α-glucosidiques).

[0017] La classification des α-glucanes repose principalement sur la mesure de leur pouvoir réducteur, exprimé classiquement par la notion de « équivalent dextrose » (« Dextrose Equivalent » ou DE).. Sur ce point particulier, la définition des maltodextrines reprise dans les Monograph Spécifications du Food Chemical Codex précise que la valeur de DE pour une maltodextrine ne doit pas excéder 20. Au-dessus de 20, il s'agit de sirops de glucose.

[0018] De manière préférée, le substrat utilisé dans le procédé selon la présente invention a un DE compris entre 15 et 20, de manière préférée entre 17 et 20, de manière préférée entre 18 et 19, de manière plus préférée encore environ 18,4.

[0019] Une telle mesure du D.E. est cependant insuffisante pour représenter précisément la distribution moléculaire des α-glucanes. En effet, l'hydrolyse acide de l'amidon, totalement aléatoire, ou son hydrolyse enzymatique, un peu plus ordonnée, fournissent des mélanges de glucose et de polymères de glucose que la seule mesure du D.E. ne permet pas de définir avec précision, et qui comportent des molécules de courte taille, de faible Degré de Polymérisation (D.P.), aussi bien que des molécules de taille très longue, de D.P. élevé.

[0020] La mesure du D.E. ne donne en fait qu'une idée approximative du D.P. moyen du mélange du glucose et des polymères de glucose constitutifs des α-glucanes et donc de leur masse moléculaire moyenne en nombre (Mn). Pour compléter la caractérisation de la distribution des masses moléculaires des α-glucanes, la détermination d'un autre paramètre est importante, celui de la masse moléculaire moyenne en poids (Mp).

[0021] Dans la pratique, les valeurs de Mn et de Mp ne se calculent pas, mais se mesurent par différentes techniques. On utilise par exemple une méthode de mesure adaptée aux polymères de glucose, qui repose sur la chromatographie de perméation de gel sur des colonnes de chromatographie étalonnées avec des pullulans de masses moléculaires connues.

[0022] Le rapport Mp/Mn est appelé indice de polymolécularité ou indice de polydispersion (IP) et permet de caractériser globalement la distribution des masses moléculaires d'un mélange polymérique. En règle générale, la répartition en masses moléculaires des maltodextrines standards conduit à des IP compris entre 5 et 10.

[0023] Ces différents paramètres sont également le reflet du profil de liaisons α-glycosidiques des α-glucanes. En effet, un mélange d'α-glucanes standard possède un pourcentage très élevé de liaisons « linéaires » α(1-4) (supérieur à 90%) et un pourcentage faible de liaisons dites « branchées (α(1-2), α(1-3) et α(1-6)).

[0024] Le procédé selon la présente invention permet de diminuer le pourcentage de liaisons α(1-4) au profit de liaisons α(1-3) et α(1-6), ce qui a l'avantage de diminuer la digestibilité du mélange d'α-glucanes obtenus par le procédé.

[0025] Selon un mode réalisation de l'invention, le substrat comprend : :

- entre 40 et 50% d'oligosaccharides ayant un degré de polymérisation (DP) entre 1 et 9 ,
- entre 15 et 20% de polysaccharides ayant un DP entre 10 et 20,
- entre 35 et 40% de polysaccharides ayant un DP supérieur à 20,

les pourcentages étant exprimés en pourcentages relatifs en moles, et le total faisant 100%.

[0026] Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le substrat a un equivalent dextrose (DE) compris entre 17 et 20, de préférence entre 18 et 19, de manière encore plus préférée environ 18,4.

[0027] Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le substrat présente les caractéristiques décrites dans le Tableau 1 ci-dessous. Il peut s'agir, par exemple, du Glucidex 19D® commercialisé par la société Demanderesse.

[0028] Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le substrat est présent à une concentration comprise entre 50 g/L et 500 g/L, de préférence entre 100g/L et 200 g/L dans le milieu réactionnel.

[0029] Les deux enzymes sont utilisées de manière séquentielle.

[0030] Dans un mode de réalisation, la première enzyme est une α-glucanotransféras e capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) et la deuxième enzyme est une α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6).

[0031] Dans un autre mode de réalisation, la première enzyme est une α-glucanotransféras e capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) et la deuxième enzyme est une α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3).

[0032] Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) est la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1. De manière préférée, il s'agit d'une protéine ayant au moins 91%, de manière encore plus préférée, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99%, au moins 99,5%, au moins 99,6%, au moins 99,7%, au moins 99,8%, au moins 99,9% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1. La séquence SEQ ID No :1 correspond au numéro d'accession Genbank WP_053069107.1.

[0033] Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques

α(1-3) est la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2. De manière préférée, il s'agit d'une protéine ayant au moins 91%, de manière encore plus préférée, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99%, au moins 99,5%, au moins 99,6%, au moins 99,7%, au moins 99,8%, au moins 99,9% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2. La séquence SEQ ID No :2 correspond au numéro d'accession Genbank AOR73699.1.

[0034] Selon un mode de réalisation de l'invention, chaque enzyme est ajoutée à une concentration comprise entre 0.01 et 1 mg/mL de milieu réactionnel, de préférence entre 0.05 et 0.5 mg/mL, de manière encore plus préférée environ 0.1 mg/mL de milieu réactionnel.

[0035] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de chaque enzyme est réalisée pendant une durée comprise entre 12 et 48 heures, de préférence environ 24 heures

[0036] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de chaque enzyme est réalisée à une température comprise entre 20 et 40°C, de préférence environ 37°C.

[0037] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de chaque enzyme est réalisée à un pH compris entre 5 et 6,5, de préférence entre 5,5 et 6, de manière encore plus préférée environ 5,75.

[0038] Selon un aspect, la présente invention porte également sur un mélange d'α-glucanes susceptible d'être obtenu par le procédé décrit ci-dessus.

[0039] Ce mélange d'α-glucanes est caractérisé par sa faible digestibilité selon la méthode AOAC 2002.02. De manière avantageuse, le procédé selon l'invention permet réduire d'un facteur d'au moins 2, de préférence d'au moins 2,5, de manière encore plus préférée d'au moins 3, la fraction hydrolysable, mesurée selon la méthode AOAC 2002.02, par rapport au substrat de départ.

[0040] La méthode AOAC 2002.02 peut notamment être mise en œuvre à l'aide du kit « resistant Starch, K-RSTAR 06/18 » commercialisé par la société Megazyme® tel que décrit dans l'Exemple 1, partie 6 ci-dessous.

[0041] Le procédé selon la présente invention permet d'augmenter la pourcentage de liaisons α(1-6) par un facteur d'au moins 3, de préférence au moins 3, de manière encore plus préférée d'au moins 4, par rapport au substrat de départ.

[0042] Le procédé selon la présente invention permet également de créer des liaisons α(1-3) qui étaient absentes dans le substrat de départ.

