



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 518**

51 Int. Cl.:

C12P 19/16 (2006.01)

C08B 30/20 (2006.01)

A23L 1/09 (2006.01)

A23L 1/0522 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03009858 .6**

86 Fecha de presentación : **14.05.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1362919**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **Producto de almidón lentamente digerible.**

30 Prioridad: **14.05.2002 US 145264**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **National Starch and Chemical
Investment Holding Corporation
1000 Uniqema Boulevard
New Castle, Delaware 19720, US**

72 Inventor/es: **Shi, Yong-Cheng;
Cui, Xiaoyuan;
Birkett, Anne M. y
Thatcher, Michael G.**

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 300 518 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

Producto de almidón lentamente digerible.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a un producto de almidón lentamente digerible preparado desramificando enzimáticamente almidones que contienen amilosa y permitiendo que las cadenas lineales resultantes cristalicen en una forma sumamente cristalina.

10 El almidón es una fuente principal de energía en la dieta americana típica. Los almidones refinados se ingieren la mayoría de las veces cocinados y en esta forma tienen generalmente un alto índice glucémico, digiriéndose rápida y sustancialmente. Algunos almidones refinados resisten la hidrólisis enzimática en el intestino delgado, de modo que el almidón no se rompe sustancialmente hasta que alcanza el intestino grueso, en el que lo utilizan los microorganismos
15 residentes (almidón resistente).

Se ha reconocido una necesidad de un almidón lentamente digerible, que proporcione al consumidor glucosa a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Por tanto, tal almidón lentamente digerible sería útil para aplicaciones tanto alimentarias como farmacológicas.

20 Tal almidón lentamente digerible sería un hidrato de carbono excelente para su uso en alimentos, incluyendo alimentos médicos y complementos dietéticos, tanto para individuos diabéticos como prediabéticos. Tal almidón lentamente digerible también sería útil para individuos sanos que desean moderar su respuesta a glucosa o lograr una liberación sostenida de energía mediante su consumo en alimentos.

25 La bibliografía de investigación indica un papel de los almidones lentamente digeribles en la salud, como resultado de la liberación de glucosa a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. La investigación sugiere que los beneficios relacionados con la salud pueden incluir un aumento de la saciedad durante periodos de tiempo más largos (es decir, para su uso en el control del peso), liberación sostenida de energía (es decir, para mejorar el rendimiento atlético, incluyendo el entrenamiento) y mejoras en el mantenimiento de la concentración y la memoria.

30 Tales almidones lentamente digeribles también podrían ser útiles como fármacos, por ejemplo para reducir el riesgo de desarrollar diabetes. Además, los almidones lentamente digeribles pueden ser útiles para el tratamiento de la hiperglucemia, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia y disfibrinólisis. También pueden ser útiles para tratar la obesidad.

De manera sorprendente, se ha descubierto ahora que puede prepararse un almidón lentamente digerible desramificando enzimáticamente almidones que contienen amilosa hasta dar como resultado una mezcla de cadenas lineales largas y cortas.

40 **Sumario de la invención**

Esta patente se refiere a un producto de almidón lentamente digerible preparado desramificando almidones que contienen amilosa y permitiendo que el almidón de cadena sumamente lineal resultante cristalice en una forma sumamente cristalina. Los almidones lentamente digeribles proporcionan liberación sostenida de energía con un bajo índice glucémico.

50 Tal como se usa en el presente documento, la expresión almidón rápidamente digerible pretende significar un almidón o partes del mismo que se digieren en el plazo de 20 minutos de digestión tal como se mide por Englyst *et al.*, 1992 (Englyst *et al.*, European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46, S33-S50 (1992).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión almidón resistente pretende significar un almidón, o la fracción del mismo, que no se digiere en el intestino delgado tal como se mide por Englyst *et al.*, 1992 (Englyst *et al.*, European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46, S33-S50 (1992).

55 Tal como se usa en el presente documento, el término almidón lentamente digerible pretende significar un almidón, o la fracción del mismo, que no es ni almidón rápidamente digerible ni almidón resistente.

