

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 021 837**

51 Int. Cl.:

C07H 3/06	(2006.01) A23G 3/34	(2006.01)
C12P 19/18	(2006.01) A23G 9/34	(2006.01)
A23L 7/109	(2006.01) A21D 2/18	(2006.01)
A23L 11/00	(2015.01) C07H 1/00	(2006.01)
A23L 29/281	(2006.01)	
A23L 29/30	(2006.01)	
A23L 33/21	(2006.01)	
A21D 13/80	(2007.01)	
A61K 8/60	(2006.01)	
A61K 47/26	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2020** **PCT/JP2020/037581**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2021** **WO21066159**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2020** **E 20871615 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025** **EP 4039693**

54 Título: **Composición de azúcar que contiene un tetrasacárido cíclico, uso de la misma y método de producción de la misma**

30 Prioridad:

04.10.2019 JP 2019183875

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2025

73 Titular/es:

NAGASE VIITA CO., LTD. (100.00%)
675-1 Fujisaki, Naka-ku
Okayama-shi, Okayama 702-8006, JP

72 Inventor/es:

YASUDA AKIKO;
MIYATA MANABU;
YAMAMOTO TAKUO;
MIZOTE AKIKO y
MITSUZUMI HITOSHI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 3 021 837 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición de azúcar que contiene un tetrasacárido cíclico, uso de la misma y método de producción de la misma

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una nueva composición de sacárido, más específicamente, una nueva composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico representado por ciclo{→6)-α-D-glucopiranosil-(1→3)-α-D-glucopiranosil-(1→6)-α-D-glucopiranosil-(1→3)-α-D-glucopiranosil-(1→)}, a un uso de la composición y a un método de producción para la composición.

Antecedentes de la técnica

El tetrasacárido cíclico que tiene una estructura representada por ciclo{→6)-α-D-glucopiranosil-(1→3)-α-D-glucopiranosil-(1→6)-α-D-glucopiranosil-(1→3)-α-D-glucopiranosil-(1→)} (en lo sucesivo denominado simplemente "tetrasacárido cíclico") es un carbohidrato cíclico compuesto por cuatro moléculas de glucosa, descubierto por Cote en 1994 (Documento no de patente 1). Su método de producción que usa una enzima derivada de un microorganismo del suelo la estableció en la década de los 2000 el mismo solicitante que el de la presente solicitud (documentos de patente 1 y 2). Dado que los tetrasacáridos cíclicos no tienen poder reductor y son altamente estables debido a sus estructuras, era esperada su aplicación industrial. El establecimiento anterior del método de producción ha conducido a una amplia gama de estudios intensivos sobre su aplicación práctica. Como resultado, por ejemplo, hasta ahora se han conocido como acciones representativas de los tetrasacáridos cíclicos una baja coloración (documentos de patente 1 y 2), la propiedad de bajo contenido calórico (documentos de patente 1 y 2), la propiedad de fibra dietética (documentos de patente 1 y 2), una acción inhibidora de la producción de radicales (documentos de patente 3), una acción reguladora de lípidos (documentos de patente 4) y una acción promotora de la absorción mineral (documento de patente 5). Se piensa, de acuerdo con estos descubrimientos, que, si un tetrasacárido cíclico o una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico puede estar ampliamente disponible en forma de un jarabe de almidón o similar como material alimentario o similar, se pueden satisfacer las crecientes demandas de comodidad, seguridad y salud en la sociedad moderna.

En general, un jarabe de almidón se obtiene hidrolizando almidón con una enzima o un ácido, purificando el producto resultante mediante decoloración y desalinización, y concentrando después el producto. Por lo tanto, se puede producir un jarabe de almidón a un coste relativamente bajo, y no es necesario disolver carbohidratos sólidos en agua durante el proceso de, por ejemplo, mezcla con otros materiales para obtener el producto final. Por consiguiente, los jarabes de almidón se han utilizado ampliamente, preferentemente como materiales de productos alimentarios. Generalmente se requiere que los jarabes de almidón tengan, por ejemplo, las siguientes propiedades: que (a) su viscosidad no sea demasiado alta; y que (b) su actividad acuosa sea baja. La propiedad (a) se requiere desde el punto de vista de evitar la alteración de la manejabilidad en el proceso de, por ejemplo, mezcla con otros materiales en la producción del producto final, y la propiedad (b) es una propiedad requerida desde el punto de vista de evitar la contaminación por microorganismos durante el almacenamiento. Por otra parte, cuando se tiene en cuenta el uso de un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico, es necesario que el jarabe de almidón tenga, además de las propiedades (a) y (b), las siguientes propiedades: (c) una coloración suficientemente baja; y (d) un contenido calórico bajo; que son características ventajosas exclusivas de los tetrasacáridos cíclicos. Además, por supuesto, es necesario que el jarabe de almidón tenga la siguiente propiedad: que (e) no se produzca la precipitación de cristales de sacáridos durante el almacenamiento, incluso cuando se prepara en forma de una solución acuosa altamente concentrada (que tiene una concentración de sólidos de, por ejemplo, el 70 % en masa). Aunque el documento de patente 2 y similares divulgan una variedad de jarabes de almidón que contienen un tetrasacárido cíclico, tales jarabes de almidón convencionales, por lo que sabe el presente solicitante, no se han aplicado en la práctica ya que no alcanzaron los niveles de los puntos (a) a (e) requeridos en el campo de los alimentos. Ni siquiera ha habido una propuesta técnica mediante la cual se puedan proporcionar jarabes de almidón que satisfagan tales niveles.

Unos tetrasacáridos cíclicos ramificados obtenidos por la acción de una enzima sobre un pentasacárido cíclico en presencia de un donador de azúcar para transferir otro carbohidrato a ese pentasacárido cíclico, y composiciones que comprenden estos, se han divulgado (documentos de patente 6 y 7).

Documentos de la técnica anterior

[Documentos de patente]

[Documento de patente 1] Publicación internacional n.º WO 2002/010361
 [Documento de patente 2] Publicación internacional n.º WO 2001/090338
 [Documento de patente 3] Publicación internacional n.º WO 2004/020552
 [Documento de patente 4] Publicación internacional n.º WO 2004/089964
 [Documento de patente 5] Publicación internacional n.º WO 2005/007171
 [Documento de Patente 6]: JP 2005/162677 A
 [Documento de Patente 7]: WO 02072594 A1

[Documentos no de patente]

[Documento no de patente 1] *European Journal of Biochemistry*, vol. 226, págs. 641-648 (1994)

[Documento no de patente 2] *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 94, número 4, págs. 336-342 (2002)

5 [Documento no de patente 3] *Luminacoids Research*, vol. 22, número 1, págs. 29-33 (2018)

Divulgación de la invención

Objeto de la invención

10 En vista de dichas circunstancias, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición de sacárido adecuada para un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico, en donde, incluso cuando la composición se prepara en forma de una solución acuosa de carbohidratos con una concentración relativamente alta (jarabe de almidón), la composición tiene una viscosidad y una actividad acuosa suficientemente bajas, muestra una coloración
15 suficientemente baja, tiene un bajo contenido calórico y es poco probable que se produzca la precipitación de cristales de sacáridos durante el almacenamiento, así como proporcionar el uso de la composición y un método de producción para la composición.

Medios para lograr el objeto

20 En los métodos de producción de una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico tales como los descritos en el documento de patente 1 anterior, se deja que la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y la α -isomaltosiltransferasa actúen sobre un hidrolizado parcial de almidón. Estos métodos normalmente producen no solo un tetrasacárido cíclico, sino también un tetrasacárido cíclico que tiene una estructura ramificada en la que una o
25 más moléculas de glucosa están unidas a un tetrasacárido cíclico (en lo sucesivo denominado "tetrasacárido cíclico ramificado"). En vista de esto, en el estudio de medios para resolver los problemas que se pretenden solucionar con la presente invención, los presentes inventores intentaron maximizar el contenido total del tetrasacárido cíclico y el tetrasacárido cíclico ramificado en la composición de sacárido obtenida por la reacción enzimática, para asegurar la propiedad de bajo contenido calórico, que es una de las características exclusivas de los tetrasacáridos cíclicos.
30 Después de establecer esta como el requisito mínimo, los medios para resolver los otros problemas se estudiaron intensamente. Los presentes inventores consideraron que este requisito se puede satisfacer más preferentemente mediante los métodos de producción descritos en el documento de patente 1 y similares, es decir, los métodos en los que se deja que la combinación de enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y α -isomaltosiltransferasa actúe sobre un hidrolizado parcial de almidón, para producir un tetrasacárido cíclico. Sin embargo, incluso aprovechando el conocimiento y la experiencia acumulados por el presente solicitante a lo largo de muchos años de experiencia en la producción de tetrasacáridos cíclicos y otros carbohidratos, no se pudieron obtener composiciones de sacárido que mostraran una buena manejabilidad y una baja coloración conservando al mismo tiempo la propiedad de bajo contenido calórico. Por consiguiente, los presentes inventores se mantuvieron al margen del conocimiento técnico común convencional y continuaron un estudio intensivo.

40 Más específicamente, en el conocimiento técnico común de la técnica antes de la solicitud de la presente invención, se había creído que, en la producción de un tetrasacárido cíclico dejando que la combinación de la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y la α -isomaltosiltransferasa actúe sobre un hidrolizado parcial de almidón, la reacción de desramificación del carbohidrato sustrato usando isoamilasa o similar lleva a una disminución de la tasa de
45 producción del tetrasacárido cíclico, y que se prefiere la presencia de una estructura ramificada a través de un enlace α -1,6-glucosídico en el sustrato para la producción del tetrasacárido cíclico por tales enzimas (documento no de patente 2). En dichas circunstancias, se prepararon composiciones de sacárido que contenían un tetrasacárido cíclico mediante el uso de diversas combinaciones de enzimas, incluyendo el uso de una enzima desramificadora de almidón en combinación. Las propiedades físicas de estas composiciones se compararon y se estudiaron ampliamente.

50 Como resultado, se descubrió que una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico con las siguientes características (1) a (3) tiene todas las propiedades descritas anteriormente requeridas para un jarabe de almidón.

55 (1) La composición de sacárido comprende, además del tetrasacárido cíclico, un tetrasacárido cíclico ramificado que comprende una o más moléculas de glucosa unidas al tetrasacárido cíclico, en donde el contenido del tetrasacárido cíclico con respecto al contenido total de sólidos de la composición de sacárido obtenida dejando que la glucoamilasa y la α -glucosidasa actúen sobre la composición de sacárido anterior es del 38 % en masa o superior, basado en los sólidos secos;

60 (2) la proporción de glucosa con enlaces α -1,4 en los residuos de glucosa totales que constituyen la composición de sacárido en el análisis de metilación es superior al 9 % y del 15 % o inferior; y

65 (3) la proporción de glucosa con enlaces α -1,4,6 en los residuos de glucosa totales que constituyen la composición de sacárido en el análisis de metilación es inferior al 6 %.

Como se describe más adelante en detalle en los experimentos y ejemplos, se descubrió que se puede obtener una composición de sacárido que tiene un contenido calórico suficientemente bajo al proporcionar la característica (1), que se puede lograr una buena manejabilidad y una baja coloración al proporcionar las características (2) y (3), y que una composición de sacárido que satisface estos requisitos (1) a (3) es una composición de sacárido notable que muestra una actividad acuosa suficientemente baja cuando se prepara en forma de una solución acuosa, y que es poco probable que se produzca la precipitación de cristales durante el almacenamiento, incluso cuando se prepara en forma de una solución acuosa altamente concentrada.

La composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico y un tetrasacárido cíclico ramificado, con las características descritas anteriormente se obtuvo por primera vez mediante el uso combinado de una enzima desramificadora de almidón en la reacción para la producción de un tetrasacárido cíclico que usa enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y α -isomaltosiltransferasa y, por esta razón, se puede decir que es una auténtica nueva composición de sacárido que nunca podría obtenerse basándose en el conocimiento técnico común convencional.

Por otra parte, los presentes inventores confirmaron que la composición de sacárido descrita anteriormente no solo es aplicable como un jarabe de almidón para alimentos y materiales alimentarios, sino que también es útil para una variedad de usos tales como cosméticos y productos parafarmacéuticos.

Más específicamente, la presente invención resuelve los problemas proporcionando una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico que tiene las siguientes características (1) a (3):

(1) la composición de sacárido comprende, además del tetrasacárido cíclico, un tetrasacárido cíclico ramificado que comprende una o más moléculas de glucosa unidas al tetrasacárido cíclico, en donde el contenido del tetrasacárido cíclico con respecto al contenido total de sólidos de la composición de sacárido obtenida dejando que la glucoamilasa y la α -glucosidasa actúen sobre la composición de sacárido anterior es del 38 % en masa o superior, basado en los sólidos secos;

(2) la proporción de glucosa con enlaces α -1,4 en los residuos de glucosa totales que constituyen la composición de sacárido en el análisis de metilación es superior al 9 % y del 15 % o inferior; y

(3) la proporción de glucosa con enlaces α -1,4,6 en los residuos de glucosa totales que constituyen la composición de sacárido en el análisis de metilación es inferior al 6 %.

Por otra parte, la presente invención resuelve los problemas al proporcionar una composición que contiene una composición de sacárido que tiene las características anteriores.

Como se ha descrito anteriormente, la composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico y un tetrasacárido cíclico ramificado, que tiene las características (1) a (3) se obtuvo por primera vez mediante el uso combinado de una enzima desramificadora de almidón en la reacción para la producción de un tetrasacárido cíclico que usa enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y α -isomaltosiltransferasa. De acuerdo con ello, la presente invención resuelve los problemas al proporcionar un método para producir la composición de sacárido de la presente invención, comprendiendo el método las etapas de: permitir que la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y

la α -isomaltosiltransferasa actúen sobre un hidrolizado parcial de almidón, con el fin de producir el tetrasacárido cíclico (etapa 1); y purificar y recoger el producto resultante de la reacción enzimática que contiene el tetrasacárido cíclico (etapa 2); en donde también se deja que actúe una enzima desramificadora de almidón en la etapa 1.

Efecto de la invención

La presente invención permite la producción de, por ejemplo, una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico en donde, incluso cuando la composición se prepara en forma de una solución acuosa de carbohidratos con una concentración relativamente alta (jarabe de almidón) que tiene una concentración de sólidos de aproximadamente el 70 % en masa o superior, la composición muestra buena manejabilidad, está libre de contaminación por microorganismos, tiene un contenido calórico suficientemente bajo, muestra una coloración suficientemente baja y es poco probable que se produzca la precipitación de cristales, lo cual es ventajoso. Por otra parte, mediante el método de producción de la presente invención, una composición de sacárido de acuerdo con la presente invención se puede producir de manera simple a bajo coste, lo cual es ventajoso. Dado que, como se ha descrito anteriormente, la composición de sacárido así obtenida de acuerdo con la presente invención tiene diversas propiedades generalmente requeridas para los productos de jarabe de almidón, la composición es ampliamente aplicable a una variedad de usos tales como en alimentos, lo cual es ventajoso.

Modo para realizar la invención

1. Definición de términos

Los siguientes términos y expresiones en la presente descripción tienen los significados descritos a continuación.

1.1 Tetrasacárido cíclico

Cuando la expresión "tetrasacárido cíclico" se usa simplemente en la presente descripción, significa un glucotetrasacárido cíclico en el que cuatro moléculas de glucosa están unidas entre sí a través de enlaces α -1,6 y enlaces α -1,3, es decir, el tetrasacárido cíclico representado por ciclo $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$).

1.2 Tetrasacárido cíclico ramificado

Cuando la expresión "tetrasacárido cíclico ramificado" se usa simplemente en la presente descripción, significa, a menos que se especifique otra cosa, un carbohidrato que tiene una estructura ramificada que comprende una o más moléculas de glucosa unidas a un tetrasacárido cíclico a través de un enlace o enlaces glucosídicos. Ejemplos específicos del tetrasacárido cíclico ramificado incluyen carbohidratos en los que una glucosa está unida a un tetrasacárido cíclico a través de un enlace glucosídico α -1,4; y carbohidratos en los que una isomaltosa está unida a un tetrasacárido cíclico a través de un enlace glucosídico α -1,3.

1.3 Contenido total de tetrasacáridos cíclicos

Cuando se usa la expresión "contenido total de tetrasacáridos cíclicos" en la presente descripción, significa el contenido, basado en los sólidos secos, de tetrasacárido cíclico (% en masa) con respecto al contenido total de sólidos de una composición de sacárido obtenida dejando que la glucoamilasa y la α -glucosidasa actúen sobre una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico y un tetrasacárido cíclico ramificado. El contenido total de tetrasacáridos cíclicos se puede usar como un índice del nivel del valor energético de la composición de sacárido, ya que refleja la cantidad de tetrasacárido cíclico producido por la digestión de la composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico y un tetrasacárido cíclico ramificado, en un organismo vivo.

1.4. Carbohidrato coexistente

Cuando la expresión "carbohidrato coexistente" se usa simplemente en la presente descripción, significa todos los carbohidratos distintos de los tetrasacáridos cíclicos y los tetrasacáridos cíclicos ramificados contenidos en una composición de sacárido. Ejemplos del carbohidrato coexistente incluyen glucosa; maltosa; isomaltosa; glucodisacáridos que tienen otros modos de enlace; maltotriosa; isomaltotriosa; panosa; glucotrisacáridos que tienen otros modos de enlace; y glucooligosacáridos y glucanos con un grado de polimerización de 4 o superior que tienen diversos modos de enlace, distintos de tetrasacáridos cíclicos y tetrasacáridos cíclicos ramificados.

1.5 Glucosa con enlaces α -1,4, glucosa con enlaces α -1,4,6, etc., y proporciones de las mismas

La expresión "glucosa con enlaces α -1,4" en la presente descripción significa un residuo de glucosa cuyos grupos hidroxilo en la posición 1 y la posición 4 están unidos a otros residuos de glucosa a través de enlaces α -glucosídicos, según se detecta mediante un análisis de metilación habitualmente utilizado para determinar los modos de enlace de los residuos de glucosa individuales que constituyen un glucano. De manera similar, cuando los grupos hidroxilo en la posición 1, la posición 4 y la posición 6 de un residuo de glucosa están unidos a otros residuos de glucosa a través de enlaces α -glucosídicos, el residuo de glucosa se denomina "glucosa con enlaces α -1,4,6". Cuando un residuo de glucosa se une a otro residuo de glucosa a través del grupo hidroxilo en otra posición, el número que indica la posición del grupo hidroxilo involucrado en el enlace se usa de manera similar para el nombre del residuo de glucosa (las posiciones de los grupos hidroxilo involucrados en los enlaces y la combinación de los mismos, pueden denominarse "modo de enlace" en la presente descripción). La relación de los residuos de glucosa que tienen cada modo de enlace (tal como glucosa con enlaces α -1,4 o glucosa con enlaces α -1,4,6) en los residuos de glucosa totales que constituyen la composición de sacárido (que puede denominarse en lo sucesivo como el "contenido" de los residuos de glucosa que tienen cada modo de enlace) se puede determinar mediante el análisis de metilación descrito anteriormente. Cabe señalar que el residuo de glucosa en el que solo el grupo hidroxilo en la posición 1 está unido a otro residuo de glucosa, es decir, el residuo de glucosa en el extremo no reductor, no se denomina "glucosa con enlaces α -1", sino que simplemente se denomina "glucosa del extremo no reductor", en la presente invención. El principio y el método del análisis de metilación se describen con detalle en Ciucanu *et al.* (*Carbohydrate Research*, vol. 131, número 2, págs. 209-217 (1984)).