[0043] Le pourcentage de liaisons α(1-6) et α(1-3) est mesuré par la méthode Hakomori (1964 HAKOMORI A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide

Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide) tel que décrit dans l'exemple 1, partie 9 ci-dessous.

[0044] Selon un aspect, la présente invention concerne un mélange d'α-glucanes caractérisé en qu'il présente :

- un taux de fibres hydrolysables, inférieur à 45%,
- et/ou au moins 20% de liaisons α(1-6),
- et/ou au moins 3% de liaisons α(1-3),

dans lequel le taux de fibres correspond à la fraction hydrolysable (c'est-à-dire non résistante) selon la méthode AOAC 2002.02 et le pourcentage de liaisons α(1-6) et α(1-3) représente le pourcentage molaire de liaisons α(1-6) et α(1-3) respectivement par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques, mesuré par la méthode Hakomori.

[0045] De manière préférée, le taux de fibres hydrolysables est inférieur à 44%, de préférence inférieur à 43%en poids par rapport au poids total de matière sèche, de manière encore plus préférée inférieur à 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%.

[0046] De manière préférée, le pourcentage de liaisons α(1-6), est d'au moins 21%, de préférence au moins 22%, de manière encore plus préférée au moins 23%, au moins 24%, au moins 25%, au moins 26%, au moins 27%, au moins 28%, au moins 29%, au moins 30%, au moins 31%, au moins 32%, au moins 33%, au moins 34%, au moins 35% par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques.

[0047] De manière préférée, le pourcentage de liaisons α(1-3), est d'au moins 4%, de préférence au moins 4%, au moins 5%, au moins 6%, au moins 7%, au moins 8% par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques.

[0048] La présente invention porte également sur l'utilisation d'un mélange d'α-glucanes obtenu selon le procédé décrit ci-dessus et d'un mélange d'α-glucanes ayant les propriétés décrits ci-dessus pour la préparation d'aliments pour l'alimentation humaine ou animale.

[0049] Typiquement, le mélange d'α-glucanes selon l'invention peut être utilisé pour favoriser la santé intestinale, la gestion de la glycémie, la satiété et la gestion du poids, et la libération d'énergie soutenue.

[0050] Enfin, dans un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation séquentielle d'une glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) et d'une glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) pour diminuer la digestibilité d'un mélange d'α-glucanes. De manière préférée, ladite glucanotransférase a pour séquence SEQ ID No :1 ou au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1. De manière préférée, ladite

glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) a pour séquence SEQ ID No :1 ou au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1. De manière préférée, ladite glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) a pour séquence SEQ ID No :2 ou au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2.

[0051] De manière préférée, la diminution de la digestibilité est une diminution d'un facteur d'au moins 2, de préférence d'au moins 2,5, de manière encore plus préférée d'au moins 3 de la fraction hydrolysable, mesurée selon la méthode AOAC 2002.02.

[0052] L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent, lesquels se veulent illustratifs et non limitatifs.

[0053] **Exemple 1. : préparation de maltodextrines branchées à partir d'un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides : matériel et méthodes**

[0054] 1. Préparation d'une solution de substrat comprenant un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides

[0055] Le substrat de départ utilisé était un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides, présentant les caractéristiques décrites dans le Tableau 1 :

[0056] [Tableaux1]

| Critère | Sous-critère | Méthode de mesure | Unité | Valeur |
|---|---|---|---|---|
| Poids moléculaire | Mn (eq pullulan) | MCL1439 | Da | 1130 |
| Poids moléculaire | Mw (eq pullulan) | MCL1439 | Da | 9510 |
| Poids moléculaire | Indice de polydispersion | MCL1439 | | 8,4 |
| Distribution en glucides | DP1 | MCL190A | % relatif | 1,7 |
| Distribution en glucides | DP2 | MCL190A | % relatif | 5 |
| Distribution en glucides | DP3 | MCL190A | % relatif | 7,2 |
| Distribution en glucides | DP4 | MCL190E | % relatif | 5,6 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Distribution en glucides | DP5 | MCL190 E | % relatif | 6 |
| Distribution en glucides | DP6 | MCL190 E | % relatif | 7 |
| Distribution en glucides | DP7 | MCL190 E | % relatif | 6,1 |
| Distribution en glucides | DP8 | MCL190 E | % relatif | 4,3 |
| Distribution en glucides | DP9 | MCL190 E | % relatif | 3,1 |
| Distribution en glucides | DP10 to DP20 | MCL190 E | % relatif | 17,1 |
| Distribution en glucides | > DP20 | MCL190 E | % relatif | 37 |
| Sucres réducteurs | Equivalent Dextrose (DE) | MCL050 B | | 18,4 |
| Matière sèche | Perte de masse après séchage | MCL209 A | % | 4% |

[0057] Différentes solutions de substrat dans du tampon sodium acétate 50mM, pH 5.75 ont été préparées, à des concentrations de 100g/L, 200g/L ou 400g/L.

[0058] 2 . Production des enzymes recombinantes.

[0059] Les enzymes suivantes ont été produites de manière recombinante :

- Enzyme GT#11 : α-4,3 glucanotransférase de *Lactobacillus fermentum* NC2970 ayant pour séquence en acide aminés la séquence répertoriée dans Genbank sous la référence AOR73699.1
- Enzyme GT#19 : glycosyl hydrolase GH70 de *Lactobacillus mucosae* ayant pour séquence en acide aminés la séquence répertoriée dans Genbank sous la référence WP_053069107.1.

[0060] Des cellules de E. coli BL21 star contenant le plasmide pET-21a-enzyme n°X (afin de produire différentes enzymes, dont GT#11 et GT#19) ont été cultivées dans un milieu ZYM-50524 contenant 1% de glycérol et 1% de lactose. En fin de culture, les cellules ont été centrifugées à 6500g pendant 10 min, les culots cellulaires remis en suspension à une DO600 nm de 80 dans un tampon phosphate 20mM pH7.4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole, et les cellules lysées par sonication à froid

grâce à 4 cycles de 20 secondes à 30 % d'amplitude suivi de 4 minutes de repos. Les débris cellulaires ont été séparés des protéines solubilisées par centrifugation pendant 30 minutes à 10000 g.

[0061] 3 Purification des enzymes

[0062] La purification des protéines d'intérêt a été réalisée sur résine Cobalt (Invitrogen) chargée en ions cobalt divalent (CO 2+), pour lesquels l'étiquette polyhistidine présente une affinité. L'élution a été réalisée en créant une compétition entre l'étiquette polyhistidine et des concentrations croissantes d'imidazole. Brièvement, 10 à 35 mL d'extrait cellulaire d'E. coli ont été mis en contact pendant 1 heure avec 1 mL de résine de Cobalt préalablement équilibrée avec 25mL tampon Phosphate 20mM pH7.4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole. La filtration de la résine sur fritté permet l'élimination de l'ensemble des protéines non fixées. La résine a ensuite été lavée 5 fois avec 40 mL de tampon Phosphate 20mM pH7,4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole. Enfin, l'élution a été réalisée avec 3 mL de tampon Phosphate 20mM pH7,4 contenant 300 mM de NaCl et 250 mM d'imidazole pendant 5 minutes afin de décrocher les enzymes d'intérêt. Les solutions enzymatiques ont alors été dialysées (membrane sigma 10 kDa) contre 5 L de tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5.75 contenant 150 Mm de NaCl (overnight, 4°C sous agitation) afin d'éliminer le NaCl et l'imidazole. Le dosage des différentes solutions protéiques a été réalisé en mesurant leur absorbance à 280 nm grâce à un nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermofisher). Les coefficients d'extinction moléculaire ε ont été déterminés grâce à l'application ProtParam tool du site ExPASy bioinformatics resource portal.