60 Almidón total o completamente desramificado, tal como se usa en el presente documento, pretende significar que comprende teóricamente el 100% en peso de cadenas lineales y, en la práctica, que está tan sumamente desramificado que la actividad enzimática adicional no produce cambio medible en el porcentaje de cadenas lineales.

65 El índice glucémico, tal como se usa en el presente documento, pretende significar el área incremental bajo la curva de la respuesta glucémica de una parte de 50 g de hidratos de carbono de un alimento de prueba expresada como un tanto por ciento de la respuesta a la misma cantidad de hidratos de carbono a partir de un alimento patrón tomado por el mismo sujeto. Normalmente, los hidratos de carbono están en una base disponible y se usa o bien pan blanco o bien glucosa como alimento patrón. Véase Carbohydrates in human nutrition, artículo 66 de la FAO Food and Nutrition, informe de una Consulta mixta FAO/OMS de expertos, Roma, 14-18 abril de 1997.

El documento US5849090 da a conocer un método de producción de un almidón resistente granular, incluyendo este método una etapa de desramificación enzimática. El documento EP688872 también da a conocer un método de producción de almidones resistentes que incluye igualmente una etapa de desramificación. El documento WO121011 da a conocer un método para producir un producto de almidón en el que se trata el almidón reticulado o nativo en un estado sustancialmente no gelatinizado con una enzima desramificante.

Descripción detallada de la invención

Esta patente se refiere a un producto de almidón lentamente digerible preparado desramificando enzimáticamente almidones que contienen amilosa y permitiendo que las cadenas lineales resultantes cristalicen en una forma sumamente cristalina. Los almidones sumamente digeribles proporcionan una liberación sostenida de energía con un bajo índice glucémico.

El almidón, tal como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los almidones derivados de cualquier fuente nativa, cualquiera de las cuales puede ser adecuada para su uso en el presente documento. Un almidón nativo tal como se usa en el presente documento es uno que se encuentra en la naturaleza. También son adecuados almidones derivados de una planta obtenida mediante técnicas de cultivo convencionales incluyendo cultivo cruzado, translocación, inversión, transformación o cualquier otro método de ingeniería génica o cromosómica para incluir variaciones de las mismas. Además, también es adecuado en el presente documento un almidón derivado de una planta que se ha hecho crecer a partir de mutaciones y variaciones artificiales de la composición genérica anterior, que puede producirse mediante métodos convencionales de cultivo por mutación.

Las fuentes típicas para los almidones son cereales, tubérculos, raíces, legumbres y frutas. La fuente nativa puede ser cualquier variedad que contenga amilosa de grano (maíz), guisante, patata, boniato, plátano, cebada, trigo, arroz, avena, sagú, amaranto, tapioca, arrurruz, *Canna*, sorgo y variedades con alto contenido en amilosa de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "que contiene amilosa" pretende incluir un almidón que contiene al menos aproximadamente el 10% en peso de amilosa. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "alto contenido en amilosa" pretende incluir un almidón que contiene al menos aproximadamente el 40%, particularmente al menos aproximadamente el 70%, más particularmente al menos aproximadamente el 80% en peso de amilosa. Son particularmente adecuados los almidones que no tienen un alto contenido en amilosa (es decir, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 40% de amilosa en peso).

El almidón se desramifica enzimáticamente usando técnicas conocidas en la técnica. Enzimas adecuadas son endo-alfa-1,6-D-glucanohidrolasas, particularmente pululanasa e isoamilasa, más particularmente isoamilasa.

La cantidad de enzima usada depende de la fuente y actividad enzimática y el material de base usado. Por ejemplo, si se usa isoamilasa, normalmente se usa la enzima en una cantidad de desde aproximadamente el 0,05 hasta aproximadamente el 10%, particularmente de desde el 0,2 hasta aproximadamente el 5% en peso del almidón.

Los parámetros óptimos para la actividad enzimática variarán dependiendo de la enzima usada. La tasa de degradación enzimática depende de factores conocidos en la técnica, incluyendo el tipo de enzima y la concentración, concentración de sustrato, pH, temperatura, presencia o ausencia de inhibidores y el grado y tipo de modificación si hay alguna. Estos parámetros pueden ajustarse para optimizar la tasa de digestión de la base de almidón.

