



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 434**

51 Int. Cl.:

C08B 30/12 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

A23L 1/09 (2006.01)

A23L 1/0522 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04790873 .6**

96 Fecha de presentación : **21.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1682585**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Uso de poli-alfa-1,4-glucanos lineales como almidón resistente.**

30 Prioridad: **24.10.2003 EP 03090366**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.02.2010

73 Titular/es: **Bayer CropScience AG.**
Alfred-Nobel-Strasse 50
40789 Monheim, DE

72 Inventor/es: **Frohberg, Claus y**
Quanz, Martin

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Uso de poli-alfa-1,4-glucanos lineales como almidón resistente.

La presente invención se refiere al uso de alfa-1,4-glucanos lineales como almidón resistente (RS), así como a un procedimiento para la preparación de almidón resistente.

Las estructuras de almidón fundamentalmente resistentes a la alfa-amilasa se conocen como “almidón resistente” (RS). Los RSs no son degradados por las alfa-amilasas. Debido a su susceptibilidad metabólica reducida los almidones resistentes representan un componente de producción en bruto con baja energía en el sentido de ser un lastre en productos alimenticios o en composiciones de productos alimenticios.

El uso de almidón resistente (RS) se está volviendo cada vez más importante en la industria de productos alimenticios. El cuerpo obtiene energía, sólo en una pequeña parte, de la degradación de los productos que contienen RS. Este suministro de energía afecta solamente a la degradación oxidativa de los ácidos grasos de cadena corta reabsorbidos en el colon. Estos ácidos grasos de cadena corta son los productos finales del metabolismo de los carbohidratos de la microflora intestinal. Con el consumo de productos alimenticios que contienen RS, están disponibles los sustratos para el metabolismo energético de la microflora intestinal y de las células epiteliales del colon. Estas últimas dependen del suministro luminal de ácidos grasos de cadena corta, especialmente butirato, para el mantenimiento de su estructura y su función.

Niveles de butirato luminal elevados en el colon representan un factor protector frente a enfermedades colorrectales.

El almidón resistente se divide en los siguientes tipos:

- RS tipo 1 Almidón no accesible físicamente por digestión, por ejemplo, células de planta parcialmente molidas (por ejemplo, en el muesli).
- RS tipo 2 Almidón granular no digerible (granos de almidón), por ejemplo, de patatas crudas, bananas verdes, etc.
- RS tipo 3 Almidón retrogradado no digerible que se obtiene, por ejemplo, por tratamiento térmico y/o enzimático y a continuación se retrograda.
- RS tipo 4 Almidón no digerible químicamente modificado que se forma, por ejemplo, por entrecruzamiento o esterificación (acetilación, etc.).

La característica del RS tipo 3 es la de que es un almidón resistente que se forma por retrogradación. Durante la retrogradación (también: recristalización) de almidones gelatinizados se forman estructuras microcristalinas que no son susceptibles a la hidrólisis enzimática por las alfa-amilasas.

Se sabe por el documento de EE.UU. 3.729.380 que la fracción de amilopectina muy ramificada se puede reducir por tratamiento enzimático con enzimas de desramificación y ese almidón desramificado posee una mayor tendencia a la retrogradación que el almidón nativo.

El documento EP-A1-0 564 893 describe un procedimiento para la preparación de un producto que contienen RS en el que está gelatinizada una suspensión acuosa al 15% de un almidón que consta de un mínimo del 40% de amilosa, tratado con una enzima desramificante, y el compuesto intermedio resultante producido a continuación se retrograda. El producto contiene al menos el 15% de RS. Si en este procedimiento se usa un almidón con una fracción en amilosa del 100%, el producto contiene el 50% de RS aproximadamente.

El documento EP-A1-0 688 872 describe un procedimiento para la preparación de un producto que contienen RS del 25 al 50% a partir de una suspensión acuosa al 20% aproximadamente de un almidón gelatinizado denominado “parcialmente degradado” o maltodextrina que está enzimáticamente desramificada o retrogradada. En el procedimiento se usa como material de partida un almidón con una fracción de amilosa inferior al 40%.

En el documento EP-A1-0 688 872 un almidón definido como “parcialmente degradado” es un almidón en el que se ha reducido su peso molecular mediante un tratamiento físico o químico adecuado, por el que el acortamiento de la longitud de la cadena afecta tanto a la amilosa como a la amilopectina. El acortamiento la longitud de la cadena se puede llevar a cabo tanto por procedimientos hidrolíticos (ácidos o enzimáticamente catalizados), como por extrusión, oxidación o pirólisis. El producto obtenido mediante retrogradación del producto degradado se seca mediante secado por pulverización. El producto pulverizado contiene una fracción de RS superior al 50% de RS.

En el documento EP-A-0846704 se describe un almidón retrogradado que tiene un contenido en RS superior al 55% y una temperatura de fusión por DSC inferior a 115°C.

La solicitud de patente internacional WO 00/02926-A1 describe un procedimiento para la preparación de polisacáridos resistentes a alfa-amilasas en los que poli-alfa-1,4-glucanos insolubles en agua se suspenden o se dispersan

en agua, la suspensión o dispersión obtenida se calienta, la pasta así obtenida se enfría y la pasta se retrograda a una temperatura que es inferior a la temperatura de la pasta calentada. De esta forma se obtienen productos de RS con un contenido en RS superior al 65%.

