Innovation, Sciences et Développement économique Canada
Office de la Propriété Intellectuelle du Canada

Innovation, Science and Economic Development Canada
Canadian Intellectual Property Office

CA 3229608 A1 2023/03/02

(21) 3 229 608

(12) DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION

(13) A1

(86) **Date de dépôt PCT/PCT Filing Date:** 2022/08/22
(87) **Date publication PCT/PCT Publication Date:** 2023/03/02
(85) **Entrée phase nationale/National Entry:** 2024/02/21
(86) **N° demande PCT/PCT Application No.:** FR 2022/051595
(87) **N° publication PCT/PCT Publication No.:** 2023/026010
(30) **Priorité/Priority:** 2021/08/23 (FR FR21 08822)

(51) **Cl.Int./Int.Cl.** ***C12P 19/04*** (2006.01),
A23L 33/21 (2016.01), ***C12P 19/18*** (2006.01)

(71) **Demandeur/Applicant:**
ROQUETTE FRERES, FR

(72) **Inventeurs/Inventors:**
LANOS, PIERRE, FR;
RAMETTE, MATTHIEU, FR;
REMAUD-SIMEON, MAGALI, FR;
MOULIS, CLAIRE, FR;
PIZZUT-SERIN, SANDRA, FR;
SEVERAC, ETIENNE, FR

(74) **Agent:** ITIP CANADA, INC.

(54) **Titre : PROCEDE D'OBTENTION DE FIBRES SOLUBLES PAR VOIE ENZYMATIQUE**
(54) **Title: METHOD FOR OBTAINING SOLUBLE FIBRES ENZYMATICALLY**

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

Date de soumission : 2024/02/21

No de la demande can. : 3229608

Abrégé:

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

Description

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

Domaine technique

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

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

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

Etat de l'art antérieur

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

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

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

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

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

[0009] En effet, les maltodextrines standards sont rapidement digestibles et se définissent comme des mélanges purifiés et concentrés de glucose et de polymères de glucose essentiellement lié en 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 mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides, d'obtenir des fibres d'intérêt en alimentation humaine et animale, par voie enzymatique. La société Demanderesse a ainsi développé un procédé qui utilise deux enzymes particulières, l'une capable de créer des liaisons α(1-3) et l'autre capable de créer des liaisons α(1-6), de façon séquentielle, et inversement.

[0016] Dans un premier aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un mélange d'α-glucanes comprenant les étapes suivantes :

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

lesdites première et deuxième enzymes étant une α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) et/ou 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 utilisées de manière interchangeable. Ils définissent des oligosaccharides composés d'au moins 3 unités de glucose reliées entre elles par des liaisons α-glycosidiques (ou α-glucosidiques).

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

[0020] Une telle mesure du D.E. est cependant insuffisante pour représenter précisément la distribution moléculaire des α-glucanes. En effet, l'hydrolyse acide de l'amidon, totalement aléatoire, ou son hydrolyse enzymatique, un peu plus ordonnée, fournissent des mélanges de glucose et de polymères de glucose que la seule mesure du D.E. ne permet pas de définir avec précision, et qui comportent des molécules de courte taille, de faible Degré de Polymérisation (D.P.), aussi bien que des molécules de taille très longue, de D.P. élevé.

[0021] La mesure du D.E. ne donne en fait qu'une idée approximative du D.P. moyen du mélange du glucose et des polymères de glucose constitutifs des α-glucanes et donc de leur masse moléculaire moyenne en nombre (Mn). Pour compléter la caractérisation de la distribution des masses moléculaires des α-glucanes, la détermination d'un autre paramètre est importante, celui de la masse moléculaire moyenne en poids (Mp).

[0022] Dans la pratique, les valeurs de Mn et de Mp ne se calculent pas, mais se mesurent par différentes techniques. On utilise par exemple une méthode de mesure adaptée aux polymères de glucose, qui repose sur la chromatographie de perméation de gel sur des colonnes de chromatographie étalonnées avec des pullulans de masses moléculaires connues.

[0023] Le rapport Mp/Mn est appelé indice de polymolécularité ou indice de polydispersion (IP) et permet de caractériser globalement la distribution des masses moléculaires d'un mélange polymérique. En règle générale, la répartition en masses moléculaires des maltodextrines standards conduit à des IP compris entre 5 et 10.

[0024] 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)).

[0025] Le procédé selon la présente invention permet de diminuer le pourcentage de liaisons α(1-4) au profit de liaisons α(1-3) et α(1-6), ce qui a l'avantage de diminuer la digestibilité du mélange d'α-glucanes obtenus par le procédé.