El almidón se gelatiniza usando técnicas conocidas en la desramificación enzimática anterior en la técnica. Las técnicas conocidas en la técnica incluyen las dadas a conocer por ejemplo en las patentes estadounidenses números 4.465.702, 5.037.929, 5.131.953 y 5.149.799. Véase también, capítulo XXII- "Production and Use of Pregelatinized Starch", Starch: Chemistry and Technology, vol. III- Industrial Aspects, R.L. Whistler y E.F. Paschall, editores, Academic Press, Nueva York 1967. El procedimiento de gelatinización despliega las moléculas de almidón a partir de la estructura granular, permitiendo de ese modo que la enzima degrade más fácil y uniformemente las moléculas de almidón.

Generalmente, el tratamiento enzimático se lleva a cabo en una suspensión acuosa o tamponada a un nivel de sólidos de almidón de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 40%, dependiendo del almidón de base que esté tratándose. Un nivel de sólidos de desde aproximadamente el 15 hasta aproximadamente el 35% es particularmente útil, más particularmente útil desde el 18 hasta el 30%, en la presente invención. Como alternativa, el procedimiento puede utilizar una enzima inmovilizada sobre un soporte sólido.

Normalmente, la digestión enzimática se lleva a cabo al contenido en sólidos más alto viable sin reducir las tasas de reacción con el fin de facilitar cualquier secado posterior deseado de la composición de almidón. Las tasas de reacción pueden reducirse mediante un contenido en sólidos alto ya que la agitación se hace difícil o ineficaz y la dispersión de almidón se hace más difícil de manejar.

El pH y la temperatura de la suspensión deben ajustarse para proporcionar una hidrólisis enzimática eficaz. Estos parámetros dependen de la enzima va a usarse y se conocen en la técnica. Por ejemplo, si se usa isoamilasa, es típica una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 70°C, particularmente de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 60°C. El pH se ajusta normalmente a de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, particularmente desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 6,0, usando técnicas conocidas en la técnica.

La reacción enzimática se continúa hasta que se logra un almidón lentamente digerible. En general, la reacción enzimática tardará desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 24 horas, particularmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas. El tiempo de la reacción depende del tipo de almidón usado, el tipo y la cantidad de enzima usada y los parámetros de reacción de tanto por ciento de sólidos, pH y temperatura.

La cantidad de hidrólisis puede monitorizarse y definirse midiendo la concentración de grupos reductores que se liberan mediante la actividad alfa-1,6-D-glucanohidrolasa mediante métodos bien conocidos en la técnica. Pueden usarse otras técnicas tales como monitorización del cambio en viscosidad, reacción de yodo o el cambio en el peso molecular para definir el punto final de la reacción. Cuando se desramifica completamente el almidón, la medición monitorizada ya no cambiará más. El almidón puede desramificarse hasta cualquier grado, particularmente al menos aproximadamente el 90%, más particularmente al menos aproximadamente el 95%.

Opcionalmente, la enzima puede desactivarse (desnaturalizarse) mediante cualquier técnica conocida en la técnica tal como desactivación por calor, ácido o base. Por ejemplo, puede conseguirse la desactivación por ácido ajustando el pH hasta menos de 3,0 durante al menos 30 minutos o puede conseguirse la desactivación por calor elevando la temperatura hasta desde aproximadamente 80 hasta aproximadamente 90°C y manteniéndola a esa temperatura durante al menos aproximadamente 20 minutos para desactivar completamente la enzima.

El almidón también puede modificarse adicionalmente, o bien antes o bien tras la hidrólisis enzimática. Tal modificación puede ser modificación física, enzimática o química. La modificación física incluye inhibición térmica o mediante cizalladura, por ejemplo mediante el procedimiento descrito en la patente estadounidense número 5.725.676.