1.6 Enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido

La expresión "enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido" en la presente descripción significa una enzima que produce un carbohidrato con un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior que tiene un enlace α -1,6-glucosídico como modo de enlace del residuo del extremo no reductor y un enlace α -1,4-glucosídico como modo de enlace de los residuos distintos del residuo del extremo no reductor, mediante la transferencia de α -glucosilo desde un carbohidrato con un grado de polimerización de glucosa de 2 o superior que tiene enlace α -1,4-glucosídico como modo de enlace del residuo del extremo no reductor, sin aumentar sustancialmente el poder reductor. La actividad enzimática de la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido se mide realizando una reacción que usa maltotriosa

como sustrato y, a continuación, cuantificando la maltosa producida por la reacción de transferencia de la glucosa del extremo no reductor de la maltotriosa a otro sacárido. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de maltosa a partir de maltotriosa en 1 minuto.

5 1.7 α -Isomaltosiltransferasa

El término " α -isomaltosiltransferasa" en la presente descripción significa una enzima que produce un tetrasacárido cíclico a partir de un carbohidrato con un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior que tiene un enlace α -1,6-glucosídico como modo de enlace del residuo del extremo no reductor y un enlace α -1,4-glucosídico como modo de enlace de los residuos distintos del residuo del extremo no reductor, mediante una reacción que incluye una transferencia de α -isomaltosilo. La actividad enzimática de la α -isomaltosiltransferasa se mide realizando una reacción que usa panosa como sustrato y, a continuación, cuantificando la glucosa producida por la reacción de transferencia de isomaltosa de la panosa a otro sacárido. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de glucosa a partir de panosa en 1 minuto.

15 1.8 Enzima formadora de tetrasacárido cíclico y unidad de actividad enzimática de la misma

Cuando la expresión "enzima formadora de tetrasacárido cíclico" se usa simplemente en la presente descripción, significa una composición enzimática que contiene enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y α -isomaltosiltransferasa, pero que no contiene sustancialmente otras enzimas. En la presente descripción, una unidad de actividad enzimática de la enzima formadora de tetrasacárido cíclico se define como la cantidad de enzima que produce un total de 1 μmol de tetrasacárido cíclico y tetrasacárido cíclico ramificado a partir de dextrina soluble en 1 minuto, basado en el tetrasacárido cíclico.

25 1.9 Unidad de actividad enzimática de la isoamilasa

En la presente descripción, la actividad enzimática de la isoamilasa se define como sigue. En primer lugar, se añaden 0,5 ml de una solución enzimática apropiadamente diluida a 3 ml de una solución de sustrato acuosa que contiene el 0,83 % (p/v) de almidón de maíz ceroso soluble de Lintner y tampón de acetato 0,1 M (pH 3,5). Mientras la solución de sustrato se mantiene a 40 °C, se muestrean 0,5 ml de la solución de sustrato después de 30 segundos de la reacción y después de 30 minutos y 30 segundos de la reacción. Al muestreo le sigue inmediatamente la adición de 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0,02 N a cada muestra para detener la reacción, con el fin de proporcionar una solución de control y una solución de reacción, respectivamente. A cada una de la solución de control y la solución de reacción obtenidas, se añaden 0,5 ml de solución de yodo 0,01 N y se deja que la coloración continúe a 25 °C durante 15 minutos, seguido de la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 610 nm usando un absorciómetro, para calcular la actividad amilolítica de acuerdo con la siguiente fórmula [1]. Una unidad de actividad isoamilasa se define como la cantidad de enzima que aumenta la absorbancia a una longitud de onda de 610 nm en 0,004 en tales condiciones de medición.

40 Fórmula [1]:

[Ecuación 1]

Actividad (unidades/ml) = $\{(A_{\text{Solución de reacción a 610 nm}} - A_{\text{Solución de control a 610 nm}})/0,004\} \times$

Factor de dilución

1.10 Unidad de actividad enzimática de la pululanasa

En la presente descripción, la actividad enzimática de la pululanasa se define como sigue. En primer lugar, una solución acuosa de pululano al 1,25 % (p/v) (fabricada por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón; para la medición de la actividad pululanasa) se proporciona como solución de sustrato. En un tubo de ensayo, se colocan 4 ml de la solución de sustrato y 0,5 ml de tampón de acetato 0,1 M (pH 5,0), y la mezcla resultante se precalienta a 30 °C. Al tubo de ensayo se añaden 0,5 ml de una solución enzimática apropiadamente diluida usando tampón de acetato 0,01 M (pH 6,0). Mientras la solución de sustrato se mantiene a 30 °C, se muestrean 0,5 ml de la solución de sustrato después de 30 segundos de la reacción y después de 30 minutos y 30 segundos de la reacción. Al muestreo le sigue inmediatamente la inyección de cada muestra en 2 ml de solución de cobre Somogyi para detener la reacción, con el fin de proporcionar una "solución de control" y una "solución de reacción", respectivamente. La solución de control y la solución de reacción obtenidas se someten al método de Somogyi-Nelson, y la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 520 nm se mide usando un absorciómetro, con el fin de medir la cantidad de azúcar reductor producido, seguido del cálculo de la actividad de degradación del pululano de acuerdo con la siguiente fórmula [2]. Una unidad de actividad pululanasa se define como la cantidad de enzima que libera azúcar reductor correspondiente a 1 μmol de maltotriosa en 1 minuto en tales condiciones de medición.

65 Fórmula [2]:

[Ecuación 2]

Actividad (unidades/ml) = $\{(A^{\text{Solución de reacción a 520 nm}} - A^{\text{Solución de control a 520 nm}}) / A^{\text{solución patrón a 520 nm}}\} \times 100 \times 5/0,5 \times 1/180 \times 1/30 \times \text{factor de dilución}$

5

Se usó D-glucosa (100 µg/ml) como solución patrón.

1.11 Actividad enzimática de la ciclomaltodextrina glucanotransferasa

- 10 En la presente descripción, la actividad enzimática de la ciclomaltodextrina glucanotransferasa (en lo sucesivo denominada "CGTasa") se define como sigue. En primer lugar, se añaden 0,2 ml de una solución enzimática apropiadamente diluida a 5 ml de una solución de sustrato acuosa que contiene el 0,3 % (p/v) de almidón soluble, tampón de acetato 20 mM (pH 5,5) y cloruro de calcio 1 mM. Mientras la solución de sustrato se mantiene a 40 °C, se muestrean 0,5 ml de la solución de sustrato después de 0 minutos de la reacción y después de 10 minutos de la
- 15 reacción. Al muestreo le sigue inmediatamente la adición de cada muestra a 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0,02 N para detener la reacción. Después de esto, se añaden 0,2 ml de solución de yodo 0,1 N a cada solución de ácido sulfúrico para permitir que la coloración continúe durante 20 minutos, y luego se mide la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 660 nm usando un absorciómetro, para calcular la actividad amilolítica de acuerdo con la siguiente fórmula [3]. Una unidad de actividad CGTasa se define como la cantidad de enzima que provoca la
- 20 desaparición completa de la coloración de yodo para 15 mg de almidón en la solución en tales condiciones de medición.

Fórmula [3]:

25 [Ecuación 3]

Actividad (unidades/ml) = $\{(A^{0 \text{ minutos de reacción a 660 nm}} - A^{10 \text{ minutos de reacción a 660 nm}}) / A^{0 \text{ minutos de reacción a 660 nm}}\} \times 1/0,2 \times \text{factor de dilución}$

30 1.12 Poder reductor

- La expresión "poder reductor" en la presente descripción significa el porcentaje (%) de la cantidad de azúcar reductor con respecto a la cantidad total de sacáridos en una composición de sacáridos, cuyo porcentaje se puede calcular usando D-glucosa como sustancia patrón, determinando la cantidad de azúcar reductor y la cantidad total de sacáridos
- 35 en la composición de sacárido mediante el método de Somogyi-Nelson y el método de antrona-ácido sulfúrico, que se usan habitualmente en la técnica, y efectuando después el cálculo de acuerdo con la siguiente fórmula [4].

Fórmula [4]:

40 [Ecuación 4]

Poder reductor = Cantidad de azúcar reductor/Cantidad total de sacáridos x 100

- La composición de sacárido de la presente invención, el uso de la misma y el método de producción de la misma se describen a continuación de manera más concreta.
- 45

2. Composición de sacárido de la presente invención

La composición de sacárido de la presente invención tiene las siguientes características (1) a (3):

50

(1) la composición de sacárido comprende, además del tetrasacárido cíclico, un tetrasacárido cíclico ramificado que comprende una o más moléculas de glucosa unidas al tetrasacárido cíclico, en donde el contenido del tetrasacárido cíclico con respecto al contenido total de sólidos de la composición de sacárido obtenida dejando que la glucoamilasa y la α-glucosidasa actúen sobre la composición de sacárido anterior es del 38 % en masa o superior, basado en los sólidos secos;

55

(2) la proporción de glucosa con enlaces α-1,4 en los residuos de glucosa totales que constituyen la composición de sacárido en el análisis de metilación es superior al 9 % y del 15 % o inferior; y

60

(3) la proporción de glucosa con enlaces α-1,4,6 en los residuos de glucosa totales que constituyen la composición de sacárido en el análisis de metilación es inferior al 6 %.

65

La composición de sacárido de la presente invención es una composición de sacárido que contiene el tetrasacárido cíclico, el tetrasacárido cíclico ramificado y otros carbohidratos coexistentes. Como se describe en el documento de patente 2, los tetrasacáridos cíclicos y los tetrasacáridos cíclicos ramificados no tienen poder reductor, no muestran coloración y es poco probable que se conviertan en fuentes de energía. Por otro lado, los otros carbohidratos

coexistentes suelen causar coloración debido a sus poderes reductores y pueden convertirse en fuentes de energía. Por lo tanto, la característica (1) descrita anteriormente está directamente relacionada con la maximización de la cantidad total de carbohidratos que tienen una estructura de tetrasacárido cíclico en la composición de sacárido, y se requiere para asegurar la propiedad de bajo contenido calórico de la composición de sacárido. En los casos en los que el contenido total de tetrasacáridos cíclicos es inferior al 38 % en masa, la proporción de carbohidratos coexistentes, que pueden causar coloración y convertirlos en fuentes de energía, aumenta, de modo que el bajo contenido calórico y la baja coloración como características de la composición de sacárido de acuerdo con la presente invención no se pueden realizar fácilmente.

Las características (2) y (3) descritas anteriormente caracterizan la composición de sacárido de la presente invención basándose en los modos de enlace de los residuos de glucosa que constituyen la composición. Es posible lograr tanto una viscosidad suficientemente baja como una baja coloración incluso como solución acuosa altamente concentrada en el caso en donde la proporción de residuos de glucosa con enlaces α -1,4 es superior al 9 %, preferentemente del 9,2 % o superior, más preferentemente del 9,5 % o superior, aún más preferentemente del 10 % o superior con respecto al límite inferior del intervalo, y del 15 % o inferior, preferentemente del 14,5 % o inferior, más preferentemente del 14 % o inferior con respecto al límite superior del intervalo, y donde la relación de glucosa con enlaces α -1,4,6 es inferior al 6 %, en los residuos de glucosa totales en el análisis de metilación. De manera adicional, la composición de sacárido de la presente invención que tiene las características anteriores muestra una actividad acuosa suficientemente baja cuando está en forma de una solución acuosa que tiene una concentración de sólidos similar a la de un jarabe de almidón habitual.

Un ejemplo específico más preferente de la composición de sacárido de la presente invención es una composición de sacárido que tiene no solo las características (1) a (3) descritas anteriormente, sino también la siguiente característica:

(4) el contenido de tetrasacárido cíclico con respecto al contenido total de sólidos es del 25 % en masa o superior, basado en los sólidos secos.

La característica (4) define el valor del límite inferior del contenido de tetrasacárido cíclico, cuyo factor de conversión de energía, que es un factor para el cálculo del valor energético de un alimento, es de 0 kcal/g (como se muestra en el ensayo de referencia descrito más adelante).

Mediante esto, se puede proporcionar una composición de sacárido de la presente invención cuyas calorías sean bajas en su conjunto. El contenido de tetrasacárido cíclico con respecto al contenido total de sólidos es más preferentemente del 30 % en masa o superior, basado en los sólidos secos.

Otro ejemplo específico más preferente de la composición de sacárido de la presente invención es una composición de sacárido de la presente invención que tiene además las siguientes características

(5) la composición de sacárido comprende carbohidrato con un grado de polimerización de 1 o 2 para un contenido total del 16 % en masa o inferior, basado en los sólidos secos con respecto al contenido de sólidos totales; y

(6) la composición de sacárido comprende carbohidrato con un grado de polimerización de 4 a 13 distinto de los tetrasacáridos cíclicos y los tetrasacáridos cíclicos ramificados que comprenden una o dos moléculas de glucosa unidas, para un contenido total superior al 37 % en masa, basado en los sólidos secos con respecto al contenido de sólidos totales.

La característica (5) define el valor del límite superior del contenido de sacáridos con un grado de polimerización de 1 o 2, que pueden convertirlos en fuentes de energía y pueden afectar negativamente a la coloración. Mediante esto, una composición de sacárido de la presente invención cuya propiedad de coloración no es problemática en su conjunto, y que tiene un contenido calórico más bajo, se puede proporcionar. El contenido es más preferentemente del 15 % en masa o inferior. La característica (6) es un índice descubierto de manera única por los presentes inventores, y el índice está relacionado con una producción más notable de la propiedad de bajo contenido calórico y la baja coloración. Por lo que sabe el presente solicitante, esta es una característica que nunca podría haberse logrado mediante una simple combinación de técnicas convencionales para la producción de un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. En la característica (6), los tetrasacáridos cíclicos ramificados que comprenden tres o más moléculas de glucosa unidas al tetrasacárido cíclico no se excluyen del carbohidrato con un grado de polimerización de 4 a 13. Esto se debe a que la separación de tetrasacáridos cíclicos ramificados que comprenden tres o más moléculas de glucosa unidas al tetrasacárido cíclico de otros carbohidratos con el mismo grado de polimerización es generalmente difícil, de modo que su extracción y cuantificación son difíciles, y debido a que, aunque los tetrasacáridos cíclicos ramificados que comprenden tres o más moléculas de glucosa unidas al tetrasacárido cíclico también se producen en el método de producción de acuerdo con la presente invención, su rendimiento es muy bajo.

Cuando la composición de sacárido de la presente invención caracterizada como se ha descrito anteriormente se prepara en forma de una solución acuosa a una concentración de sólidos del 73 % en masa, tiene una viscosidad de normalmente 35 Pa.s o inferior, preferentemente 30 Pa.s o inferior, más preferentemente 27 Pa.s o inferior, en un entorno a 15 °C. Un nivel tan bajo de viscosidad no podría lograrse junto con una baja coloración mediante soluciones

acuosas convencionales de composiciones de sacárido que contienen tetrasacáridos cíclicos, y asegura la propiedad que permite conseguir una manejabilidad favorable durante el proceso de extracción de un recipiente y mezcla con otros materiales para obtener el producto final, incluso en un entorno de trabajo a una temperatura relativamente baja, conservando al mismo tiempo una baja coloración. Por otra parte, cuando la composición de sacárido de la presente invención se prepara en forma de una solución acuosa a la misma concentración, muestra una actividad acuosa normalmente inferior a 0,88, preferentemente inferior a 0,87, más preferentemente inferior a 0,86. Esta llega suficientemente al nivel normalmente requerido para suprimir la contaminación en la producción de alimentos.

Otra característica útil de la composición de sacárido de la presente invención es que la composición muestra una propiedad de fibra dietética. En la composición de sacárido de la presente invención, el contenido de fibra dietética soluble en agua determinado por cromatografía líquida de alta resolución (método enzima-HPLC) suele ser del 40 % en masa o superior, preferentemente del 50 % en masa o superior, más preferentemente del 60 % en masa o superior. La composición de sacárido de la presente invención también se puede caracterizar por su poder reductor. El poder reductor suele ser del 7,5 % al 17 %, preferentemente del 8,0 % al 15 %.

La composición de sacárido de la presente invención descrita anteriormente también se puede proporcionar como un producto reducido de la composición de sacárido llevando a cabo la hidrogenación de acuerdo con un método convencional.

3. Composición que contiene la composición de sacárido de la presente invención

Como se ha descrito anteriormente, la composición de sacárido de la presente invención o el producto reducido de la misma tiene una viscosidad y una actividad acuosa suficientemente bajas, muestra una coloración suficientemente baja, tiene un bajo contenido calórico y es poco probable que se produzca la precipitación de cristales cuando se prepara en forma de una solución acuosa. Por consiguiente, la composición se puede usar ventajosamente como un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico mediante la preparación en una solución acuosa altamente concentrada; o tal cual; o como un alimento; o como un material de base en polvo, un aglutinante, un excipiente o similar para su uso en un cosmético, un producto parafarmacéutico, un producto farmacéutico, un pienso para ganado, un alimento para peces, un fertilizante o similar; o como una combinación apropiada con otro material para proporcionar un alimento o una bebida, un material alimentario o de bebida, un material cosmético, un material parafarmacéutico, un material farmacéutico, un material de pienso para ganado, un material de alimento para peces, un material fertilizante o similar. La presente invención también proporciona tales composiciones que contienen la composición de sacárido de la presente invención y otros materiales.