- 5 Schmiedl y col. (Carbohydrate Polymers 43, (2000), 183-193) describen en profundidad la acción butirogénica de almidones resistentes de tipo 3 (denominados “almidón resistente de tipo III” en la publicación de Schmiedl y col.) que se preparan a partir de alfa-1,4-glucanos.

10 La descripción de la solicitud de patente internacional WO 00/38537-A1 se cimenta sobre el documento WO 00/02926-A1. El documento WO 00/38537-A1 describe composiciones que contienen, entre otros, un almidón resistente que se produce como se describe en la descripción del documento WO 00/02926-A1. El documento WO 00/38537-A1 describe que la formación del almidón resistente usado en las composiciones se lleva a cabo por retrogradación de los alfa-1,4-D-glucanos lineales “no resistentes” insolubles en agua y que los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales “no resistentes” insolubles en agua producen almidones resistentes únicamente después en la retrogradación.

15 En resumen, se puede ver que el estado de la técnica para la preparación de almidones resistentes no granulares no modificados químicamente enseña que las estructuras de almidón resistente se forman cuando los polisacáridos se someten a un proceso de retrogradación adicional que normalmente requiere mucho tiempo y es muy costoso.

20 Los documentos US 2003094172 (A1) y WO 01/42309 se refieren a un procedimiento para incrementar el contenido en almidón (contenido en RS) resistente a la alfa-amilasa de un polisacárido en el que el polisacárido usado se incubaba, en déficit de agua, a continuación se enfría, y si es apropiado se seca y se obtiene un polisacárido que tiene un contenido en RS incrementado comparado con el polisacárido usado. El contenido en almidón resistente del material de partida no retrogradado es del 57,3-65%.

25 El objetivo de la presente invención es hacer disponible de formas rentables polisacáridos que se puedan usar como almidones resistentes.

El objetivo se resuelve con la provisión de las formas de realización descritas en las reivindicaciones de la patente.

30 Así, la presente invención se refiere al uso de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales como almidón resistente (RS), caracterizados porque

35 los poli-alfa-1,4-D-glucanos no están retrogradados, y presentan un contenido en RS determinado por el método de Englyst y col. superior al 70% en peso,

40 en los que los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua se pueden obtener con la reacción de una disolución acuosa de sacarosa con un extracto de proteína en bruto de la cepa KV832 de la bacteria *E. coli* que expresa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea*.

Sorprendentemente se encontró que alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua como los caracterizados anteriormente también se pueden usar como almidones resistentes sin una o más etapas de retrogradación adicionales.

45 La solicitud de patente internacional WO-00/38537-A1 enseña que un almidón resistente que se puede obtener a partir de un poli-alfa-1,4-D-glucano lineal insoluble en agua únicamente se puede obtener mediante la retrogradación de los alfa-1,4-D-glucanos lineales “no resistentes” insolubles en agua.

50 La presente invención hace disponibles de una manera rentable almidones resistentes cuya preparación no requiere mucho tiempo ni una etapa de retrogradación costosa. La omisión de la etapa de retrogradación representa una ventaja significativa opuesta al procedimiento para la preparación de almidones resistentes descritos en el documento WO 00/02926-A1 en el que, debido a su insolubilidad en agua, los poli-alfa-1,4-D-glucanos primero se deben solubilizar a altas temperaturas y/o presiones elevadas antes de que se puedan someter a la retrogradación posterior. El uso de temperaturas y/o presiones elevadas es un proceso muy energético, y así muy costoso.

55 En relación con la presente invención, el término “almidón resistente” o “RS” se entiende que es un polisacárido que consta de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua y que no es susceptible a la degradación por alfa-amilasas. El “almidón resistente” a usar de acuerdo con la invención no es un almidón granular (RS de tipo 2), ni un almidón retrogradado (RS de tipo 3) ni un almidón químicamente modificado (RS de tipo 4), y así representa un nuevo tipo de almidón resistente que, en consecuencia, en lo sucesivo se denominará RS de tipo 5.

60 En una forma de realización adicional del uso según la invención los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua se preparan enzimáticamente.

65 En relación con la presente invención, el término “insoluble en agua” se entiende que son poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales que, según la definición del Deutsches Arzneimittelbuch (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Gori-Verlag GmbH, Frankfurt, 9. Edition (1987)) entran dentro de la categoría de “menos solubles”, “poco solubles”, “muy poco solubles” y “prácticamente insolubles”, con respecto a las clases 4-7.

ES 2 333 434 T3

La insolubilidad en agua de los poli-alfa-1,4-D-glucanos usado según la invención preferentemente es tal que al menos el 98%, en particular al menos el 99,5% de los polisacáridos usados son insolubles en agua en condiciones normales (temperatura = 25°C ± 20%; presión = 101.325 Pascal ± 20%) (que corresponde al menos las clases 4 y 5 de la definición del Deutsches Arzneimittelbuch).

Los procedimientos para la determinación de la solubilidad de los poli-alfa-1,4-D-glucanos son conocidos por la persona experta en la materia.