[0026] Selon un mode réalisation de l'invention, le substrat comprend : :

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

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

[0027] De manière préférée, le substrat comprend :

- entre 90 et 97%, de préférence entre 92 et 95%, de liaisons α(1-4),
- entre 3 et 7%, de préférence entre 4 et 6%, de liaisons α(1-6),

entre 0 et 3 %, de préférence entre 1 et 2%, de liaisons α(1-3),

le pourcentage de liaisons α(1-6) étant le pourcentage molaire de liaisons α(1-6) respectivement par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques, mesuré par la méthode Hakomori.

[0028] Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le substrat a un equivalent dextrose (DE) compris entre 17 et 20, de préférence entre 18 et 19, de manière encore plus préférée environ 18,4.

[0029] Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le substrat présente les caractéristiques décrites dans le Tableau 1 ci-dessous. Il peut s'agir, par exemple, du Glucidex 19D® commercialisé par la société Demanderesse.

[0030] 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.

[0031] Les deux enzymes sont utilisées de manière séquentielle.

[0032] Dans un mode de réalisation, la première enzyme est une α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4), mais également de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) et la deuxième enzyme est une α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6).

[0033] Dans un autre mode de réalisation, la première enzyme est une α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) et la deuxième enzyme est une α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3).

[0034] Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'α-glucanotransférase capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) est la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1. De manière préférée, il s'agit d'une protéine ayant au moins 91%, de manière encore plus préférée, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99%, au moins 99,5%, au moins 99,6%, au moins 99,7%, au moins 99,8%, au moins 99,9% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1. La séquence SEQ ID No :1 correspond au numéro d'accession Genbank WP_053069107.1.

[0035] 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(1-3) est la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2. De manière préférée, il s'agit d'une protéine ayant au moins 91%, de manière encore plus préférée, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99%, au moins 99,5%, au moins 99,6%, au moins 99,7%, au moins 99,8%, au moins 99,9% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2. La séquence SEQ ID No :2 correspond au numéro d'accession Genbank AOR73699.1.

[0036] Selon un mode de réalisation de l'invention, chaque enzyme est ajoutée à une concentration comprise entre 0.01 et 1 mg/mL de milieu réactionnel, de préférence entre 0.05 et 0.5 mg/mL, de manière encore plus préférée environ 0.1 mg/mL de milieu réactionnel, lors des incubations séquentielles.

[0037] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de chaque enzyme est réalisée pendant une durée comprise entre 12 et 48 heures, de préférence environ 24 heures

[0038] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de chaque enzyme est réalisée à une température comprise entre 20 et 40°C, de préférence environ 37°C.

[0039] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de chaque enzyme est réalisée à un pH compris entre 5 et 6,5, de préférence entre 5,5 et 6, de manière encore plus préférée environ 5,75.

[0040] Selon un aspect, la présente invention porte également sur un mélange d'α-glucanes susceptible d'être obtenu par le procédé décrit ci-dessus.

[0041] 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.

[0042] 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 6 ci-dessous.

[0043] 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 4, de manière encore plus préférée d'au moins 5, 6, 7 ou 8, par rapport au substrat de départ.

[0044] Le procédé selon la présente invention permet également de créer des liaisons α(1-3) qui étaient absentes dans le substrat de départ.

[0045] Le pourcentage de liaisons α(1-4), α(1-6), α(1-2) et α(1-3) est mesuré par la méthode Hakomori (1964 HAKOMORI A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide) tel que décrit dans l'exemple 1, partie 9 ci-dessous.

[0046] 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 45%,
- et/ou au moins 20% de liaisons α(1-6),
- et/ou au moins 3% de liaisons α(1-3),

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

[0047] De manière préférée, le taux de fibres hydrolysables est inférieur à 44%, de préférence inférieur à 43% en poids par rapport au poids total de matière sèche, de manière encore plus préférée inférieur à 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%.

[0048] 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%, le pourcentage de liaisons α(1-6) étant le pourcentage molaire de liaisons α(1-6) respectivement par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques, mesuré par la méthode Hakomori.

[0049] De manière préférée, le pourcentage de liaisons α(1-3), est d'au moins 4%, de préférence au moins 4%, au moins 5%, au moins 6%, au moins 7%, au moins 8% le pourcentage de liaisons α(1-3) étant le pourcentage molaire de liaisons α(1-3) respectivement par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques, mesuré par la méthode Hakomori.