En los casos en los que la composición de sacárido de la presente invención o el producto reducido de la misma se prepara en una solución acuosa para su uso como un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico o un jarabe de almidón reducido de una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico, su concentración de sólidos es normalmente del 70 % en masa o superior, preferentemente del 71 % en masa o superior, más preferentemente del 73 % en masa o superior. Ejemplos específicos de alimentos y bebidas en los que se puede añadir o incluir la composición en forma de jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico o un jarabe de almidón reducido de una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico (en lo sucesivo denominado "jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención") incluyen bebidas alcohólicas tales como el sake sintético, licor fermentado, sake, licor de frutas, cerveza baja en malta, cerveza y licor; bebidas tales como bebidas carbonatadas, bebidas de leche, batidos, zumos de verduras, bebidas de jalea, bebidas deportivas, bebidas de vinagre, bebidas de leche de soja, bebidas que contienen hierro, bebidas con bacterias del ácido láctico, té verde, té negro, cacao, café y bebidas no alcohólicas; alimentos básicos tales como arroz cocido, gachas de arroz, pastel de arroz, *tteokbokki* y pan; fideos tales como *udon* (fideos gruesos hechos de harina de trigo), *soba* (fideos de trigo sarraceno), *somen* (fideos finos hechos de harina de trigo), *hiyamugi* (fideos *udon* finos servidos fríos) y *ramen*; pastas tales como espagueti, lasaña, macarrones y *penne*; productos de harina de trigo procesados tales como piel de rollito de primavera y piel de *dumpling* (*gyoza*); sopas tales como sopa de *miso*, *tom yam kung*, sopa de almejas y *seolleongtang*; productos lácteos tales como yogur, queso y leche en polvo; productos cárnicos tales como salchichas y jamón; productos de carne de pescado tales como *kamaboko* (pasta de pescado al vapor), *chikuwa* (pasta de pescado en forma de tubo), *hampen* (pasta de pescado de forma cuadrada) y salchicha de carne de pescado; productos marinos procesados tales como mariscos enlatados, *himono* (marisco seco), *shio-kara* (tripas de pescado saladas) y encurtidos Matsumae; alimentos cocinados tales como tempura, comida frita, bistec de hamburguesa, *takoyaki* (*dumpling* de pulpo), *shumai* (*dumpling* de carne al vapor), croquetas, alimentos para lactantes y alimentos líquidos y alimentos congelados preparados congelando estos alimentos cocinados; productos de confitería tales como caramelos blandos, caramelos duros, gominolas, jalea, galletas, galletas blandas, *senbei* (galleta de arroz), *arare* (cubo de pastel de arroz), *okoshi* (pastel de mijo y arroz), arroz alfa, *gyuhi* (pasta de almidón), pasteles de arroz, *warabimochi* (*dumpling* de almidón de helecho), *manju* (bollo con relleno de pasta de alubias), *uiro* (jalea de arroz dulce), "an" (pastas dulces de alubia roja), *yokan* (jalea dulce de judías *azuki*), *mizu-yokan* (*yokan* suave), *kingyoku* (un tipo de *yokan*), jalea, jalea de pectina, mousse, crema bávara, *castella* (bizcocho japonés), bizcochos, galletas saladas, pastel, pudín, crema de mantequilla, crema pastelera, nata fresca, hojaldre de crema, gofre, bizcocho, tortita, magdalena, donut, chocolate, ganache, goma de mascar, caramelo, turrón, pasta de harina, pasta de cacahuete, pasta de frutas, confitura, mermelada, malvavisco, barrita de proteína, barrita de cereales y barrita energética; postres congelados tales como helado, sorbete y helado italiano; y condimentos, y productos cocinados y procesados, tales como salsa

de soja, salsa de soja en polvo, *miso*, *miso* en polvo, *moromi* (un tipo de condimento fermentado), *hishio* (un tipo de condimento fermentado), *furikake* (condimento de arroz), mayonesa, aliño, vinagre, *sanbaizu* (una mezcla de azúcar, salsa de soja y vinagre), *funmatsu-sushizu* (vinagre en polvo para sushi), *chuka-no-moto* (una mezcla instantánea para un plato chino), *tentsuyu* (salsa para mojar para tempura), *mentsuyu* (salsa para fideos japoneses), salsa, salsa de tomate, ketchup, *yakiniku-no-tare* (salsa para carne a la parrilla japonesa), *yakitori-no-tare* (salsa para pollo a la parrilla japonés), *kabayaki-no-tare* (salsa para asados), *karaage-ko* (polvo para freír), *tempura-ko* (harina de tempura), polvo de rebozado, harina de *takoyaki*, harina de *okonomiyaki* (harina para *okonomiyaki*, una tortita de estilo japonés), pan rallado, *roux* al curry, mezcla de estofado instantáneo, mezcla de sopa instantánea, *dashi-no-moto* (mezcla de caldo instantánea), *nimono-tsuyu* (salsa para alimentos hervidos), líquido de condimento para pescado hervido, líquido de condimento para huevas de pescado, líquido de condimento para marisco seco, condimento mixto, *mirin* (sake dulce) y *shin-mirin* (mirin sintético). Para alimentos y bebidas preparados por fermentación, el jarabe de almidón de tetrasacárido cíclico de la presente invención se puede añadir después de la fermentación, o se puede añadir antes de la fermentación para usar el jarabe de almidón de tetrasacárido cíclico de la presente invención como materia prima de fermentación.

Dado que el tetrasacárido cíclico en sí mismo es una sustancia estable y eficaz para la retención de humedad, la prevención de la sinéresis, la prevención de la desnaturalización de proteínas, la prevención del deterioro de lípidos y similares, el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención también se puede usar ventajosamente añadiéndolo a cosméticos. A tales cosméticos, el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención se añade generalmente junto con uno o más componentes cuya aplicación a la piel es aceptable, por ejemplo, uno o más seleccionados apropiadamente de entre aceites y lípidos, ceras, hidrocarburos, ácidos grasos, ésteres, alcoholes, tensioactivos, colorantes, perfumes, hormonas, vitaminas, extractos vegetales, extractos animales, extractos microbianos, sales, absorbentes de ultravioleta, pigmentos fotosensibles, antioxidantes, antisépticos/microbicidas, antitranspirantes/desodorantes, refrigerantes, agentes quelantes, agentes blanqueadores de la piel, agentes antiinflamatorios, enzimas, hidratos de carbono, aminoácidos, espesantes y similares, cuya aplicación externa a la piel es aceptable. Ejemplos de los cosméticos a los que se añade el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención incluyen aquellos en forma de loción, crema, loción lechosa, gel, polvo, pasta o bloque, por ejemplo, cosméticos de limpieza tales como jabones, jabones cosméticos, cremas de limpieza facial, espumas de limpieza facial, enjuagues faciales, champús corporales, enjuagues corporales, champús, enjuagues, y polvos para lavar el cabello; cosméticos para el cabello tales como lociones de fijación, productos para el secado del cabello, pomadas en barra, cremas para el cabello, pulverizadores capilares, líquidos capilares, tónicos capilares, lociones capilares, restauradores capilares, tintes para el cabello, tratamientos para el cuero cabelludo, pomadas, aceites para el cabello que imparten brillo, aceites para el cabello y aceites para el peinado; cosméticos de base tales como lociones cosméticas, cremas evanescentes, cremas emolientes, lociones emolientes, envases cosméticos (en forma de jalea de tipo despegable, jalea de tipo limpiable, pasta de tipo lavado, polvo o similares), cremas de limpieza, cremas frías, cremas de manos, lociones de manos, lociones lechosas, líquidos hidratantes, lociones para después del afeitado, lociones de afeitado, lociones para antes del afeitado, cremas para después del afeitado, espumas para después del afeitado, cremas para antes del afeitado, aceites cosméticos y aceites para bebés; cosméticos de maquillaje tales como bases (en forma de líquido, crema o similares), polvos de talco, talcos para bebé, polvos corporales, polvos de perfume, bases de maquillaje, polvos faciales (en forma de crema, pasta, líquido, polvo o similares), sombras de ojos, cremas para los ojos, máscaras, lápices de cejas, cosméticos para pestañas, coloretes para las mejillas y lociones para las mejillas; cosméticos de perfume tales como perfumes, perfumes en pasta, perfumes en polvo, agua de Colonia, perfume de Colonia y agua de tocador; cosméticos bronceadores/protectores solares tales como cremas bronceadoras, lociones bronceadoras, aceites bronceadores, cremas de protección solar, lociones de protección solar y aceites de protección solar; cosméticos para uñas tales como manicuras, pedicuras, colores de uñas, lacas de uñas, eliminadores de esmalte, cremas para uñas y materiales cosméticos para uñas; cosméticos delineadores de ojos; cosméticos para labios tales como barras de labios, crema de labios, coloretes en pasta y brillos de labios; cosméticos bucales tales como pastas dentales y enjuagues bucales; y cosméticos de baño tales como sales de baño, aceites de baño y materiales cosméticos de baño.

Dado que el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención tiene un bajo contenido calórico y estabiliza eficazmente otros componentes añadidos en combinación, el jarabe de almidón también se puede usar ventajosamente como aditivo, excipiente o similares para productos farmacéuticos. Ejemplos de los productos farmacéuticos a los que se puede añadir el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención incluyen preparaciones de antibióticos tales como las de penicilina, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomycin, sulfato de kanamicina o similares; preparaciones de vitaminas tales como las de tiamina, riboflavina, ácido L-ascórbico, aceite de hígado de bacalao, carotenoide, ergosterol, tocoferol o similares; preparaciones de enzimas tales como las de lipasa, esterasa, uroquinasa, proteasa, β -amilasa, glucanasa, lactasa o similares; preparaciones de extractos tales como las de un extracto de ginseng, extracto de tortuga de caparazón blando, extracto de *Chlorella*, extracto de aloe, extracto de propóleo o similares; líquidos que contienen hormonas tales como los del factor inhibidor de la migración de macrófagos, factor estimulante de colonias, insulina, hormona del crecimiento, prolactina, eritropoyetina, hormona foliculoestimulante o similares; y preparaciones biológicas tales como la vacuna BCG, vacuna contra la encefalitis japonesa, vacuna contra el sarampión, vacuna viva contra la poliomiелitis, vacuna contra la viruela, toxoide tetánico, antitoxina *habu* e inmunoglobulina humana. Estos productos farmacéuticos se pueden proporcionar en forma de, por ejemplo, un líquido, una pasta, un semisólido o un comprimido.

La composición de sacárido de la presente invención se puede proporcionar como un producto intermedio, una premezcla o similar en forma de una composición preparada mediante combinación con otros materiales, dependiendo del propósito tal como el uso final. Los otros materiales que se puede usar para su aplicación en alimentos y bebidas, y en productos parafarmacéuticos y productos farmacéuticos tomados por vía oral, no están limitados siempre que estos materiales sean aceptables como materiales para ser ingeridos por vía oral. Ejemplos de tales materiales incluyen carbohidratos no reductores que incluyen alcoholes de azúcar tales como sorbitol, maltitol, isomaltitol, maltotriitol, eritritol, xilitol, lactitol, panitol, trehalosa, glicosiltrehalosa, selaginosa, selaginooligosacárido, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina; fibras dietéticas solubles en agua tales como isomaltodextrina, glucano no digerible, polidextrosa, dextrano, inulina y fructooligosacárido; polisacáridos solubles en agua tales como goma arábiga, goma guar, goma garrofin, carragenina, pectina, hemicelulosa y pululano; edulcorantes de alta intensidad tales como dihidrocalcona, esteviósido, esteviósido de α -glicosilo, rebaudiósido, glicirrizina, éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina, acesulfamo K, taumatina y monelina; aminoácidos y proteínas tales como glicina, alanina, ácido glutámico, sales de ácido glutámico y péptidos de soja; ácidos nucleicos tales como ácido inosínico, sales de ácido inosínico, ácido guanílico y sales de ácido guanílico; emulsionantes tales como ésteres de ácidos grasos de glicerina, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, ésteres de ácidos grasos de propilenglicol, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, lecitina, saponina y caseína sódica; vitaminas tales como vitamina C y derivados de azúcar de la misma, niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, biotina, hesperidina y derivados de azúcar de la misma, y naringina y derivados de azúcar de la misma; y extractos y zumos de plantas que incluyen hojas de té y frutos, tales como el té verde, té oolong, té rooibos, té de jazmín, café y zumo. Los otros materiales que se puede usar para su aplicación en cosméticos y en productos parafarmacéuticos y productos farmacéuticos para su aplicación externa en la piel, no están limitados siempre que estos materiales sean aceptables como materiales que se van a someter a una aplicación externa sobre la piel. Ejemplos de tales materiales incluyen los otros materiales ilustrados anteriormente para su aplicación en alimentos y bebidas, y también incluyen macromoléculas solubles en agua tales como semilla de membrillo, alginato de sodio, celulosa catiónica, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilalmidón, alginato de propilenglicol, colágeno, queratina, caseína, albúmina, gelatina, éter de cloruro de hidroxipropil trimetilamonio, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, copolímeros de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo, polietilenimina, poliácido de sodio, polivinil metil éter, y polímeros de carboxivinilo; agentes blanqueadores de la piel tales como 2-glucósido de ácido ascórbico, ácido kójico, ácido láctico, ácido antranílico, cumarina, benzotriazol, imidazolina, pirimidina, dioxano, furano, pirona, ácido nicotínico, arbutina, baicalina y baicaleína; antioxidantes tales como galato de propilo, galato de butilo, galato de octilo, galato de dodecilo, ácido nordihidroguaiarético, butilhidroxianisol, dibutilhidroxitolueno y 4-hidroximetil 1-2,6-di-*tert*-butilfenol; y tensioactivos tales como tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos zwitteriónicos y tensioactivos no iónicos.

La composición y el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico que contiene la composición de sacárido de la presente invención con las características anteriores se pueden usar ventajosamente como materiales para ser añadidos a piensos para ganado y alimentos para peces, tales como los destinadas al ganado; aves de corral; mascotas; abejas; gusanos de seda; pescados y mariscos; crustáceos tales como gambas y cangrejos; equinodermos tales como erizos de mar y pepinos de mar; y larvas, juveniles y adultos de insectos; y también como materiales que se añaden a los fertilizantes administrados a los juveniles, tales como plantas germinadas, plántulas y hongos trasplantados.

4. Método de producción de la composición de sacárido de la presente invención

El método de producción de la composición de sacárido de la presente invención se describe a continuación. El método de producción de la composición de sacárido de la presente invención es un método de producción de una composición de sacárido que comprende las etapas de: dejar que la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y la α -isomaltosiltransferasa actúen sobre un hidrolizado parcial de almidón, para producir una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico (etapa 1); y purificar y recoger la composición de sacárido obtenida en la etapa 1 (etapa 2); en donde también se deja que actúe una enzima desramificadora de almidón en la etapa 1.

Las fuentes de la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y la α -isomaltosiltransferasa usadas en el método de producción de la presente invención no están limitadas siempre que la composición de sacárido de la presente invención se pueda producir con las mismas. Ejemplos específicos de las fuentes incluyen los microorganismos que pertenecen al género *Bacillus* o el género *Arthrobacter* divulgados en el documento de patente 2 y similares. La cepa C9 del *Bacillus globisporus* (FERM BP-7143), la cepa C11 del *Bacillus globisporus* (FERM BP-7144), la cepa N75 del *Bacillus globisporus* (FERM BP-7951) y las cepas mutantes de las mismas; y la cepa N75 del *Arthrobacter globiformis* (FERM BP-7591) y cepas mutantes de la misma; se prefieren especialmente como fuentes de estas enzimas. Las enzimas pueden ser enzimas purificadas obtenidas por separación y purificación, pueden ser enzimas purificadas en bruto que contienen esas enzimas, o pueden ser extractos o cultivos obtenidos a partir de microorganismos fuente o similares. Cada una de las cepas de microorganismos y las cepas mutantes de las mismas ilustradas anteriormente suele producir ambas enzimas también en el medio cuando se cultivan mediante un método convencional. Por consiguiente, un concentrado de un filtrado obtenido eliminando las células bacterianas del cultivo mediante filtración se puede usar como un agente enzimático formador de tetrasacáridos cíclicos que contiene ambas enzimas, y el agente enzimático se prefiere especialmente desde el punto de vista de ahorro de costes y mano de obra requerida para su producción. Evidentemente, las enzimas usadas pueden ser enzimas obtenidas mediante aislamiento de los genes que codifican las enzimas y realizando la recombinación genética.

Como material para producir un tetrasacárido cíclico mediante los dos tipos de enzimas descritos anteriormente, se usa un hidrolizado parcial de almidón. El origen del almidón no está limitado y puede ser almidón de superficie derivado del maíz, trigo, arroz o similares, o almidón subterráneo de patata, batata, tapioca o similares. El hidrolizado parcial del almidón se puede obtener tratando el almidón con un ácido, α -amilasa o similares mediante un método convencional. Cuanto menor es el grado de hidrólisis, mayor es el rendimiento de tetrasacárido cíclico, lo que se prefiere. El grado de hidrólisis en términos de DE (equivalente de dextrosa), que se conoce como un índice que indica el grado de hidrólisis, suele ser de 20 o inferior, preferentemente 12 o inferior, más preferentemente 7 o inferior.

Una característica importante del método de producción de la composición de sacárido de la presente invención es que también se deja que una enzima desramificadora de almidón actúe en la etapa 1, en donde se deja que la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y la α -isomaltosiltransferasa actúen sobre el hidrolizado parcial de almidón descrito anteriormente para producir tetrasacárido cíclico. El tipo y la fuente de la enzima desramificadora de almidón usada en la presente invención no están limitados siempre que la composición de sacárido de la presente invención se pueda producir con la misma. Ejemplos de la enzima desramificadora de almidón incluyen isoamilasa (EC 3.2.1.68), pululanasa (EC 3.2.1.41), oligo-1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.10) y amilo-1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.33). Entre estas, la isoamilasa producida por *Pseudomonas amyloclavata* y la pululanasa producida por un microorganismo que pertenece al género *Bacillus* (*Bacillus* sp.) son especialmente preferentes ya que la viscosidad de la composición de sacárido obtenida como resultado puede reducirse eficazmente sin evitar la reacción para producir el tetrasacárido cíclico.

En la etapa 1, en donde el tetrasacárido cíclico se produce mediante las acciones enzimáticas descritas anteriormente, el rendimiento de tetrasacárido cíclico se puede aumentar aún más dejando que actúe también la CGTasa (EC 2.4.1.19). Por lo tanto, la CGTasa se puede usar en combinación con las enzimas descritas anteriormente. La fuente de la CGTasa no está limitada, y ejemplos de la fuente incluyen *Geobacillus stearothermophilus*, *Paenibacillus illinoisensis*, *Paenibacillus pabuli*, y *Paenibacillus amylolyticus*. Entre estas, el *Geobacillus stearothermophilus* es especialmente útil ya que produce una CGTasa que aumenta eficazmente el rendimiento de tetrasacárido cíclico.

