

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 janvier 2024 (18.01.2024)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2024/013451 A1

(51) Classification internationale des brevets :

C12P 19/18 (2006.01) A23K 20/163 (2016.01)
C12N 9/10 (2006.01) A23L 29/30 (2016.01)
C13K 13/00 (2006.01)

MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2023/051068

(22) Date de dépôt international :

10 juillet 2023 (10.07.2023)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

FR2207071 11 juillet 2022 (11.07.2022) FR

(71) Déposant : **ROQUETTE FRERES** [FR/FR] ; 1 rue de la
Haute Loge, 62136 LESTREM (FR).

(72) Inventeurs : **LANOS, Pierre** ; 3 rue des Remparts, 59480
LA BASSEE (FR). **RAMETTE, Matthieu** ; 18 place
de l'ancien rivage - Appt 18, 62000 ARRAS (FR). **RE-
MAUD-SIMEON, Magali** ; 1 rue Benjamin Charrier,
31520 RAMONVILLE-SAINT-AGNE (FR). **MOULIS,
Claire** ; 216 rue de lazières, 31290 VIEILLEVIGNE
(FR). **PIZZUT-SERIN, Sandra** ; 485 chemin des bouta-
rics, 11400 MAS-SAINTES-PUELLES (FR). **SEVERAC,
Etienne** ; 13 avenue de Gascogne, 31820 PIBRAC (FR).

(74) Mandataire : **PLASSERAUD IP** ; 66 rue de la Chaussée
d'Antin, 75440 PARIS CEDEX 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS,
ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, CV, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues (règle 48.2(h))
- avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR THE ENZYMATIC PRODUCTION OF SOLUBLE FIBRES

(54) Titre : PROCÉDÉ D'OBTENTION DE FIBRES SOLUBLES PAR VOIE ENZYMATIQUE

(57) Abstract: The invention relates to a method for preparing a mixture of poorly-digestible alpha-glucans from a substrate rich in oligosaccharides having a degree of polymerisation (DP) of 4.

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

WO 2024/013451 A1

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

10 **[0002]** L'invention concerne également un mélange d' α -glucanes faiblement
digestibles.

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

15 **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
20 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
25 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
30 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
5 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 $\alpha(1-4)$) avec
10 seulement de 4 à 5 % de liaisons glucosidiques alpha 1 → 6 (ci-après 1 → 6 ou $\alpha(1-6)$), 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
15 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.

20 **[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.

25 **[0013]** Aujourd'hui, la plupart des procédés enzymatiques utilisent des amylomaltases, pour produire des fibres solubles à partir d'amidon.

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

Description détaillée de l'invention

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

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

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

[0018] La classification des α -glucanes repose principalement sur la mesure de
20 leur pouvoir réducteur, exprimé classiquement par la notion de « équivalent dextrose » (« Dextrose Equivalent » ou DE). Sur ce point particulier, la définition des maltodextrines reprise dans les Monograph Spécifications du Food Chemical Codex précise que la valeur de DE pour une maltodextrine ne doit pas excéder 20. Au-dessus de 20, il s'agit de sirops de glucose.

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

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

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

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

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

20 **[0024]** Le procédé selon la présente invention permet de diminuer le pourcentage de liaisons $\alpha(1-4)$ au profit de liaisons $\alpha(1-6)$, ce qui a l'avantage de diminuer la digestibilité du mélange d' α -glucanes obtenus par le procédé.

[0025] Le mélange d' α -glucanes préparé selon le procédé de l'invention est de préférence un mélange de maltodextrines branchées.

25 **[0026]** Au sens de l'invention, on entend par maltodextrines branchées des maltodextrines dont la teneur en liaisons glucosidiques $\alpha(1-6)$ est supérieure à celle des maltodextrines standards.

[0027] Les maltodextrines standards se définissent comme des mélanges purifiés et concentrés de glucose et de polymères de glucose essentiellement lié en $\alpha(1-4)$
30 avec seulement de 4 à 5 % de liaisons glucosidiques $\alpha(1-6)$, de poids moléculaires

extrêmement variés, complètement solubles dans l'eau et à faible pouvoir réducteur.

[0028] Selon un mode réalisation de l'invention, le sirop riche en oligosaccharides ayant DP de 4 comprend au moins 40%, de préférence au moins 45%, de manière encore plus préférée au moins 50% d'oligosaccharides ayant un DP de 4.

