(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 137 686***

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **22 07071**

(51) Int Cl[8] : ***C 12 P 19/18*** *(2022.01), C 13 K 13/00, A 23 L 29/30, A 23 K 20/163, C 12 N 9/10*

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 11.07.22.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 12.01.24 Bulletin 24/02.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

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

( ) **Demande(s) d'extension :**

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

(72) **Inventeur(s) :** LANOS Pierre, RAMETTE Matthieu, REMAUD-SIMEON Magali, MOULIS Claire, PIZZUT-SERIN Sandra et SEVERAC Etienne.

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

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

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

(57) L'invention est relative à un procédé de préparation d'un mélange d'α-glucanes faiblement digestibles à partir d'un substrat riche en oligosaccharides ayant un degré de polymérisation (DP) de 4.

FR 3 137 686 - A1

Description

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

Domaine technique

[0001] La présente invention est relative à un procédé de préparation d'un mélange d'α-glucanes faiblement digestibles à partir d'un substrat riche en oligosaccharides ayant un degré de polymérisation (DP) de 4. Dans la présente demande, ce substrat désigne un sirop contenant des oligosaccharides avec une teneur en oligosaccharides ayant un degré de polymérisation (DP) de 4 d'au moins 40%, de préférence d'au moins 45%, de manière encore plus préférée d'au moins 50%.

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

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

Etat de l'art antérieur

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

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

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

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

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

[0009] En effet, les maltodextrines standards sont rapidement digestibles et se définissent

comme des mélanges purifiés et concentrés de glucose et de polymères de glucose essentiellement lié en alpha 1 → 4 (ci-après 1 → 4 ou α(1-4)) avec seulement de 4 à 5 % de liaisons glucosidiques alpha 1 → 6 (ci-après 1 → 6 ou α(1-6)), de poids moléculaires extrêmement variés, complètement solubles dans l'eau et à faible pouvoir réducteur.

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

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

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

[0013] Aujourd'hui, la plupart des procédés enzymatiques utilisent des amylomaltases, pour produire des fibres solubles à partir d'amidon.

[0014] Il est souhaitable d'obtenir des fibres solubles par voie enzymatique à partir de substrat, en l'absence de saccharose.

Description détaillée de l'invention

[0015] La société Demanderesse a alors trouvé qu'il était possible, à partir d'un sirop riche en oligosaccharides ayant un degré de polymérisation (DP) de 4, d'obtenir des fibres d'intérêt en alimentation humaine et animale, par voie enzymatique. La société Demanderesse a ainsi développé un procédé qui utilise une enzyme particulière, capable de créer des liaisons α(1-6) à partir de sirop riche en oligosaccharides DP4.

[0016] Dans un premier aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un mélange d'α-glucanes comprenant une étape de mise en présence d'un substrat et d'une enzyme, ledit substrat étant un sirop riche en oligosaccharides ayant un degré de polymérisation (DP) de 4 et ladite enzyme étant une α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6).

[0017] Selon la présente invention, les termes «α-glucane », « fibre soluble », « fibre soluble alimentaire » sont utilisés de manière interchangeable. Ils définissent des oligosaccharides composés d'au moins 3 unités de glucose reliées entre elles par des liaisons α-glycosidiques (ou α-glucosidiques).

[0018] La classification des α-glucanes repose principalement sur la mesure de leur pouvoir réducteur, exprimé classiquement par la notion de « équivalent dextrose » (« Dextrose

Equivalent » ou DE). Sur ce point particulier, la définition des maltodextrines reprise dans les Monograph Spécifications du Food Chemical Codex précise que la valeur de DE pour une maltodextrine ne doit pas excéder 20. Au-dessus de 20, il s'agit de sirops de glucose.

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

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

[0021] En pratique, (Mn) et (Mp) sont déterminées de manière expérimentale par différentes techniques d'analyse, comme par exemple une méthode de mesure adaptée aux polymères de glucose, qui repose sur la chromatographie de perméation de gel sur des colonnes de chromatographie étalonnées avec des pullulanes de masses moléculaires connues.

