

MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE FIBRAS SOLUBLES

CAMPO TÉCNICO

La invención se relaciona con un método para preparar una mezcla de alfa-glucanos deficientemente digeribles de un sustrato rico en oligosacáridos que tienen un grado de polimerización (DP, por sus siglas en inglés) de 4. En la presente solicitud, este sustrato designa un jarabe que contiene oligosacáridos con un contenido de oligosacáridos que tienen un grado de polimerización (DP) de 4 de al menos 40 %, preferentemente de al menos 45 %, aun con mayor preferencia de al menos 50 %.

La invención también se relaciona con una mezcla de alfa-glucanos poco digeribles.

La presente invención también se relaciona con el uso de una alfa-glucanotransferasa capaz de crear enlaces alfa(1,6) glicosídicos para reducir la digestibilidad de una mezcla de alfa-glucanos.

TÉCNICA ANTERIOR

La fibra dietética tiene un papel importante en la nutrición humana. Entre las fibras dietéticas, se hace una

distinción entre las fibras solubles, que son solubles en agua y tienen una capacidad gelificante, y fibras insolubles. Las fibras solubles, incluyendo las maltodextrinas ramificadas, son particularmente ventajosas porque son poco digeribles. Debido a esto, su incorporación en la dieta hace posible reducir el índice glucémico de un alimento y prolongar la sensación de saciedad. También se destacan con propiedades prebióticas sobre la flora intestinal; en otras palabras, son capaces de promover selectivamente el crecimiento de ciertas bacterias de tipo probiótico o la actividad de la microbiota, al proporcionar un beneficio a la salud.

Hasta ahora, las fibras solubles, incluidas las maltodextrinas ramificadas, se obtuvieron principalmente por vía física.

Este es el caso en particular con maltodextrina vendida por la compañía del solicitante bajo el nombre comercial NUTRIOSE® FM10 como fibra soluble en agua.

Otras fibras solubles obtenidas fisicoquímicamente existen, como PROMITOR® comercializado por la compañía Tate y Lyl, FIBERSOL® o LITESSE® comercializado por la compañía Dupont Nutrition y Biosciences.

Numerosos estudios han demostrado que las propiedades de digestibilidad se enlazaron directamente a

los porcentajes de los diversos tipos de enlaces glucosídicos dentro de las fibras solubles.

Claramente, las maltodextrinas estándar son rápidamente digeribles y se definen como mezclas purificadas y concentradas de polímeros de glucosa y glucosa esencialmente unidos a alfa 1→4 (de aquí en adelante 1→4 o alfa(1,4)) con solo 4 a 5 % de alfa 1→6 uniones glicosídicas (de aquí en adelante 1→6 o alfa(1,6)), de pesos moleculares extremadamente variados, completamente solubles en agua y de baja reducción de energía.

Al aumentar el porcentaje de alfa 1→6 o alfa 1→3 uniones, el grado de ramificación de las maltodextrinas aumenta, lo que las hace más resistentes a la digestión.

El enfoque enzimático, que usa enzimas capaces de promover la creación de enlaces “ramificados”, tiene numerosas ventajas, en términos de seguridad y conservación ambiental, y también ofrece una mejor especificidad.

Originalmente, la mayoría de los procesos enzimáticos para producir fibras solubles se llevan a cabo usando sacarosa como sustrato para la enzima, para crear nuevos enlaces. Por ejemplo, WO2015183714 describe una reacción enzimática de una mezcla de sacarosa y un sustrato de tipo alfa-glucano.

En la actualidad, la mayoría de los procesos enzimáticos usan amilomaltasas para producir fibras solubles a partir del almidón.

Es deseable obtener fibras enzimáticamente solubles del sustrato, en ausencia de sacarosa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La compañía del solicitante ha descubierto que es posible, a partir de un jarabe rico en oligosacáridos que tienen un grado de polimerización (DP) de 4, obtener por vía enzimática fibras de interés en la nutrición humana y animal. Por lo tanto, la compañía del solicitante ha desarrollado un método que usa una enzima particular, capaz de crear enlaces alfa(1,6) a partir de jarabe rico en oligosacáridos de DP4.

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un método para preparar una mezcla de alfa-glucanos, preferentemente una mezcla de maltodextrinas ramificadas, que comprende una etapa de reunir un sustrato y una enzima, dicho sustrato es un jarabe rico en oligosacáridos que tienen un grado de polimerización (DP) de 4 y dicha enzima es una alfa-glucanotransferasa capaz de escindir enlaces alfa(1,4) glicosídicos y de crear enlaces alfa(1,6) glicosídicos.