En el método de producción de la composición de sacárido de la presente invención, el uso de una amilasa de tipo exo más preferentemente se evita a lo largo de todo el proceso ya que, en este caso, se puede lograr una baja viscosidad y una baja coloración cuando la composición de sacárido se usa como jarabe de almidón. En los casos en los que se deja que tal amilasa de tipo exo actúe durante la etapa de producción del tetrasacárido cíclico o después de esta etapa, el contenido de monosacáridos reductores, disacáridos y similares aumenta, lo que lleva a dificultades en la realización de la baja coloración, de modo que el objeto de la presente invención no se puede lograr fácilmente. Ejemplos de amilasas de tipo exo cuyo uso se evita preferentemente en el método de producción de la composición de sacárido de la presente invención incluyen aquellas que tienen acciones de producción de monosacáridos o disacáridos, tales como glucoamilasa (EC 3.2.1.3), α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) y β -amilasa (EC 3.2.1.2). En la producción enzimática de un jarabe de almidón habitual, se deja que una amilasa de tipo endo tal como la α -amilasa actúe para finalizar en la etapa final de la reacción enzimática en algunos casos. Esto se lleva a cabo con el fin de reducir el peso molecular de las macromoléculas de glucano que quedan en una pequeña cantidad tras la finalización de la reacción enzimática para producir la composición de sacárido que se va a preparar en el jarabe de almidón, para mejorar de ese modo la eficacia de la etapa de purificación posterior. Esta operación normalmente no cambia sustancialmente la composición de sacárido. También en el método de producción de la composición de sacárido de la presente invención, se puede dejar que una amilasa de tipo endo actúe para finalizar, y dicha amilasa de tipo endo es más preferentemente una amilasa licuadora. Por otra parte, cuando sea necesario, una amilasa de tipo exo que tiene una acción que produce maltooligosacáridos con un grado de polimerización de 3 o superior, más preferentemente una amilasa de tipo exo que tiene una acción que produce maltooligosacáridos con un grado de polimerización de 4 o superior, se puede usar en combinación ya que apenas producen monosacáridos y disacáridos.

Las condiciones para permitir las acciones de las enzimas en la etapa 1 se pueden seleccionar apropiadamente con el fin de producir el tetrasacárido cíclico, tales como la concentración de la materia prima, el tiempo de reacción, la temperatura de reacción y el pH de reacción, dependiendo del fin y de situaciones tales como el valor del contenido total de tetrasacáridos cíclicos que se ha de obtener, y los tipos y los orígenes de las enzimas utilizadas. La temperatura de reacción es normalmente de 40 °C a 60 °C, preferentemente de 45 °C a 55 °C. El pH de la reacción es normalmente superior a 4,5 e inferior a 7,0, preferentemente de 5,0 a 6,7, más preferentemente 5,5 a 6,3. En los casos en los que se espera que la reacción enzimática se complete en 48 horas, la concentración del hidrolizado parcial de almidón como materia prima en términos de concentración de sólidos suele ser preferentemente del 1 % en masa o superior con respecto al límite inferior, y normalmente es del 40 % o inferior, preferentemente del 35 % en masa o inferior, más preferentemente del 33 % en masa o inferior con respecto al límite superior. Con respecto a las cantidades de las enzimas que se dejarán actuar, en los casos en los que se usa una enzima formadora de tetrasacárido cíclico como la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y la α -isomaltosiltransferasa, su cantidad está dentro del intervalo de normalmente 0,2 unidades a 5 unidades, preferentemente de 0,7 unidades a 4 unidades, más preferentemente de 1 unidad a 3 unidades, aún más preferentemente de 1,2 unidades a 2,5 unidades, por 1 g de la materia prima sólida. En los casos en los que se usa isoamilasa como la enzima desramificadora de almidón, su cantidad está dentro del intervalo de normalmente 100 unidades a 2000 unidades, preferentemente de 200 unidades a 1000 unidades, más preferentemente de 400 unidades a 600 unidades, por 1 g de la materia prima sólida. En los casos en los que se usa

pululanasa, su cantidad está dentro del intervalo de normalmente 0,5 unidades a 10 unidades, preferentemente de 1 unidades a 8 unidades, más preferentemente de 2 unidades a 6 unidades, por 1 g de la materia prima sólida. En los casos en los que se usa CGTasa, su cantidad está dentro del intervalo de normalmente 0,1 unidades a 5 unidades, preferentemente de 0,2 unidades a 3 unidades, más preferentemente de 0,4 unidades a 2 unidades, por 1 g de la materia prima sólida. En los casos en los que el tiempo de reacción total se establece en un tiempo distinto de 48 horas, las cantidades de las enzimas que se dejan que actúen se pueden ajustar apropiadamente dependiendo de la duración del tiempo de reacción total. El momento de la adición de cada enzima no está limitado. Todas las enzimas usadas se pueden añadir al mismo tiempo, o las enzimas se pueden añadir secuencialmente. Dependiendo de condiciones tales como la concentración de la materia prima incluida, las enzimas se añaden preferentemente de manera secuencial para aumentar el contenido total de tetrasacáridos cíclicos sin aumentar la coloración de la composición de sacárido resultante. En este caso, la enzima formadora de tetrasacárido cíclico, la CGTasa y la enzima desramificadora de almidón se añaden preferentemente en este orden. El momento de la adición de la enzima desramificadora de almidón suele ser anterior al punto temporal en el que ha pasado 1/2 del tiempo total de reacción, preferentemente antes del punto temporal en el que ha pasado 1/5 del tiempo total de reacción. Dependiendo de las condiciones, por ejemplo, cuando la concentración de sólidos de la materia prima es del 30 % en masa o superior, no se recomienda añadir la enzima desramificadora de almidón después de que la producción del tetrasacárido cíclico haya alcanzado un nivel estable, ya que esto no provoca suficientemente una disminución de la viscosidad de la composición de sacárido resultante en algunas condiciones. En los casos en los que se usa una amilasa de tipo endo para finalizar la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, cuando se asume un tiempo de reacción de aproximadamente 2 horas, la cantidad de la enzima que se deja que actúe es normalmente de 1 unidad a 40 unidades, preferentemente de 2 unidades a 25 unidades, más preferentemente de 4 unidades a 15 unidades, por 1 g de la materia prima sólida.

La solución de reacción después de la finalización de la reacción para producir el tetrasacárido cíclico se somete entonces a la etapa 2, en donde el producto de reacción se purifica y se recoge. La purificación se puede llevar a cabo de acuerdo con un método convencional de la técnica. Ejemplos del método convencional incluyen la filtración con tierra de diatomeas, la decoloración usando carbón activado y la desalinización utilizando una resina o resinas de intercambio iónico de tipo H y/o tipo OH. La purificación puede ir seguida de un ajuste de la concentración según sea apropiado, y luego el producto se puede recoger como un sólido mediante secado por pulverización, secado al vacío, liofilización o similar. Como alternativa, la purificación puede ir seguida de concentración para el ajuste a una concentración deseada, y luego el producto se puede recoger como un jarabe de almidón. Por lo tanto, se puede producir la composición de sacárido de la presente invención. En el método de producción de la composición de sacárido de la presente invención, la hidrogenación se puede llevar a cabo de acuerdo con un método convencional después de la reacción para producir enzimáticamente el tetrasacárido cíclico, pero antes de la recogida del producto, con el fin de obtener un producto reducido de la composición de sacárido. El método de producción de la composición de sacárido de la presente invención descrito anteriormente es simplemente un ejemplo preferente para obtener la composición de sacárido de la presente invención. Siempre que se pueda obtener una composición de sacárido de la presente invención que tenga las características (1) a (3), la composición de sacárido se puede producir, por ejemplo, añadiendo apropiadamente un tetrasacárido cíclico ramificado preparado por separado y carbohidratos coexistentes a un tetrasacárido cíclico de alta pureza.

La presente invención se describe a continuación basándose en experimentos y ejemplos. Sin embargo, estos son simplemente ejemplos específicos, y la presente invención no se limita a los mismos.

<Experimento 1: Preparación de diversos jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos y evaluación de las propiedades físicas de los mismos>

<Experimento 1-1: Preparación de diversos jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos>

Se prepararon un total de siete tipos de composiciones de sacárido que contienen tetrasacáridos cíclicos (jarabes de almidón) como muestras de ensayo llevando a cabo una reacción de formación de tetrasacáridos cíclicos usando enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y α -isomaltosiltransferasa basándose en el sistema de reacción (el último sistema de reacción mencionado para la muestra de ensayo 1) de una técnica convencional en la que se ha demostrado que el valor del contenido total de tetrasacáridos cíclicos es suficientemente mayor que el contenido de otros carbohidratos, mientras se emplean diversas enzimas y se cambian los tiempos de su adición.

<Experimento 1-1-1: Materiales>

- Materia prima para la reacción de formación de tetrasacáridos cíclicos

Como materia prima para la reacción de formación de tetrasacáridos cíclicos, se usó un líquido licuado obtenido hidrolizando parcialmente el almidón de maíz mediante un método convencional usando una enzima de licuefacción a alta temperatura. La concentración de sólidos y el DE de la materia prima se determinaron mediante métodos convencionales. Como resultado, fueron el 30 % en masa y un DE de 5, respectivamente.

- Enzimas

Se preparó una enzima formadora de tetrasacárido cíclico que contiene enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y α -isomaltosiltransferasa de acuerdo con el método del experimento 3 del documento de patente 1, cultivando la cepa C9 del *Bacillus globisporus* (FERM BP-7143) y retirando las células bacterianas del cultivo resultante usando una membrana SF de acuerdo con un método convencional, seguido de la concentración del filtrado resultante usando una membrana UF. La actividad enzimática se midió como sigue. En primer lugar, se mezclaron 500 μ l de un líquido preparado diluyendo adecuadamente la enzima formadora de tetrasacárido cíclico con 500 μ l de tampón de acetato 50 mM (pH 6,0) que contenía dextrina soluble al 2 % (p/v) (nombre comercial, "PINE-DEX n.º 100"; fabricada por Matsutani Chemical Industry Co., Ltd., Hyogo, Japón), y la mezcla resultante se mantuvo a 40 °C durante 1 hora para dejar que prosiguiera la reacción, después se detuvo la reacción mediante ebullición durante 10 minutos, y luego se realizó un análisis del contenido total de tetrasacáridos cíclicos (descrito más adelante) para cuantificar el tetrasacárido cíclico total producido por la reacción, y determinar de ese modo la actividad enzimática. La actividad de la enzima formadora de tetrasacárido cíclico obtenida fue de 492 unidades/ml.

Como α -glucosidasa, se usó la enzima fabricada por Amano Enzyme Inc., Aichi, Japón (nombre comercial, "Transglucosidase L 'Amano"; 13.000 unidades/ml). Como glucoamilasa, se usó la enzima fabricada por Nagase ChemteX Corporation, Osaka, Japón (nombre comercial, "Denazyme GSA/R"; 3800 unidades/g). Como isoamilasa, se usó la enzima fabricada por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón (derivada de

Pseudomonas amyloclavata, 553.500 unidades/g). Como pululanasa, se usó la enzima fabricada por Amano Enzyme Inc., Aichi, Japón (nombre comercial, "Pullulanase 'Amano' 3"; 3000 unidades/g). Como CGTasa, se usó la enzima fabricada por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón (derivada de *Geobacillus stearothermophilus*, 1634 unidades/g). Como α -amilasa, se usó la enzima fabricada por Nagase ChemteX Corporation, Osaka, Japón (nombre comercial, "NEO-Spitase PK-6/R"; 37.500 unidades/g).

<Experimento 1-1-2: Preparación de diversos jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos>

- Muestra de ensayo 1

A la materia prima (líquido licuado de almidón de maíz; DE 5; concentración de sólidos, 30 % en masa), se añadieron 2 unidades de la enzima formadora de tetrasacárido cíclico por 1 g de la materia prima sólida y 1 unidad de CGTasa por 1 g de la materia prima sólida, y la mezcla resultante se mantuvo a pH 6,0 a 50 °C durante 48 horas, para llevar a cabo la reacción de formación de tetrasacáridos cíclicos de acuerdo con el método descrito en el ejemplo A-9 del documento de patente 1. Después de esto, la solución de reacción se mantuvo a 95 °C durante 30 minutos para detener la reacción y después se enfrió a temperatura normal, seguido de una filtración, una desalinización utilizando resinas de intercambio iónico de tipo H y tipo OH, una decoloración usando carbón activado y luego una concentración hasta una concentración de sólidos del 73 % en masa utilizando un evaporador de acuerdo con métodos convencionales, para obtener la muestra de ensayo 1.

- Muestra de ensayo 2

Se llevó a cabo la misma operación que la operación para la muestra de ensayo 1, con la excepción de que se añadieron 500 unidades de isoamilasa por 1 g de la materia prima sólida en el punto temporal en el que habían pasado 5 horas desde el comienzo de la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, para obtener la muestra de ensayo 2.

- Muestra de ensayo 3

Se llevó a cabo la misma operación que la operación para la muestra de ensayo 1, con la excepción de que se añadieron 5 unidades de pululanasa por 1 g de la materia prima sólida en el punto temporal en el que habían pasado 5 horas desde el comienzo de la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, para obtener la muestra de ensayo 3.

- Muestra de ensayo 4

Se llevó a cabo la misma operación que la operación para la muestra de ensayo 1, con la excepción de que se incluyó la operación de añadir 5 unidades de α -amilasa por 1 g de la materia prima sólida después de completar la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, manteniendo la mezcla resultante a pH 6,0 a 50 °C durante 20 horas, y luego manteniendo la mezcla a 95 °C durante 30 minutos para detener la reacción, para obtener la muestra de ensayo 4. • Muestra de ensayo 5

Se llevó a cabo la misma operación que la operación para la muestra de ensayo 1, con la excepción de que se incluyó la operación de añadir 500 unidades de isoamilasa por 1 g de la materia prima sólida después de completar la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, manteniendo la mezcla resultante a pH 6,0 a 50 °C durante 20 horas, y luego manteniendo la mezcla a 95 °C durante 30 minutos para detener la reacción, para obtener la muestra de ensayo 5. • Muestra de ensayo 6

Se llevó a cabo la misma operación que la operación para la muestra de ensayo 1, con la excepción de que se incluyó la operación de añadir 5 unidades de α -amilasa por 1 g de la materia prima sólida, 1 unidad de glucoamilasa por 1 g

de la materia prima sólida, y 500 unidades de isoamilasa por 1 g de la materia prima sólida después de la completar la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, manteniendo la mezcla resultante a pH 6,0 a 50 °C durante 20 horas, y luego manteniendo la mezcla a 95 °C durante 30 minutos para detener la reacción, para obtener la muestra de ensayo 6.

5

• Muestra de ensayo 7

Se llevó a cabo la misma operación que la operación para la muestra de ensayo 1, con la excepción de que se incluyó la operación de añadir 5 unidades de α -amilasa por 1 g de la materia prima sólida, 1 unidad de glucoamilasa por 1 g de la materia prima sólida, y 5 unidades de pululanasa por 1 g de la materia prima sólida después de completar la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, manteniendo la mezcla resultante a pH 6,0 a 50 °C durante 20 horas, y luego manteniendo la mezcla a 95 °C durante 30 minutos para detener la reacción, para obtener la muestra de ensayo 7.

10

15 • Muestra de ensayo 8

Se llevó a cabo la misma operación que la operación para la muestra de ensayo 1, con la excepción de que se añadieron 2,5 unidades de la enzima formadora de tetrasacárido cíclico por 1 g de la materia prima sólida y 0,5 unidades de CGTasa por 1 g de la materia prima sólida en la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, de que se añadieron 400 unidades de isoamilasa por 1 g de la materia prima sólida en el punto temporal en el que habían pasado 5 horas desde el comienzo de la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, después se mantuvo la mezcla resultante hasta que hubieron pasado 56 horas desde el comienzo de la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, y se añadieron 5 unidades de α -amilasa por 1 g de la materia prima sólida después de completar la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, y después se dejó que la reacción prosiguiera a 80 °C durante 2 horas, para obtener la muestra de ensayo 8.

20

25

<Experimento 1-2: Análisis>

• Análisis de la composición de sacárido

30

Los contenidos (% en masa) de carbohidratos tales como tetrasacáridos cíclicos contenidos en cada muestra de ensayo obtenida, basado en los sólidos secos con respecto al contenido de sólidos totales, se determinaron sometiendo la muestra de ensayo a cromatografía líquida de alta resolución (en lo sucesivo denominada HPLC) usando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución disponible en el mercado (nombre comercial, "Prominence"; fabricado por Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) en las siguientes condiciones, y realizando el cálculo por el método de porcentajes basándose en el cromatograma obtenido. En este análisis, el contenido se determinó para cada uno de los siguientes: tetrasacárido cíclico; el total de tetrasacáridos cíclicos ramificados que contienen una o dos moléculas de glucosa unidas; el total de glucosa, maltosa e isomaltosa como carbohidratos con un grado de polimerización de 1 o 2; y "otros", que es el total de todos los demás carbohidratos.

35

40

<Condiciones de HPLC>

Columna: dos columnas "MCI GEL CK04SS" (fabricadas por Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japón) conectadas en serie

45

Concentración de muestra: 1 % en masa en términos de concentración de sólidos

Volumen de inyección de muestra: 20 μ l

Eluyente: Agua ultrapura

Caudal: 0,4 ml/min

Temperatura: 80 °C

50

Detección: índice de refracción diferencial

• Análisis del contenido total de tetrasacáridos cíclicos

El contenido total de tetrasacáridos cíclicos en cada muestra de ensayo obtenida se determinó mezclando 0,5 ml de una solución cuya concentración de sólidos se ajustó al 2 % en masa, con 0,5 ml de tampón de acetato 50 mM (pH 5,0) que contiene 400 unidades/ml de α -glucosidasa y 10 unidades/ml de glucoamilasa, manteniendo la mezcla resultante a 50 °C durante 24 horas para digerir completamente los enlaces entre las moléculas de glucosa distintas de las de los tetrasacáridos cíclicos, deteniendo la reacción de digestión mediante ebullición durante 10 minutos, sometiendo el producto resultante a desalinización y filtración a través de un filtro de membrana mediante métodos convencionales, realizando una HPLC en las siguientes condiciones y, a continuación, realizando el método de porcentajes de área basándose en el cromatograma obtenido. Mediante la reacción enzimática en estas condiciones, una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico, tetrasacárido cíclico ramificado y carbohidrato coexistente, tal como las muestras de ensayo, sufre una hidrólisis completa del resto de la cadena de azúcar excluyendo el tetrasacárido cíclico, para producir glucosa. Como resultado, después de la reacción, la composición se convierte en una composición de sacárido compuesta sustancialmente solo por el tetrasacárido cíclico y la glucosa.