En relación con la presente invención, se entiende que el término “lineal” es un poli-alfa-1,4-D-glucano que no presenta ramificación o cuya ramificación es tan escasa que no es detectable con procedimientos normales tales como espectroscopia de RMN ¹³C.

En relación con la presente invención, se entiende que una “disolución acuosa de sacarosa” es una disolución acuosa que puede estar exenta de sales tamponantes, pero preferentemente contiene sales tamponantes, con una concentración de sacarosa en el intervalo comprendido entre el 0,5% en peso y el 80% en peso, preferentemente en el intervalo entre el 5% en peso y el 60% en peso, más preferido en un intervalo entre el 10% en peso y el 50% en peso, especialmente preferido en un intervalo entre el 20% en peso y el 30% en peso.

En relación con la presente invención, se entiende que una “enzima con la actividad de una amilosacarasa” es una enzima que cataliza las siguientes relaciones:

1. Sacarosa + sacarosa ↔ oligo-(alfa-1,4-glucano)_n + fructosa

2. Oligo-(alfa-1,4-glucano)_n + sacarosa ↔ poli-(alfa-1,4-glucano)_{n+1} + fructosa

Partiendo de este esquema de reacción los alfa-1,4-glucanos lineales oligoméricos o poliméricos pueden servir como aceptores para una reacción de alargamiento de la cadena que da lugar a poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua a usar según la invención, cuyos residuos glucosa están conectados mediante enlaces alfa-1,4-glicosídicos y presentan un peso molecular medio en el intervalo de 0,75 x 10² g/mol a 10⁷ g/mol, preferentemente entre 1 x 10² g/mol y 10⁵ g/mol, y más preferentemente entre 1 x 10³ g/mol y 3 x 10⁴ g/mol, lo más preferentemente entre 2 x 10³ g/mol y 1,2 x 10⁴ g/mol.

Estos aceptores alfa-1,4-glucano oligoméricos o poliméricos se pueden añadir externamente, sin embargo, preferentemente se producen a partir de sacarosa por la propia amilosacarasa como se describe en el ejemplo 1.

La ramificación, por ejemplo los enlaces alfa-1,6-glicosídicos, no es detectable por RMN ¹³C (Rемаud-Simeon y col. en “Carbohydrate Bioengineering” (ed. S. B. Petersen y col.), Elsevier Science B.V. (1995), 313-320) en estos productos que se obtuvieron mediante la reacción de una disolución acuosa de sacarosa con una enzima con la actividad enzimática de la amilosacarasa.

En relación con la presente invención en principio se puede usar cualquier amilosacarasa opcional. Las proteínas con la actividad enzimática de una amilosacarasa son conocidas por la persona experta en la materia. Preferentemente, las amilosacarastas a usar según la invención se originan a partir de microorganismos, preferentemente a partir del género *Neisseria*, más preferentemente la amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea*.

La patente de EE.UU. 6265635-B1, la solicitud de patente internacional WO 00/14249-A1 y Potocki de Montalk y col. (Journal of Bacteriology 181 (2), (1999), 375-381) describen, por ejemplo, secuencias de ADN que codifican una proteína amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea* que es preferida en relación con la presente invención. Además, se ha descrito la presencia de proteínas con actividad amilosacarasa para una serie de especies de *Neisseria* adicionales, por ejemplo, para *Neisseria perflava* (Okada y Hehre, J. Biol. Chem. 249 (1974), 126-135), MacKenzie y col., Can J. Microbiol. 23, (1977), 1303-1307), *Neisseria canis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria denitrificans*, *Neisseria sicca*, *Neisseria subflava* (MacKenzie y col., Can. J. Microbiol. 24, (1978), 357-362).

Se describe una secuencia de ADN que codifica para una proteína amilosacarasa de *Caulobacter crescentus* CB 15 en la Secuencia completa del genoma de *Caulobacter crescentus*. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4136-4141, la información del ADN y de la proteína están disponibles en el banco de datos del EMBL (<http://srs.ebi.ac.uk>) con el ID N° AE005791 y Protein_id AAK23119.1.

También se conoce una amilosacarasa de la cepa 93246 de *Neisseria meningitidis* cuyo ADN y la secuencia de aminoácidos está disponible con la ID AY099334 y Protein_id AAM51152.1 del banco datos del EMBL.

Además, se conoce una secuencia de ADN de *Deinococcus radiodurans* R1 (número de acceso del banco de genes del NCBI NP_294657, conocida como alfa-amilasa) que codifica para una proteína con la actividad enzimática de una amilosacarasa.

Con la ayuda de este ADN y la información de la secuencia de aminoácidos de las amilosacarastas, preferentemente con la ayuda de la información de la secuencia descrita en el documento WO 00/14249-A1 ahora es posible para la persona experta aislar secuencias homólogas de otros organismos, preferentemente microorganismos. Esto se

puede llevar a cabo, por ejemplo, con la ayuda de procedimientos convencionales, por ejemplo, seleccionando bancos genómicos con sondas de hibridación adecuadas. La persona experta sabe que el aislamiento de secuencias homólogas también se puede llevar a cabo con la ayuda de oligonucleótidos (degenerados) y con el uso de procedimientos basados en la PCR.