[0029] Selon un mode de réalisation de l'invention, le sirop riche en oligosaccharides ayant un DP de 4 a un équivalent dextrose (DE) supérieur à 20.

[0030] Selon un mode de réalisation préférée de l'invention, le sirop riche en DP4 est un sirop présentant les caractéristiques décrites dans le Tableau 1 ci-dessous.

10 **[0031]** 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.

[0032] Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l' α -glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques $\alpha(1-4)$ et de créer des liaisons glucosidiques $\alpha(1-6)$ est la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1 ou une
15 protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1 (dénommée ci-après GT#19). De manière préférée, il s'agit d'une protéine ayant au moins 91%, de manière encore plus préférée, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%,
20 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'accèsion Genbank WP_053069107.1.

[0033] Comme cela est montré dans les exemples, les inventeurs ont montré que
25 l'enzyme GT#19 est capable de modifier un sirop riche en DP4 de sorte à le rendre faiblement digestible, avec un % d'hydrolyse selon la méthode AOAC2002.02 inférieur ou égal à 45%).

[0034] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'enzyme est ajoutée à une concentration comprise entre 0.01 et 1 mg/mL de milieu réactionnel, de préférence

entre 0.05 et 0.5 mg/mL, de manière encore plus préférée environ 0.1 mg/mL de milieu réactionnel.

[0035] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de l'enzyme est réalisée pendant une durée comprise entre 12 et 48 heures, de
5 préférence environ 24 heures

[0036] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat et de l'enzyme est réalisée à une température comprise entre 20 et 40°C, de préférence environ 37°C.

[0037] Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en présence du substrat
10 et de l'enzyme est réalisée à un pH compris entre 5 et 6,5, de préférence entre 5,5 et 6, de manière encore plus préférée environ 5,75.

[0038] Dans un mode de réalisation de l'invention, le procédé comprend en outre une étape de traitement enzymatique par une α -glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques $\alpha(1-4)$ et de créer des liaisons glucosidiques $\alpha(1-3)$.
15 Il peut s'agir par exemple d'une protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :2 (dénommée ci-après GT#11). De manière préférée, il s'agit d'une protéine ayant au moins 91%, de manière encore plus préférée, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%,
20 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'accèsion Genbank AOR73699.1.

[0039] Selon un aspect, la présente invention porte également sur un mélange d' α -glucanes, de préférence un mélange de maltodextrines branchées, susceptible
25 d'être obtenu par le procédé décrit ci-dessus.

[0040] 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
30 méthode AOAC 2002.02, par rapport au substrat de départ.

[0041] La méthode AOAC 2002.02 peut notamment être mise en œuvre à l'aide de la partie « dosage HPAEC-PAD » du kit « resistant Starch, K-RSTAR 06/18 » commercialisé par la société Megazyme® tel que décrit dans l'Exemple 1, partie 5 ci-dessous.

- 5 **[0042]** Le procédé selon la présente invention permet d'augmenter la pourcentage de liaisons $\alpha(1-6)$ par un facteur d'au moins 3, de préférence au moins 3,5, de manière encore plus préférée d'au moins 4, par rapport au substrat de départ.

- [0043]** Le pourcentage de liaisons $\alpha(1-6)$ peut être mesuré par la méthode Hakomori (1964 HAKOMORI A Rapid Permethylation of Glycolipid, and
10 Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide) tel que décrit dans l'exemple 1, partie 8 ci-dessous ou par RMN du proton tel que décrit dans l'exemple 1, partie 7 ci-dessous.

- [0044]** Selon un aspect, la présente invention concerne un mélange d' α -glucanes, de préférence un mélange de maltodextrines branchées, caractérisé en ce qu'il
15 présente :

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

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

- [0045]** De manière préférée, le taux de fibres hydrolysables est inférieur à 44%, de préférence inférieur à 43%, de manière encore plus préférée inférieur à 42%, 41%,
25 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%.

[0046] De manière préférée, le taux de fibres hydrolysables est supérieur à 5%, de préférence supérieur à 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%.

[0047] De manière préférée, le taux de fibres hydrolysables est compris entre 5% et 45%, de préférence est compris entre 10% et 45%, de préférence est compris entre 20% et 44%, de préférence encore est compris entre 30% et 45%.