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

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

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

[0025] Selon un mode réalisation de l'invention, le sirop riche en oligosaccharides ayant DP de 4 comprend au moins 40%, de préférence au moins 45%, de manière encore plus préférée au moins 50% d'oligosaccharides ayant un DP de 4.

[0026] Selon un mode de réalisation de l'invention, le sirop riche en oligosaccharides ayant un DP de 4 a un équivalent dextrose (DE) supérieur à 20.

[0027] Selon un mode de réalisation préférée de l'invention, le sirop riche en DP4 est un sirop présentant les caractéristiques décrites dans le Tableau 1 ci-dessous.

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

[0029] Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) est la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1 (dénommée ci-après GT#19). De manière préférée, il s'agit d'une protéine ayant au moins 91%, de manière encore plus préférée, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99%, au moins 99,5%, au moins 99,6%, au moins 99,7%, au moins 99,8%, au moins 99,9% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1. La séquence SEQ ID No :1 correspond au numéro d'accession Genbank WP_053069107.1.

[0030] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'enzyme est ajoutée à une concentration comprise entre 0.01 et 1 mg/mL de milieu réactionnel, de préférence entre 0.05 et 0.5 mg/mL, de manière encore plus préférée environ 0.1 mg/mL de milieu réactionnel.

[0031] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de l'enzyme est réalisée pendant une durée comprise entre 12 et 48 heures, de préférence environ 24 heures

[0032] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de l'enzyme est réalisée à une température comprise entre 20 et 40°C, de préférence environ 37°C.

[0033] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de l'enzyme est réalisée à un pH compris entre 5 et 6,5, de préférence entre 5,5 et 6, de manière encore plus préférée environ 5,75.

[0034] Dans un mode de réalisation de l'invention, le procédé comprend en outre une étape de traitement enzymatique par une α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3). Il peut s'agir par exemple d'une protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2 (dénommée ci-après GT#11). De manière préférée, il s'agit d'une protéine ayant au moins 91%, de manière encore plus préférée, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99%, au moins 99,5%, au moins 99,6%, au moins 99,7%, au moins 99,8%, au moins 99,9% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2. La séquence SEQ ID No :2 correspond au numéro d'accession Genbank AOR73699.1

[0035] Selon un aspect, la présente invention porte également sur un mélange d'α-glucanes susceptible d'être obtenu par le procédé décrit ci-dessus.

[0036] Ce mélange d'α-glucanes est caractérisé par sa faible digestibilité selon la méthode AOAC 2002.02. De manière avantageuse, le procédé selon l'invention permet réduire d'un facteur d'au moins 2, de préférence d'au moins 2,5, de manière encore plus préférée d'au moins 3, la fraction hydrolysable, mesurée selon la méthode AOAC 2002.02, par rapport au substrat de départ.

[0037] La méthode AOAC 2002.02 peut notamment être mise en œuvre à l'aide de la partie « dosage HPAEC-PAD » du kit « resistant Starch, K-RSTAR 06/18 » commercialisé par la société Megazyme® tel que décrit dans l'Exemple 1, partie 5 ci-dessous.

[0038] Le procédé selon la présente invention permet d'augmenter la pourcentage de liaisons α(1-6) par un facteur d'au moins 3, de préférence au moins 3,5, de manière encore plus préférée d'au moins 4, par rapport au substrat de départ.

[0039] Le pourcentage de liaisons α(1-6) peut être mesuré par la méthode Hakomori (1964 HAKOMORI A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide) tel que décrit dans l'exemple 1, partie 8 ci-dessous ou par RMN du proton tel que décrit dans l'exemple 1, partie 7 ci-dessous.

[0040] Selon un aspect, la présente invention concerne un mélange d'α-glucanes caractérisé en ce qu'il présente :

- un taux de fibres hydrolysables, inférieur à 55%, de préférence inférieur à 50%, de manière encore plus préférée inférieur à 45%,
- et/ou au moins 20% de liaisons α(1-6),

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

[0041] De manière préférée, le taux de fibres hydrolysables est inférieur à 44%, de préférence inférieur à 43%, de manière encore plus préférée inférieur à 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%.