La modificación química incluye, sin limitación, reticulación, acetilación y esterificación orgánica, hidroxialquilación, fosforilación y esterificación inorgánica, modificaciones catiónicas, aniónicas, no iónicas y zwitteriónicas, y succinación. Tales modificaciones se conocen en la técnica, por ejemplo en *Modified Starches: Properties and Uses*, Ed. Wurzburg, CRC Press, Inc., Florida (1986).

Los almidones pueden convertirse y se pretende que incluyan almidones de fluidez o desleídos por ebullición por ácidos preparados mediante oxidación, hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática, calor y/o dextrinización ácida. Estos procedimientos se conocen bien en la técnica.

Cualquier almidón de base que tenga propiedades adecuadas para su uso en el presente documento puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para eliminar aromas y colores del almidón que son nativos con respecto al polisacárido o se crean durante el procesamiento. Se dan a conocer procedimientos de purificación adecuados para tratar almidones en la familia de patentes representada por el documento EP 554 818 (Kasica, *et al.*). También son útiles técnicas de lavado con álcali y se describen en la familia de patentes representada por el documento U.S. 4.477.480 (Seidel) y 5.187.272 (Bertalan *et al.*). Los almidones desramificados también pueden purificarse usando estos métodos.

La disolución resultante se ajusta normalmente hasta el pH deseado según su uso final previsto. En general, el pH se ajusta hasta desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 7,5, particularmente desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 7,0, usando técnicas conocidas en la técnica. Además, cualquier cadena lineal que precipita fuera de la dispersión de almidón puede volver a dispersarse. Si se desea la purificación de la composición de almidón desramificado, pueden eliminarse las impurezas y los subproductos de reacción mediante diálisis, filtración, centrifugación o cualquier otro método conocido en la técnica para aislar y concentrar composiciones de almidón. Por ejemplo, el almidón degradado puede lavarse usando técnicas conocidas en la técnica para eliminar fracciones solubles de bajo peso molecular, tales como oligosacáridos, dando como resultado un almidón más sumamente cristalino.

Se permite que el almidón desramificado cristalice mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo permitiendo que el almidón repose y experimente retrogradación. Entonces se recupera el almidón usando métodos conocidos en la técnica, particularmente mediante filtración o mediante secado, incluyendo secado por pulverización, liofilización, secado por evaporación súbita o secado al aire, más particularmente mediante filtración o secado por evaporación súbita. Es importante controlar la cristalización, normalmente controlando la retrogradación y el secado con el fin de obtener el grado necesario de cristalinidad que es importante para la presente invención. Además es importante que el método de secado y otros procedimientos tras la cristalización no destruyan sustancialmente los cristales.

El almidón resultante está en forma de alfa-glucanos lineales sumamente cristalinos a partir del almidón desramificado y es únicamente funcional como almidón lentamente digerible. El almidón se caracteriza por una temperatura de punto de fusión, T_p , tal como se mide mediante CDB usando el procedimiento descrito más adelante, de al menos aproximadamente 70°C, particularmente de al menos aproximadamente 80°C; más particularmente de al menos aproximadamente 90°C, y una entalpía, ΔH , tal como se mide mediante CDB usando el procedimiento descrito más adelante, de al menos aproximadamente 25 J/g, particularmente de al menos aproximadamente 30 J/g. Tales valores de CDB son indicativos de la naturaleza cristalina del producto.

El almidón resultante es lentamente digerible porque tiene digestión sostenida, particularmente a lo largo de al menos un periodo de tiempo de dos horas, más particularmente a lo largo de al menos un periodo de tiempo de cuatro horas, aunque está digerido significativamente a aproximadamente 6 horas tras la ingestión. En particular, se digiere

ES 2 300 518 T3

menos de aproximadamente el 50%, más particularmente menos de aproximadamente el 30%, en los primeros veinte minutos tras el consumo y se digiere al menos aproximadamente el 20%, particularmente al menos aproximadamente el 30%, entre 20 minutos y dos horas tras el consumo, tal como se mide usando el procedimiento descrito más adelante. Además, se digiere al menos aproximadamente el 50%, particularmente al menos aproximadamente el 60%, en el plazo de dos horas tras el consumo.