[0063] Une électrophorèse en conditions dénaturantes a permis de contrôler la qualité des extraits enzymatiques purifiés. Pour cela, des échantillons contenant 30µL d'extrait protéique et 10 µL du tampon de charge (NuPage LDS Sample buffer 4x, Invitrogen) ont été dénaturés pendant 5 minutes à 95°C puis déposés sur des gels d'acrylamide pré-coulés (Mini-Protean Tris-Glycine eXtented (Biorad)). La migration a été réalisée pendant 30 min dans du tampon Tris/Glycine/SDS 1x sous une tension de 150 V. Les protéines ont ensuite été révélées par incubation des gels pendant 1 heure dans une solution de coloration (PageBlue Protein Staining Solution, Fermentas) puis par rinçage pendant 30 min dans trois bains consécutifs d'eau.

[0064] 4 . Mesures de l'activité des enzymes de branchement

[0065] L'activité enzymatique des enzymes de branchement a été déterminée en mesurant la vitesse initiale de production des sucres réducteurs à l'aide de la méthode à l'acide dinitrosalicilique (DNS). Une unité enzymatique représente la quantité d'enzyme qui libère une µmole de fructose par minute, à 30 °C, pour une concentration initiale de saccharose de 100 g.L-1 dans les conditions de tampon d'activité adéquate. Au cours

d'une cinétique d'1 mL de volume, 100 µL de milieu réactionnel ont été prélevés et la réaction stoppée par ajout d'un volume équivalent de DNS. Les échantillons ont ensuite été chauffés 5 min à 95 °C, refroidis dans la glace, dilués au demi dans de l'eau, et l'absorbance a été lue à 540 nm. Une gamme étalon de 0 à 2 g.L-1 de fructose permet d'établir le lien entre la valeur d'absorbance et la concentration en sucres réducteurs.

[0066] 5 . Réactions enzymatiques

[0067] Les réactions ont été réalisées avec 0.1 mg/mL d'enzyme purifiée et dialysée en présence de 10%, 20% ou 40% de substrat dans du tampon sodium acétate 50 mM, pH 5.75. Les réactions ont été incubées sous agitation pendant 24 h à 20°C ou 37°C. Les réactions ont été arrêtées par chauffage (95°C pendant 5 minutes). Des prélèvements aux temps initiaux et finaux ont été réalisés pour analyser la spécificité des enzymes en utilisant différentes techniques analytiques (HPAEC-PAD, RMN et HPSEC).

[0068] 6 . Test de digestibilité

[0069] Les réactions de transfert ont été lyophilisées après congélation à -80°C pendant 24 heures. 25 mg de produits lyophilisés ont été repris dans 1 mL de tampon de maléate de sodium 100mM contenant 30 U d'α-amylase pancréatique et 3 U d'amyloglucosidase (kit resistant Starch, Megazyme K-STAR 06/18, qui met en œuvre la méthode AOAC 2002.02). Les réactions ont été incubées pendant 16 heures à 37°C. Les produits ont été dilués dans l'eau avant analyse HPAEC PAD

[0070] 7 . Analyses chromatographiques

[0071] Les produits obtenus ont été analysés par chromatographie d'exchange d'anions couplée à un détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC PAD - High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Ampero-metric Detection). Les analyses ont été réalisées sur un système Thermo ICS6000 équipé d'une colonne CarboPacTM PA100 analytical column (2 mm x 250 mm) couplée avec une pré-colonne CarboPacTM PA100 guard (2 mm x 50 mm). Un gradient d'acétate de sodium dans 150 mM de soude a été appliqué à un débit de 0,250 ml.min-1 selon le profil suivant : 0–5 min, 0 mM ; 5–35 min, 0–300 mM ; 35–40 min, 300–450 mM ; 40-42 min, 450 mM. La détection a été réalisée grâce à une électrode de travail en or et une cellule de référence pH Ag/AgCl. Les échantillons ont été dilués à une masse sèche totale de 1 g.L-1 avant injection. La taille des produits de réaction a également été parfois déterminée par Chromatographie d'exclusion de taille (high performance size exclusion chromatography) sur un système Fisher Ultimate 3000 équipé d'une colonne Shodex OH-Pak SB-802.5 protégée par une pré-colonne Shodex OH-Pak SB-G guard column, placée à 70°C dans le four du système. La phase mobile était de l'eau à un débit de 0.3 mL.min-1 . La détection a été réalisée par réfractométrie. Les échantillons ont été dilués à une masse sèche totale de 20 g.L-1 avant injection.

[0072] 8 . RMN.

[0073] Les spectres $^{1}H$, $^{13}C$ et HSQC ont été enregistrés sur un équipement Bruker Avance 500MHz à 298K avec une sonde 5 mm z-gradient TBI. Les données ont été acquises et traitées grâce au logiciel TopSpin 3.

[0074] 9. Méthode Hak o mori

[0075] La méthode Hakomori (1964 HAKOMORI A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide) permet de caractériser chimiquement les liaisons osidiques en différenciant les groupements OH libres et les groupements liés. Il s'agit d'une méthode destructrice comprenant les étapes de méthylation, hydrolyse, réduction avec $NaBD_4$ , acétylation et analyse par spectrométrie de masse.

[0076] **Exemple 2 . : utilisation séparée des enzymes GT#11 et GT#19**

[0077] Dans cet exemple, l'action des enzymes GT#11 et GT#19 a été testée séparément.

[0078] Les résultats des différentes réactions enzymatiques sont présentés dans le Tableau 2 ci-dessous, qui présente les pourcentages de liaisons α-1,6 ; α-1,3 et α-1,4 mesurés par RMN du proton ou par la méthode Hakomori et % d'hydrolyse (AOAC 2002.02) dans les produits de réaction obtenus.