[0042] De manière préférée, le pourcentage de liaisons α(1-6), est d'au moins 21%, de préférence au moins 22%, de manière encore plus préférée au moins 23%, au moins 24%, au moins 25%, au moins 26%, au moins 27%, au moins 28%, au moins 29%, au moins 30%, au moins 31%, au moins 32%, au moins 33%, au moins 34%, au moins 35%.

[0043] La présente invention porte également sur l'utilisation d'un mélange d'α-glucanes obtenu selon le procédé décrit ci-dessus et d'un mélange d'α-glucanes ayant les propriétés décrits ci-dessus pour la préparation d'aliments pour l'alimentation humaine ou animale.

[0044] Typiquement, le mélange d'α-glucanes selon l'invention peut être utilisé pour

favoriser la santé intestinale, la gestion de la glycémie, la satiété et la gestion du poids, et la libération d'énergie soutenue.

[0045] Enfin, dans un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'une glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) pour diminuer la digestibilité d'un mélange d'α-glucanes, ladite glucanotransférase ayant pour séquence SEQ ID No :1 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1.

[0046] De manière préférée, la diminution de la digestibilité est une diminution d'un facteur d'au moins 2, de préférence d'au moins 2,5, de manière encore plus préférée d'au moins 3 de la fraction hydrolysable, mesurée selon la méthode AOAC 2002.02, par rapport au substrat de départ.

[0047] L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent, lesquels se veulent illustratifs et non limitatifs.

[0048] **Exemple 1. : préparation de maltodextrines branchées à partir de sirop riche en DP4 : matériel et méthodes**

[0049] 1. Préparation d'une solution de substrat DP4

[0050] Le substrat de départ utilisé était un sirop riche en DP4, présentant les caractéristiques décrites dans la Tableau 1 :

[0051] [Tableaux1]

Critère	Sous-critère	Méthode de mesure	Unité	Valeur
Poids moléculaire	Mn (eq pullulan)	MCL1439	Da	615
Poids moléculaire	Mw (eq pullulan)	MCL1439	Da	1045
Distribution en glucides	DP1	MCL190A	% relatif	2,5
Distribution en glucides	DP2	MCL190A	% relatif	6,1
Distribution en glucides	DP3	MCL190A	% relatif	7,4
Distribution en glucides	DP4	MCL190E	% relatif	55,7
Distribution en glucides	DP5	MCL190E	% relatif	2,3
Distribution en glucides	DP6	MCL190E	% relatif	2,1
Distribution en glucides	DP7	MCL190E	% relatif	2,3
Distribution en glucides	DP8	MCL190E	% relatif	5,5
Distribution en glucides	DP9	MCL190E	% relatif	1,4
Distribution en glucides	DP10	MCL190E	% relatif	1,3
Distribution en glucides	> DP10	MCL190E	% relatif	13,4
Sucres réducteurs	Equivalent Dextrose (DE)	MCL050B		33,4
Matière sèche	Perte de	MCL209	%	30,2

	masse après séchage	A		

[0052] Différentes solutions de substrat (sirop riche en DP4) dans du tampon sodium acétate 50mM, pH 5.75 ont été préparées, à des concentrations de 100g/L, 200g/L ou 400g/L.

[0053] 2. Production des enzymes recombinantes.

[0054] Les enzymes suivantes ont été produites de manière recombinante :

- Enzyme GT#11 : α-4,3 glucanotransférase de *Lactobacillus fermentum* NC2970 ayant pour séquence en acides aminés la séquence répertoriée dans Genbank sous la référence AOR73699.1 (SEQ ID N°2)
- Enzyme GT#19 : glycosyl hydrolase GH70 de *Lactobacillus mucosae* ayant pour séquence en acide aminés la séquence répertoriée dans Genbank sous la référence WP_053069107.1. (SEQ ID N°1)