De acuerdo con la presente invención, los términos “alfa-glucano”, “fibra soluble” y “fibra soluble alimentaria” se usan indistintamente. Definen oligosacáridos compuestos de al menos 3 unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces alfa-glucosídicos (o alfa-glucosídicos).

La clasificación de alfa-glucanos se basa principalmente en la medición de su potencia reductora, convencionalmente expresada por el concepto de “equivalente de dextrosa” (“Equivalente de Dextrosa” o DE, por sus siglas en inglés). En este punto particular, la definición de maltodextrinas dadas en las Especificaciones de Monografía del Código Químico de Alimento especifica que el valor de DE para una maltodextrina no debe ser más de 20. Por encima de 20, estos son jarabes de glucosa.

Sin embargo, esta medición de DE es insuficiente para representar con precisión la distribución molecular de los alfa-glucanos. De hecho, la hidrólisis ácida del almidón, que es totalmente aleatoria, o su hidrólisis enzimática, que es ligeramente más ordenada, proporciona mezclas de glucosa y polímeros de glucosa que la sola medición del DE no hace posible definir con precisión, y que comprenden moléculas cortas, de bajo DP, así como moléculas muy largas, de alto DP.

La medición del DE de hecho proporciona solo una idea aproximada del DP promedio de la mezcla de la glucosa y de los polímeros de glucosa constituyentes de los alfa-glucanos y por lo tanto de su masa molecular promedio en número (M_n). Para completar la caracterización de la distribución de masa molecular de alfa-glucanos, es

importante determinar otro parámetro, que del peso molecular promedio en peso (M_w).

En la práctica, (M_n) y (M_w) se determinan experimentalmente mediante diferentes técnicas de análisis, tales como, por ejemplo, un método de medición adecuado para polímeros de glucosa, que se basa en cromatografía de permeación en gel sobre columnas cromatográficas calibradas con pululanos de masas moleculares conocidas.

La relación M_w/M_n se denomina índice de polimolecularidad (PI, por sus siglas en inglés) y hace posible caracterizar en general la distribución de la masa molecular de una mezcla de polímeros. Como regla general, la distribución de masa molecular de las maltodextrinas estándar da como resultado valores PI de entre 5 y 10.

Estos diversos parámetros también son el reflejo del perfil de enlace alfa-glucosídico de los alfa-glucanos. De hecho, una mezcla de alfa-glucanos estándar tiene un porcentaje muy alto de enlaces alfa(1,4) "lineales" (más de 90 %) y un bajo porcentaje de los denominados enlaces "ramificados" (alfa(1,2), alfa(1,3) y alfa(1,6)).

El método de acuerdo con la presente invención hace posible reducir el porcentaje de enlaces alfa(1,4) a favor de enlaces alfa(1,6), lo que tiene la ventaja de

reducir la digestibilidad de la mezcla de alfa-glucanos obtenida mediante el método.

La mezcla de alfa-glucanos preparada de acuerdo con el método de la invención es preferentemente una mezcla de maltodextrinas ramificadas.

Para los fines de esta invención, se entiende que las maltodextrinas ramificadas son maltodextrinas con un mayor contenido de enlaces alfa(1,6) glicosídicos que las maltodextrinas estándar.

Las maltodextrinas estándar se definen como mezclas purificadas y concentradas de glucosa y polímeros de glucosa esencialmente unidos en alfa(1,4) con solamente 4 a 5 % de enlaces alfa(1,6) glicosídicos, de peso molecular extremadamente variado, completamente solubles en agua y de baja potencia reductora.

De acuerdo con una modalidad de la invención, el jarabe rico en oligosacáridos que tienen un DP de 4 comprende al menos 40 %, preferentemente al menos 45 %, aun con mayor preferencia al menos 50 % de oligosacáridos que tienen un DP de 4.

De acuerdo con una modalidad de la invención, el jarabe rico en oligosacáridos que tienen un DP de 4 tiene un equivalente de dextrosa (DE) mayor que 20.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, el jarabe rico en DP4 es un jarabe que tiene las características descritas en la siguiente Tabla 1.

En una modalidad preferida de la invención, el sustrato está presente a una concentración de entre 50 g/l y 500 g/l, preferentemente entre 100 g/l y 200 g/l, en el medio de reacción.

En una modalidad preferida de la invención, la alfa-glucanotransferasa capaz de escindir los enlaces alfa(1,4) glicosídicos y crear enlaces alfa(1,6) glicosídicos es la proteína que tiene la sec. con núm. de ident.:1 o una proteína que tiene al menos 90 % de identidad con la proteína que tiene la sec. con núm. de ident.:1 (de aquí en adelante conocida como GT núm. 19). Preferentemente, es una proteína que tiene al menos 91 %, aun con mayor preferencia al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 %, al menos 99,9 % de identidad con la proteína que tiene la sec. con núm. de ident.:1. La secuencia sec. con núm. de ident.:1 corresponde al número de acceso del Genbank WP_053069107.1.