[0079] [Tableaux2]

| | | RMN | | | | HAKOMORI | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Enzyme | Concentration g/l | α-1,2 | α-1,3 | α-1,4 | α-1,6 | α-1,2 | α-1,3 | α-1,4 | α-1,6 | %hydrolyse (AOAC 2002.02) |
| / | 100 | 0% | 0% | 95% | 5% | | | | | 88% |
| / | 200 | 0% | 0% | 95% | 5% | | | | | 94% |
| / | 400 | 0% | 0% | 95% | 5% | | | | | 86% |
| GT#11 | 100 | 0% | 17% | 72% | 11% | 2% | 8% | 78% | 12% | 58% |
| GT#11 | 200 | 0% | 15% | 76% | 9% | 3% | 8% | 77% | 12% | 68% |
| GT#11 | 400 | 0% | 14% | 78% | 8% | 2% | 5% | 84% | 10% | 96% |
| GT#19 | 100 | 0% | 0% | 65% | 35% | 1% | 3% | 66% | 30% | 46% |
| GT#19 | 200 | 0% | 0% | 69% | 31% | 6% | 6% | 62% | 26% | 55% |
| GT#19 | 400 | 0% | 0% | 73% | 27% | 2% | 3% | 75% | 20% | 63% |

[0080] Les inventeurs ont constaté que l'enzyme GT#11 était capable de diminuer le pourcentage de liaisons linéaires α-1,4 et d'augmenter le pourcentage de liaisons dites « branchées » α-1,3 et α-1,6.

[0081] L'enzyme GT#19 était quant à elle capable de diminuer le pourcentage de liaisons linéaires α-1,4 et d'augmenter nettement le pourcentage de liaisons dites « branchées » α-1,6.

[0082] Dans les deux cas, une augmentation de la résistance à la digestion (reflétée par une diminution du taux d'hydrolyse) a été observée. Toutefois, les produits obtenus ne sont pas suffisamment résistants pour être considérés comme des fibres.

[0083] **Exemple 3. : utilisation simultanée des enzymes GT#11 et GT#19**

[0084] Dans cet exemple, les inventeurs ont étudié l'action combinée des deux enzymes GT#11 et GT#19.

[0085] Les deux exemples ont donc été ajoutées simultanément au mélange réactionnel, dans les différentes proportions mentionnées dans la colonne de gauche du Tableau 3.

[0086] Les résultats des différentes réactions enzymatiques sont présentés dans le Tableau 3 ci-dessous, qui présente les pourcentages de liaisons α-1,6 ; α-1,3 et α-1,4 mesurés par RMN du proton ou par la méthode Hakomori et % d'hydrolyse (AOAC 2002.02) dans les produits de réaction obtenus.

[0087] [Tableaux3]

| | | RMN | | | | HAKOMORI | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Enzyme | Concentration g/l | α-1,2 | α-1,3 | α-1,4 | α-1,6 | α-1,2 | α-1,3 | α-1,4 | α-1,6 | %hydrolyse (AOAC 2002.02) |
| 1/2 GT#11 + 1/2 GT#19 | 200 | 0% | 0% | 64% | 36% | 2% | 5% | 65% | 28% | 55% |
| 3/4 GT#11 + 1/4 GT#19 | 200 | 0% | 7% | 65% | 28% | 2% | 4% | 67% | 27% | 52% |
| 1/4 GT#11 + 3/4 GT#19 | 200 | 0% | 0% | 66% | 34% | 1% | 4% | 64% | 31% | 57% |

[0088] Les inventeurs ont constaté que l'action simultanée des enzymes GT#11 et GT#19 résultait en une diminution du pourcentage de liaisons linéaires α-1,4 et une augmentation du pourcentage de liaisons dites « branchées » α-1,3 et α-1,6. Les résultats obtenus sont équivalents, voire un peu moins bons que l'utilisation de GT19 seule sur 200 g/l de substrat.

[0089] Cette modification du profil de liaisons résulte en une augmentation de la résistance à la digestion (reflétée par une diminution du taux d'hydrolyse) a été observée.

Toutefois, les produits obtenus ne sont pas suffisamment résistants (<40% d'hydrolyse selon la méthode AOAC2002.02) pour être considérés comme des fibres.

[0090] **Exemple 4 . : utilisation séquentielle des enzymes GT#11 et GT#19**

[0091] Dans cet exemple, les inventeurs ont étudié l'action séquentielle des deux enzymes GT#11 et GT#19.

[0092] La cascade enzymatique représente une bonne stratégie pour augmenter la résistance des produits aux enzymes hydrolytiques et atteindre un niveau de digestibilité inférieur à 40%.

[0093] Dans le cadre de la cascade enzymatique, les enzymes sont utilisées l'une après l'autre. Deux configurations différentes alternant les deux α-GT ont été étudiées :

[0094] - Le Glucidex 19D est mis en solution à 200 g.L-1, la première α-GT est mise en réaction à une concentration de 0,05 mg.mL-1pendant 24h. La réaction est arrêtée par chauffage pendant 5 minutes à 95°C. la seconde enzyme est alors mise en réaction à la même concentration de 0,05 mg.ml-1. La réaction est de nouveau stoppée par chauffage pendant 5 minutes à 95°C après 24 h d'incubation.

[0095] - Le Glucidex 19D est mis en réaction à 100 g.L-1, première α-GT est mise en réaction à une concentration de 0,05 mg.mL-1 pendant 24h. La réaction est arrêtée par chauffage pendant 5 minutes à 95°C. Le milieu réactionnel est supplémenté de 100 g.L-1 de Glucidex 19D et la seconde enzyme est alors mise en réaction à la même concentration de 0,05 mg.mL-1. La réaction est de nouveau stoppée par chauffage pendant 5 minutes à 95°C après 24 h d'incubation.

[0096] Ces différentes stratégies permettent de mettre à profit la spécificité α-4,3 glucanotransférase de l'α-GT n°11 et favorisent son action par rapport à celle de l'α-GT n°19. En effet, un taux de liaisons α-1,3 non négligeable peut être atteint en sus du taux de liaisons α-1,6 (Tableau 4).

[0097] Les inventeurs ont observé que des taux de liaisons α-1,4 inférieurs ou égaux à 50 % sont obtenus dans ces conditions et que les trois types de liaisons osidiques (α-1,6 ; α-1,3 et α-1,4) sont représentés dans le produit final

[0098] Les résultats des différentes réactions enzymatiques sont présentés dans le Tableau 4 ci-dessous, qui présente les pourcentages de liaisons α-1,6 ; α-1,3 et α-1,4 mesurés par RMN du proton ou par la méthode Hakomori et % d'hydrolyse (AOAC 2002.02) dans les produits de réaction obtenus.

[0099] [Tableaux4]

| | | RMN | | | | HAKOMORI | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Enzyme | Concentration g/l | α-1,2 | α-1,3 | α-1,4 | α-1,6 | α-1,2 | α-1,3 | α-1,4 | α-1,6 | %hydrolyse (AOAC 2002.02) |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GT#11 puis GT #19 | 100+100 | 0% | 16% | 50% | 35% | 2% | 7% | 62% | 29% | 39% |
| GT#19 puis GT #11 | 100+100 | 0% | 13% | 44% | 43% | 3% | 5% | 55% | 36% | 39% |
| GT#11 puis GT #19 | 200 | 0% | 18% | 51% | 32% | 2% | 8% | 64% | 26% | 36% |
| GT#19 puis GT #11 | 200 | 0% | 14% | 42% | 44% | 2% | 5% | 57% | 36% | 37% |

[0100] Ainsi, les inventeurs ont mis en évidence que l'utilisation séquentielle des deux enzymes, quel que soit l'ordre de cette séquence, et avec ou sans ajout de substrat entre les deux réactions, permettait d'obtenir des produits présentant une hydrolyse inférieure à 40%. En d'autres termes, l'utilisation séquentielle des α-glucanotransféras e GT#11 et GT#19 a permis d'obtenir des fibres solubles à partir d'un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides présentant un DE de 19.