55

60

65

<Condiciones de HPLC>

Columna: "Shodex Sugar KS-801 (tipo Na)" (fabricada por Showa Denko K. K., Tokio, Japón)

Caudal: 0,5 ml/min

Temperatura: 60 °C

Los aparatos y condiciones no descritos en este caso fueron los mismos que los del análisis de LA composición de sacárido anterior (parte de bajo grado de polimerización).

• Medición de la viscosidad

La viscosidad de cada muestra de ensayo se determinó mediante medición con un reómetro (nombre comercial, "MCR102"; fabricado por Anton Paar Japan K. K., Tokio, Japón) en condiciones en las que la temperatura de la muestra y la temperatura del entorno eran de 15 °C.

• Medición de la actividad acuosa

La actividad acuosa de cada muestra de ensayo se midió utilizando un sistema de medición de la actividad acuosa (nombre comercial, "AquaLab Series 4TDL", fabricado por AINX Co., Ltd., Tokio, Japón).

<Experimento 1-3: Resultados y Discusión>

Los resultados obtenidos al someter las muestras de ensayo 1 a 8, obtenidas en el experimento 1-1, a análisis de composición de sacáridos, análisis de contenido total de tetrasacáridos cíclicos, medición de la viscosidad y análisis de la actividad acuosa de acuerdo con los métodos descritos en el experimento 1-2 se muestran en la tabla 1. La tabla 1 también muestra el tipo y el momento de adición de cada enzima utilizada para la preparación de las muestras de ensayo 1 a 8, en donde "+" indica que se añadió la enzima, y "-" indica que no se añadió la enzima.

[Tabla 1]

N.º de muestra de ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Enzima formadora de tetrasacárido cíclico	+	+	+	+	+	+	+	+
CGTasa	+	+	+	+	+	+	+	+
isoamilasa								
(adición en la hora 5 de la reacción)	---	+	---	---	---	---	---	+
Pululanasa								
(adición en la hora 5 de la reacción)	---	---	+	---	---	---	---	---
α -Amilasa								
(adición después de completar la reacción)	---	---	---	+	---	+	+	+
Glucosamilasa								
(adición después de completar la reacción)	---	---	---	---	---	+	+	---
isoamilasa								
(adición después de completar la reacción)	---	---	---	---	+	+	---	---
Pululanasa								
(adición después de completar la reacción)	---	---	---	---	---	---	+	---
Contenido total de tetrasacáridos cíclicos (% en masa)	49,1	48,4	44,3	48,9	49,5	48,4	48,9	49,6
Tetrasacárido cíclico	30,4	31,7	29,2	30,5	31,1	29,8	29,2	33,2
Tetrasacárido cíclico ramificado ²⁾	13,8	15,0	15,5	14,0	14,4	16,3	18,0	16,4
DP1+DP2 ³⁾	4,8	9,7	15,0	4,9	5,5	19,1	21,1	11,5
Otros ⁴⁾	51,0	43,6	40,3	50,6	49,0	34,8	31,7	38,9
Viscosidad (Pa·s)	45,6	26,4	18,1	36,1	38,3	18,7	13,4	32,4
Actividad acuosa	0,87	0,86	0,85	0,87	0,87	0,84	0,84	0,86

*1) "Adición en la hora 5 de la reacción" significa que la enzima se añadió cuando habían pasado 5 horas desde el comienzo de la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, y "adición después de completar la reacción" significa que la enzima se añadió después de la finalización de la reacción de formación de tetrasacárido cíclico.

*2) "Tetrasacárido cíclico ramificado" significa el contenido total de tetrasacáridos cíclicos ramificados que contienen una o dos moléculas unidas de residuos de glucosa.

*3) "DP1+DP2" significa el contenido total de glucosa, maltosa e isomaltosa.

*4) "Otros" significa el contenido total de todos los demás sacáridos.

Como se puede observar en la tabla 1, también en los casos en los que se dejó que actuaran otras enzimas, enumeradas en la tabla 1, además de la enzima formadora de tetrasacárido cíclico y la CGTasa (muestras de ensayo 2 a 8), el nivel del contenido total de tetrasacárido cíclico fue equivalente al del caso de la muestra de ensayo 1, que se obtuvo mediante un método convencional. El factor de conversión de energía es un factor para el cálculo del valor energético de un alimento. Mientras que la glucosa tiene un factor de conversión de energía de 4 kcal/g, el tetrasacárido cíclico tiene un factor de conversión de energía de 0 kcal/g (como se muestra en el ensayo de referencia descrito más adelante). Teniendo en cuenta este hecho junto con los resultados del cálculo del valor energético en el experimento 4, el ejemplo 1 y el ejemplo comparativo 1 descritos más adelante, se cree que una propiedad de bajo contenido calórico puede ser suficientemente atractiva como material de carbohidrato en los casos en los que el contenido total de tetrasacáridos cíclicos es del 38 % en masa o superior. Asimismo, la actividad acuosa fue de 0,88 o inferior en todos los casos, de modo que la actividad acuosa también fue satisfactoria desde el punto de vista del valor requerido para evitar la contaminación microbiana en los alimentos. La muestra de ensayo 1, que se obtuvo mediante la técnica convencional, mostró una viscosidad de 45,6 Pa.s. Por otro lado, las muestras de ensayo 2, 3 y 8, que se obtuvieron mediante un proceso en el que se dejó que la enzima desramificadora de almidón isoamilasa o pululanasa actuara durante la reacción para producir tetrasacárido cíclico, mostraron viscosidades de 26,4 Pa.s, 18,1 Pa.s y 32,4 Pa.s, respectivamente. Por lo tanto, mostraron viscosidades notablemente más bajas que las de la muestra de ensayo 1, que se obtuvo por el método convencional.

Por otro lado, la muestra de ensayo 4, que se obtuvo mediante un proceso en el que se dejó que la amilasa α -amilasa de tipo endo actuara después de la reacción para producir tetrasacárido cíclico, sin dejar que actuara una enzima desramificadora de almidón, y la muestra de ensayo 5, que se obtuvo mediante un proceso en el que se dejó que la enzima desramificadora de almidón isoamilasa actuara después de la reacción en lugar de durante la reacción, no mostró una disminución significativa de la viscosidad (viscosidades: 36,1 Pa.s y 38,3 Pa.s, respectivamente) en comparación con la muestra de ensayo 1. Las muestras de ensayo 6 y 7, que se obtuvieron mediante un proceso en el que la glucoamilasa, que es una amilasa de tipo exo que tiene una actividad que produce monosacáridos, y la α -amilasa, que es una amilasa de tipo endo, así como la enzima desramificadora de almidón isoamilasa o pululanasa, se dejó que actuaran después de la reacción para producir tetrasacárido cíclico, y mostraron viscosidades notablemente más bajas (18,7 Pa.s y 13,4 Pa.s, respectivamente) que la de la muestra de ensayo 1, que se usó como base. Por otro lado, la muestra de ensayo 8, que se obtuvo mediante un proceso en el que se dejó que la enzima desramificadora de almidón isoamilasa actuara durante la reacción para producir tetrasacárido cíclico, y en el que se dejó que la amilasa α -amilasa de tipo endo actuara sola después de la reacción, mostró una viscosidad de 32,4 Pa.s, que era inferior a la de la muestra de ensayo 1, y también inferior al nivel prácticamente aceptable, 35 Pa.s.

Desde el punto de vista del valor medido de la viscosidad sola, se esperaba que las muestras de ensayo 2, 3, 6, 7 y 8 permitieran lograr el objeto de la presente invención. Sin embargo, la medida en la que el valor medido de la viscosidad refleja la manejabilidad real aún no estaba clara, y la coloración no se pudo juzgar basándose únicamente en los resultados anteriores.

<Experimento 2: Evaluación de la manejabilidad y la coloración de varios jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos>

Basándose en los resultados del experimento 1, la evaluación en el experimento 2 se llevó a cabo para esclarecer lo siguiente.

- (i) Si las diferencias en la viscosidad encontradas entre las muestras de ensayo en el experimento 1 afectan o no a la manejabilidad real.
- (ii) Si hay o no diferencias en la coloración entre las muestras de ensayo obtenidas en el experimento 1.

<Experimento 2-1: Métodos>

• Método de evaluación de la manejabilidad

En condiciones en las que la temperatura del entorno y las temperaturas de todos los materiales utilizados se ajustaron a 15 °C, se colocaron 500 g de cada muestra de ensayo preparada en el experimento 1 en un vaso de precipitados de vidrio de 1 l, y se añadieron con cuidado 200 g de agua desionizada, seguido de la mezcla de la muestra con una espátula de metal para homogeneizar toda la muestra. Para proporcionar un control, un jarabe de almidón que contiene maltotetraosa disponible en el mercado (nombre comercial, "TETRUP"; fabricado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón; contenido de maltotetraosa, 50 % en masa o más), cuya concentración de sólidos se había ajustado previamente al 73 % en masa, se trató en las mismas condiciones, y luego la muestra se mezcló usando una espátula de metal para homogeneizar toda la muestra. El tiempo y la fuerza requeridos para que cada muestra de ensayo llegara a ser completamente homogénea mediante mezcla se compararon con el tiempo y la fuerza requeridos para que la muestra de control llegara a ser completamente homogénea mediante mezcla, y se calificaron en la siguiente escala de 3 puntos.

"O" (manejabilidad "excelente"): Equivalente a la del control.

"Δ" (manejabilidad "buena"): Se requirió algo más de tiempo y fuerza en comparación con el control, aunque no

hubo problema en la manejabilidad.

"X" (manejabilidad "deficiente"): Claramente se requería más tiempo y fuerza en comparación con el control, y había un problema en la manejabilidad.

5 • Método de evaluación de la coloración

En un recipiente sellado, un tampón de acetato 50 mM (pH 6,0) que contenía cada una de las muestras de ensayo 1 a 8 al 10 % en masa como un sólido, y que contenía también un 1 % en masa de glicina, se introdujo. A continuación, el recipiente se mantuvo en un baño de agua en ebullición durante 1 hora. Para proporcionar un control, el jarabe de almidón que contiene maltotetraosa disponible en el mercado descrito anteriormente se sometió a la misma operación. Después de completar el mantenimiento en el baño de agua en ebullición durante 1 hora, cada muestra se enfrió rápidamente y se midió la absorbancia a 460 nm mediante un método convencional, seguido de una comparación visual del grado de coloración entre las muestras. La absorbancia de la muestra de control fue de 0,100. El resultado de cada muestra de ensayo se comparó con el resultado de la muestra de control, y la coloración se calificó en la siguiente escala de 3 puntos.

"O" (coloración "baja"): La absorbancia fue 1,3 veces la absorbancia del control o menor, y apenas se pudo encontrar una diferencia visual de la coloración en la comparación con el control.

"Δ" (coloración "media"): La absorbancia fue más de 1,3 veces la absorbancia del control, pero fue 1,6 veces la absorbancia del control o menor. Se encontró visualmente algo de coloración en la comparación con el control, pero se consideró que la coloración estaba dentro del intervalo aceptable en la producción de alimentos habitual.

"X" (coloración "alta"): La absorbancia fue más de 1,6 veces la absorbancia del control. Se encontró visualmente de manera clara una coloración intensa en la comparación con el control, y se consideró que la coloración era inaceptable en la producción de alimentos habitual.

25 <2-2: Resultados y Discusión>

Los resultados se muestran en la tabla 2.

30 [Tabla 2]

N.º de muestra de ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Manejabilidad	X	O	O	X	X	O	O	O
Coloración	O	O	Δ	O	O	X	X	Δ

Como se muestra en la tabla 2, las muestras de ensayo 2, 3 y 8 se calificaron como "O" (excelente) en términos de manejabilidad, lo que se cree que está relacionado con la viscosidad. Por lo tanto, no tenían ningún problema en la manejabilidad. También desde el punto de vista de la coloración, se calificaron como "O" (baja) o "Δ" (media), indicando que no tenían ningún problema. Por otro lado, mientras que las muestras de ensayo 6 y 7, cuyas viscosidades también eran bajas, fueron calificadas ambas como "O" (excelente) en términos de manejabilidad, y no eran satisfactorias desde el punto de vista de la coloración. Las muestras de ensayo 6 y 7, que se calificaron en términos de coloración como "X" (alta), contienen más del 16 % en masa de carbohidratos con un grado de polimerización de 1 o 2. Por lo tanto, se pensó que el problema en la coloración se puede evitar estableciendo el contenido de carbohidratos con un grado de polimerización de 1 o 2 hasta un 16 % en masa o inferior. Las muestras de ensayo 4 y 5 se calificaron en términos de coloración como "O" (excelente), pero fueron calificadas en términos de manejabilidad como "X" (deficiente). Basándose en los resultados anteriores, así como en la propiedad de bajo contenido calórico y la baja actividad acuosa confirmada en el experimento 1, se pensó que las muestras de ensayo 2, 3 y 8 permitían lograr el objeto de la presente invención.

Posteriormente, el experimento 3 se llevó a cabo de la siguiente manera para elucidar la característica estructural por la que las muestras de ensayo 2, 3 y 8 mostraron baja viscosidad y buena manejabilidad independientemente del hecho de que sus contenidos de tetrasacáridos cíclicos totales no fueran notablemente diferentes de los de otras muestras de ensayo.

<Experimento 3: Estudio de la estructura implicada en la manejabilidad del jarabe de almidón que contiene tetrasacárido cíclico>

Para esclarecer la diferencia estructural que afecta a las diferencias en la manejabilidad entre las muestras de ensayo, se llevó a cabo el siguiente análisis centrándose en el contenido de residuos de glucosa que tienen cada modo de enlace y el contenido de carbohidratos con un grado medio de polimerización en cada muestra de ensayo.

<Experimento 3-1: Métodos>

60 • Análisis de metilación

De acuerdo con un método descrito en Ciucanu *et al.* (*Carbohydrate Research*, vol. 131, número 2, págs. 209-217

(1984)), cada muestra de ensayo obtenida en el experimento 1 se sometió primero a la metilación de los grupos hidroxilo libres y a la hidrólisis completa, para obtener glucosa metilada. La glucosa metilada se redujo para preparar glucitol metilado, y los grupos hidroxilo del glucitol metilado obtenido se acetilaron para obtener finalmente acetato de glucosa metilado. El acetato de glucosa metilado obtenido de cada muestra de ensayo se sometió a continuación a cromatografía de gases (en lo sucesivo denominada "GC") utilizando un sistema de cromatografía de gases disponible en el mercado (nombre comercial, "GC-2010 Plus"; fabricado por Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) en las siguientes condiciones, para determinar el contenido (%) de residuos de glucosa que tienen cada modo de enlace en cada muestra de ensayo.

10 <Condiciones de GC>

Columna: columna capilar InertCap5 (0,25 mm (diámetro interior) x 30 m (longitud) x 0,25 µm (espesor de película), fabricada por GL Sciences, Inc., Tokio, Japón)

Gas portador: Helio

15 Temperatura de la columna: retención a 130 °C durante 3 minutos, calentamiento hasta 250 °C a 5 °C/min, y luego retención a 250 °C durante 10 minutos

Caudal: 1,0 ml/min

Detección: FID

Volumen de inyección: 1 µl (división 1/50)

20 Tiempo de análisis: 46 minutos

• Medición del contenido de carbohidratos con un grado medio de polimerización

25 En las mismas condiciones que en la HPLC para el análisis de la composición de sacáridos del experimento 1, se analizó una mezcla de maltooligosacáridos con un grado de polimerización conocido. El cromatograma resultante se comparó con el cromatograma obtenido para cada muestra de ensayo en el experimento 1, para medir el contenido de carbohidratos con un grado medio de polimerización que no se había evaluado o estudiado con detalle en el experimento 1, es decir, los carbohidratos que se juzgó que correspondían a un grado de polimerización de 4 a 13 (sin embargo, los tetrasacáridos cíclicos y los tetrasacáridos cíclicos ramificados que contenían una o dos moléculas de glucosa unidas a un tetrasacárido cíclico, se excluyeron en este caso debido a las propiedades de HPLC en las condiciones anteriores), mediante el método de porcentajes de área.

• Medición del poder reductor

35 El poder reductor se determinó usando D-glucosa como sustancia patrón midiendo la cantidad de azúcar reductor por el método de Somogyi-Nelson como se describe a continuación, y midiendo la cantidad total de sacáridos por el método de antrona-ácido sulfúrico, seguido de la sustitución de estas en la fórmula [4] descrita anteriormente para realizar el cálculo.

40 • Medición por el método de Somogyi-Nelson

Después de mezclar 2 ml de reactivo de cobre Somogyi con 1 ml de una muestra diluida dentro del intervalo de una curva de calibración, la mezcla resultante se sometió a ebullición durante 10 minutos y luego se enfrió con agua corriente. Después de esto, se añadieron 2 ml de reactivo de Nelson al líquido enfriado y, a continuación, la mezcla resultante se mezcló rápidamente. La mezcla se dejó reposar hasta que su color cambió después de la adición de reactivo de Nelson de amarillo-verde a azul, y luego se le añadieron 5 ml de agua, seguido de agitación de la mezcla y medición de la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm. Basándose en la absorbancia medida y la curva de calibración, se determinó la cantidad de azúcar reductor. La curva de calibración se preparó usando una solución patrón de D-glucosa.

50 • Medición por el método de antrona-ácido sulfúrico

55 En 5 ml de reactivo de antrona al 0,2 % preenfriado en agua helada, se vertieron con cuidado 0,5 ml de cada muestra diluida dentro del intervalo de una curva de calibración y la mezcla resultante se mezcló lo suficiente. Después de esto, la mezcla se sometió a ebullición durante 10 minutos y luego se enfrió con agua corriente, seguido de la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm. Basándose en la absorbancia medida y la curva de calibración, se determinó la cantidad total de sacáridos. La curva de calibración se preparó usando una solución patrón de D-glucosa.

<Experimento 3-2: Resultados y Discusión>

60 La tabla 3 muestra el contenido de residuos de glucosa que tienen cada modo de enlace, determinado por el análisis de metilación de cada muestra de ensayo. Dado que la medición del contenido de carbohidratos con un grado medio de polimerización mostró una cierta relación entre la viscosidad observada para cada muestra de ensayo y el contenido de carbohidratos correspondientes a un grado de polimerización de 4 a 13, el contenido de carbohidratos con tal grado de polimerización también se muestra en la tabla 3. Los resultados sobre la manejabilidad y la coloración se copiaron de la tabla 2.