5

La selección de bancos de datos tales como los que hay disponibles, por ejemplo, en el EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index/htm>) o el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), también puede servir para identificar secuencias homólogas que codifican para una proteína con la actividad enzimática de una amilosacarasa. Aquí, una o más secuencias se preajustan a la denominada secuencia de consulta. A continuación, esta secuencia de consulta se compara con secuencias que están contenidas en los bancos de datos seleccionados por medio de programas estadísticos de ordenador. Esas consultas a los bancos de datos (por ejemplo, búsquedas en blast o fasta) son conocidas por la persona experta y se pueden llevar a cabo con diferentes proveedores. Si esa consulta al banco de datos se lleva a cabo, por ejemplo, en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se deben usar los ajustes normales que están preajustados para la respectiva comparación de la secuencia de consulta. Estos son los ajustes para las comparaciones de secuencias de proteínas (blastp): límite de entrada = no activado; filtro = baja complejidad activada; valor esperado = 10; tamaño de la palabra = 3; matriz = BLOSUM62; costes de los huecos: existencia = 11, extensión = 1.

Los siguientes parámetros son para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos (blastn): límite de entrada: no activado; filtro = baja complejidad activada; valor esperado = 10; tamaño de la palabra = 11.

En esa búsqueda en el banco de datos de la información del ADN y de la secuencia de aminoácidos de las amilosacarases, se puede usar la información de la secuencia descrita en el documento WO 00/14249-A1, por ejemplo, como secuencia de consulta para identificar moléculas de ácidos nucleicos y/o proteínas adicionales que codifican una proteína con la actividad enzimática de una amilosacarasa.

La actividad enzimática de una proteína con actividad amilosacarasa se puede detectar muy fácilmente con la expresión del gen de la amilosacarasa en *E. coli* y la posterior tinción de azul de las células de *E. coli* con yodo como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6 de la solicitud de patente internacional WO 95/31553-A1.

30

La conversión de la disolución acuosa de sacarosa se lleva a cabo *in vitro*.

Las solicitudes internacionales WO 99/67412-A1 (ejemplo 3) (correspondientes a la solicitud de EE.UU. US 20020052029-A1), WO 00/38537-A1 (ejemplo 1) y de Montalk y col. (FEBS letters 471, (2000), 219-223) describen, por ejemplo, procedimientos para la preparación *in vitro* de poli-alfa-1,4-D-glucanos por medio de amilosacarasa. Aquí se hace referencia explícita a la descripción de estos documentos. Además, en el ejemplo 1 de la presente solicitud de patente se describe un procedimiento *in vitro* para la preparación de poli-alfa-1,4-D-glucanos.

En una forma de realización adicional de la presente invención la preparación *in vitro* de poli-alfa-1,4-D-glucanos con amilosacarasa tiene lugar en presencia de aceptores de un grupo glucosilo lineal externo. Dentro del contexto de la presente invención, se entiende que el término “aceptor de un grupo glucosilo lineal externo” es un oligo- o polisacárido lineal, por ejemplo, maltopentosa, maltohexosa, maltoheptosa, que se añade externamente al sistema *in vitro* y está en posición de incrementar la velocidad de conversión inicial de la sacarosa por parte de la amilosacarasa.

45

En una forma de realización adicional particularmente preferida de la presente invención, la preparación *in vitro* de poli-alfa-1,4-D-glucanos por medio de amilosacarasa tiene lugar en ausencia de aceptores de un grupo glucosilo ramificado externo. Dentro del contexto de la presente invención, se entiende que el término “aceptor de un grupo glucosilo ramificado externo” es una molécula de carbohidratos ramificada tal como glucógeno o amilopectina que se añade externamente al sistema *in vitro* o ya está presente en la mezcla de reacción, por ejemplo, como componente del extracto enzimático de amilosacarasa y que está en posición de incrementar la velocidad de conversión inicial de la sacarosa por parte de la amilosacarasa.

Los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua que presentan las propiedades descritas en el presente documento (insolubles en agua, sin ramificación, con un peso molecular entre 10^2 g/mol y 10^7 g/mol) pero preparados mediante un procedimiento diferente también pueden ser materiales de partida del uso según la invención.

Los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua presentan un contenido en RS determinado según el método de Englyst y col. (European Journal of Clinical Nutrition 46, (Supp.23), (1992), S33-S50) superior al 70% en peso. En relación con la presente invención, el método de Englyst y col. usado preferentemente para determinar el contenido en RS se describe en el ejemplo 1.

En una forma de realización adicional de la presente invención, los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua a usar según la invención presentan un contenido en RS determinado mediante el método de Englyst y col. superior al 75% en peso, preferentemente superior al 80% en peso, más preferentemente superior al 85% en peso.

Los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua a usar según la invención presentan un alto contenido en RS. Esto es completamente sorprendente para la persona experta puesto que en base al contenido de la descripción del documento WO 00/38537-A1 tendría que asumir que los poli-alfa-1,4-D-glucanos a usar según la invención formarían estructuras “no resistentes”, esto es, estructuras que serían susceptibles a la degradación por alfa-amilasas.