[0101] **Exemple 5 . : utilisation séquentielle des enzymes GT#11 et GT#19 à grande échelle**

[0102] Dans cet exemple, les inventeurs ont réalisé une augmentation d'échelle afin de produite 1 g de fibres au lieu des 50mg produits dans les exemples précédents) : 15 ml de Glucidex 19D à 200 g.L-1 ont subi une réaction en cascade mettant en jeu en premier temps l'α-GT n°11 pendant 24 heures suivi de l'α-GT n°19 pendant 24 heures. Chaque enzyme a été utilisée à 0,1 mg.mL-1. La même répartition en type de liaisons est obtenue par rapport à l'essai équivalent en plus petit volume de l'exemple 4 (Tableau 5):

[0103] [Tableaux5]

| | | RMN | | | | HAKOMORI | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Enzyme | Concentration g/l | α-1 ,2 | α-1 ,3 | α-1 ,4 | α-1 ,6 | α-1 ,2 | α-1 ,3 | α-1 ,4 | α-1 ,6 |
| GT#11puis GT#19 | 200 | 0% | 18% | 56% | 26% | 2% | 8% | 68% | 22% |

# Revendications

[Revendication 1] Procédé de préparation d'un mélange de maltodextrines branchées comprenant les étapes suivantes :
- la fourniture d'un substrat, ledit substrat étant un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides ayant un indice de polydispersion compris entre 5 et 10, de préférence entre 6 et 9,5, de manière encore plus préférée entre 7 et 9, entre 8 et 8,5,de manière préférée entre toutes environ 8,4.,
- une première incubation en présence d'une première enzyme,
- une deuxième incubation avec une deuxième enzyme,
lesdites première et deuxième enzymes étant une α-glucanotransféras e capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) et une α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6).

[Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, dans lequel le substrat comprend :
- entre 40 et 50% d'oligosaccharides ayant un degré de polymérisation (DP) entre 1 et 9 ,
- entre 15 et 20% de polysaccharides ayant un DP entre 10 et 20,
- entre 35 et 40% de polysaccharides ayant un DP supérieur à 20,
les pourcentages étant exprimés en pourcentages relatifs en moles, et le total faisant 100%

[Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le substrat a un équivalent dextrose (DE) compris entre 18 et 20, de préférence entre 18 et 19, de manière encore plus préférée environ 18,4.

[Revendication 4] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le substrat est introduit à une concentration comprise entre 50 g/L et 500 g/L, de préférence entre 100g/L et 200 g/L de milieu réactionnel.

[Revendication 5] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel du substrat est ajouté entre les première et deuxième incubations.

[Revendication 6] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la première enzyme est une α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) et la deuxième enzyme est une α-

glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6).

[Revendication 7] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la première enzyme est une α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) et la deuxième enzyme est une α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3).

[Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) est la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1.

[Revendication 9] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) est la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2.

[Revendication 10] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel chaque enzyme est à une concentration comprise entre 0.01 et 1 mg/mL de milieu réactionnel, de préférence entre 0.05 et 0.5 mg/mL, de manière encore plus préférée environ 0.1 mg/mL de milieu réactionnel.

[Revendication 11] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que chaque incubation est réalisée pendant une durée comprise entre 12 et 48 heures, de préférence environ 24 heures et/ou à une température comprise entre 20 et 40°C, de préférence environ 37°C et/ou à un pH compris entre 5 et 6,5, de préférence environ 5,75.

[Revendication 12] Mélange de maltodextrines branchées susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

[Revendication 13] Mélange de maltodextrines branchées caractérisé en ce qu'il présente :

- un taux de fibres inférieur à 45%, en poids par rapport au poids total de matière sèche,

- au moins 20% de liaisons α(1-6) par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques, et- au moins 3% de liaisons α(1-3) par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques.

[Revendication 14] Utilisation d'un mélange de maltodextrines branchées selon l'une quelconque des revendications 12 ou 13 pour la préparation d'aliments pour l'alimentation humaine ou animale.

[Revendication 15] Utilisation séquentielle d'une glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) et d'une glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) pour diminuer la digestibilité d'un mélange d'α-glucans, lesdites glucanotransférases ayant respectivement pour séquence SEQ ID No :1 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1 et SEQ ID No :2 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2.