[0050] 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 décrites ci-dessus pour la préparation d'aliments pour l'alimentation humaine ou animale.

[0051] 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.

[0052] Enfin, dans un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation séquentielle d'une glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) et d'une glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) pour diminuer la digestibilité d'un mélange d'α-glucanes. De manière préférée, ladite glucanotransférase a pour séquence SEQ ID No :1 ou au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1. De manière préférée, ladite glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-6) a pour séquence SEQ ID No :1 ou au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1. De manière préférée, ladite glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) a pour séquence SEQ ID No :2 ou au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2.

[0053] 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.

[0054] L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent, lesquels se veulent illustratifs et non limitatifs.

[0055] Exemple 1. : préparation de maltodextrines branchées à partir d'un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides: matériel et méthodes

[0056] 1. Préparation d'une solution de substrat comprenant un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides

[0057] Le substrat de départ utilisé était un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides, présentant les caractéristiques décrites dans le Tableau 1 :

[0058] [Tableau 1]

Critère	Sous-critère	Méthode de mesure	Unité	Valeur
Poids moléculaire	Mn (eq pullulan)	MCL1439	Da	1130
Poids moléculaire	Mw (eq pullulan)	MCL1439	Da	9510
Poids moléculaire	Indice de polydispersion	MCL1439		8,4
Distribution en glucides	DP1	MCL190A	% relatif	1,7
Distribution en glucides	DP2	MCL190A	% relatif	5
Distribution en glucides	DP3	MCL190A	% relatif	7,2
Distribution en glucides	DP4	MCL190E	% relatif	5,6
Distribution en glucides	DP5	MCL190E	% relatif	6
Distribution en glucides	DP6	MCL190E	% relatif	7
Distribution en glucides	DP7	MCL190E	% relatif	6,1
Distribution en glucides	DP8	MCL190E	% relatif	4,3
Distribution en glucides	DP9	MCL190E	% relatif	3,1
Distribution en glucides	DP10 to DP20	MCL190E	% relatif	17,1
Distribution en glucides	> DP20	MCL190E	% relatif	37
Sucres réducteurs	Equivalent Dextrose (DE)	MCL050B		18,4
Matière sèche	Perte de masse après séchage	MCL209A	%	4%

[0059] Différentes solutions de substrat dans du tampon sodium acétate 50mM, pH 5.75 ont été préparées, à des concentrations de 100g/L, 200g/L ou 400g/L.

[0060] 2. Production des enzymes recombinantes.

[0061] Les enzymes suivantes ont été produites de manière recombinante :

- Enzyme GT#11 : α-4,3 glucanotransférase de *Lactobacillus fermentum* NC2970, de la famille des glycoside hydrolases GH70 ayant pour séquence en acide aminés la séquence répertoriée dans Genbank sous la référence AOR73699.1

- Enzyme GT#19 : α-4,6 glucanotransférase de *Lactobacillus mucosae,* de la famille des glycoside hydrolases GH70 ayant pour séquence en acide aminés la séquence répertoriée dans Genbank sous la référence WP_053069107.1.

[0062] Des cellules de *E. coli* BL21 star (DE3) contenant le plasmide pET-21a-enzyme (afin de produire différentes enzymes, dont GT#11 et GT#19) ont été cultivées dans un milieu ZYM-50524 contenant 1% de glycérol et 1% de lactose. En fin de culture, les cellules ont été centrifugées à 6500g pendant 10 min, les culots cellulaires remis en suspension à une DO600 nm de 80 dans un tampon phosphate 20mM pH7.4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole, et les cellules lysées par sonication à froid grâce à 4 cycles de 20 secondes à 30 % d'amplitude suivi de 4 minutes de repos. Les débris cellulaires ont été séparés des protéines solubilisées par centrifugation pendant 30 minutes à 10000 g.