[0055] Des cellules de *E. coli* BL21 star contenant le plasmide pET-21a-enzyme n°X (afin de produire différentes enzymes, dont GT#11 et GT#19) ont été cultivées dans un milieu ZYM-5052 contenant 1% de glycérol et 1% de lactose. En fin de culture, les cellules ont été centrifugées à 6 500g pendant 10 min, les culots cellulaires remis en suspension à une DO600 nm de 80 dans un tampon phosphate 20mM pH=7,4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole, et les cellules lysées par sonication à froid grâce à 4 cycles de 20 secondes à 30 % d'amplitude suivi de 4 minutes de repos. Les débris cellulaires ont été séparés des protéines solubilisées par centrifugation pendant 30 minutes à 10 000 g.

[0056] 3. Purification des enzymes

[0057] La purification des protéines d'intérêt a été réalisée sur résine Cobalt (Invitrogen) chargée en ions cobalt divalent (CO 2+), pour lesquels l'étiquette polyhistidine présente une affinité. L'élution a été réalisée en créant une compétition entre l'étiquette polyhistidine et des concentrations croissantes d'imidazole. Brièvement, 10 à 35 mL d'extrait cellulaire d'E. coli ont été mis en contact pendant 1 heure avec 1 mL de résine de Cobalt préalablement équilibrée avec 25mL tampon Phosphate 20 mM pH=7,4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole. La filtration de la résine sur fritté permet l'élimination de l'ensemble des protéines non fixées. La résine a ensuite été lavée 5 fois avec 40 mL de tampon Phosphate 20mM pH=7,4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole. Enfin, l'élution a été réalisée avec 3 mL de tampon Phosphate 20 mM pH=7,4 contenant 300 mM de NaCl et 250 mM d'imidazole pendant 5 minutes afin de décrocher les enzymes d'intérêt. Les solutions enzymatiques ont alors été dialysées (membrane de seuil de coupure10 kDa) contre 5 L de tampon acétate de sodium 50 mM, pH=5,75 (overnight, 4°C sous agitation) afin d'éliminer le

NaCl et l'imidazole. Le dosage des différentes solutions protéiques a été réalisé en mesurant leur absorbance à 280 nm grâce à un nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermofisher). Les coefficients d'extinction moléculaire ε ont été déterminés grâce à l'application ProtParam tool du site ExPASy bioinformatics resource portal.

[0058] 4. Réactions enzymatiques

[0059] Les réactions ont été réalisées avec 0,1 mg/mL d'enzyme purifiée et dialysée en présence de 10%, 20% ou 40% de substrat dans du tampon sodium acétate 50 mM, pH=5,75. Les réactions ont été incubées sous agitation pendant 24 h à 37°C. Les réactions ont été arrêtées par chauffage (95°C pendant 5 minutes). Des prélèvements aux temps initiaux et finaux ont été réalisés pour analyser la spécificité des enzymes en utilisant différentes techniques analytiques (HPAEC-PAD, RMN).

[0060] 5. Test de digestibilité

[0061] Les réactions de transfert ont été lyophilisées après congélation à -80°C pendant 24 heures. 25 mg de produits lyophilisés ont été repris dans 1 mL de tampon de maléate de sodium 100mM contenant 30 U d'α-amylase pancréatique et 3 U d'amyloglucosidase (kit resistant Starch, Megazyme K-STAR 06/18, qui met en œuvre la méthode AOAC 2002.02). Les réactions ont été incubées pendant 16 heures à 37°C. Les produits ont été dilués dans l'eau avant analyse HPAEC PAD.

[0062] 6. Analyses chromatographiques

[0063] Les produits obtenus ont été analysés par chromatographie d'échange d'anions couplée à un détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC PAD - High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection). Les analyses ont été réalisées sur un système Thermo ICS6000 équipé d'une colonne CarboPac™ PA100 analytical column (2 mm x 250 mm) couplée avec une pré-colonne CarboPac™ PA100 guard (2 mm x 50 mm). Un gradient d'acétate de sodium dans 150 mM de soude a été appliqué à un débit de 0,250 ml.min-1 selon le profil suivant : 0–5 min, 0 mM ; 5–35 min, 0–300 mM ; 35–40 min, 300–450 mM ; 40-42 min, 450 mM. La détection a été réalisée grâce à une électrode de travail en or et une cellule de référence pH Ag/AgCl. Les échantillons ont été dilués à une masse sèche totale de 1 g.L-1 avant injection.