## Sequence de nucléotide

SEQUENCE LISTING <110> Roquette Frčres <120> Procédé d'obtention de fibres solubles par voie enzymatique <130> B2121027FR and B2121028FR <160> 2 <170> PatentIn version 3.5 <210> 1 <211> 881 <212> PRT <213> lactobacillus mucosae <400> 1 Met Lys Asn Leu Val Ala Lys Pro Gln Gly Asn Gln Leu Asn Ile Tyr 1 5 10 15 Asn Gly Asn Thr Val Leu Lys Thr Leu Gly Pro Gly Thr Trp Glu Asn 20 25 30 Met Ala Phe Ala Gln Asp Ser Ser Ala Ile Asn Asn Ile Asn Gly Tyr 35 40 45 Leu Ser Tyr Thr Gly Trp Tyr Arg Pro Tyr Gly Thr Ser Gln Asp Gly 50 55 60 Lys Thr Trp Tyr Gln Thr Thr Ala Met Asp Trp Arg Pro Leu Leu Met 65 70 75 80 Tyr Thr Trp Pro Ser Lys Asp Val Gln Ala Gln Phe Ile Lys Tyr Phe 85 90 95 Val Asn His Gly Tyr Glu Asn Ala Asn Tyr Gly Leu Thr Lys Val Ser 100 105 110 Val Ala Asn Leu Asn Lys Asp Thr Asp Ala Thr Val Leu Asn Thr Ala 115 120 125 Ala Gln Asn Leu Arg Tyr Val Ile Glu Gln Ser Ile Ala Thr Asn Lys 130 135 140 Gly Thr Gly Lys Leu Ala Asn Asp Ile Asn Gly Phe Ala Ala Thr Val 145 150 155 160 Pro Glu Leu Ser Ala Ser Ser Glu Leu Ser Leu Gln Ser Met Pro Asn 165 170 175 Tyr Lys Pro Asp Glu Ser Gly Thr Val Asp Ser Asp Gln Val Ile Phe 180 185 190 Val Asn Asn Asp Ser Lys Asp Gln Arg Arg Gly Asn Thr Ser Tyr Ala 195 200 205 Asp Ser Lys Tyr Arg Leu Met Asn Arg Thr Ile Asn Asn Gln Thr Gly 210 215 220 Asn Asp Asn Ser Asp Asn Ser Pro Glu Leu Leu Val Gly Asn Asp Ile 225 230 235 240 Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Asn Leu Asn Trp Glu Tyr 245 250 255 Phe Leu Leu Asn Tyr Gly Lys Leu Met Gly Tyr Asn Gln Asp Gly Asn 260 265 270 Phe Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Asp Asn Ile Asn Ala Asp Val 275 280 285 Leu Asp Gln Met Gly Gln Leu Met Asn Asp Met Tyr His Met Lys Gly 290 295 300 Asn Pro Gln Asn Ala Asn Asn His Leu Ser Tyr Asn Glu Gly Tyr His 305 310 315 320 Ser Gly Ala Ala Gln Met Leu Asn Glu Lys Gly Asn Pro Gln Leu Tyr 325 330 335 Met Asp Ser Gly Glu Phe Tyr Thr Leu Glu Asn Val Leu Gly Arg Ala 340 345 350 Asn Asn Arg Asp Asn Ile Ser Asp Leu Val Thr Asn Ser Ile Val Asn 355 360 365 Arg Gln Asn Asp Val Thr Glu Asn Glu Ala Thr Pro Asn Trp Ser Phe 370 375 380 Val Thr Asn His Asp Gln Arg Lys Asn Leu Ile Asn Arg Leu Ile Ile 385 390 395 400 Lys Asp His Pro Gly Ile Ala Tyr Ile Met Gly Ser Ala Tyr Lys Ala 405 410 415 Glu Tyr Ala Asn Gln Ala Trp Gln Glu Phe Tyr Ala Asp Gln Lys Lys 420 425 430 Thr Asp Lys Gln Tyr Ala Gln Tyr Asn Val Pro Ala Gln Tyr Ala Ile 435 440 445 Leu Leu Ser Asn Lys Asp Thr Val Pro Gln Ile Tyr Tyr Gly Asp Leu 450 455 460 Tyr Asn Glu Thr Ala Gln Tyr Met Gln Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Asp 465 470 475 480 Ala Ile Thr Thr Leu Met Lys Ala Arg Lys Gln Phe Val Ser Gly Gly 485 490 495 Gln Thr Met Thr Lys Leu Ser Asp Asn Leu Ile Ala Ser Val Arg Tyr 500 505 510 Gly Lys Gly Val Ala Asn Ala Asn Ser Glu Gly Thr Asp Ser Leu Ser 515 520 525 Arg Thr Ser Gly Met Ala Val Ile Val Gly Asn Asn Pro Gln Met Ala 530 535 540 Glu Gln Thr Ile Ser Ile Asn Met Gly Arg Ala His Ala Asn Glu Gln 545 550 555 560 Tyr Arg Asn Leu Leu Asp Thr Thr Asp Asn Gly Leu Thr Tyr Asn Ala 565 570 575 Asp Gly Ala Glu Asn Pro Glu Thr Leu Thr Thr Asp Asp Asn Gly Ile 580 585 590 Leu Lys Val Thr Val Lys Gly Tyr Ser Asn Pro Tyr Val Ser Gly Tyr 595 600 605 Leu Gly Val Trp Val Pro Val Val Ser Gly Asn Gln Asp Val Thr Thr 610 615 620 Asn Ala Ala Thr Val Ser Ala Asp Ser Asn Lys Ile Phe Glu Ser Asn 625 630 635 640 Ala Ala Leu Asp Ser His Met Ile Tyr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Gln 645 650 655 Pro Glu Pro Thr Ser Thr Glu Asn His Ala Tyr Asn Ile Ile Ala Gln 660 665 670 Asn Ala Glu Leu Phe Asn Asn Leu Gly Ile Thr Asp Phe Trp Met Ala 675 680 685 Pro Ala Tyr Thr Pro Phe Gly Met Ser Arg Tyr Asn Glu Gly Tyr Ser 690 695 700 Met Thr Asp Arg Tyr Asn Leu Gly Thr Asn Ala Asn Pro Thr Lys Tyr 705 710 715 720 Gly Ser Gly Glu Glu Leu Ala Asn Ala Ile Ala Ala Leu His Ser Ala 725 730 735 Gly Leu Lys Val Gln Glu Asp Ile Val Met Asn Gln Met Ile Gly Phe 740 745 750 Ser Gly Gln Glu Ala Val Thr Val Thr Arg Thr Asp Asp Arg Gly Met 755 760 765 Gln Ile Tyr Val Asn Gly Lys Thr Tyr Ala Asn Gln Ile Tyr Phe Ala 770 775 780 Tyr Thr Thr Gly Gly Gly Asn Gly Gln Glu Thr Tyr Gly Gly Lys Tyr 785 790 795 800 Leu Ser Glu Leu Gln Ser Lys Tyr Pro Asp Leu Phe Thr Thr Lys Ala 805 810 815 Ile Ser Thr Gly Val Ala Pro Asp Pro Thr Thr His Ile Thr Lys Trp 820 825 830 Ser Ala Lys Tyr Glu Asn Gly Thr Ser Leu Gln Asn Ile Gly Ile Gly 835 840 845 Leu Ala Val Lys Leu Pro Asn Gly Glu Tyr Ala Tyr Leu Arg Ser Ser 850 855 860 Asp Asn Lys Ser Phe Asn Thr Leu Leu Pro Ser Glu Ile Ser Val Lys 865 870 875 880 Leu <210> 2 <211> 1593 <212> PRT <213> Lactobacillus fermentum <400> 2 Met Glu Phe Lys Lys His Phe Lys Leu Tyr Lys Ser Gly Lys Gln Trp 1 5 10 15 Cys Ile Ala Ala Val Val Thr Phe Thr Ala Thr Leu Gly Leu Val Ala 20 25 30 Gly Asn Thr Thr Val Asn Ala Asp Thr Leu Thr Thr Gly Gly Ser Thr 35 40 45 Pro Gln Ala Gln Val Asn Gln Glu Lys Gly Ile Thr Asn Thr Ser Gln 50 55 60 Pro Ala Ser Asp Gln Gly Lys Thr Ser Asn Thr Gly Asp Val Arg Asn 65 70 75 80 Thr Val Pro Gln Pro Asn Asn Ser Asp Lys Thr Asn Gln Tyr Gln Ala 85 90 95 Asp Thr Leu Thr Thr Gly Gly Ser Thr Pro Gln Ala Gln Val Asn Gln 100 105 110 Glu Lys Gly Ile Thr Asn Thr Ser Gln Pro Ala Ser Asp Gln Gly Lys 115 120 125 Thr Ser Asn Thr Gly Asp Val Arg Asn Thr Val Pro Gln Pro Asn Asn 130 135 140 Ser Gly Lys Thr Asn