[0048] De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-6)$, est d'au moins 21%,
5 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%.

[0049] De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-6)$, est d'au plus 40%,
10 de préférence d'au plus 36%, d'au plus 35%, d'au plus 34%, d'au plus 33%, d'au plus 32%, d'au plus 31%.

[0050] De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-6)$, est compris entre 20% et 40%, de préférence est compris entre 20% et 35%, de préférence est compris entre 25% et 35%.

15 **[0051]** De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-3)$, est d'au moins 2%, de préférence d'au moins 3%.

[0052] De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-3)$, est d'au plus 6%, de préférence d'au plus 5%.

[0053] De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-3)$, est compris entre
20 2% et 8%, de préférence entre 3% et 5%.

[0054] De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-2)$, est d'au moins 1%, de préférence d'au moins 2%.

[0055] De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-2)$, est d'au plus 8%, de préférence d'au plus 6%, d'au plus 5%, d'au plus 4% d'au plus 3%.

25 **[0056]** De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-4)$, est d'au plus 80%, de préférence d'au plus 70%, d'au plus 65%.

[0057] De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-4)$, est d'au moins 50%, de préférence d'au moins 55%, d'au moins 60%.

[0058] De manière préférée, le pourcentage de liaisons $\alpha(1-4)$, est compris entre 50% et 80%, de préférence entre 55% et 70%, de préférence entre 55% et 65%.

[0059] De préférence, le mélange d' α -glucanes, qui est de préférence un mélange de maltodextrines branchées, est caractérisé en ce qu'il présente :

- 5 - un taux de fibres hydrolysables, inférieur à 55%, de préférence inférieur à 50%, de manière encore plus préférée inférieur à 45%,
- et présente une ou plusieurs des caractéristique suivantes :
 - entre 20% et 40% de liaisons $\alpha(1-6)$,
 - entre 20% et 40% de liaisons $\alpha(1-3)$,
- 10 - entre 2% et 8% de liaisons $\alpha(1-2)$,
- entre 50% et 80% de liaisons $\alpha(1-4)$,

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 $\alpha(1-6)$, $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-2)$, ou $\alpha(1-4)$ représente le pourcentage molaire dudit type de liaisons par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques, mesuré par la méthode Hakomori.

[0060] De préférence, lesdits taux de liaisons $\alpha(1-6)$, $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-2)$, ou $\alpha(1-4)$ sont tels que la somme de leur pourcentage molaire est égale à 100%.

[0061] La présente invention porte également sur l'utilisation d'un mélange d' α -glucanes obtenu selon le procédé décrit ci-dessus et d'un mélange d' α -glucanes ayant les propriétés décrits ci-dessus pour la préparation d'aliments pour l'alimentation humaine ou animale.

[0062] 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.

[0063] Enfin, dans un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'une glucanotransférase capable de cliver les liaisons glucosidiques $\alpha(1-4)$ et de créer des liaisons glucosidiques $\alpha(1-6)$ pour diminuer la digestibilité d'un mélange d' α -glucanes, ladite glucanotransférase ayant pour séquence SEQ ID No :1 ou une

protéine ayant au moins 90% d'identité avec la protéine ayant pour séquence SEQ ID No :1.

- [0064]** Dans cet aspect de l'invention, le mélange d' α -glucanes est de préférence un sirop riche en oligosaccharides, en particulier un sirop riche en oligosaccharides ayant DP de 4 tel que décrit dans le premier aspect de l'invention.

[0065] De manière préférée, la diminution de la digestibilité est une diminution d'un facteur d'au moins 2, de préférence d'au moins 2,5, de manière encore plus préférée d'au moins 3 de la fraction hydrolysable, mesurée selon la méthode AOAC 2002.02, par rapport au substrat de départ.

- 10 **[0066]** L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent, lesquels se veulent illustratifs et non limitatifs.