[0063] 3 Purification des enzymes

[0064] La purification des protéines d'intérêt a été réalisée sur résine Cobalt (Invitrogen) chargée en ions cobalt divalent (CO^{2+}), pour lesquels l'étiquette polyhistidine présente une affinité. L'élution a été réalisée en créant une compétition entre l'étiquette polyhistidine et des concentrations croissantes d'imidazole. Brièvement, 10 à 35 mL d'extrait cellulaire d'E. coli ont été mis en contact pendant 1 heure avec 1 mL de résine de Cobalt préalablement équilibrée avec 25mL tampon Phosphate 20mM pH7.4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole. La filtration de la résine sur fritté permet l'élimination de l'ensemble des protéines non fixées. La résine a ensuite été lavée 5 fois avec 40 mL de tampon Phosphate 20mM pH7,4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole. Enfin, l'élution a été réalisée avec 3 mL de tampon Phosphate 20mM pH7,4 contenant 300 mM de NaCl et 250 mM d'imidazole pendant 5 minutes afin de décrocher les enzymes d'intérêt. Les solutions enzymatiques ont alors été dialysées (membrane sigma 10 kDa) contre 5 L de tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5.75 contenant 150 Mm de NaCl (overnight, 4°C sous agitation) afin d'éliminer le NaCl et l'imidazole. Le dosage des différentes solutions protéiques a été réalisé en mesurant leur absorbance à 280 nm grâce à un nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermofisher). Les

coefficients d'extinction moléculaire ε ont été déterminés grâce à l'application ProtParam tool du site ExPASy bioinformatics resource portal.

[0065] Une électrophorèse en conditions dénaturantes a permis de contrôler la qualité des extraits enzymatiques purifiés. Pour cela, des échantillons contenant 30µL d'extrait protéique et 10 µL du tampon de charge (NuPage LDS Sample buffer 4x, Invitrogen) ont été dénaturés pendant 5 minutes à 95°C puis déposés sur des gels d'acrylamide pré-coulés (Mini-Protean Tris-Glycine eXtented (Biorad)). La migration a été réalisée pendant 30 min dans du tampon Tris/Glycine/SDS 1x sous une tension de 150 V. Les protéines ont ensuite été révélées par incubation des gels pendant 1 heure dans une solution de coloration (PageBlue Protein Staining Solution, Fermentas) puis par rinçage pendant 30 min dans trois bains consécutifs d'eau.

[0066] 4. Mesures de l'activité des enzymes de branchement

[0067] L'activité enzymatique des enzymes de branchement peut être déterminée en mesurant la vitesse initiale de production des sucres réducteurs à l'aide de la méthode à l'acide dinitrosalicilique (DNS). Une unité enzymatique représente la quantité d'enzyme qui libère une µmole de fructose par minute, à 30 °C, pour une concentration initiale de saccharose de 100 g.L-1 dans les conditions de tampon d'activité adéquate. Au cours d'une cinétique d'1 mL de volume, 100 µL de milieu réactionnel ont été prélevés et la réaction stoppée par ajout d'un volume équivalent de DNS. Les échantillons ont ensuite été chauffés 5 min à 95 °C, refroidis dans la glace, dilués au demi dans de l'eau, et l'absorbance a été lue à 540 nm. Une gamme étalon de 0 à 2 g.L-1 de fructose permet d'établir le lien entre la valeur d'absorbance et la concentration en sucres réducteurs.

[0068] 5. Réactions enzymatiques

[0069] Les réactions ont été réalisées avec 0.1 mg/mL d'enzyme purifiée soit GT#11 soit GT#19 et dialysée en présence de 10%, 20% ou 40% de substrat dans du tampon sodium acétate 50 mM, pH 5.75. Les réactions ont été incubées sous agitation pendant 24 h à 20°C ou 37°C. Les réactions ont été arrêtées par chauffage (95°C pendant 5 minutes). Des prélèvements aux temps initiaux et finaux ont été

réalisés pour analyser la spécificité des enzymes en utilisant différentes techniques analytiques (HPAEC-PAD, RMN et HPSEC).

[0070] 6. Test de digestibilité

[0071] 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.

[0072] 7. Analyses chromatographiques

[0073] Les produits obtenus ont été analysés par chromatographie d'exchange d'anions couplée à un détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC PAD - High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Ampero-metric Detection). Les analyses ont été réalisées sur un système Thermo ICS6000 équipé d'une colonne CarboPacTM PA100 analytical column (2 mm x 250 mm) couplée avec une pré-colonne CarboPacTM PA100 guard (2 mm x 50 mm). Un gradient d'acétate de sodium dans 150 mM de soude a été appliqué à un débit de 0,250 ml.min-1 selon le profil suivant : 0–5 min, 0 mM ; 5–35 min, 0–300 mM ; 35–40 min, 300–450 mM ; 40-42 min, 450 mM. La détection a été réalisée grâce à une électrode de travail en or et une cellule de référence pH Ag/AgCl. Les échantillons ont été dilués à une masse sèche totale de 1 g.L-1 avant injection. La taille des produits de réaction a également été parfois déterminée par Chromatographie d'exclusion de taille (high performance size exclusion chromatography) sur un système Fisher Ultimate 3000 équipé d'une colonne Shodex OH-Pak SB-802.5 protégée par une pré-colonne Shodex OH-Pak SB-G guard column, placée à 70°C dans le four du système. La phase mobile était de l'eau à un débit de 0.3 mL.min-1 . La détection a été réalisée par réfractométrie. Les échantillons ont été dilués à une masse sèche totale de 20 g.L-1 avant injection.