Ahora sorprendentemente se ha encontrado que, al contrario de lo que se afirma en la descripción del documento WO 00/38537-A1, los poli-alfa-1,4-D-glucanos a usar según la reivindicación 1 de la invención de presentan un contenido en RS superior al 70% en peso, preferentemente superior al 80% en peso, más preferentemente superior al 85% en peso sin que haya que someterlos a una etapa de retrogradación adicional.

En relación con la presente invención “retrogradación” (también: recristalización) se entiende que significa un procedimiento que consta de al menos una etapa de calentamiento y al menos una etapa de enfriamiento de una suspensión de polisacáridos o una dispersión de polisacáridos. Durante la etapa de calentamiento, la suspensión de polisacáridos o la dispersión de polisacáridos gelatiniza, durante la fase de enfriamiento se forman estructuras microcristalinas que no son susceptibles a la hidrólisis enzimática por las alfa-amilasas.

Además, se encontró que los poli-alfa-1,4-D-glucanos a usar según la invención promueven la formación de ácidos grasos de cadena corta, particularmente butirato, en el colon y así, son adecuados para su uso como suplementos nutricionales para la prevención de enfermedades colorrectales.

En una forma de realización adicional del uso según la invención los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua presentan una temperatura máxima por DSC de entre 95°C y 125°C, preferentemente entre 100°C y 120°C, más preferentemente entre 105°C y 116°C.

El procedimiento de “calorimetría de barrido diferencial” (DSC) también es conocido por la persona experta en la materia. Los resultados de las mediciones de la DSC se usan para la caracterización de la estabilidad térmica de los productos de RS. El procedimiento de DSC usado preferentemente en relación con la presente invención se describe en el ejemplo 3 de la presente solicitud de patente.

Los máximos endotérmicos de las mediciones de la DSC se caracterizan con mayor precisión mediante diversos parámetros (T_0 , T_p , T_c y dH). La temperatura de inicio T_0 caracteriza el comienzo de la transformación térmica. Al valor de la T_p (T_p = temperatura máxima de la DSC) se lee la temperatura a la cual tiene lugar la máxima transformación térmica del material cristalino, mientras que T_c representa la temperatura a la cual concluye el proceso de transformación (temperatura final).

La energía de transformación dH (entalpía de transformación) se determina calculando el área del pico. Representa la energía total que es necesaria para la transformación.

En una forma de realización adicional del uso según la invención, los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua presentan una energía por DSC de transformación de fase dH de 10 J/g - 30 J/g, preferentemente de 11 J/g - 25 J/g y más preferentemente de 20 J/g - 24 J/g.

En una forma de realización preferida adicional del uso según la invención los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua no están modificados.

En relación con la presente invención, el término “no modificado” significa que los poli-alfa-1,4-D-glucanos a usar según la invención se producen enzimáticamente, preferentemente por conversión de una disolución acuosa de sacarosa por una amilosa, y después de la preparación enzimática y el aislamiento de los poli-alfa-1,4-D-glucanos, posteriormente no se modifican químicamente y/o físicamente.

Este procedimiento ofrece la ventaja de que se omiten las etapas de retrogradación intensivas en costes y el tiempo, a diferencia de los procedimientos para la preparación de almidones resistentes, en particular, RS de tipo 3, descrito en el estado de la técnica.

En una forma de realización adicional la invención se refiere al uso de poli-alfa-1,4-D-glucanos insolubles en agua ligeramente ramificados como almidón resistente.

En relación con la presente invención, se entiende que el término “ligeramente ramificados” es un grado de ramificación inferior al 1%, preferentemente inferior al 0,5% y más preferentemente inferior al 0,25%.

La determinación del grado de ramificación se lleva a cabo por medio de espectroscopia de RMN ^{13}C .

La ramificación se puede producir en las posiciones 2 y 3, preferentemente en la posición 6. Puede aparecer por modificación química, por ejemplo, por formación de éter o esterificación o por modificación enzimática, por ejemplo, con una enzima ramificante.

Los poli-alfa-1,4-D-glucanos insolubles en agua ligeramente ramificados preferentemente no están modificados.

En una forma de realización adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un almidón resistente que engloba las siguientes etapas del proceso:

- a) preparación de una disolución acuosa de sacarosa;
- b) conversión de la disolución acuosa de sacarosa con un extracto de proteína en bruto de la cepa KV832 de la bacteria *E. coli* que expresa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea* en poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua; y opcionalmente
- c) el aislamiento de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua.

La preparación de una disolución acuosa de sacarosa es conocida por la persona experta en la materia. Ya se han descrito disoluciones acuosas de sacarosa adecuadas en relación con el uso según la invención. La conversión según la etapa b) del procedimiento también se ha descrito anteriormente en relación con el uso según la invención. Los procedimientos también son conocidos por la persona experta, y cómo puede aislar los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua que son almidones resistentes RS de tipo 5. Las propiedades de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua a usar según la invención ya se han descrito anteriormente en relación con el uso según la invención.

En una forma de realización adicional de la presente invención los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua se pueden secar después del aislamiento. Por ejemplo, se pueden criodesecar, secar al aire o secar por pulverización.