El almidón puede consumirse en su estado en bruto, pero se consume normalmente tras el procesamiento en condiciones de alta o baja humedad. Por tanto, la invención pretende incluir aquellos almidones que tienen la ventaja de digerirse lentamente en el estado en el que se consumen. Tal estado se modela mediante los métodos descritos en los ejemplos, más adelante.

Además, el almidón lentamente digerible resultante no produce un gran aumento rápido en los niveles de glucemia de los almidones de alto índice glucémico, si no que en su lugar proporciona un aumento más moderado por encima del nivel inicial que se sostiene durante un periodo de tiempo más largo. También es tolerante a los procedimientos porque la parte lentamente digerible no disminuye sustancialmente tras el cocinado y/u otras condiciones típicas de procesamiento de los alimentos.

El almidón puede usarse en una variedad de productos comestibles incluyendo, pero sin limitarse a: cereales, barritas, pizzas, pasta, aliños, incluyendo aliños que pueden verterse y aliños que pueden cogerse con cuchara; rellenos de pastel, incluyendo rellenos de fruta y crema; salsas, incluyendo salsas blancas y salsas a base de productos lácteos tales como salsas de queso; jugos de carne; jarabes ligeros; pudines; natillas; yogures; cremas agrias; bebidas, incluyendo bebidas a base de productos lácteos; glaseados; artículos horneados, incluyendo galletas saladas, panes, magdalenas, bollos con forma de rosquilla ("bagel"), panecillos, galletas, cortezas de pasteles y tartas; condimentos, productos de confitería y chicles, y sopas.

También se pretende que los productos comestibles incluyan alimentos y bebidas nutritivas, incluyendo complementos dietéticos, productos diabéticos, productos para la liberación sostenida de energía tales como bebidas para deportistas, barritas nutritivas y barritas energéticas.

El presente almidón puede añadirse en cualquier cantidad deseada o necesaria para obtener la funcionalidad de la composición. En general, el almidón puede añadirse en una cantidad de desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 100%, particularmente de desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 50% en peso de la composición. El almidón puede añadirse al alimento o bebida de la misma manera que cualquier otro almidón, normalmente mezclándolo directamente en el producto o añadiéndolo en forma de un sol.

Las siguientes realizaciones se presentan para mostrar a modo de ejemplo adicionalmente la presente invención y no deben tomarse como limitativos en ningún aspecto.

Realización 1

Una composición de almidón preparada a partir de almidón que contiene amilosa que comprende α -glucanos lineales cristalinos caracterizada por:

- a) al menos aproximadamente el 20% de almidón lentamente digerible;
- b) menos de aproximadamente el 50% de almidón rápidamente digerible;
- c) una temperatura de punto de fusión, T_p , tal como se mide mediante CDB, de al menos aproximadamente 70°C; y
- d) una entalpía, ΔH , tal como se mide mediante CDB, de al menos aproximadamente 25 J/g.

Realización 2

La composición de almidón según la realización 1, en la que al menos aproximadamente el 50% se digiere en el plazo de dos horas de digestión.

Realización 3

La composición de almidón según la realización 1, en la que al menos aproximadamente el 60% se digiere en el plazo de dos horas de digestión.

Realización 4

La composición de almidón según la realización 1, mediante la que la composición de almidón se prepara a partir de almidón seleccionado del grupo que consiste en almidón de maíz, almidón de sagú, almidón de tapioca y almidón de patata.

ES 2 300 518 T3

Realización 5

La composición de almidón según la realización 1, en la que la temperatura de punto de fusión es de al menos aproximadamente 80°C.

Realización 6

La composición de almidón según la realización 1, en la que la temperatura de punto de fusión es de al menos aproximadamente 90°C.

Realización 7

La composición de almidón según la realización 1, en la que la entalpía es de al menos aproximadamente 30 J/g.

Realización 8

La composición de almidón según la realización 1, caracterizada por al menos aproximadamente el 30% de almidón lentamente digerible.

Realización 9

Un procedimiento de fabricación de la composición de almidón según la realización 1 que comprende:

- a) desramificar un almidón que contiene amilosa;
- b) permitir que el almidón desramificado cristalice; y
- c) secar el almidón desramificado sumamente cristalizado.