[0074] 8. RMN.

[0075] 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.

[0076] 9. Méthode Hakomori

[0077] 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.

[0078] Exemple 2. : utilisation séparée des enzymes GT#11 et GT#19

[0079] Dans cet exemple, l'action des enzymes GT#11 et GT#19 a été testée séparément.

[0080] 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.

[0081] [Tableau 2]

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

[0082] Les inventeurs ont constaté que l'enzyme GT#11 était capable de diminuer le pourcentage de liaisons linéaires α-1,4 et d'augmenter le pourcentage de liaisons dites « branchées » α-1,3 et α-1,6.

[0083] L'enzyme GT#19 était quant à elle capable de diminuer le pourcentage de liaisons linéaires α-1,4 et d'augmenter nettement le pourcentage de liaisons dites « branchées » α-1,6.

[0084] Dans les deux cas, une augmentation de la résistance à la digestion (reflétée par une diminution du taux d'hydrolyse) a été observée. Toutefois, les produits obtenus ne sont pas suffisamment résistants pour être considérés comme des fibres.

[0085] Exemple 3. : utilisation simultanée des enzymes GT#11 et GT#19

[0086] Dans cet exemple, les inventeurs ont étudié l'action combinée des deux enzymes GT#11 et GT#19.

[0087] Les deux enzymes ont donc été ajoutées simultanément au mélange réactionnel, dans les différentes proportions mentionnées dans la colonne de gauche du Tableau 3.

[0088] Les résultats des différentes réactions enzymatiques sont présentés dans le Tableau 3 ci-dessous, qui présente les pourcentages de liaisons α-1,6 ; α-1,3 et α-1,4 mesurés par RMN du proton ou par la méthode Hakomori et % d'hydrolyse (AOAC 2002.02) dans les produits de réaction obtenus.

[0089] [Tableau 3]

		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)
0.05mg/mL GT#11 + 0.05mg/mL GT#19	200	0%	0%	64%	36%	2%	5%	65%	28%	55%
0.075mg/mL GT#11 + 0.025mg/mL GT#19	200	0%	7%	65%	28%	2%	4%	67%	27%	52%

0.025mg/mL GT#11 + 0.075mg/mL GT#19	200	0%	0%	66%	34%	1%	4%	64%	31%	57%

[0090] Les inventeurs ont constaté que l'action simultanée des enzymes GT#11 et GT#19 résultait en une diminution du pourcentage de liaisons linéaires α-1,4 et une augmentation du pourcentage de liaisons dites « branchées » α-1,3 et α-1,6. Les résultats obtenus sont équivalents, voire un peu moins bons que l'utilisation de GT19 seule sur 200 g/l de substrat.

[0091] Cette modification du profil de liaisons résulte en une augmentation de la résistance à la digestion (reflétée par une diminution du taux d'hydrolyse) a été observée. Toutefois, les produits obtenus ne sont pas suffisamment résistants (<40% d'hydrolyse selon la méthode AOAC2002.02) pour être considérés comme des fibres.

[0092] Exemple 4. : utilisation séquentielle des enzymes GT#11 et GT#19

[0093] Dans cet exemple, les inventeurs ont étudié l'action séquentielle des deux enzymes GT#11 et GT#19.

[0094] La cascade enzymatique représente une bonne stratégie pour augmenter la résistance des produits aux enzymes hydrolytiques et atteindre un niveau de digestibilité inférieur à 40%.

[0095] Dans le cadre de la cascade enzymatique, les enzymes sont utilisées l'une après l'autre. Deux configurations différentes alternant les deux α-GT ont été étudiées :

[0096] - Le Glucidex 19D est mis en solution à 200 g.L-1, la première α-GT est mise en réaction à une concentration de 0,05 mg.mL-1pendant 24h. La réaction est arrêtée par chauffage pendant 5 minutes à 95°C. la seconde enzyme est alors mise en réaction à la même concentration de 0,05 mg.ml-1. La réaction est de nouveau stoppée par chauffage pendant 5 minutes à 95°C après 24 h d'incubation.