En una forma de realización adicional, la presente invención se refiere al uso del procedimiento de la invención para la preparación de un almidón resistente.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención con mayor precisión sin que esté limitada a los ejemplos.

Procedimientos generales

1. Preparación de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua. La preparación de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua se describe, por ejemplo, en los documentos WO 00 44492, WO 00 02926, WO 00 38537, WO 99 67412 o WO 01 42309.

2. Purificación de amilosacarasa. Se describe un protocolo para la purificación de una proteína con la actividad enzimática de una amilosacarasa en el documento WO 99 67412.

3. Expresión de una proteína con la actividad enzimática de una amilosacarasa. La expresión de una proteína con la actividad enzimática de una amilosacarasa en células bacterianas se describe, entre otros, por Potocki de Montalk y col. (2000, FEMS Microbiology Letters 186, 103-10) y Potocki de Montalk y col. (1999, J. of Bacteriology 181, 375-381).

Ejemplo 1

Determinación del contenido en RS de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua

El contenido en RS de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua, preparados con la conversión de sacarosa por una proteína con la actividad enzimática de una amilosacarasa, se basó en el método de Englyst (European Journal of Clinical Nutrition (1992) 46 (suppl.2), p.33-50) para la determinación de almidones resistentes de tipo III. Al mismo tiempo, el método de Englyst se modificó en relación con la información sobre la determinación del contenido en RS en el documento WO 00 02926.

a) Tratamiento con pancreatina/amiloglucosidasa (AGS)

Tampón de digestión de pancreatina/amiloglucosidasa usado:

Acetato Na 0,1 M, pH 5,2

CaCl₂ 4 mM

Preparación de la disolución enzimática

Se agitaron 12 g de pancreatina (Merck, N° de Producto 1.07130.1000) en 80 ml de agua desmineralizada (conductividad 18 M ohm aproximadamente) durante 10 min a 37°C y a continuación se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm.

54 ml del sobrenadante obtenido después de la centrifugación se trataron con 9,86 ml de agua desmineralizada y 0,14 ml de amiloglucosidasa (6000 u/ml, Sigma, N° de Producto A-3042).

ES 2 333 434 T3

Procedimiento de digestión con pancreatina/amiloglucosidasa (AGS)

5 5 ensayos de la digestión con pancreatina/amiloglucosidasa (AGS) se prepararon cada vez para cada lote de poli-
alfa-1,4-D-glucano lineal insoluble en agua a medir. Posteriormente no se añadió disolución enzimática a 2 de estos
5 ensayos. Los ensayos a los que no se les añadió disolución enzimática se designan como referencia y se usan para
la determinación de la velocidad de recuperación. Los 3 ensayos restantes se designan como muestras, posteriormente
se tratan con disolución enzimática y se usan para la determinación del contenido en RS de los respectivos poli-
alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua. Una serie de matraces de reacción que no contienen poli-alfa-1,4-D-
glucanos lineales insolubles en agua se procesaron en paralelo (muestras de blanco). Estas muestras de blanco que no
10 contienen poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua se usan para la determinación de la cantidad de material
coprecipitado (proteína, sales).

Se determinó el peso neto de 50 ml de matraces de reacción (tubos Falcon) y a continuación en cada caso se
añadieron 200 mg aproximadamente de poli-alfa-1,4-D-glucano lineal insoluble en agua.

15 Se añadieron 15 ml de tampón de acetato sódico a cada una de las muestras de poli-alfa-1,4-D-glucano lineal
insoluble en agua y las muestras de blanco, y 200 ml de tampón de acetato sódico a cada una de las referencias (véase
más arriba). Estas muestras se precalentaron a 37°C.

20 La reacción se inició con la adición de 5 ml de disolución enzimática a cada uno de los matraces de reacción
individuales de las muestras y de las muestras de blanco que a continuación, se agitaron durante 2 horas a 37°C (200
rpm).

La reacción se inactivó con la adición de 5 ml de ácido acético glacial (equilibrado a pH 3,0) y 80 ml de etanol
25 técnico a las muestras, a las muestras de blanco y a las referencias.

La precipitación del poli-alfa-1,4-D-glucano lineal insoluble en agua a partir de la mezcla de reacción se consiguió
con la incubación del ensayo de reacción inactivado a temperatura ambiente durante 1 hora.

30 Después de la sedimentación (centrifugación durante 10 minutos a 2500 x g), el sedimento de los ensayos indivi-
duales obtenidos se lavó dos veces con etanol al 80% para eliminar los glucanos de cadena corta y a continuación se
criodeseccó después de enfriar a -70°C.