Realización 10

El procedimiento según la realización 9, en el que la composición de almidón se desramifica usando pululanasa o isoamilasa.

Realización 11

Un producto comestible que comprende la composición de almidón según la realización 1.

Realización 12

El producto según la realización 11, en el que el producto es un alimento nutritivo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar y explicar adicionalmente la presente invención y no deben tomarse como limitativos en ningún aspecto. Todos los tantos por ciento usados son en una base de peso/peso. Se usan los siguientes procedimientos de prueba en todos los ejemplos:

Calorimetría diferencial de barrido - Se realizaron las mediciones de calorimetría diferencial de barrido en un instrumento DSC-7 de Perkin-Elmer (Norwalk, CT, EE.UU). Se calibró el instrumento con indio. Se preparan muestras de aproximadamente 10 mg de almidón a una razón de almidón:agua de 1:3 y se calientan a 10°C/min. desde 5°C hasta 160°C. Se usa como referencia una cubeta de acero inoxidable vacía.

Equivalente de dextrosa (ED) - Para la medición de ED en proceso, se usó el método de valoración volumétrica de Fehling. Se aclaró un matraz Erlenmeyer de 500 ml con agua desionizada (D.I.). Se añadieron entonces 50 ml de agua D.I. Siguió la adición de 5 ml de cada una de las disoluciones A y B de Fehling y 2 gotas de azul de metileno con dos perlas de vidrio. Tras la determinación de los sólidos de reacción usando un refractómetro, se preparó una disolución de almidón que contenía el 2-4 por ciento de sólidos de almidón usando agua D.I. diluyendo la disolución de reacción en un vaso de precipitados. Antes de proceder a la siguiente etapa, se comprobaron los sólidos mediante un refractómetro para asegurarse de que la disolución se preparaba de manera correcta. Se pesó el vaso de precipitados con la disolución de almidón y se registró el peso. Se añadieron 15 gramos de la disolución de almidón al matraz Erlenmeyer con la disolución de Fehling preparada. Tras haberse sometido a ebullición con agitación durante 2 minutos en una placa caliente, apareció normalmente un tinte azulado. Se añadió gradualmente la disolución de almidón del vaso de precipitados usando una pipeta hasta que el tinte azulado desapareció y se formó un óxido cuproso rojizo característico. Se agitó la disolución de almidón de manera continua con la pipeta de plástico para mantener la disolución uniforme. Cuando se alcanzó el punto final rojizo, se pesó de nuevo el vaso de precipitados que contenía la disolución de almidón para determinar el peso de almidón consumido. El cálculo del ED puede observarse a partir de la siguiente ecuación:

ES 2 300 518 T3

$$ED = \frac{[\text{Factor de Fehling} \times 100]}{[(\text{gramos requeridos de la disolución de almidón}) \times (\text{conc. de la disolución de almidón})]}$$

Digestión simulada (Englyst et al, *European Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 46, S33-S50) - Se trituran/desmenuzan muestras de alimentos como si se masticasen. Se seleccionan muestras de almidón en polvo hasta un tamaño de partícula de 250 micrómetros o menos. Se pesan 500-600 mg \pm 0,1 mg de muestra y se añaden al tubo de muestra. Se añaden a cada tubo 10 ml de una disolución de pepsina (0,5%), goma guar (0,5%) y HCl (0,05 M).

Se preparan tubos patrón de glucosa y blanco. El blanco es 20 ml de un tampón que contiene acetato de sodio 0,25 M y cloruro de calcio al 0,02%. Se preparan patrones de glucosa mezclando 10 ml de tampón acetato de sodio (descrito anteriormente) y 10 ml de una disolución de glucosa 50 mg/ml. Los patrones se preparan por duplicado.

Se prepara la mezcla enzimática añadiendo 18 g de pancreatina porcina (Sigma P-7545) a 120 ml de agua desionizada, mezclando bien, centrifugando luego a 3000 g durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante y se añaden 48 mg de invertasa seca (Sigma I-4504) y 0,5 ml de AMG 400 (Novo Nordisk).