Gln Ser Gln Asn Gly Gln Asp Gln Lys Glu Ser 145 150 155 160 Ala Gly Asn Asp Asn Gly Ser Thr Gly Asn Asn Asp Gln Asn Lys Gly 165 170 175 Gln Gln Thr Thr Asp Trp Gln Lys Asn Ala Asn Asn Gln Trp Val Tyr 180 185 190 Asn Gly Lys Thr Asp Gln Asp Leu Lys Gly Thr Gln Tyr Val Gln Leu 195 200 205 Pro Thr Ile Pro Asp Thr Asn Val Gln Gly Asn Thr Asn Trp Tyr Phe 210 215 220 Val Lys Asp Gly Ile Ala Gln Ser Gly Val Gln Gln Trp Ala Gly Thr 225 230 235 240 Tyr Tyr Tyr Phe Asp Pro Thr Thr Tyr Leu Arg Val Asp Asn Asp Tyr 245 250 255 Arg Gln Ser Gln Trp Gly Asp Trp Tyr Leu Phe Gly Asn Asp Gly Arg 260 265 270 Ile Leu Ser Gly Val Gln Gln Trp Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp 275 280 285 Pro Thr Thr Tyr Leu Arg Val Asp Asp Asp Tyr Val Thr Ser Gln Trp 290 295 300 Gly Leu Lys Tyr Met Phe Gly Lys Asp Gly Arg Ile Ala Thr Gly Leu 305 310 315 320 Tyr Lys Trp Asp Lys Asn Asn Gln Trp Tyr Tyr Phe Asn Pro Thr Thr 325 330 335 Tyr Leu Ala Val Thr Asn Asn Tyr Ile Gln Ala Asn Asp Gly His Trp 340 345 350 Tyr Leu Phe Thr Ala Asp Gly Thr Ala Ala Ser Arg Val Ala Lys Trp 355 360 365 Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Pro Gln Thr His Leu Arg Val Asp 370 375 380 Asp Asn Tyr Val Gln Ser Gln Trp Gly Asp Trp Tyr Met Phe Gly Lys 385 390 395 400 Asp Gly Arg Ile Ala Thr Gly Leu Tyr Lys Trp Asp Lys Asn Asn Gln 405 410 415 Trp Tyr Tyr Phe Asp Pro Thr Thr Tyr Leu Ala Val Thr Asn Asn Tyr 420 425 430 Ile Gln Ala Asn Asp Gly His Trp Tyr Leu Phe Thr Ala Asp Gly Thr 435 440 445 Ala Ala Ser Arg Val Ala Lys Trp Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp 450 455 460 Pro Val Thr His Leu Arg Val Asp Asn Asn Tyr Val Gln Ser Gln Trp 465 470 475 480 Gly Asp Trp Tyr Leu Phe Gly Asn Asp Gly Arg Ile Leu Ser Gly Val 485 490 495 Gln Gln Trp Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Pro Thr Thr Tyr Leu 500 505 510 Arg Val Asp Asp Asp Tyr Val Thr Ser Gln Trp Gly Leu Lys Tyr Met 515 520 525 Phe Gly Lys Asp Gly Arg Ile Ala Thr Gly Leu Tyr Lys Trp Asp Lys 530 535 540 Asn Asn Gln Trp Tyr Tyr Phe Asp Pro Thr Thr Tyr Leu Ala Val Thr 545 550 555 560 Asn Asn Tyr Ile Gln Ala Asn Asp Gly His Trp Tyr Leu Phe Thr Ala 565 570 575 Asp Gly Thr Ala Ala Ser Arg Val Ala Lys Trp Ala Gly Thr Tyr Tyr 580 585 590 Tyr Phe Asp Pro Gln Thr His Leu Arg Val Asp Asp Asn Tyr Val Gln 595 600 605 Ser Gln Trp Gly Asp Trp Tyr Met Phe Gly Lys Asp Gly Arg Ile Ala 610 615 620 Thr Gly Leu Tyr Lys Trp Asp Lys Asn Asn Gln Trp Tyr Tyr Phe Asp 625 630 635 640 Pro Val Thr Tyr Leu Lys Val Thr Asn Lys Trp Val Asp Gly Asn Tyr 645 650 655 Tyr Asp Glu Asp Gly Ala Gln Ala Ile Ser Lys Leu Val Thr Ile Asn 660 665 670 Asn Arg Leu Tyr Tyr Phe Asp Asp Gln Gly Lys Glu Ile Ser Asn Gln 675 680 685 Phe Arg Thr Ile His Gly Asp Lys Tyr Tyr Phe Gly Asn Asp Ser Ala 690 695 700 Ala Val Thr Gly Gln Gln Thr Ile Asp Gly Lys Val Tyr Lys Phe Ser 705 710 715 720 Asn Tyr Gly Tyr Leu Leu Gly Asn Arg Tyr Gly Lys Ile Glu Asn Gly 725 730 735 Lys Leu Asn Ile Tyr Ser Leu Ala Asp His Ser Leu Ile Lys Thr Val 740 745 750 Glu Ala Gly Pro Trp Glu Asn Met Ala Tyr Ser Met Asp Ser Asn Ser 755 760 765 Ile Asn Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Trp Tyr Arg Pro 770 775 780 Tyr Gly Thr Ser Gln Asp Gly Lys Thr Trp Tyr Pro Thr Thr Val Ala 785 790 795 800 Asp Trp Arg Pro Ile Leu Met Tyr Val Trp Pro Ser Lys Asp Val Gln 805 810 815 Val Lys Phe Ile Gln Tyr Phe Val Asn His Gly Tyr Glu Asn Ser Asn 820 825 830 Tyr Gly Leu Thr Ala Gly Ser Val Lys Asp Leu Ser Glu Asn Thr Ala 835 840 845 Ser Ile Asn Leu Asn Glu Val Ala Gln Asn Leu Arg Tyr Val Ile Glu 850 855 860 Gln His Ile Val Ala Ala Lys Ser Thr Ser Gln Leu Ala Asn Asp Ile 865 870 875 880 Asn Asn Phe Ile Thr Thr Ile Pro Glu Leu Ser Ala Ser Ser Glu Leu 885 890 895 Pro Asp Glu Ser Gly Ser Gly Gln Val Ile Phe Val Asn Asn Asp Asn 900 905 910 Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Lys Tyr Arg Leu Met Asn Arg Thr Val Asn 915 920 925 Asn Gln Thr Gly Asn Asp Asn Ser Asp Tyr Cys Pro Glu Phe Val Val 930 935 940 Gly Asn Asp Ile Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Asn Leu 945 950 955 960 Asn Trp Glu Tyr Phe Leu Leu Asn Tyr Gly Lys Leu Met Gly Tyr Asn 965 970 975 Gln Asp Gly Asn Phe Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Asp Asp Met 980 985 990 Asp Ala Asp Val Leu Asp Gln Ile Gly Gln Leu Met Asn Asp Met Tyr 995 1000 1005 His Met Lys Gly Asn Pro Gln Asn Ala Asn Asn His Leu Ser Tyr 1010 1015 1020 Asn Glu Gly Tyr Gly Pro Gly Ala Ala Arg Met Leu Asn Lys Lys 1025 1030 1035 Gly Asn Pro Gln Leu Phe Met Asp Ala Arg Glu Cys Asn Thr Leu 1040 1045 1050 Glu Asn Val Leu Gly Arg Ala Asn Asn Arg Asp Thr Ile Ser His 1055 1060 1065 Leu Val Thr Asp Ser Ile Val Asn Arg Gln Asn Asp Val Thr Glu 1070 1075 1080 Asn Glu Ala Thr Pro Asn Trp Ser Tyr Val Thr Asn His Asp Ile 1085 1090 1095 Arg Asn Asn Leu Ile Asn Gly Leu Ile Ile Lys Asp His Pro Gly 1100 1105 1110 Met Gly Ser Ala Tyr Lys Ala Glu Tyr Ala Asn Gln Ala Trp Gln 1115 1120 1125 Glu Phe Tyr Ala Asp Gln Lys Lys Thr Asp Lys Gln Tyr Ala Gln 1130 1135 1140 Tyr Asn Val Pro Ala Gln Tyr Ala Ile Leu Leu Ser Asn Lys Asp 1145 1150 1155 Thr Val Pro Gln Ile Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Asn Glu Thr Ala 1160 1165 1170 Gln Tyr Met Gln Glu Lys Ser Ile Tyr Tyr Asp Ala Ile Thr Thr 1175 1180 1185 Leu Met Lys Ala Arg Lys Gln Phe Val Ser Gly Gly Gln Thr Met 1190 1195 1200 Thr Lys Leu Ser Asp Asn Leu Ile Ala Ser Val Arg Tyr Gly Lys 1205 1210 1215 Gly Val Ala Asn Ala Asn Ser Glu Gly Thr Asp Ser Leu Ser Arg 1220 1225 1230 Thr Ser Gly Met Ala Val Ile Val Gly Asn Asn Pro Gln Met Ala 1235 1240 1245 Glu Gln Thr Ile Ser Ile Asn Met Gly Arg Ala His Ala Asn Glu