Tabla 3]

N.º de muestra de ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Manejabilidad ^{*1}	X	o	O	X	X	O	o	O
Coloración ^{*1}	O	o	Δ	O	O	X	X	Δ
α-1,4	15,4	11,2	10,8	15,3	15,6	8,2	6,3	9,2
α-1,4,6	6,4	5,0	4,5	6,3	5,7	5,2	5,2	3,9
α-1,3	33,3	34,9	34,6	33,0	33,4	35,8	35,7	33,7
α-1,6	29,9	30,8	28,7	30,1	29,4	29,6	27,4	31,5
α-1,3,6	3,2	3,4	3,8	3,1	3,3	3,3	5,1	4,0
α-1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
No reductora	11,8	14,7	17,6	12,2	12,6	18,0	20,4	17,5
Contenido (% en masa) de carbohidratos con DP de 4 a 13	31,5	39,2	37,4	33,5	37,0	30,5	28,9	37,1
Poder reductor (%)	4,1	8,5	13,6	7,1	5,5	17,6	19,8	12,4

*1) Copiado de la tabla 2.

*2) "α-1,4" significa glucosa con enlaces α-1,4 (lo mismo se aplica en lo sucesivo). "No reductora" significa la glucosa del extremo no reductor.

• Sobre la relación del modo de enlace con la viscosidad y la coloración

Basándose en los resultados mostrados en la tabla 3, con respecto a la relación de la manejabilidad y la coloración con el contenido de residuos de glucosa que tienen cada modo de enlace determinado por el análisis de metilación, se pensó que los contenidos de glucosa con enlaces α -1,4 y de glucosa con enlaces α -1,4,6 tienen una relación característica con la manejabilidad y la coloración. Más específicamente, las muestras de ensayo 1, 4 y 5, que se calificaron como "deficientes" en términos de manejabilidad, tenían contenidos relativamente altos de glucosa con enlaces α -1,4 (15,4 %, 15,3 % y 15,6 %, respectivamente). Por otro lado, Las muestras de ensayo 6 y 7, que se calificaron como "excelentes" en términos de manejabilidad, pero que se calificaron como "altas" en términos de coloración, indicando la presencia de un problema en la coloración, tendían a tener contenidos relativamente bajos de glucosa con enlaces α -1,4 (8,2 % y 6,3 %, respectivamente). Por otra parte, el contenido de glucosa con enlaces α -1,4,6 tendía a ser relativamente alto en las muestras de ensayo 1, 4 y 5, pero tendía a ser relativamente bajo en las muestras de ensayo 6 y 7. A partir de los resultados anteriores, se pensó que una muestra con manejabilidad deficiente no tiene problemas en la coloración y tiene un alto contenido de glucosa con enlaces α -1,4, y que una muestra con buena manejabilidad y coloración problemática tiende a tener bajos contenidos tanto de glucosa con enlaces α -1,4 como de glucosa con enlaces α -1,4,6.

Desde un punto de vista integral, teniendo también en cuenta el ejemplo 1 y el ejemplo comparativo 1 descritos más adelante, se pensó que, en una composición de sacárido obtenida mediante una reacción de formación de tetrasacárido cíclico en la que se deja que la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y la α -isomaltosiltransferasa actúen sobre un hidrolizado parcial de almidón, generalmente tiende a ocurrir un problema en la manejabilidad sin causar problemas en la coloración cuando el contenido de glucosa con enlaces α -1,4 es superior al 15 %, o el contenido de glucosa con enlaces α -1,4,6 es del 6 % o superior, excepto en los casos en los que se deja que una enzima desramificadora de almidón actúe en paralelo a la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, tal como los casos de las muestras de ensayo 2, 3 y 8. Por otro lado, se pensó que, cuando el contenido de glucosa con enlaces α -1,4 es del 9 % o inferior, el contenido de glucosa con enlaces α -1,4,6 muestra un valor de menos del 6 %, de modo que la composición de sacárido tiende a tener un problema en la coloración sin tener problemas en la manejabilidad.

Por el contrario, en las muestras de ensayo 2, 3 y 8, que se obtuvieron mediante un proceso en el que se dejó que una enzima desramificadora de almidón actuara en paralelo a la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, el contenido de glucosa con enlaces α -1,4 fue superior al 9 % y del 15 % o inferior, y el contenido de glucosa con enlaces α -1,4,6 fue inferior al 6 %. En correspondencia con estos resultados, las muestras de ensayo 2, 3 y 8 no tenían ni un problema en la manejabilidad ni un problema en la coloración. A partir de los resultados anteriores, así como los resultados del ejemplo 1 y el ejemplo comparativo 1 descritos más adelante, se descubrió que se puede obtener un jarabe de almidón que contiene tetrasacárido cíclico que no tiene ni un problema en la manejabilidad ni un problema en la coloración en el caso en el que el contenido de glucosa con enlaces α -1,4 es del 15 % o inferior, incluso cuando es superior al 9 %, y donde el contenido de glucosa con enlaces α -1,4,6 es inferior al 6 %. Como se muestra en la tabla 1 anterior, las viscosidades de las muestras de ensayo 2, 3 y 8 fueron de 26,4 Pa.s, 18,1 Pa.s y 32,4 Pa.s, respectivamente. Estos valores fueron notablemente inferiores a 45,6 Pa.s, la viscosidad de la muestra de ensayo 1, que se produjo mediante un método de producción convencional. Por otra parte, ya que las muestras de ensayo 4 y 5, cuyas viscosidades eran de 36,1 Pa.s y 38,3 Pa.s, respectivamente, se calificaron como "deficientes" (x) en términos de manejabilidad, se consideró que es preferente una viscosidad de 35,0 Pa.s o inferior, y es más preferente una viscosidad de 33,0 Pa.s o inferior, para la composición de sacárido de acuerdo con la presente invención.

El descubrimiento anterior, obtenido mediante el uso combinado de una enzima desramificadora de almidón en la reacción de formación de tetrasacárido cíclico que emplea una enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y α -isomaltosiltransferasa, se puede decir que es un descubrimiento histórico completamente novedoso, realizado de manera única por los presentes inventores.

• Sobre la relación de la manejabilidad y la coloración con el método de producción

En cuanto a la relación con el método de producción, se puede obtener de manera eficiente un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico cuyo contenido de glucosa con enlaces α -1,4 es superior al 9 % y del 15 % o inferior, y cuyo contenido de glucosa con enlaces α -1,4,6 es inferior al 6 %, que muestra buena manejabilidad y baja coloración, dejando que una enzima desramificadora de almidón actúe durante el proceso de la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, como es evidente a partir de los resultados de las tablas 1, 2 y 4. Por otro lado, en el caso en el que se dejó que actuara la α -amilasa, que es una amilasa de tipo endo, sin dejar que una enzima desramificadora de almidón (muestra de ensayo 4) actuara, el caso en el que se dejó que una enzima desramificadora de almidón actuara después de la reacción de formación de tetrasacárido cíclico (muestra de ensayo 5), y los casos en los que la glucoamilasa, que es una amilasa de tipo exo, se dejó que actuara junto con una enzima desramificadora de almidón (muestras de ensayo 6 y 7), no se podía obtener una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico (jarabe de almidón) cuyo contenido de glucosa con enlaces α -1,4 y glucosa con enlaces α -1,4,6 están dentro de los intervalos descritos anteriormente. Por lo tanto, se pensó que lograr el objeto de la presente invención es difícil en los casos en los que se deja que actúe una amilasa de tipo endo sola sin dejar que actúe una enzima desramificadora de almidón, los casos en los que se deja que actúe una enzima desramificadora de almidón, pero el momento de la acción

es después de completar la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, y los casos en los que se deja que actúe una amilasa de tipo exo junto con una enzima desramificadora de almidón.

- Sobre la relación del contenido de carbohidratos que tienen un grado medio de polimerización, con la manejabilidad y la coloración

Basándose en los resultados mostrados en la tabla 3 obtenidos determinando el contenido de carbohidratos con un grado de polimerización medio (con un grado de polimerización de 4 a 13), las muestras de ensayo 2, 3 y 8, que no tenía ningún problema ni en la manejabilidad ni en la coloración, mostraron contenidos notablemente más altos, de más del 37 % en masa, de carbohidratos con un grado de polimerización de 4 a 13 (excluyendo, sin embargo, los tetrasacáridos cíclicos y los tetrasacáridos cíclicos ramificados que contenían una o dos moléculas de glucosa unidas a un tetrasacárido cíclico) en comparación con otros casos. Por consiguiente, se pensó que el contenido de carbohidratos con un grado de polimerización de 4 a 13 estaba implicado en la buena manejabilidad y la baja coloración, que son características incompatibles. Por lo tanto, se pensó que no solo los contenidos de residuos de glucosa que tienen los modos de enlace particulares descritos anteriormente, sino también el contenido de carbohidratos con un grado de polimerización de 4 a 13 se pueden usar como índices que indican si una composición de sacárido que contiene tetrasacárido cíclico tiene o no una buena manejabilidad y una baja coloración.

<Experimento 4: Otros análisis y evaluaciones>

Basándose en los experimentos 1, 2 y 3 descritos anteriormente, se descubrió que las muestras de ensayo 2, 3 y 8 permiten lograr el objeto de la presente invención desde el punto de vista de su buena manejabilidad y baja coloración. En el experimento 4, se llevaron a cabo ensayos de evaluación sobre la ausencia de precipitación de carbohidratos durante el almacenamiento y sobre la propiedad de bajo contenido calórico, como otros problemas. De manera adicional, se llevó a cabo una evaluación de la propiedad de fibra dietética.

<Experimento 4-1: Materiales>

Las muestras de ensayo 2, 3 y 8 preparadas en el experimento 1-1-2 se usaron como los sujetos a evaluar.

<Experimento 4-2: Métodos>

- Evaluación de la propiedad de precipitación de cristales durante el almacenamiento

Cantidades iguales de las muestras de ensayo 2, 3 y 8, y, como control, el mismo jarabe de almidón que contiene maltotetraosa que el del experimento 2, se colocaron por separado en vasos de precipitados de vidrio y se mantuvieron a 4 °C durante 1 semana. A continuación, se evaluó visualmente la presencia o ausencia de precipitados.

- Cálculo del valor energético

Como se describe más adelante en el ensayo de referencia, se determinó que el factor de conversión de energía del tetrasacárido cíclico era 0 kcal/g. Por otro lado, se supone que el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico preparado en el experimento 1 se digiere en el organismo vivo, dando como resultado la conversión del carbohidrato coexistente y el resto de estructura ramificada del tetrasacárido cíclico ramificado en glucosa, para convertirse en una fuente de energía. Basándose en la suposición anterior, el contenido total de tetrasacáridos cíclicos (% en masa) de cada una de las muestras de ensayo 2, 3 y 8 se restó del 100 % en masa, y el valor resultante se multiplicó por el factor de conversión de energía de la glucosa, 4 kcal/g, con el fin de determinar el valor energético de cada muestra de ensayo.

- Medición del contenido de fibra dietética

Como sólido, se tomaron con precisión 100 mg de cada una de las muestras de ensayo 2, 3 y 8 y, a continuación, se sometieron a digestión con α -amilasa, a digestión con proteasa y a digestión con amiloglucosidasa usando un kit de ensayo de fibra dietética disponible en el mercado (nombre comercial, "Dietary Fiber Total Assay Control Kit"; fabricado por Sigma, Kanagawa, Japón) de acuerdo con el método descrito en la sección 8, Fibra dietética, (2) Cromatografía líquida de alta resolución (método enzima-HPLC), en "Methods for analyzing nutritional components, etc. (Métodos descritos en el apéndice 1-3 de la Norma de etiquetado nutricional)" en la Norma de etiquetado nutricional (Notificación n.º 146 del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, mayo de 1996)", seguida de desalinización y concentración de acuerdo con métodos convencionales, y luego ajuste del volumen a 25 ml. La solución después del tratamiento se sometió a HPLC en las siguientes condiciones, para determinar la relación del área de pico del otro componente (es decir, fibra dietética) en relación con la de glucosa en la solución después del tratamiento.

<Condiciones de HPLC>

Columna: dos columnas "TSKgel G2500PWXL" (7,8 mm (diámetro interior) x 300 mm (longitud); fabricadas por Tosoh Corporation, Tokio, Japón) conectadas en serie

Eluyente: Agua ultrapura
 Concentración de sacárido en la muestra: 0,8 % en masa
 Temperatura de la columna: 80 °C
 Caudal: 0,5 ml/min
 Detección: Índice de refracción diferencial
 Volumen de inyección: 20 µl
 Tiempo de análisis: 50 minutos

Los aparatos y condiciones no descritos en este caso fueron los mismos que los del análisis de composición de sacáridos mostrado en el experimento 1-2.

Posteriormente, la cantidad de glucosa (mg) contenida en cada solución tratada se cuantificó mediante el método habitual de la glucosa oxidasa y el valor cuantificado se multiplicó por la relación del área de pico del otro componente (es decir, fibra dietética) en relación con la de glucosa en la solución tratada determinada como se ha descrito anteriormente, para calcular la cantidad de fibra dietética (mg) contenida en la solución tratada. Basándose en este resultado y la masa inicial del sólido (100 mg) de cada muestra de ensayo, se determinó el contenido de fibra dietética (% en masa) en la muestra de ensayo.

<Experimento 4-3: Resultados y Discusión>

Los resultados se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4]

N.º de muestra de ensayo	2	3	8
Propiedad de precipitación de cristales*1	O	O	O
Valor energético (kcal/g sólido seco)	2	2	2
Contenido de fibra dietética (% en masa)	73	74	74

*1) "O" representa que no se encontró precipitación de cristales, de manera similar al control.

Como se puede observar en la tabla 4, no se produjo precipitación de cristales en las muestras de ensayo 2, 3 y 8 en las condiciones descritas anteriormente, de manera similar al caso del jarabe de almidón que contiene maltotetraosa de control. La cristalización de un tetrasacárido cíclico se produce fácilmente. Por ejemplo, como se muestra en el experimento 30 del documento de patente 1, un tetrasacárido cíclico que tiene una pureza del 98 % en masa produce fácilmente la precipitación de cristales cuando se prepara en forma de una solución acuosa con una concentración de sólidos del 50 % en masa. En vista de esto, se puede decir que las muestras de ensayo 2, 3 y 8 tienen suficientemente la propiedad de que la precipitación de cristales apenas se produce incluso como solución acuosa altamente concentrada, propiedad que se requiere para los jarabes de almidón. En las muestras de ensayo 2, 3 y 8, el valor energético fue de 2 kcal/g. Basándose en el hecho de que un carbohidrato completamente digerido y absorbido tiene un valor energético de 4 kcal/g, se puede decir que la propiedad de bajo contenido calórico de las muestras de ensayo puede ser suficientemente atractiva. El contenido de fibra dietética también estaba en un nivel relativamente alto tal como se esperaba. Por lo tanto, se podría confirmar que las muestras de ensayo 2, 3 y 8 son composiciones de sacárido que contienen tetrasacáridos cíclicos que permiten la consecución de todos los objetos de la presente invención.

<Prueba de referencia: Cálculo del factor de conversión de energía del tetrasacárido cíclico>

1. Antecedentes y objeto

Una evaluación preliminar ha revelado que un tetrasacárido cíclico ingerido por vía oral por un organismo humano alcanza el intestino grueso sin ser digerido o absorbido. Por otro lado, no está claro si el tetrasacárido cíclico es fermentado o no por las enterobacterias. El cálculo del factor de conversión de energía de un carbohidrato que llega por completo al intestino grueso sin ser digerido o absorbido se debe realizar determinando cuantitativamente el grado de fermentación basándose en la comparación con un material del que se sabe que no es digerido o absorbido sino que es completamente fermentado por las enterobacterias, y cuyo factor de conversión de energía se conoce, tal como un fructooligosacárido (factor de conversión de energía, 2 kcal/g) (documento no de patente 3). Se sabe que, cuando se ingiere por vía oral un carbohidrato que es sometido a fermentación por las enterobacterias, el gas hidrógeno en el aliento exhalado tiende a aumentar dependiendo de la cantidad del carbohidrato ingerido. Por lo tanto, por ejemplo, comparando la cantidad total del gas hidrógeno generado en el aliento exhalado por la ingestión del fructooligosacárido con la cantidad total del gas hidrógeno generado en el aliento exhalado por la ingestión del carbohidrato que se ha de evaluar, el grado de fermentación del carbohidrato que se va a evaluar se puede determinar como el porcentaje relativo al del fructooligosacárido. Al multiplicar el factor de conversión de energía del fructooligosacárido, 2 kcal/g, por el porcentaje determinado, se puede calcular el factor de conversión de energía del sujeto que se ha de evaluar.

Basándose en tales antecedentes, el factor de conversión de energía de un tetrasacárido cíclico se calculó usando los siguientes materiales y métodos.

2. Materiales

Como sustancia de ensayo, se usó una preparación de cristales de un tetrasacárido cíclico preparado de acuerdo con el método descrito en el documento de patente 1. Como sustancia de control, se usó un fructooligosacárido (nombre comercial, "Meiologo"; fabricado por Meiji Co., Ltd., Tokio, Japón).

3. Métodos y resultados

• Sujetos

Se seleccionaron como sujetos un total de 13 adultos sanos, incluidos hombres y mujeres.

• Ingestión de alimento, sustancia de ensayo y sustancia de control, y recogida del aliento exhalado

A las 9 p.m. del día anterior al ensayo, a todos los sujetos se les permitió tomar una comida del mismo menú que no contenía fibra dietética ni materiales fermentables. A las 7 a.m. del día del ensayo, se confirmó que cada sujeto estaba en buenas condiciones físicas y se le permitió recoger su propio aire al final de la espiración usando el aparato de recogida de aliento descrito a continuación. Después de esto, se dejó que el sujeto ingiriera, en 2 minutos, un líquido preparado disolviendo una sustancia de ensayo en una cantidad de 5 g en base sólida en 100 ml de agua. Hasta que hubieron pasado 14 horas desde la ingestión, el aire espiratorio final se recogió de manera similar a intervalos de una hora. En este periodo, se proporcionó una comida del mismo menú que no contenía fibra dietética ni materiales fermentables cada 3 horas. A cada sujeto se le permitió ingerir u omitir la comida, y elegir la cantidad de ingestión, de acuerdo con su decisión arbitraria. Por otra parte, se proporcionaron constantemente artículos de bebida particulares que no contenían fibra dietética ni materiales fermentables, y a cada sujeto se le permitió ingerir los artículos en cualquier momento y elegir la cantidad de ingestión de acuerdo con su decisión arbitraria. También se dejó que el sujeto añadiera azúcar a los artículos a voluntad.

Un mes después del ensayo de ingestión de la sustancia de ensayo, de manera similar, a cada sujeto se le permitió ingerir una sustancia de control en lugar de la sustancia de ensayo y recoger su aliento exhalado.