[0067] Exemple 1. : préparation de maltodextrines branchées à partir de sirop riche en DP4 : matériel et méthodes

[0068] 1. Préparation d'une solution de substrat DP4

- 15 **[0069]** Le substrat de départ utilisé était un sirop riche en DP4, présentant les caractéristiques décrites dans la Tableau 1 :

[0070] [Tableau 1]

Critère	Sous-critère	Méthode de mesure	Unité	Valeur
Poids moléculaire	Mn (eq pullulan)	MCL1439	Da	615
Poids moléculaire	Mw (eq pullulan)	MCL1439	Da	1045
Distribution en glucides	DP1	MCL190A	% relatif	2,5
Distribution en glucides	DP2	MCL190A	% relatif	6,1
Distribution en glucides	DP3	MCL190A	% relatif	7,4
Distribution en glucides	DP4	MCL190E	% relatif	55,7
Distribution en glucides	DP5	MCL190E	% relatif	2,3
Distribution en glucides	DP6	MCL190E	% relatif	2,1
Distribution en glucides	DP7	MCL190E	% relatif	2,3

Distribution en glucides	DP8	MCL190E	% relatif	5,5
Distribution en glucides	DP9	MCL190E	% relatif	1,4
Distribution en glucides	DP10	MCL190E	% relatif	1,3
Distribution en glucides	> DP10	MCL190E	% relatif	13,4
Sucres réducteurs	Equivalent Dextrose (DE)	MCL050B		33,4
Matière sèche	Perte de masse après séchage	MCL209A	%	30,2

[0071] Différentes solutions de substrat (sirop riche en DP4) dans du tampon sodium acétate 50mM, pH 5.75 ont été préparées, à des concentrations de 100g/L, 200g/L ou 400g/L.

5 **[0072]** 2. Production des enzymes recombinantes.

[0073] Les enzymes suivantes ont été produites de manière recombinante :

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

[0074] Des cellules de *E. coli* BL21 star contenant le plasmide pET-21a-enzyme n°X (afin de produire différentes enzymes, dont GT#11 et GT#19) ont été cultivées dans un milieu ZYM-5052 contenant 1% de glycérol et 1% de lactose. En fin de culture, les cellules ont été centrifugées à 6 500g pendant 10 min, les culots cellulaires remis en suspension à une DO600 nm de 80 dans un tampon phosphate 20mM pH=7,4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole, et les cellules lysées par sonication à froid grâce à 4 cycles de 20 secondes à 30 % d'amplitude suivi de 4 minutes de repos. Les débris cellulaires ont été séparés des protéines solubilisées par centrifugation pendant 30 minutes à 10 000 g.

[0075] 3. Purification des enzymes

[0076] 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.

- 5 Brièvement, 10 à 35 mL d'extrait cellulaire d'E. coli ont été mis en contact pendant 1 heure avec 1 mL de résine de Cobalt préalablement équilibrée avec 25mL tampon Phosphate 20 mM pH=7,4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole. La filtration de la résine sur fritté permet l'élimination de l'ensemble des protéines non fixées. La résine a ensuite été lavée 5 fois avec 40 mL de tampon Phosphate 20mM
- 10 pH=7,4 contenant 300 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole. Enfin, l'élution a été réalisée avec 3 mL de tampon Phosphate 20 mM pH=7,4 contenant 300 mM de NaCl et 250 mM d'imidazole pendant 5 minutes afin de décrocher les enzymes d'intérêt. Les solutions enzymatiques ont alors été dialysées (membrane de seuil de coupure 10 kDa) contre 5 L de tampon acétate de sodium 50 mM, pH=5,75
- 15 (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.

20 **[0077]** 4. Réactions enzymatiques

[0078] Les réactions ont été réalisées avec 0,1 mg/mL d'enzyme purifiée et dialysée en présence de 10%, 20% ou 40% de substrat dans du tampon sodium acétate 50 mM, pH=5,75. Les réactions ont été incubées sous agitation pendant 24 h à 37°C. Les réactions ont été arrêtées par chauffage (95°C pendant 5 minutes).

- 25 Des prélèvements aux temps initiaux et finaux ont été réalisés pour analyser la spécificité des enzymes en utilisant différentes techniques analytiques (HPAEC-PAD, RMN).

[0079] 5. Test de digestibilité

- [0080]** Les réactions de transfert ont été lyophilisées après congélation à -80°C
- 30 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 résistant 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.