[0097] - Le Glucidex 19D est mis en réaction à 100 $g.L^{-1}$, première α-GT est mise en réaction à une concentration de 0,05 $g.L^{-1}$ pendant 24h. La réaction est arrêtée par chauffage pendant 5 minutes à 95°C. Le milieu réactionnel est supplémenté de

100 g.L^{-1} de Glucidex 19D et la seconde enzyme est alors mise en réaction à la même concentration de 0,05 g.L^{-1}. La réaction est de nouveau stoppée par chauffage pendant 5 minutes à 95°C après 24 h d'incubation.

[0098] Ces différentes stratégies permettent de mettre à profit la spécificité α-4,3 glucanotransférase de l'α-GT n°11 et favorisent son action par rapport à celle de l'α-GT n°19. En effet, un taux de liaisons α-1,3 non négligeable peut être atteint en sus du taux de liaisons α-1,6 (Tableau 4).

[0099] Les inventeurs ont observé que des taux de liaisons α-1,4 inférieurs ou égaux à 50 % sont obtenus dans ces conditions et que les trois types de liaisons osidiques (α-1,6 ; α-1,3 et α-1,4) sont représentés dans le produit final

[0100] Les résultats des différentes réactions enzymatiques sont présentés dans le Tableau 4 ci-dessous, qui présente les pourcentages de liaisons α-1,6 ; α-1,3 et α-1,4 mesurés par RMN du proton ou par la méthode Hakomori et % d'hydrolyse (AOAC 2002.02) dans les produits de réaction obtenus.

[0101] [Tableau 4]

		RMN				HAKOMORI				
Enzyme	Concentration g/l	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	α-1,2	α-1,3	α-1,4	α-1,6	%hydrolyse (AOAC 2002.02)
GT#11 puis GT#19	100+100	0%	16%	50%	35%	2%	7%	62%	29%	39%
GT#19 puis GT#11	100+100	0%	13%	44%	43%	3%	5%	55%	36%	39%
GT#11 puis GT#19	200	0%	18%	51%	32%	2%	8%	64%	26%	36%
GT#19 puis GT#11	200	0%	14%	42%	44%	2%	5%	57%	36%	37%

[0102] Ainsi, les inventeurs ont mis en évidence que l'utilisation séquentielle des deux enzymes, quel que soit l'ordre de cette séquence, et avec ou sans ajout de substrat entre les deux réactions, permettait d'obtenir des produits présentant une hydrolyse inférieure à 40%. En d'autres termes, l'utilisation séquentielle des α-

glucanotransférase GT#11 et GT#19 a permis d'obtenir des fibres solubles à partir d'un mélange d'oligosaccharides et de polysaccharides présentant un DE de 19.

[0103] Exemple 5. : utilisation séquentielle des enzymes GT#11 et GT#19 à grande échelle

[0104] Dans cet exemple, les inventeurs ont réalisé une augmentation d'échelle afin de produite 1 g de fibres au lieu des 50mg produits dans les exemples précédents) : 15 ml de Glucidex 19D à 200 g.L-1 ont subi une réaction en cascade mettant en jeu en premier temps l'α-GT n°11 pendant 24 heures suivi de l'α-GT n°19 pendant 24 heures. Chaque enzyme a été utilisée à 0,1 g.L-1. La même répartition en type de liaisons est obtenue par rapport à l'essai équivalent en plus petit volume de l'exemple 4 (Tableau 5):

[0105] [Tableau 5]

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

Revendications

[Revendication 1] Procédé de préparation d'un mélange d'α-glucanes comprenant les étapes suivantes :

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

lesdites première et deuxième enzymes étant une α-glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques α(1-4) et de créer des liaisons glucosidiques α(1-3) et 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 substrat comprend :

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

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

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

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

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

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

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

[Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'α-glucanotransférase capable 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 9] 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(1-3) est la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2.

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

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

[Revendication 12] Mélange d'α-glucanes susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

[Revendication 13] Mélange d'α-glucanes caractérisé en ce qu'il présente :
- un taux de fibres hydrolysables inférieur à 45%, en poids par rapport au poids total de matière sèche,
- et/ou au moins 20% de liaisons α(1-6),
et/ou au moins 3% de liaisons α(1-3),
dans lequel le taux de fibres correspond à la fraction hydrolysable (c'est-à-dire non résistante) selon la méthode AOAC 2002.02 et le pourcentage de liaisons α(1-6) et α(1-3) représente le pourcentage molaire de liaisons α(1-6) et α(1-3) respectivement par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques, mesuré par la méthode Hakomori.

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

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