[0064] 7. RMN.

[0065] Les spectres ^{1}H, ^{13}C et HSQC ont été enregistrés sur un équipement Bruker Avance 500MHz à 298K avec une sonde BBI 5 mm z-gradient H-BB-D. Les données ont été acquises et traitées grâce au logiciel TopSpin 3.

[0066] 8. Méthode Hakomori

[0067] La méthode Hakomori (1964 HAKOMORI A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide) permet de caractériser chimiquement les liaisons osidiques en différenciant les

groupements OH libres et les groupements liés. Il s'agit d'une méthode destructrice comprenant les étapes de méthylation, hydrolyse, réduction avec $NaBD_4$, acétylation et analyse par spectrométrie de masse

[0068] **Exemple 2. : préparation de maltodextrines branchées à partir de sirop riche en DP4 : résultats**

[0069] Les résultats des différentes réactions enzymatiques sont présentés dans le Tableau 2 ci-dessous, qui présente les pourcentages de liaisons α-1,6 ; α-1,3 et α-1,4 mesurés par RMN du proton ou par la méthode Hakomori et % d'hydrolyse (AOAC 2002.02) dans les produits de réaction obtenus.

[0070] [Tableaux2]

		RMN				HAKOMORI				
Enzyme	Concentration g/l	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	%hydrolyse (AOAC 2002.02)
MP	100	0%	0%	99%	1%	2,3%	2,6%	93,1%	2,0%	78,0%
MP	200	0%	0%	99%	1%	2,3%	2,6%	93,1%	2,0%	80,0%
MP	400	0%	0%	99%	1%	2,3%	2,6%	93,1%	2,0%	83,0%
GT#11	100	0%	10%	90%	0%	2,9%	10,6%	82,3%	4,1%	48,7%
GT#11	200	0%	9%	91%	1%	2,7%	9,3%	84,4%	3,7%	52,9%
GT#11	400	0%	5%	92%	3%	2,3%	6,6%	88,5%	2,9%	62,8%
GT#19	100	0%	0%	57%	43%	2,1%	4,3%	62,6%	30,9%	31,6%
GT#19	200	0%	0%	59%	41%	2,2%	4,3%	63,0%	30,5%	34,8%
GT#19	400	0%	0%	65%	35%	2,3%	4,1%	63,8%	29,7%	40,0%

[0071] MP : Matière Première, = Sirop DP4

[0072] Les inventeurs ont démontré que l'enzyme GT#19 est capable de modifier le sirop riche en DP4 de sorte à le rendre faiblement digestible (% d'hydrolyse selon la méthode AOAC2002.02 inférieur ou égal à 45%).

[0073] Le produit obtenu par ce traitement enzymatique par l'enzyme GT#19 contient significativement moins de liaisons α-1,4 et plus de liaisons α-1,6 que le point de départ. Le nombre de liaisons α-1,2 et α-1,3 n'est pas modifié. L'enzyme GT#19 est donc une α-

4,6 glucanotransférase.

[0074] A l'inverse, un traitement par une autre GT, l'enzyme GT#11, conduit à une diminution du pourcentage de liaisons α-1,4 et à l'apparition de liaisons α-1,3. La digestibilité de produit obtenu par traitement avec l'enzyme GT#11 est également diminuée (53 et 55%, pour des concentrations initiales respectives de 100 et 200 mg/mL, à comparer à 84 et 88% pour les substrats non traitées).

[0075] Avantageusement, le mélange d'α-glucanes selon la présente invention présente également un profil de digestibilité *in vitro* selon la méthode Englyst intéressant

Revendications

[Revendication 1] Procédé de préparation d'un mélange d'α-glucans comprenant une étape de mise en présence d'un substrat et d'une enzyme, ledit substrat étant un sirop riche en oligosaccharides ayant un degré de polymérisation (DP) de 4 et ladite enzyme étant une α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6).

[Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, dans lequel le sirop riche en oligosaccharides ayant un DP de 4 comprend au moins 40%, de préférence au moins 45%, de manière encore plus préférée au moins 50% d'oligosaccharides ayant un DP de 4.

[Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le sirop riche en oligosaccharides ayant un DP de 4 a un équivalent dextrose (DE) supérieur à 20.

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

[Revendication 5] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) est la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1.

[Revendication 6] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'enzyme est à une concentration comprise entre 0,01 et 1 mg/mL de milieu réactionnel, de préférence entre 0,05 et 0,5 mg/mL, de manière encore plus préférée environ 0,1 mg/mL de milieu réactionnel.

[Revendication 7] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la mise en présence du substrat et de l'enzyme est réalisé pendant une durée comprise entre 12 et 48 heures, de préférence environ 24 heures et/ou à une température comprise entre 20 et 40°C, de préférence environ 37°C et/ou à un pH compris entre 5 et 6,5, de préférence environ 5,75.

[Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de traitement enzymatique par une α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3).

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

[Revendication 10] Mélange d'α-glucanes susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

[Revendication 11] Mélange d'α-glucanes caractérisé en ce qu'il présente :
- un taux de fibres hydrolysables inférieur à 55%, de préférence inférieur à 50%, de manière encore plus préférée inférieur à 45%,
- et/ou au moins 20% de liaisons α(1-6),
dans lequel le taux de fibres correspond à la fraction hydrolysable selon la méthode AOAC 2002.02 et le pourcentage de liaisons α(1-6) représente le pourcentage molaire de liaisons α(1-6) par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques, mesuré par la méthode Hakomori.

[Revendication 12] Utilisation d'un mélange d'α-glucanes selon l'une quelconque des revendications 10 à 11 pour la préparation d'aliments pour l'alimentation humaine ou animale.

[Revendication 13] Utilisation d'une glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) pour diminuer la digestibilité d'un mélange d'α-glucanes, ladite glucanotransférase ayant pour séquence SEQ ID No :1 ou une séquence ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1..

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national

FA 911413
FR 2207071

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2018/167032 A1 (NESTEC SA [CH]; UNIV GRONINGEN [NL]) 20 septembre 2018 (2018-09-20)	1,10,12	C12P19/18 C13K13/00 A23L29/30
Y	* page 1, lignes 3-8 * * page 2, ligne 29 - page 4, ligne 3 * * figures 3,7 * * page 17, ligne 29 - page 18, ligne 11 * * page 19, lignes 3-13 * * page 26, ligne 12 - page 27, ligne 20; séquence 6 *	2-9	A23K20/163 C12N9/10

X	HANS LEEMHUIS ET AL: "4,6-[alpha]-Glucanotransferase activity occurs more widespread instrains and constitutes a separate GH70 subfa", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 97, no. 1, 25 février 2012 (2012-02-25), pages 181-193, XP035158276, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-012-3943-1	1,10,12	
Y	* abrégé * * page 182, colonne de droite, alinéa 3 - page 183, colonne de gauche, alinéa 2 * * page 183, colonne de droite, alinéa 2 - page 184, colonne de gauche, alinéa 2 * * page 186, colonne de droite, alinéa 1 - page 188, colonne de gauche, alinéa 1; figures 2,3 *	2-9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12P C12N

	-/--		

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
1 mars 2023	Mateo Rosell, A

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons
.....
& : membre de la même famille, document correspondant

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national

FA 911413
FR 2207071

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	KRALJ SLAVKO ET AL: "4,6-[alpha]-Glucanotransferase, a Novel Enzyme That Structurally and Functionally Provides an Evolutionary Link between Glycoside Hydrolase Enzyme Families 13 and 70", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 77, no. 22, 15 novembre 2011 (2011-11-15), pages 8154-8163, XP093026818, US ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.05735-11 Extrait de l'Internet: URL:https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/AEM.05735-11>	1,10,12	
Y	* abrégé * * page 8156, colonne de gauche, alinéa 4 - page 8158, colonne de droite, alinéa 1; figure 3 *	2-9	