[0081] 6. Analyses chromatographiques

- 5 **[0082]** Les produits obtenus ont été analysés par chromatographie d'échange d'anions couplée à un détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC PAD - High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection). Les analyses ont été réalisées sur un système Thermo ICS6000 équipé d'une colonne CarboPac™ PA100 analytical column (2 mm x 250 mm) couplée avec
- 10 une pré-colonne CarboPac™ PA100 guard (2 mm x 50 mm). Un gradient d'acétate de sodium dans 150 mM de soude a été appliqué à un débit de 0,250 ml.min⁻¹ selon le profil suivant : 0–5 min, 0 mM ; 5–35 min, 0–300 mM ; 35–40 min, 300–450 mM ; 40–42 min, 450 mM. La détection a été réalisée grâce à une électrode de travail en or et une cellule de référence pH Ag/AgCl. Les échantillons ont été dilués à une
- 15 masse sèche totale de 1 g.L⁻¹ avant injection.

[0083] 7. RMN.

[0084] Les spectres ¹H, ¹³C 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.

20 **[0085]** 8. Méthode Hakomori

- [0086]** 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
- 25 méthode destructrice comprenant les étapes de méthylation, hydrolyse, réduction avec NaBD₄, acétylation et analyse par spectrométrie de masse

[0087] **Exemple 2. : préparation de maltodextrines branchées à partir de sirop riche en DP4 : résultats**

- [0088]** Les résultats des différentes réactions enzymatiques sont présentés dans
- 30 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.

[0089] [Tableau 2]

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

[0090] MP : Matière Première, = Sirop DP4

- 5 **[0091]** Les inventeurs ont démontré que l'enzyme GT#19 est capable de modifier le sirop riche en DP4 de sorte à le rendre faiblement digestible (% d'hydrolyse selon la méthode AOAC2002.02 inférieur ou égal à 45%).

[0092] Le produit obtenu par ce traitement enzymatique par l'enzyme GT#19 contient significativement moins de liaisons α -1,4 et plus de liaisons α -1,6 que le point de départ. Le nombre de liaisons α -1,2 et α -1,3 n'est pas modifié. L'enzyme GT#19 est donc une α -4,6 glucanotransférase.

10

[0093] A l'inverse, un traitement par une autre GT, l'enzyme GT#11, conduit à une diminution du pourcentage de liaisons α -1,4 et à l'apparition de liaisons α -1,3. La digestibilité de produit obtenu par traitement avec l'enzyme GT#11 est également diminuée (53 et 55%, pour des concentrations initiales respectives de 100 et 200 mg/mL, à comparer à 84 et 88% pour les substrats non traitées).

15

[0094] Avantageusement, le mélange d' α -glucanes selon la présente invention présente également un profil de digestibilité *in vitro* selon la méthode Englyst intéressant.

Revendications

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

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

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

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

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

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

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

préférence environ 37°C et/ou à un pH compris entre 5 et 6,5, de préférence environ 5,75.

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

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

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

[Revendication 11] Mélange d' α -glucanes caractérisé en ce qu'il présente :

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

dans lequel le taux de fibres correspond à la fraction hydrolysable selon la méthode AOAC 2002.02 et le pourcentage de liaisons $\alpha(1-6)$ représente le pourcentage molaire de liaisons $\alpha(1-6)$ par rapport au nombre total de liaisons glycosidiques, mesuré par la méthode Hakomori.