• Medición de la concentración de gas hidrógeno en el aliento exhalado

Para la recogida del aliento exhalado, se utilizó un aparato de recogida de aliento disponible en el mercado (nombre comercial, "End-tidal air (alveolar air) collection system"; fabricado por Laboratory for Expiration Biochemistry Nourishment Metabolism Co., Ltd., Nara, Japón. La concentración de gas hidrógeno en el aliento exhalado recogido se midió utilizando un analizador de gas de aliento disponible en el mercado (nombre comercial, "Breath Gas Analyzer BGA-1000D"; fabricado por Laboratory for Expiration Biochemistry Nourishment Metabolism Co., Ltd., Nara, Japón).

• Cálculo del factor de conversión de energía del tetrasacárido cíclico basado en el resultado de la medición de la concentración de gas hidrógeno en el aliento exhalado

La cantidad de gas hidrógeno descargado en el aliento exhalado de cada sujeto se evaluó mediante la preparación de un gráfico tomando el tiempo de recogida del aliento exhalado a lo largo de la abscisa y la concentración de gas hidrógeno a lo largo de la ordenada, la representación en el gráfico de la concentración de gas en el aliento exhalado medida en cada momento durante la prueba, y la medición posterior del área bajo la curva (AUC) de la curva trazada en el gráfico. Se determinó el porcentaje de la AUC de la sustancia de ensayo con respecto a la AUC de la sustancia de control para cada sujeto, y se calculó el promedio a partir del mismo. El promedio del porcentaje se multiplicó por el factor de conversión de energía del fructooligosacárido, 2 kcal/g, y el valor calculado se evaluó de acuerdo con la norma de la técnica, en la que un factor de conversión de energía se expresa como el valor obtenido redondeando al número entero más cercano (documento no de patente 3). Como resultado, se determinó que el factor de conversión de energía del tetrasacárido cíclico era 0 kcal/g.

EJEMPLO 1

<Jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos>

• Ejemplo 1-1

Como materia prima, se usó un líquido licuado de almidón de patata con un DE de 5 y una concentración de sólidos del 20 % en masa. A la materia prima, se añadieron 2,5 unidades de una enzima formadora de tetrasacárido cíclico (derivada de *Bacillus globisporus* (FERM BP-7143), fabricada por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón) por 1 g de la materia prima sólida, 1,2 unidades de CGTasa (derivadas de *Geobacillus stearothermophilus*, fabricada por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón) por 1 g de la materia prima sólida, y 300 unidades de isoamilasa (derivada de *Pseudomonas amyloclavata*, fabricada por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón) por 1 g de la materia prima sólida, y la mezcla resultante se mantuvo a pH 6,0 a 50 °C durante 48 horas para llevar a cabo la reacción de formación de tetrasacáridos cíclicos. Después de esto, la solución de reacción se mantuvo a 95 °C durante 30 minutos para

detener la reacción y después se enfrió a temperatura normal, seguido de una filtración, una desalinización utilizando resinas de intercambio iónico de tipo H y tipo OH, una decoloración usando carbón activado y luego una concentración hasta una concentración de sólidos del 73 % en masa utilizando un evaporador de acuerdo con métodos convencionales, para obtener un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención (ejemplo 1-1).

• Ejemplo 1-2

Se llevó a cabo la misma operación que en la preparación del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico del ejemplo 1-1 con la excepción de que, después de realizar la reacción de formación de tetrasacárido cíclico en las condiciones descritas anteriormente y de detener la reacción, se añadieron 5 unidades de α -amilasa (nombre comercial, "NEO-Spitase PK-6/R", fabricada por Nagase ChemteX Corporation, Osaka, Japón) por 1 g de la materia prima sólida, y después se dejó que la reacción prosiguiera a 80 °C durante 2 horas y se mantuvo la solución de reacción resultante a 95 °C durante 30 minutos para detener la reacción, con el fin de terminarla. Mediante esto, se obtuvo un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención (ejemplo 1-2).

• Ejemplo 1-3

Se llevó a cabo la misma operación que en la preparación del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico del ejemplo 1-1 con la excepción de que, en la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, las cantidades de la enzima formadora de tetrasacárido cíclico, la CGTasa y la isoamilasa añadidas se establecieron en 1 unidad, 0,5 unidades y 250 unidades, respectivamente, por 1 g de la materia prima sólida, y de que se añadió α -amilasa de manera similar al ejemplo 1-2 después de detener la reacción de formación de tetrasacárido cíclico, para obtener un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención (ejemplo 1-3).

EJEMPLO COMPARATIVO 1

• Ejemplo Comparativo 1-1

Se llevó a cabo la misma operación que en el caso del ejemplo 1-1, con la excepción de que se omitió la adición de isoamilasa en las condiciones de preparación para el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico del ejemplo 1-1, y de que se añadieron 10 unidades de la α -amilasa usada para la preparación del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico del ejemplo 1-2 por 1 g de la materia prima sólida en lugar de la isoamilasa, para obtener un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico fuera del alcance de la presente invención (ejemplo comparativo 1-1).

• Ejemplo comparativo 1-2

Se llevó a cabo la misma operación que en el caso del ejemplo 1-1, con la excepción de que la cantidad de isoamilasa añadida se cambió a 200 unidades por 1 g de la materia prima sólida en las condiciones de preparación para el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de del ejemplo 1-1, y de que se añadieron 2 unidades de la α -amilasa usada en el ejemplo 1-2 y 0,2 unidades de la glucoamilasa usada en el experimento 1 por 1 g de la materia prima sólida tras la adición de la enzima formadora de tetrasacárido cíclico, para obtener un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico fuera del alcance de la presente invención (ejemplo comparativo 1-2).

Cada uno de los jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos obtenidos en el ejemplo 1 (ejemplos 1-1, 1-2 y 1-3) y el ejemplo comparativo 1 (ejemplos comparativos 1-1 y 1-2) se sometió a análisis y evaluación de acuerdo con lo siguiente: el análisis del contenido total de tetrasacáridos cíclicos, el análisis de la composición de sacárido y el análisis de actividad acuosa mostrados en el experimento 1-2; la evaluación de la manejabilidad resultante de la viscosidad y la evaluación de la coloración mostrada en el experimento 2-2; el análisis de metilación y la medición del contenido de carbohidratos con un grado medio de polimerización mostrado en el experimento 3-1; y el cálculo del valor energético mostrado en el experimento 4-2. Los resultados del análisis y la evaluación se muestran a continuación en la tabla 5, junto con un compendio del método de preparación para cada jarabe de almidón que contiene tetrasacárido cíclico.

[Tabla 5]

N.º de muestra de ensayo		Ejemplo 1-1	Ejemplo 1-2	Ejemplo 1-3	Ejemplo comparativo 1-1	Ejemplo comparativo 1-2
Momento de la adición y cantidad (unidades) de enzima usada*1	Enzima formadora de tetrasacárido cíclico	2,5	2,5	1	2,5	2,5
	CGTasa (desde el principio)	1,2	1,2	0,5	1,2	1,2
	Isoamilasa (desde el principio)	300	300	250	—	200
	α-Amilasa (después de completar la reacción)	—	5	5	—	—
	α-Amilasa (desde el principio)	—	—	—	10	2
	Glucoamilasa (desde el principio)	—	—	—	—	0,2
Contenido total de tetrasacáridos cíclicos (% en masa)		50	50	38	48	50
Composición de sacáridos*2 (% en masa)	Tetrasacárido cíclico	35	35	26	32	35
	DP1+DP2	10	10	8	8	18
	DP4 a DP13	40	40	40	45	30
Contenido (%) de residuos de glucosa que tienen cada modo de enlace*3	α-1,4	13	13	14	11	9
	α-1,4,6	4	4	5	7	5
Viscosidad (Pa·s)		27	26	29	40	20
Manejabilidad		O	O	O	X	O
Coloración		O	O	O	O	X
Actividad acuosa		0,86	0,86	0,87	0,88	0,86
Valor energético (Kcal/g sólido seco)		2	2	2	2	2

*1) El nombre de cada enzima va seguido del momento de adición de la enzima. El momento fue el siguiente: "desde el principio" = La enzima se añadió al mismo tiempo que la enzima formadora de tetrasacárido cíclico;

"después de completar la reacción" = La enzima se añadió después de detener la reacción de la enzima formadora de tetrasacárido cíclico calentando la solución de reacción.

Cada valor representa la cantidad (unidades) de enzima añadida por 1 g del sólido seco de materia prima.

*2) "DP1+DP2" significa el contenido total de glucosa, maltosa e isomaltosa. "DP4 a 13" significa el contenido total de carbohidratos con un grado de polimerización de 4 a 13 distintos de los tetrasacáridos cíclicos y los tetrasacáridos cíclicos ramificados que comprenden una o dos moléculas de glucosa unidas.

*3) Los resultados de medición para la glucosa con enlaces α-1,4 (representada como "α-1,4" en la tabla) y la glucosa con enlaces α-1,4,6 (representada como "α-1,4,6" en la tabla) se muestran entre los contenidos de residuos de glucosa que tienen cada modo de enlace determinado por análisis de metilación.

Todos los jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos de los ejemplos 1-1 a 1-3 obtenidos fueron jarabes de almidón que mostraron buena manejabilidad y buena coloración.

Estos tenían las características de la composición de sacárido de la presente invención en cuanto a que el contenido total de tetrasacárido cíclico es del 38 % en masa o superior, y el contenido de glucosa con enlaces α-1,4 es superior al 9 % y del 15 % o inferior, y el contenido de glucosa con enlaces α-1,4,6 es inferior al 6 %, en el análisis de metilación.

Además, la actividad acuosa y la viscosidad eran suficientemente bajas. Basándose en estas características, los jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos de los ejemplos 1-1 a 1-3 son jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos de alta calidad con una baja coloración y una buena manejabilidad y, por lo tanto, se pueden usar ampliamente para usos tales como alimentos, cosméticos, productos para farmacia, productos farmacéuticos, piensos para ganado, alimentos para peces y fertilizantes. Como resultado de la medición de los contenidos de fibra dietética de los jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos de los ejemplos 1-1 a 1-3 de acuerdo con la medición del contenido de fibra dietética mostrado en el experimento 4-2, se descubrió que todos estos tenían un contenido de fibra dietética del 60 % o superior, lo que indica que estos jarabes de almidón que contienen tetrasacáridos cíclicos tienen una propiedad de fibra dietética.

Por otro lado, el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico obtenido en el ejemplo comparativo 1-1 tenía una viscosidad de hasta 40 Pa·s, lo que indica su deficiente manejabilidad. Con respecto a componentes tales como la composición de sacárido, el contenido de glucosa con enlaces α-1,4,6 fue del 7 % de acuerdo con el análisis de metilación. Este valor fue más alto que los de la presente invención y consistente con la alta viscosidad y la deficiente manejabilidad. El jarabe de almidón de tetrasacárido cíclico del ejemplo comparativo 1-2 no tuvo problemas en cuanto

a la viscosidad y la manejabilidad. Sin embargo, el contenido de carbohidratos con un grado de polimerización de 1 o 2 (DP1+DP2) en la composición de sacárido fue del 18 % en masa, mostrando un valor relativamente alto. Por consiguiente, este jarabe mostró una alta coloración y no se pudo lograr el objeto de la presente invención.

5 EJEMPLO 2

<Composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico>

10 El jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención obtenido en el ejemplo 1 (ejemplo 1-1) se sometió a secado por pulverización de acuerdo con un método convencional, para obtener una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención en forma de polvo. Este producto se puede usar ventajosamente como un alimento bajo en calorías con el que se puede complementar la fibra dietética. El producto se puede mezclar apropiadamente con otros carbohidratos, edulcorantes de alta intensidad, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, vitaminas, tensioactivos, emulsionantes, lubricantes, astringentes, perfumes, pigmentos y similares, para su uso ventajoso como material alimentario, material cosmético, material parafarmacéutico, material farmacéutico, material de pienso para ganado, material de alimento para peces, material fertilizante o similares.

20 EJEMPLO 3

<Producto reducido de una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico>

25 El jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención obtenido en el ejemplo 1 (ejemplo 1-2) se sometió a una reacción de hidrogenación en presencia de un catalizador de níquel de acuerdo con un método convencional, y luego se detuvo la reacción, y después se llevó a cabo la purificación de acuerdo con un método convencional, y el ajuste de la concentración, para obtener un producto reducido de una composición de sacárido que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención en forma de una solución acuosa. Este producto es útil como material alimentario, material parafarmacéutico, material farmacéutico, o similar, que tiene un contenido calórico más bajo y muestra menos coloración, ya que el carbohidrato coexistente contenido en el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico usado como materia prima se convierte en alcohol de azúcar. Por otra parte, debido a la menor coloración, el producto es especialmente útil como material cosmético y como material parafarmacéutico para aplicación externa a la piel.

35 EJEMPLO 4

<Pastel de gasa>

40 De acuerdo con un método convencional, 150 partes en masa de yema de huevo, 60 partes en masa de azúcar, 54 partes en masa de leche, 54 partes en masa de aceite de ensalada y 126 partes en masa de harina para pasteles se mezclaron para preparar una masa de yema de huevo. Por separado, 260 partes en masa de clara de huevo, 68 partes en masa de azúcar y 56 partes en masa (41 partes en masa en términos del sólido) del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención preparado en el ejemplo 1 (ejemplo 11) se mezclaron de acuerdo con un método convencional para preparar un merengue. La masa de yema de huevo preparada y el merengue se mezclaron homogéneamente entre sí con el menor número posible de veces de agitación. A continuación, la mezcla se vertió en un molde de pastel de gasa y se horneó hasta que las grietas de la masa se volvieron de color marrón pálido, para obtener un pastel de gasa. Esta receta es la misma que la receta habitual para un pastel de gasa, con la excepción de que el 20 % del azúcar se sustituyó por un sólido del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico.

50 El pastel de gasa obtenido tenía una textura húmeda, exhibía un dulzor suave y tenía un buen sabor. En comparación con los productos obtenidos mediante recetas habituales, el presente producto tiene un contenido calórico más bajo, de modo que el producto se puede tomar sin problemas. Asimismo, dado que el producto contiene el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico, contiene fibra dietética. Por lo tanto, el producto es un pastel de gasa de alta calidad del que cabe esperar que produzca un efecto que mantenga y mejore la salud. También en un caso en el que la relación de sustitución del azúcar en la receta habitual se incrementó al 40 %, el producto tenía una textura, un sabor y un aroma buenos.

EJEMPLO 5

60 <Udon>

65 De acuerdo con un método convencional, 31 partes en masa de agua, 4 partes en masa de sal y 15 partes en masa del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención preparado en el ejemplo 1 (ejemplo 1-1) se mezclaron, y la sal se disolvió por completo. A la mezcla resultante, se añadieron 100 partes en masa de harina de uso general, y la harina se amasó lo suficiente durante 20 minutos o más, para preparar una masa de *udon*. La masa de *udon* resultante se dejó reposar durante 1 hora tal cual, y luego se extendió hasta un espesor de

aproximadamente 3 mm usando un rodillo. A continuación, la masa se dobló y se cortó a una anchura de aproximadamente 4 mm para obtener el *udon*.

El *udon* obtenido se hirvió en agua en ebullición durante aproximadamente 15 minutos y luego se expuso al agua fría. Después de verter una sopa calentada (*dashijiru*) sobre el *udon*, se comió el *udon*. Como resultado, se descubrió que el *udon* era un *udon* de buena calidad que tenía una armonía entre una textura suave y una sensación agradable al pasar por la garganta (*nodogoshi*). También tenía un buen sabor. El producto también es útil como un *udon* de buena calidad para la suplementación con fibra dietética que se puede tomar de manera segura y sin problemas. También en un caso en el que la cantidad del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico añadido en la receta descrita anteriormente se cambió a 20 partes en masa, se podía obtener de manera similar un *udon* de buena calidad.

EJEMPLO 6

<"An" (Pasta dulce de alubias rojas)>

En un recipiente, se dispusieron 700 partes en masa de agua y 560 partes en masa de azúcar, y el azúcar se disolvió completamente calentando sobre un fuego abierto. Después de esto, se añadieron en tres porciones y con agitación suave 1000 partes en masa de una pasta de judías rojas sin azúcar obtenida triturando lo suficiente judías rojas hervidas. La mezcla resultante se hirvió lo suficiente mediante calentamiento continuo a fuego lento. A la mezcla se añadieron 320 partes en masa del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención obtenido en el ejemplo 1 (ejemplo 1-1), y la mezcla resultante se hirvió adicionalmente mediante calentamiento continuo para lograr un Brix (concentración de sólidos en términos de sacarosa) del 58 %, con el fin de obtener una "an". Esta receta es la misma que la receta habitual para la "an" con la excepción de que el 30 % del azúcar se sustituyó por un sólido del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico.

La "an" obtenida tenía un brillo intenso y una dulzura delicada. Por otra parte, la "an" no mostró deterioro de la capacidad de retención de la forma, deterioro que se encuentra normalmente cuando se reduce la cantidad de azúcar utilizada para la pasta de judías rojas sin azúcar. El producto no mostró un aumento brusco en la viscosidad durante el proceso de producción, y su manejabilidad durante la producción fue buena. En comparación con los productos obtenidos mediante recetas habituales, el presente producto tiene un contenido calórico más bajo, y el producto contiene fibra dietética debido a la adición del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. Por lo tanto, este producto se puede tomar sin problemas y, además, es una pasta de alubias rojas endulzada de alta calidad de la que cabe esperar que produzca un efecto que mantenga y mejore la salud. Por otra parte, solidificando la "an" obtenida usando agar o similar, se puede convertir en un *yokan*. También en un caso en el que la relación de sustitución del azúcar en la receta habitual se incrementó al 70 %, el producto tenía una textura, un sabor y un aroma buenos.

EJEMPLO 7

<Gominolas>

De acuerdo con un método convencional, 100 partes en masa de azúcar, 60 partes en masa de un jarabe de azúcar de malta (nombre comercial, "MALTRUP"; fabricado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón), 87 partes en masa del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención obtenido en el ejemplo 1 (ejemplo 1-1), 18 partes en masa de gelatina, 36 partes en masa de agua, 7,5 partes en masa de una solución acuosa de ácido cítrico al 50 % en masa, 0,6 partes en masa de un aroma y una cantidad apropiada de un agente colorante se mezclaron con calor, y la mezcla resultante se hirvió para lograr una cantidad total de 300 partes en masa y un Brix del 80 %, seguido del moldeo del producto para obtener gominolas. Esta receta es la misma que la receta habitual para gominolas, con la excepción de que el 60 % del jarabe de azúcar de malta se sustituyó por el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico.