Las muestras se volvieron a pesar y las diferencias de peso se usaron para el cálculo del contenido en RS “gravi-
35 métrico”.

b) Determinación del contenido en RS

40 Se usó el siguiente procedimiento para la determinación del contenido en RS de lotes individuales de poli-alfa-1,4-
D-glucanos lineales insolubles en agua:

- a) Determinación del contenido en agua de lotes de muestra individuales de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales
(peso de H₂O).
- 45 b) Determinación del peso neto de los matraces de reacción individuales para las respectivas muestras (peso de
RGP), referencias (peso de RGR) y las muestras de blanco (peso de RGB).
- c) Pesaje de 200 mg aproximadamente de poli-alfa-1,4-D-glucano lineal insoluble en agua en los matraces de
50 reacción individuales para las muestras (peso de P) y las referencias (peso de R).
- d) Cálculo de la fracción seca de los pesos para las muestras (peso de P_{tr} = peso de P - peso de H₂O) y las
referencias (peso de R_{tr} = peso de P - peso de H₂O).
- 55 e) Digestión enzimática de las respectivas muestras y muestras de blanco. Las referencias se trataron de la
misma manera pero sin la adición de la disolución enzimática.
- f) Precipitación, sedimentación, lavado y criodeseccado de las sustancias que permanecen en los matraces de
reacción de las muestras, referencias y muestras de blanco después del tratamiento descrito en e).
- 60 g) Pesaje de las sustancias que permanecen en los matraces de reacción de las muestras (peso de PRG), referen-
cias (peso de RRG) y las muestras de blanco (peso de BRG), incluyendo el matraz de reacción después del
tratamiento descrito en f).
- 65 h) Cálculo del peso de las sustancias que permanecen en los matraces de reacción de
las muestras (peso de P_{nv} = peso de PRG - peso de RGP),

ES 2 333 434 T3

referencias (peso de Rnv = peso de RRG - peso de RGR)

las muestras de blanco (peso de Bnv = peso de BRG - peso de RGB)

después del tratamiento descrito en f).

i) Determinación del contenido en agua de las sustancias que permanecen en los matraces de reacción de las muestras (peso de H_2OPnv),

referencias (peso de H_2ORnv)

las muestras de blanco (peso de H_2OBnv)

j) Cálculo de la fracción seca de las sustancias que permanecen en los matraces de reacción de las muestras (peso de Pnv_{tr} = peso de Pnv - peso de H_2OPnv)

referencias (peso de Rnv_{tr} = peso de Rnv - peso de H_2ORnv)

y las muestras de blanco (peso de Bnv_{tr} = peso de Bnv - H_2OBnv)

después del tratamiento descrito en f).

k) Determinación de los pesos corregidos de las muestras (peso de Pnv_{kor} = peso de Pnv_{tr} - peso de Bnv_{tr})

y las referencias (peso de Rnv_{kor} = peso de Rnv_{tr} - peso de Bnv_{tr})

l) Cálculo del porcentaje de la fracción de los pesos corregidos de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua que permanecen después de la digestión enzimática en relación al peso seco de la cantidad de partida de las

muestras ($RSaP$ = peso de Pnv_{kor} /peso de P_{tr} 100)

y cálculo del porcentaje de la fracción de los pesos corregidos de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua restantes de las referencias en relación al peso seco de las cantidades de partida de las referencias ($RSaR$ = peso de Rnv_{kor} /peso de R_{tr} x 100).

m) Determinación del valor medio del porcentaje de las fracciones de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua restantes después de la digestión enzimática de las muestras ($RSaPMW$ = $n \times RSaP/n$)

y determinación de los valores medios del porcentaje de las fracciones de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua restantes de las referencias: (velocidad de recuperación; $RSaRMW$ = $n \times RSaR/n$)

en las que n es el número de muestra y los ensayos de referencia llevados a cabo para los respectivos lotes de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua.

n) Determinación del contenido en RS en porcentaje de los lotes individuales de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua por corrección de los valores medios de las fracciones en porcentaje de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua restantes después de la digestión enzimática con la velocidad de recuperación (RS = $RSaPMW/RSaRMW \times 100$).

c) Contenido en RS de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua

Se determinó el contenido en RS de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua, preparados con la conversión de sacarosa por una proteína con la actividad enzimática de una amilosacarasa según el procedimiento descrito en el ejemplo 2b). Si se usa un extracto de proteína en bruto procedente de la cepa DH5 α de la bacteria *E. coli* que expresa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea* (Potocki de Montalk y col., 1999, J. of Bacteriology 181, 375 -381) para la preparación del poli-alfa-1,4-D-glucano lineal insoluble en agua, el contenido en RS del poli-alfa-1,4-D-glucano lineal insoluble en agua es del 75% $\pm$ 2%.

Si se usa un extracto de proteína en bruto de la cepa KV832 de la bacteria *E. coli* (Kiel y col., 1987, Mol. Gen. Genet. 207: 294-301) que expresa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea* (Potocki de Montalk y col., 1999, J. of Bacteriology 181, 375 -381) para la preparación del poli-alfa-1,4-D-glucano lineal insoluble en agua, el contenido en RS del poli-alfa-1,4-D-glucano lineal insoluble en agua es del 91% $\pm$ 2%

ES 2 333 434 T3

Ejemplo 2

Determinación del peso molecular de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua

5 Se determinó el peso molecular de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua con la conversión de sacarosa por una proteína con la actividad enzimática de una amilosacarasa mediante cromatografía de exclusión molecular (GPC).

10 a) *Preparación de las muestras para llevar a cabo la GPC*

1. Preparación de una disolución al 1% del poli-alfa-1,4-D-glucano lineal insoluble en agua en DMSO + NaNO₃ 90 mM (que corresponde al eluyente usado en el análisis de GPC).
- 15 2. Agitación durante 30 minutos aproximadamente a 60°C para disolver.
3. Centrifugación durante 1 minuto a 8000 rpm en una centrífuga de sobremesa.
- 20 4. Dilución 1:10 en el eluyente.
5. Inyección de 24 µl de dilución 1:10.