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2023/051068

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12P 19/18</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/10</i> (2006.01)i; <i>C13K 13/00</i> (2006.01)i; <i>A23K 20/163</i> (2016.01)i; <i>A23L 29/30</i> (2016.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P; C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018167032 A1 (NESTEC SA [CH]; UNIV GRONINGEN [NL]) 20 September 2018 (2018-09-20)	1,10,12
Y	page 1, lines 3-8 page 2, line 29 - page 4, line 3 figures 3,7 page 17, line 29 - page 18, line 11 page 19, lines 3-13 page 26, line 12 - page 27, line 20; sequence 6	2-9
X	HANS LEEHMUIS ET AL. "4,6- α -Glucanotransferase activity occurs more widespread in strains and constitutes a separate GH70 subfa" <i>APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY</i> , SPRINGER, BERLIN, DE, Vol. 97, No. 1, 25 February 2012 (2012-02-25), pages 181-193 DOI: 10.1007/S00253-012-3943-1 ISSN: 1432-0614, XP035158276	1,10,12
Y	abstract page 182, right-hand column, paragraph 3 - page 183, left-hand column, paragraph 2 page 183, right-hand column, paragraph 2 - page 184, left-hand column, paragraph 2 page 186, right-hand column, paragraph 1 - page 188, left-hand column, paragraph 1; figures 2,3	2-9
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 October 2023		Date of mailing of the international search report 07 November 2023
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Mateo Rosell, A Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRALJ SLAVKO ET AL. "4,6- α -Glucanotransferase, a Novel Enzyme That Structurally and Functionally Provides an Evolutionary Link between Glycoside Hydrolase Enzyme Families 13 and 70" , US, Vol. 77, No. 22, 15 November 2011 (2011-11-15), pages 8154-8163, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Retrieved from the Internet: https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/AEM.05735-11 DOI: 10.1128/AEM.05735-11 ISSN: 0099-2240, XP093026818	1,10,12
Y	abstract page 8156, left-hand column, paragraph 4 - page 8158, right-hand column, paragraph 1; figure 3	2-9
X	MENG XIANGFENG ET AL. "Biochemical characterization of two GH70 family 4,6- α -glucanotransferases with distinct product specificity from <i>Lactobacillus aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i> DSM 20655" <i>FOOD CHEMISTRY</i> , NL, Vol. 253, 01 July 2018 (2018-07-01), pages 236-246 DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.154 ISSN: 0308-8146, XP093026642	10
Y	abstract page 241, right-hand column, last paragraph - page 244, left-hand column, paragraph 1	2-9
X	WO 2015183724 A1 (DU PONT [US]) 03 December 2015 (2015-12-03) claim 1	11
X	WO 2015183726 A1 (DU PONT [US]) 03 December 2015 (2015-12-03) claim 1	11
X	WO 2015183729 A1 (DU PONT [US]) 03 December 2015 (2015-12-03) claim 1	11
X	MONCHOIS V ET AL. "Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextranucrase from <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-1299 synthesizing only α (1-6) and α (1-3) linkages" <i>GENE, ELSEVIER AMSTERDAM, NL</i> , Vol. 182, No. 1-2, 05 December 1996 (1996-12-05), pages 23-32 DOI: 10.1016/S0378-1119(96)00443-X ISSN: 0378-1119, XP004071926 abstract; figure 1 page 27, right-hand column, paragraph 2 - page 29, left-hand column, paragraph 2	10,13
X	CN 113186238 A (UNIV JIANGNAN) 30 July 2021 (2021-07-30) sequence 1	10,13
Y	GANGOITI JOANA ET AL. "4,3- α -Glucanotransferase, a novel reaction specificity in glycoside hydrolase family 70 and clan GH-H" , Vol. 7, No. 1, 06 January 2017 (2017-01-06), SCIENTIFIC REPORTS, Retrieved from the Internet: https://www.nature.com/articles/srep39761 DOI: 10.1038/srep39761 XP093027136 abstract page 2, paragraph 3 page 8, paragraph 3 - page 10, paragraph 2	8,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2023/051068

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☐ forming part of the international application as filed:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2023/051068

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018167032	A1	20 September 2018	CN	110312806	A	08 October 2019
				EP	3596223	A1	22 January 2020
				JP	7183174	B2	05 December 2022
				JP	2020510441	A	09 April 2020
				US	2020123510	A1	23 April 2020
				WO	2018167032	A1	20 September 2018
WO	2015183724	A1	03 December 2015	BR	112016027887	A2	24 October 2017
				CA	2949276	A1	03 December 2015
				CN	106535653	A	22 March 2017
				EP	3149186	A1	05 April 2017
				US	2017198323	A1	13 July 2017
				WO	2015183724	A1	03 December 2015
WO	2015183726	A1	03 December 2015	BR	112016027849	A2	24 October 2017
				CA	2949300	A1	03 December 2015
				CN	106414506	A	15 February 2017
				EP	3149184	A1	05 April 2017
				US	2017198324	A1	13 July 2017
				WO	2015183726	A1	03 December 2015
WO	2015183729	A1	03 December 2015	BR	112016027839	A2	31 October 2017
				CA	2949278	A1	03 December 2015
				CN	106661559	A	10 May 2017
				EP	3149181	A1	05 April 2017
				US	2017204442	A1	20 July 2017
				WO	2015183729	A1	03 December 2015
CN	113186238	A	30 July 2021	NONE			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2023/051068