Se preincuban los tubos de muestra a 37°C durante 30 min., luego se sacan del baño y se añaden 10 ml de tampón acetato de sodio junto con esferas/bolitas de vidrio (para ayudar en la rotura física de la muestra durante la agitación).

Se añaden 5 ml de mezcla enzimática a las muestras, el blanco y los patrones. Se agitan los tubos horizontalmente en un baño de agua a 37°C a aproximadamente 180 golpes/min. El tiempo "cero" representa la primera adición de la mezcla enzimática al primer tubo.

Tras 20 y 120 minutos, se extraen alícuotas de 0,5 ml de las muestras en incubación y se colocan en un tubo separado de 20 ml de etanol al 66% (para detener la reacción). Tras 1 hora, se centrifuga una alícuota a 3000 g durante 10 minutos.

Se mide la concentración de glucosa en cada tubo usando el método de la glucosa oxidasa/peroxidasa (procedimiento de ensayo de glucosa GLC9/96 de Megazyme). Éste es un procedimiento colorimétrico. También puede usarse HPLC para detectar la glucosa tal como se describe en la bibliografía anterior que usa este experimento.

Se determina el grado de digestión de almidón calculando la concentración de glucosa frente a los patrones de glucosa, usando un factor de conversión de 0,9. Los resultados se dan como "% de almidón digerido" (base en peso seco) tras 20 y 120 minutos. El ALD (almidón lentamente digerible) es el valor a los 120 minutos menos el valor a los 20 minutos.

Cada lote de análisis de muestra incluye una muestra de referencia de almidón de maíz sin cocinar. El intervalo aceptado de valores de digestión en % para el almidón de maíz es:

Muestra	a20	a120	ALD
Almidón de maíz ¹	17,5 \pm 2,5	80 \pm 5	aprox. 62,5

¹almidón Melogel®, disponible comercialmente de National Starch and Chemical Company, Bridgewater, NJ, EE.UU.

Modelos cocinados - Se usan dos modelos generales para imitar los procesos alimentarios comerciales: alta humedad y baja humedad. El modelo de alimento de alta humedad usa almidón en agua al 20% de sólidos, cocinado en un baño de vapor a 90°C durante 5 minutos. Entonces se congela este producto cocinado en un baño de nieve carbónica/acetona, se liofiliza, se tritura y se somete a prueba para determinar la digestión. El modelo de alimento de baja humedad usa almidón en agua al 50% de sólidos y hornea la pasta en un horno a 190°C durante aproximadamente 20 minutos. Se tritura el almidón cocinado y se selecciona hasta 250 micrómetros o menos y se somete a prueba para determinar el perfil de digestión del almidón.

Ejemplo 1

Preparación de almidón de tapioca y sagú desramificado y cristalizado para el estudio de digestión

A. Se suspendieron 3 kg de almidón de tapioca en 8423 g de agua. Se ajustó el pH de la muestra hasta 5,5 usando agua:HCl 3:1. Se cocinó la muestra por inyección de vapor y se colocó en un baño de agua a 59°C. Cuando la tempe-

ES 2 300 518 T3

5 ratura de la muestra estaba a 59°C, se añadió pululanasa al 5% (Promozyme 200L de Novo Nordisk). Se desramificó la muestra durante la noche (16 horas) y entonces se desnaturizó la enzima calentando la muestra en un baño a 95°C durante media hora. Tras el calentamiento, se colocó la muestra en una mesa de trabajo y se cristalizó durante la noche a temperatura ambiente con ligera agitación. Se recuperó el producto mediante secado por pulverización con una temperatura de entrada de 210°C y una temperatura de salida de 116°C. El ED final de la muestra fue de 5,3.

B. Se repitió el método del ejemplo 1A con la excepción de que el almidón era almidón de sagú. El ED final fue de 4,0.

10 C. Se repitió el método del ejemplo 1A con la excepción de que el almidón de tapioca se desramificó completamente usando isoamilasa. La temperatura de reacción estaba a 55°C y el pH era de 4,0. Se añadió isoamilasa al 0,2% (Hayashibara Inc., Japón). Se desramificó la muestra durante la noche (16 horas) y luego se desnaturizó la enzima disminuyendo el pH hasta 2,0 y manteniéndolo durante 30 minutos. Tras ajustar el pH de nuevo hasta 6,0 se recuperó el producto mediante secado por pulverización con una temperatura de entrada de 210°C y una temperatura de salida de 116°C.