25 b) *Análisis por GPC*

Componentes del sistema GPC usado:

Bomba: Dionex, P580

30 Muestreador automático: Dionex, AS50

Columnas: PSS (pre-columna: PSS GRAM, 10 µ; columnas de separación: PSS GRAM 3000, 10 µ y PSS GRAM 100, 10 µ)

35 Horno de columna: Dionex, modelo 585

Detección: Shodex R171

40 *El análisis por GPC se llevó a cabo en las siguientes condiciones:*

Muestreador automático y horno de columna a 60°C

Eluyente: DMSO + NaNO₃ 90 mM

45 Velocidad de flujo del eluyente: 0,7 ml/min

El control se llevó a cabo con el software Chromeleon (Dionex) y la evaluación de los datos con la ayuda del software PSS WinGPC compact V.6.20.

50 c) *Pesos moleculares de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua*

Los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua presentaban un peso molecular de 1500 a 55.000 Dalton. El pico máximo cae a 9000 Dalton.

55

Ejemplo 3

60 *Determinación de la estabilidad térmica de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua por medio de análisis por DSC*

La estabilidad térmica de los productos de RS se determinó con la ayuda del Pyris Diamond DSC de Perkin Elmer. Se pesó cada vez 10 mg de productos de RS en una cápsula de medida (plato de acero Perkin Elmer N° de producto 03190029), se trataron con 30 µl de agua desionizada (Millipore) y la cápsula de medida se selló según las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se midieron en las siguientes 12 horas. Una cápsula de medida vacía sirvió como referencia. La calibración se llevó a cabo con un patrón de indio. La medición de la DSC se llevó a cabo sobre un intervalo de temperaturas de 20-150°C a una velocidad de calentamiento de 10°C por minuto. La determinación de

ES 2 333 434 T3

la T_0 , T_P y ΔH se llevó a cabo con el software Pyrus (vers. 5). Los datos para la ΔH se refieren a los pesos en seco de las muestras que se determinaron con una balanza calefactada. Cada muestra se midió dos veces con este procedimiento.

TABLA 1

Valores determinados por análisis de DSC para poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua

	Criodesecación de DH5 α de <i>E. coli</i>	Criodesecación de KV832 de <i>E. coli</i>	Secado al aire de KV832 de <i>E. coli</i>
T_0	78,3°C	98,7°C	92,7°C
T_P	101,3°C	112,3°C	114,2°C
ΔH	12,4 J/g	23 J/g	20 J/g

Los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua se prepararon con un extracto de proteína en bruto de la cepa DH5 α de la bacteria *E. coli* que expresa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea* (Potocki de Montalk y col., 1999, J. Bacteriology 181, 375-381) o con un extracto de proteína en bruto de la cepa KV832 de la bacteria *E. coli* (Kiel y col., 1987 Mol. Gen. Genet. 207: 294-301) que expresa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea* (Potocki de Montalk y col., 1999, J. Bacteriology 181, 375-381). Los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua obtenidos se criodesecaron o se secaron al aire.

REIVINDICACIONES

1. Uso de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua como almidón resistente (RS), **caracterizado** por-
que los poli-alfa-1,4-D-glucanos no están retrogradados, y presentan un contenido en RS determinado por el método
de Englyst y col. superior al 70% en peso, en el que los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua se pueden
obtener haciendo reaccionar de una disolución acuosa de sacarosa con un extracto de proteína en bruto de la cepa
KV832 de la bacteria *E. coli* que expresa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una amilosacarasa de
Neisseria polysaccharea.
2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua
presentan un contenido en RS determinado por el método de Englyst y col. superior al 75% en peso.
3. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua
presentan un contenido en RS determinado por el método de Englyst y col. superior al 80% en peso.
4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** porque los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolu-
bles en agua presentan una temperatura máxima por DSC de entre 95°C y 125°C.
5. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado** porque los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolu-
bles en agua presentan una energía por DSC de transformación de fase dH de 20 J/g - 24 J/g.
6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** porque los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolu-
bles en agua presentan un peso molecular medio de 1×10^2 g/mol a 10^5 g/mol.
7. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** porque los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolu-
bles en agua presentan un peso molecular medio de 1×10^3 g/mol a 3×10^4 g/mol.
8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** porque los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolu-
bles en agua presentan un peso molecular medio de 2×10^3 g/mol a $1,2 \times 10^4$ g/mol.
9. Procedimiento para la preparación de poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua según las reivindica-
ciones 1-8 que engloba las siguientes etapas:
 - a) preparación de una disolución acuosa de sacarosa;
 - b) conversión de la disolución acuosa de sacarosa con un extracto de proteína en bruto de la cepa KV832 de
la bacteria *E. coli* que expresa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una amilosacarasa de
Neisseria polysaccharea en poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua; y opcionalmente
 - c) el aislamiento de los poli-alfa-1,4-D-glucanos lineales insolubles en agua.