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12P19/18 C12N9/10 C13K13/00 A23K20/163 A23L29/30 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12P C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2018/167032 A1 (NESTEC SA [CH]; UNIV GRONINGEN [NL])	1, 10, 12
Y	20 septembre 2018 (2018-09-20) page 1, lignes 3-8 page 2, ligne 29 - page 4, ligne 3 figures 3, 7 page 17, ligne 29 - page 18, ligne 11 page 19, lignes 3-13 page 26, ligne 12 - page 27, ligne 20; séquence 6 ----- --/--	2-9
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 26 octobre 2023		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 07/11/2023
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Mateo Rosell, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2023/051068

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, la recherche internationale a été effectuée sur la base d'un listage des séquences :
 - a. ☒ faisant partie de la demande internationale telle que déposée.
 - b. ☐ remis postérieurement à la date de dépôt international aux fins de la recherche internationale (règle 13~~ter~~.1.a)),
☐ accompagné d'une déclaration selon laquelle le listage des séquences ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée.
2. ☐ En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le présent rapport a été établi dans la mesure où une recherche valable pouvait être effectuée en l'absence d'un listage des séquences conforme à la norme ST.26 de l'OMPI.
3. Commentaire complémentaires:

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	HANS LEEMHUIS ET AL: "4,6-[alpha]-Glucanotransferase activity occurs more widespread in strains and constitutes a separate GH70 subfamily", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 97, no. 1, 25 février 2012 (2012-02-25), pages 181-193, XP035158276, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-012-3943-1	1, 10, 12
Y	abrégé page 182, colonne de droite, alinéa 3 - page 183, colonne de gauche, alinéa 2 - page 183, colonne de droite, alinéa 2 - page 184, colonne de gauche, alinéa 2 - page 186, colonne de droite, alinéa 1 - page 188, colonne de gauche, alinéa 1; figures 2, 3 -----	2-9
X	KRALJ SLAVKO ET AL: "4,6-[alpha]-Glucanotransferase, a Novel Enzyme That Structurally and Functionally Provides an Evolutionary Link between Glycoside Hydrolase Enzyme Families 13 and 70", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY , vol. 77, no. 22 15 novembre 2011 (2011-11-15), pages 8154-8163, XP093026818, US ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.05735-11 Extrait de l'Internet: URL:https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/AEM.05735-11	1, 10, 12
Y	abrégé page 8156, colonne de gauche, alinéa 4 - page 8158, colonne de droite, alinéa 1; figure 3 ----- -/--	2-9

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MENG XIANGFENG ET AL: "Biochemical characterization of two GH70 family 4,6-[alpha]-glucanotransferases with distinct product specificity from Lactobacillus aviarius subsp. aviarius DSM 20655", FOOD CHEMISTRY, vol. 253, 1 juillet 2018 (2018-07-01), pages 236-246, XP093026642, NL ISSN: 0308-8146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.154	10
Y	abrégé page 241, colonne de droite, dernier alinéa - page 244, colonne de gauche, alinéa 1	2-9
X	----- WO 2015/183724 A1 (DU PONT [US]) 3 décembre 2015 (2015-12-03) revendication 1	11
X	----- WO 2015/183726 A1 (DU PONT [US]) 3 décembre 2015 (2015-12-03) revendication 1	11
X	----- WO 2015/183729 A1 (DU PONT [US]) 3 décembre 2015 (2015-12-03) revendication 1	11
X	----- MONCHOIS V ET AL: "Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextranucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299 synthesizing only alpha(1-6) and alpha(1-3) linkages", GENE, ELSEVIER AMSTERDAM, NL, vol. 182, no. 1-2, 5 décembre 1996 (1996-12-05), pages 23-32, XP004071926, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/S0378-1119(96)00443-X abrégé; figure 1 page 27, colonne de droite, alinéa 2 - page 29, colonne de gauche, alinéa 2	10,13
X	----- CN 113 186 238 A (UNIV JIANGNAN) 30 juillet 2021 (2021-07-30) séquence 1 ----- -/--	10,13

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	GANGOITI JOANA ET AL: "4,3-[alpha]-Glucanotransferase, a novel reaction specificity in glycoside hydrolase family 70 and clan GH-H", SCIENTIFIC REPORTS , vol. 7, no. 1 6 janvier 2017 (2017-01-06), XP093027136, DOI: 10.1038/srep39761 Extrait de l'Internet: URL:https://www.nature.com/articles/srep39 761 abrégé page 2, alinéa 3 page 8, alinéa 3 - page 10, alinéa 2 -----	8, 9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2023/051068

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