15 También se sometieron a prueba estas muestras para determinar la digestión. Se cocinaron las muestras 1A y 1B usando el modelo de baja humedad y la muestra 1C se mantuvo sin cocinar. Entonces se sometieron a prueba las muestras para determinar su perfil de digestión. La tabla 1 muestra los resultados de digestión junto con los contenidos en ALD calculados así como los datos de ALD del material de partida.

TABLA 1

25 *Resultados de digestión y de ALD del material de partida para almidón de tapioca y sagú desramificado y cristalizado*

Muestra	20 min.	120 min.	ALD	CDB			
				To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	ΔH (J/g)
1A	40,9	63,0	22,1	89,7	106,7	120,0	24,0
1B	47,5	68,4	20,9	41,0	76,3	110,8	34,0
1C	36,0	56,5	26,5	48,8	86,8	113,6	33,5

40 Las muestras de este ejemplo mostraron un contenido en ALD superior al 20%.

La muestra 1A sirve como ejemplo comparativo sólo.

REIVINDICACIONES

1. Composición de almidón preparada a partir de almidón gelatinizado que contiene desde el 10 hasta el 40% de
5 amilosa en peso que se ha desramificado al menos en el 95% a α -glucanos lineales cristalinos **caracterizada** por:

- a. al menos el 20% de almidón lentamente digerible;
- b. menos del 50% de almidón rápidamente digerible;
- 10 c. una temperatura de punto de fusión, T_p medida mediante CDB, de al menos aproximadamente 70°C; y
- d. una entalpía, ΔH medida mediante CDB, de al menos aproximadamente 25 J/g,

15 en la que al menos aproximadamente el 50% se digiere en el plazo de dos horas, tal como se mide por Englyst *et al*, European Journal of Clinical Nutrition, 46, páginas 33-50 (1992) y en la que el almidón rápidamente digerible comprende un almidón o partes del mismo que se digieren en el plazo de 20 minutos de digestión y el almidón lentamente digerible comprende un almidón o una fracción del mismo que no es ni almidón rápidamente digerible ni almidón resistente y se digiere menos del 50% en los primeros veinte minutos tras el consumo y al menos el 20% se
20 digiere entre 20 minutos y dos horas tras el consumo.

2. Composición de almidón según la reivindicación 1, en la que al menos aproximadamente el 60% se digiere en el plazo de dos horas.

25 3. Composición de almidón según la reivindicación 1, por la que la composición de almidón se prepara a partir de almidón seleccionado del grupo que consiste en almidón de maíz, almidón de sagú, almidón de tapioca y almidón de patata.

30 4. Composición de almidón según la reivindicación 1, en la que la temperatura de punto de fusión es de al menos aproximadamente 80°C.

5. Composición de almidón según la reivindicación 1, en la que la temperatura de punto de fusión es de al menos aproximadamente 90°C.

35 6. Composición de almidón según la reivindicación 1, en la que la entalpía es de al menos aproximadamente 30 J/g.

7. Composición de almidón según la reivindicación 1, **caracterizada** por al menos aproximadamente el 30% de almidón lentamente digerible.

40 8. Procedimiento de fabricación de la composición de almidón según la reivindicación 1, que comprende:

- a. gelatinizar un almidón que contiene desde el 10 hasta el 40% de amilosa en peso;
- 45 b. desramificar el almidón hasta al menos el 95%;
- c. permitir que cristalice el almidón desramificado; y
- d. secar el almidón desramificado altamente cristalizado.

50 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la composición de almidón se desramifica usando pululanasa o isoamilasa.

10. Producto comestible que comprende la composición de almidón según la reivindicación 1.

55 11. Producto según la reivindicación 10, en el que el producto es un alimento nutricional.