Las gominolas obtenidas exhibieron un color y un brillo completamente equivalentes a los de las gominolas comunes preparadas sin la sustitución con un jarabe de almidón de tetrasacárido cíclico. Además, las gominolas obtenidas era gominolas de alta calidad que muestran una repulsión más fuerte al masticar en comparación con las gominolas comunes, tienen una buena textura y no muestran pegajosidad en la superficie. El producto no mostró un aumento brusco en la viscosidad durante el proceso de producción, y su manejabilidad durante la producción fue buena. En comparación con los productos obtenidos mediante recetas habituales, el presente producto tiene un contenido calórico más bajo, y el producto contiene fibra dietética debido a la adición del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. Por lo tanto, este producto se puede tomar sin problemas y, además, son gominolas de alta calidad de las que cabe esperar que produzcan un efecto que mantenga y mejore la salud.

EJEMPLO 8

<Caramelos duros>

De acuerdo con un método convencional, 6 partes en masa de azúcar, 2 partes en masa de un jarabe de azúcar de malta (nombre comercial, "MALTRUP"; fabricado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón), 2 partes en masa del

jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención obtenido en el ejemplo 1 (ejemplo 1-2), 10 partes en masa de agua y una cantidad apropiada de un aromatizante se mezclaron, y la mezcla resultante se hirvió lo suficiente calentando a 155 °C, seguido de moldeo para obtener caramelos duros. Como control para la comparación, se obtuvieron caramelos mediante la misma operación, con la excepción de que se usó un glucano no digerible preparado tostando almidón en presencia de un ácido, realizando la digestión enzimática y eliminando la glucosa y similares generados, en lugar del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención.

Mientras que los caramelos duros obtenidos como se ha descrito anteriormente que contienen el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención tenían un color ámbar, los caramelos duros para la comparación tenían un color marrón oscuro. A partir de este resultado, se pudo confirmar que el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención muestra baja coloración y, por ende, que el jarabe no afecta negativamente al color de un producto preparado mezclando el jarabe con otros materiales y calentando después la mezcla resultante.

En comparación con los caramelos duros comunes, el presente producto tiene un contenido calórico más bajo, y el producto contiene fibra dietética debido a la adición del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. Por lo tanto, este producto se puede tomar sin problemas y, además, son caramelos duros de alta calidad de los que cabe esperar que produzcan un efecto que mantenga y mejore la salud.

EJEMPLO 9

<Helado>

De acuerdo con un método convencional, 150 partes en masa de nata fresca al 35 %, 45 partes en masa de leche en polvo desnatada, 50 partes en masa de aceite de palma, 266 partes en masa del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención obtenido en el ejemplo 1 (ejemplo 1-3), 2 partes en masa de goma garrofin y 1 parte en masa de éster de ácido graso de sacarosa se mezclaron para homogeneizar la mezcla mientras se calentaba la mezcla a fuego lento. Posteriormente, la mezcla se mezcló mediante agitación vigorosa a temperatura normal y luego se dispuso en un recipiente, seguido de una congelación a -20 °C para obtener un helado. Esta receta es la misma que la receta habitual para un helado, con la excepción de que el jarabe de maíz con alto contenido de fructosa se sustituyó totalmente por el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico.

Incluso cuando habían pasado 3 días desde que se congeló el helado obtenido, el helado no mostraba la denominada contracción, que es un fenómeno en el que se forma un hueco entre el helado y su recipiente. Cuando habían pasado 7 días desde que se congeló el helado, el helado se retiró del recipiente y se observó. Como resultado, se descubrió que su superficie era muy lisa, lo que indica que el helado es un helado de buena calidad. El producto no mostró un aumento brusco en la viscosidad durante el proceso de producción, y su manejabilidad durante la producción fue buena. Respecto al sabor, el producto tenía una clara dulzura refrescante. También tenía una buena textura y un buen sabor. En comparación con los productos obtenidos mediante recetas habituales, el presente producto tiene un contenido calórico más bajo, y el producto contiene fibra dietética debido a la adición del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. Por lo tanto, este producto se puede tomar sin problemas y, además, es un helado de buena calidad del que cabe esperar que produzca un efecto que mantenga y mejore la salud.

EJEMPLO 10

<Tortita *dorayaki* (*dorayaki-no kawa*)>

Se añadieron veinte partes en masa de agua a 65 partes en masa de huevo, 50 partes en masa de azúcar, 20 partes en masa (15 partes en masa en términos del sólido) del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención preparado en el ejemplo 1 (ejemplo 1-1), 5 partes en masa de miel y 2 partes en masa de *mirin*, y la mezcla resultante se mezcló bien. Posteriormente, 0,6 partes en masa de bicarbonato de sodio disuelto en 2 partes en masa de agua y 63 partes en masa de harina de trigo tamizada se añadieron a la mezcla, con el fin de preparar una masa. Después de dejar reposar la masa durante aproximadamente 1 hora, la masa se horneó sobre una placa de hierro, para obtener una tortita *dorayaki*.

La tortita *dorayaki* obtenida era esponjosa y tenía una dulzura delicada. En comparación con los productos obtenidos mediante recetas habituales, el presente producto tiene un contenido calórico más bajo, y el producto contiene fibra dietética debido a la adición del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. Por lo tanto, este producto se puede tomar sin problemas y, además, es una tortita *dorayaki* de alta calidad de la que cabe esperar que produzca un efecto que mantenga y mejore la salud. Por otra parte, intercalando la "an" obtenida en el ejemplo 6 entre las tortitas *dorayaki*, se puede preparar un *dorayaki* de alta calidad que contiene fibra dietética tanto en la tortita como en la "an".

EJEMPLO 11

<Bollo al vapor de azúcar moreno>

Se preparó una mezcla mezclando 60 partes en masa de huevo, 180 partes en masa de azúcar moreno, 140 partes en masa (102 partes en masa en términos del sólido) del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención preparado en el ejemplo 1 (ejemplo 1-2), y 160 partes en masa de agua, y la mezcla se calentó a aproximadamente 30 °C en un baño de agua. Con la mezcla calentada, se mezclaron 200 partes en masa de harina de repostería y 5 partes en masa de *isupata* tamizada (un tipo de levadura en polvo), y se añadieron además 30 partes en masa de aceite de semilla de sésamo sin tostar, y después se mezcló bien la mezcla resultante. La masa resultante se vertió en un molde y luego se coció al vapor durante 20 minutos, con el fin de obtener un bollo al vapor de azúcar moreno.

El bollo al vapor obtenido era un bollo al vapor esponjoso que tenía un dulzor delicado y una buena textura y un buen sabor. El bollo al vapor contiene fibra dietética debido a la adición del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. Por lo tanto, cabe esperar que produzca un efecto que mejore la salud.

EJEMPLO 12

<Jalea de naranja>

Doscientas partes en masa de azúcar, 2,5 partes en masa de K-carragenina, 2,5 partes en masa de goma garrofín, 2,5 partes en masa de citrato de sodio, 1 parte en masa de cloruro de potasio y 0,2 partes en masa de acesulfamo de potasio se mezclaron bien y se dispusieron en un recipiente que contenía 650 partes en masa de agua, de modo que no se formaran grumos. A la mezcla se añadieron 140 partes en masa (102 partes en masa en términos del sólido) del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención preparado en el ejemplo 1 (ejemplo 1-3), y se evaporó el agua de la mezcla resultante mediante ebullición hasta 800 partes en masa. Después de esto, la mezcla se enfrió a aproximadamente 70 °C, y se añadieron a la misma 200 partes en masa de un zumo de naranja y una cantidad apropiada de un aroma de naranja, seguido del ajuste del pH dentro del intervalo de 3,2 a 4,0 usando una solución acuosa de ácido cítrico al 50 %. Se llenó en un vaso para jalea con la solución resultante y se dejó reposar en un refrigerador para permitir la solidificación, con el fin de obtener una jalea de naranja.

La jalea obtenida contiene fibra dietética debido a la adición del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. Asimismo, la jalea tenía una alta capacidad de retención de la forma, y una textura suave y un claro dulzor. Incluso en los casos en los que el agente gelificante se sustituyó por gelatina, goma xantana, agar, pectina o similares, no se encontró sinéresis, y se pudieron preparar jaleas con una buena textura.

EJEMPLO 13

<Galletas>

Se fundieron cien partes en masa de mantequilla sin sal en un baño de agua, y se añadieron 40 partes en masa de azúcar tamizada y 170 partes en masa de harina de repostería, y después se mezcló la mezcla resultante. A la mezcla se añadieron 20 partes en masa de yema de huevo y 50 partes en masa del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención preparado en el ejemplo 1 (ejemplo 1-1), y después se mezcló adicionalmente la mezcla resultante, con el fin de obtener una masa. La masa obtenida se dejó reposar en un refrigerador y luego se le dio forma, seguido de un horneado en un horno para obtener galletas.

Las galletas obtenidas tenían una textura crujiente. Asimismo, las galletas son buenas para la salud ya que contienen fibra dietética debido a la adición del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. Por otra parte, añadiendo una vitamina, un mineral, una proteína en polvo y/o similares, también se pueden proporcionar galletas que permiten igualmente la suplementación nutricional.

EJEMPLO 14

<Bebida carbonatada>

Sesenta partes en masa del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención preparado en el ejemplo 1 (ejemplo 1-2), 20 partes en masa de jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, 0,1 partes en masa de acesulfamo potásico, 0,02 partes en masa de sucralosa, 2 partes en masa de ácido cítrico y 0,5 partes en masa de citrato de sodio se mezclaron con 170 partes en masa de agua, y la mezcla resultante se agitó bien hasta que se disolvieron los materiales. Se le añadió una cantidad apropiada de un aroma de limón y la mezcla resultante se agitó bien, y después se añadieron 750 partes en masa de agua carbonatada, con el fin de obtener una bebida carbonatada.

La bebida carbonatada obtenida contiene fibra dietética debido a la adición del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. La bebida carbonatada tenía un claro dulzor y un cuerpo excelente a pesar de su bajo contenido calórico. Por otra parte, también se podía formular una bebida carbonatada fácil de beber sin sabores ni olores extraños, con un dulzor intenso y un cuerpo excelente mediante la misma receta que la descrita anteriormente, con la excepción de que no se usó el jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, y que la cantidad del jarabe de almidón

que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención (ejemplo 1-2) se aumentó a 140 partes en masa (en donde la cantidad de agua se cambió a 90 partes en masa). Por otra parte, se podía formular una bebida carbonatada con un cuerpo excelente incluso con un contenido de sólidos reducido, mediante la misma receta que la descrita anteriormente, con la excepción de que la cantidad del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención (ejemplo 1-2) se redujo a 20 partes en masa, y de que se aumentó la cantidad de acesulfamo potásico para complementar el dulzor a 0,15 partes en masa.

EJEMPLO 15

<Chuhai (bebida a base de shochu)>

Cuarenta partes en masa del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención preparado en el ejemplo 1 (ejemplo 1-3), 0,1 partes en masa de acesulfamo potásico, 0,02 partes en masa de sucralosa, 4 partes en masa de ácido cítrico y 1 parte en masa de citrato de sodio se mezclaron con 170 partes en masa de un vodka que contenía un 50 % (v/v) de alcohol (The Nikka Whiskey Distilling Co., Ltd., Tokio, Japón; WILKINSON VODKA 50°), y la mezcla resultante se agitó bien hasta que se disolvieron los materiales. Se le añadió una cantidad apropiada de un aroma de limón y la mezcla resultante se agitó bien, y después se añadieron 750 partes en masa de agua carbonatada, con el fin de obtener un *chuhai*.

Aunque el *chuhai* obtenido tenía un contenido de alcohol de hasta el 9 %, era un *chuhai* fácil de beber sin el olor y el sabor irritantes del alcohol. Asimismo, a pesar de que el *chuhai* no contiene azúcar, tenía un cuerpo intenso y un sabor satisfactorio. Se podía formular también un *chuhai* sin el irritante olor a alcohol, con un buen cuerpo en un caso en el que la cantidad del jarabe de almidón de tetrasacárido cíclico de la presente invención (ejemplo 1-3) se redujo a 10 partes en masa (en donde se añadió agua carbonatada en la cantidad correspondiente a la disminución).

EJEMPLO 16

<Café en lata>

Cien partes en masa de granos de café de la especie arábica se tostaron hasta un valor L (brillo de los granos de café medido con un medidor de diferencia de color) de 18, y luego se pulverizaron, seguido de una extracción con agua caliente. Ciento cincuenta partes en masa de leche cruda, 150 partes en masa del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención preparado en el ejemplo 1 (ejemplo 1-1), 200 partes en masa de agua, y cantidades apropiadas de un emulsionante y un aroma se añadieron a 500 partes en masa de un líquido preparado ajustando el Brix del extracto de granos de café a 2, y luego se llevó a cabo el tratamiento de homogeneización. El líquido homogeneizado obtenido se sometió a un ajuste de pH y luego se llenó una lata con él, seguido de una esterilización en retorta, con el fin de obtener un café en lata.

El café en lata obtenido contiene fibra dietética debido a la adición del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico. El café en lata carecía de sabores y olores extraños, tenía un sabor claro y era fácil de beber. La cantidad de fibra dietética se puede ajustar arbitrariamente ajustando la cantidad del jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico añadido. El dulzor también se puede ajustar con azúcar o un edulcorante artificial.

Aplicabilidad industrial

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona un jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de alta calidad cuya viscosidad y actividad acuosa son suficientemente bajas incluso cuando se prepara en forma de una solución acuosa de carbohidratos con una concentración relativamente alta (jarabe de almidón), jarabe de almidón que muestra una coloración suficientemente baja, tiene un bajo contenido calórico y es poco probable que se produzca la precipitación de cristales de sacáridos durante el almacenamiento. La presente invención contribuye a la aplicación práctica de los tetrasacáridos cíclicos, que no ha tenido éxito en el pasado a pesar de la gran expectativa desde el punto de vista de sus propiedades físicas y funciones. Se puede decir que el jarabe de almidón que contiene un tetrasacárido cíclico de la presente invención es una invención extremadamente útil desde el punto de vista industrial, ya que es ampliamente aplicable a usos tales como alimentos, cosméticos, productos parafarmacéuticos, productos farmacéuticos, piensos para ganado, alimentos para peces y fertilizantes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de sacárido que comprende un tetrasacárido cíclico representado por $\text{ciclo}\{\rightarrow 6\}\text{-}\alpha\text{-D-glucopiranosil-(1}\rightarrow 3\text{)-}\alpha\text{-D-glucopiranosil-(1}\rightarrow 6\text{)-}\alpha\text{-D-glucopiranosil-(1}\rightarrow 3\text{)-}\alpha\text{-D-glucopiranosil-(1}\rightarrow \}$, que tiene las siguientes características (1) a (3):
 - (1) la composición de sacárido comprende, además del tetrasacárido cíclico, un tetrasacárido cíclico ramificado que comprende una o más moléculas de glucosa unidas al tetrasacárido cíclico, en donde el contenido del tetrasacárido cíclico con respecto al contenido total de sólidos de la composición de sacárido obtenida dejando que la glucoamilasa y la α -glucosidasa actúen sobre la composición de sacárido anterior es del 38 % en masa o superior, basado en los sólidos secos;
 - (2) la proporción de glucosa con enlaces α -1,4 en los residuos de glucosa totales que constituyen la composición de sacárido en el análisis de metilación es superior al 9 % y del 15 % o inferior; y
 - (3) la proporción de glucosa con enlaces α -1,4,6 en los residuos de glucosa totales que constituyen la composición de sacárido en el análisis de metilación es inferior al 6 %.
2. La composición de sacárido de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene además la siguiente característica (4):
 - (4) el contenido de tetrasacárido cíclico con respecto al contenido total de sólidos es del 25 % en masa o superior, basado en los sólidos secos.
3. La composición de sacárido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que tiene además las siguientes características (5) y (6):
 - (5) la composición de sacárido comprende carbohidrato con un grado de polimerización de 1 o 2 para un contenido total del 16 % en masa o inferior, basado en los sólidos secos con respecto al contenido de sólidos totales; y
 - (6) la composición de sacárido comprende carbohidrato con un grado de polimerización de 4 a 13 distinto de los tetrasacáridos cíclicos y los tetrasacáridos cíclicos ramificados que comprenden una o dos moléculas de glucosa unidas al tetrasacárido cíclico, para un contenido total superior al 37 % en masa, basado en los sólidos secos con respecto al contenido de sólidos totales.
4. La composición de sacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde una solución acuosa de la composición de sacárido a una concentración de sólidos del 73 % en masa tiene una viscosidad de 35 Pa·s o inferior a 15 °C.
5. La composición de sacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde una solución acuosa de la composición de sacárido a una concentración de sólidos del 73 % en masa tiene una actividad acuosa de menos de 0,88.
6. Un producto reducido de la composición de sacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una composición que comprende: la composición de sacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y/o el producto reducido de acuerdo con la reivindicación 6; y otro material.
8. La composición de sacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el producto reducido de acuerdo con la reivindicación 6, o la composición de acuerdo con la reivindicación 7, en forma de solución acuosa.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, que tiene una concentración de sólidos del 70 % en masa o superior.
10. La composición de sacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el producto reducido de acuerdo con la reivindicación 6, o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en forma de alimento, material alimentario, material cosmético, material parafarmacéutico, material farmacéutico, material de pienso para ganado, material de comida para peces o material fertilizante.
11. Un método para producir la composición de sacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de:
 - dejar que la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y la α -isomaltosiltransferasa actúen sobre un hidrolizado parcial de almidón, con el fin de producir el tetrasacárido cíclico (etapa 1); y
 - purificar y recoger el producto de la reacción enzimática resultante que contiene el tetrasacárido cíclico (etapa 2);
 en donde
 - también se deja que actúe una enzima desramificadora de almidón en la etapa 1.

12. El método para producir la composición de sacárido de acuerdo con la reivindicación 11, que no comprende la etapa de dejar que actúe una amilasa de tipo exo.
13. El método para producir la composición de sacárido de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde se usa isoamilasa o pululanasa como enzima desramificadora de almidón.
14. El método para producir la composición de sacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde también se deja que actúe la ciclomaltodextrina glucanotransferasa en la etapa 1.
15. Un método para producir el producto reducido de la composición de sacárido de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende las etapas de:
- dejar que la enzima formadora de α -isomaltosilglucosacárido y la α -isomaltosiltransferasa actúen sobre un hidrolizado parcial de almidón, con el fin de producir el tetrasacárido cíclico (etapa 1); y
- purificar y recoger el producto de la reacción enzimática resultante que contiene el tetrasacárido cíclico (etapa 2);
- en donde
- también se deja que actúe una enzima desramificadora de almidón en la etapa 1; y
- el método comprende una etapa de hidrogenación después de la etapa 1, pero antes de la recogida en la etapa 2.