1250 1255 1260 Gln Tyr Arg Asn Leu Leu Asp Thr Thr Asp Asn Gly Leu Thr Tyr 1265 1270 1275 Asn Ala Asp Gly Ala Glu Asn Pro Glu Thr Leu Thr Thr Asp Asp 1280 1285 1290 Asn Gly Ile Leu Lys Val Thr Val Lys Gly Tyr Ser Asn Pro Tyr 1295 1300 1305 Val Ser Gly Tyr Leu Gly Val Trp Val Pro Val Ala Ser Gly Asn 1310 1315 1320 Gln Asp Val Thr Thr Asn Ala Ala Thr Val Ser Ala Asp Ser Asn 1325 1330 1335 Lys Ile Phe Glu Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser His Met Ile Tyr 1340 1345 1350 Glu Asp Phe Ser Met Tyr Gln Pro Lys Pro Thr Ser Thr Glu Asn 1355 1360 1365 His Ala Tyr Asn Ile Ile Ala Gln Asn Ala Glu Leu Phe Asn Asn 1370 1375 1380 Leu Gly Ile Thr Asp Phe Trp Met Ala Pro Ala Tyr Thr Gln Ala 1385 1390 1395 Gly Thr Ser Arg Tyr Asn Glu Gly Tyr Ser Val Ala Asp Arg Tyr 1400 1405 1410 Asn Leu Gly Thr Asn Ala Asn Pro Thr Lys Tyr Gly Ser Gly Glu 1415 1420 1425 Glu Leu Ala Asn Ala Ile Ala Ala Leu His Ser Ala Gly Leu Lys 1430 1435 1440 Val Gln Glu Asp Ile Val Met Asn Gln Met Ile Gly Leu Pro Gly 1445 1450 1455 Gln Glu Ala Val Thr Val Thr Arg Ala Asp Asn Arg Gly Met Gln 1460 1465 1470 Thr Tyr Val Asn Gly Lys Thr Tyr Ala Asn Gln Met Tyr Phe Ala 1475 1480 1485 Tyr Thr Thr Gly Gly Gly Asn Gly Gln Glu Thr Tyr Gly Gly Lys 1490 1495 1500 Tyr Leu Ser Glu Leu Gln Ser Lys Tyr Pro Asp Leu Phe Thr Thr 1505 1510 1515 Arg Ala Ile Ser Thr Gly Val Ala Pro Asp Pro Thr Thr His Ile 1520 1525 1530 Thr Lys Trp Ser Ala Lys Tyr Glu Asn Gly Thr Ser Leu Gln Asn 1535 1540 1545 Ile Gly Ile Gly Leu Ala Val Lys Leu Ala Asn Gly Asp Tyr Ala 1550 1555 1560 Tyr Leu Asn Asp Ser Asn Asn Lys Ala Phe Asn Thr Thr Leu Pro 1565 1570 1575 Glu Thr Met Ser Ser Thr Asp Tyr Tyr Ala Asn Ile Glu Asp Asn 1580 1585 1590

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveauté) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.
Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

[x] Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

☐ Le demandeur a maintenu les revendications.

[x] Le demandeur a modifié les revendications.

☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

[x] Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

## 1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

E. M. TE POELE ET AL: "Development of Slowly Digestible Starch Derived alpha-Glucans with 4,6-alpha-Glucanotransferase and Branching Sucrase Enzymes", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 68, no. 24, 21 mai 2020 (2020-05-21), pages 6664-6671, XP055746093, US ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/acs.jafc.0c01465

AGA H ET AL: "Improved yields of cyclic nigerosylnigerose from starch by pretreatment with a thermostable branching enzyme", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 109, no. 4, 1 avril 2010 (2010-04-01) , pages 381-387, XP026949556, ISSN: 1389-1723, DOI: 10.1016/J.JBIOSC.2009.09.047 [extrait le 2009-10-21]

US 8 673 608 B2 (HAYASHIBARA CO [JP]; HAYASHIBARA CO [JP]) 18 mars 2014 (2014-03-18)

WO 2015/123327 A1 (DU PONT [US]) 20 août 2015 (2015-08-20)

WO 03/008618 A2 (TNO [NL]; VAN GEEL-SCHUTTEN GERRITDINA H [NL]) 30 janvier 2003 (2003-01-30)

WO 2015/183714 A1 (DU PONT [US]) 3 décembre 2015 (2015-12-03)

GANGOITI JOANA ET AL: "Biotechnological potential of novel glycoside hydrolase family 70 enzymes synthesizing alpha-glucans from starch and sucrose", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, vol. 36, no. 1, 1 janvier 2018 (2018-01-01), pages 196-207, XP055822691, GB ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.11.001

## 2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN

| TECHNOLOGIQUE GENERAL |
| --- |
| NEANT |
| **3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES** |
| NEANT |