X	MENG XIANGFENG ET AL: "Biochemical characterization of two GH70 family 4,6-[alpha]-glucanotransferases with distinct product specificity from Lactobacillus aviarius subsp. aviarius DSM 20655", FOOD CHEMISTRY, vol. 253, 1 juillet 2018 (2018-07-01), pages 236-246, XP093026642, NL ISSN: 0308-8146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.154	10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	* abrégé * * page 241, colonne de droite, dernier alinéa - page 244, colonne de gauche, alinéa 1 *	2-9	

	-/--		

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
1 mars 2023	Mateo Rosell, A

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons
.....
& : membre de la même famille, document correspondant

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national

FA 911413
FR 2207071

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2015/183724 A1 (DU PONT [US]) 3 décembre 2015 (2015-12-03) * revendication 1 * -----	11	
X	WO 2015/183726 A1 (DU PONT [US]) 3 décembre 2015 (2015-12-03) * revendication 1 * -----	11	
X	WO 2015/183729 A1 (DU PONT [US]) 3 décembre 2015 (2015-12-03) * revendication 1 * -----	11	
X	MONCHOIS V ET AL: "Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299 synthesizing only alpha(1-6) and alpha(1-3) linkages", GENE, ELSEVIER AMSTERDAM, NL, vol. 182, no. 1-2, 5 décembre 1996 (1996-12-05), pages 23-32, XP004071926, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/S0378-1119(96)00443-X * abrégé; figure 1 * * page 27, colonne de droite, alinéa 2 - page 29, colonne de gauche, alinéa 2 * -----	10,13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
X	CN 113 186 238 A (UNIV JIANGNAN) 30 juillet 2021 (2021-07-30) * séquence 1 * ----- -/--	10,13	

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
1 mars 2023	Mateo Rosell, A

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons
.....
& : membre de la même famille, document correspondant

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national

FA 911413
FR 2207071

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	GANGOITI JOANA ET AL: "4,3-[alpha]-Glucanotransferase, a novel reaction specificity in glycoside hydrolase family 70 and clan GH-H", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 6 janvier 2017 (2017-01-06), XP093027136, DOI: 10.1038/srep39761 Extrait de l'Internet: URL:https://www.nature.com/articles/srep39761> * abrégé * * page 2, alinéa 3 * * page 8, alinéa 3 - page 10, alinéa 2 * -----	8,9	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
1 mars 2023	Mateo Rosell, A

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons
.....
& : membre de la même famille, document correspondant

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2207071 FA 911413

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **01-03-2023**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2018167032 A1	20-09-2018	CN 110312806 A	08-10-2019
		EP 3596223 A1	22-01-2020
		JP 7183174 B2	05-12-2022
		JP 2020510441 A	09-04-2020
		US 2020123510 A1	23-04-2020
		WO 2018167032 A1	20-09-2018
WO 2015183724 A1	03-12-2015	BR 112016027887 A2	24-10-2017
		CA 2949276 A1	03-12-2015
		CN 106535653 A	22-03-2017
		EP 3149186 A1	05-04-2017
		US 2017198323 A1	13-07-2017
		WO 2015183724 A1	03-12-2015
WO 2015183726 A1	03-12-2015	BR 112016027849 A2	24-10-2017
		CA 2949300 A1	03-12-2015
		CN 106414506 A	15-02-2017
		EP 3149184 A1	05-04-2017
		US 2017198324 A1	13-07-2017
		WO 2015183726 A1	03-12-2015
WO 2015183729 A1	03-12-2015	BR 112016027839 A2	31-10-2017
		CA 2949278 A1	03-12-2015
		CN 106661559 A	10-05-2017
		EP 3149181 A1	05-04-2017
		US 2017204442 A1	20-07-2017
		WO 2015183729 A1	03-12-2015
CN 113186238 A	30-07-2021	AUCUN	

EPO FORM P0465