Como se muestra en los ejemplos, los inventores han demostrado que la enzima GT núm. 19 es capaz de modificar un jarabe rico en DP4 para hacerlo poco digerible,

con un porcentaje de hidrólisis de acuerdo con el método AOAC2002.02 menor que o igual a 45 %).

De acuerdo con una modalidad de la invención, la enzima se agrega a una concentración de entre 0,01 y 1 mg/mL de medio de reacción, preferentemente entre 0,05 y 0,5 mg/mL, aun con mayor preferencia aproximadamente 0,1 mg/mL de medio de reacción.

De acuerdo con una modalidad de la invención, el sustrato y la enzima se ponen en contacto durante un período de entre 12 y 48 horas, preferentemente aproximadamente 24 horas.

De acuerdo con una modalidad de la invención, el sustrato y la enzima se reúnen a una temperatura de entre 20 y 40 °C, preferentemente aproximadamente 37 °C.

De acuerdo con una modalidad de la invención, el sustrato y la enzima se reúnen a un pH de entre 5 y 6,5, preferentemente, entre 5,5 y 6, y aun con mayor preferencia aproximadamente 5,75.

En una modalidad de la invención, el método comprende además una etapa de tratamiento enzimático mediante una alfa-glucanotransferasa capaz de escindir enlaces alfa(1,4) glicosídicos y de crear enlaces alfa(1,3) glicosídicos. Por ejemplo, puede ser una proteína que tiene la sec. con núm. de ident.:2 o una proteína que tiene al menos

90 % de identidad con la proteína que tiene la sec. con núm. de ident.:2 (de aquí en adelante conocida como GT núm. 11). Preferentemente, es una proteína que tiene al menos 91 %, aun con mayor preferencia al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 %, al menos 99,9 % de identidad con la proteína que tiene la sec. con núm. de ident.:2. La secuencia sec. con núm. de ident.:2 corresponde al número de acceso del Genbank AOR73699.1.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención también se relaciona con una mezcla de alfa-glucanos, preferentemente una mezcla de maltodextrinas ramificadas, que pueden obtenerse mediante el método descrito anteriormente.

Esta mezcla de alfa-glucanos se caracteriza por su baja digestibilidad de acuerdo con el método AOAC 2002.02. Ventajosamente, el proceso de acuerdo con la invención hace posible reducir la fracción hidrolizable, medida de acuerdo con el método AOAC 2002.02, por un factor de al menos 2, preferentemente de al menos 2,5, aun con mayor preferencia de al menos 3, en relación con el sustrato de partida.

En particular, el método AOAC 2002.02 puede implementarse usando la parte del “ensayo HPAEC-PAD” del kit “Starch resistant, K-RSTAR 06/18”, comercializado por la

compañía Megazyme® como se describe en el siguiente Ejemplo 1, parte 5.

El método de acuerdo con la presente invención hace posible aumentar el porcentaje de enlaces alfa(1,6) por un factor de al menos 3, preferentemente al menos 3,5, aun con mayor preferencia de al menos 4, en relación con el sustrato de partida.

El porcentaje de enlaces alfa(1,6) puede medirse mediante el método de Hakomori (1964 HAKOMORI A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide) como se describe en el siguiente Ejemplo 1, parte 8 o mediante RMN de protones como se describe en el siguiente Ejemplo 1, parte 7.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención se relaciona con una mezcla de alfa-glucanos, preferentemente una mezcla de maltodextrinas ramificadas, caracterizada porque tiene:

- un contenido de fibras hidrolizables de menos de 55 %, preferentemente menos de 50 %, aun con mayor preferencia menos de 45 %,
- y/o al menos 20 % de enlaces alfa(1,6),

en donde el contenido de fibra corresponde a la fracción hidrolizable (es decir, no resistente) de acuerdo con el

método AOAC 2002.02 y el porcentaje de enlaces alfa(1,6) representa el porcentaje molar de enlaces alfa(1,6) en relación con el número total de enlaces glicosídicos, medido mediante el método de Hakomori.

Preferentemente, el contenido de fibras hidrolizables es menos de 44 %, preferentemente menos de 43 % aun con mayor preferencia menos de 42 %, 41 %, 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %.

Preferentemente, el contenido de fibras hidrolizables es mayor que 5 %, preferentemente mayor que 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %.

Preferentemente, el contenido de fibras hidrolizables está entre 5 % y 45 %, preferentemente entre 10 % y 45 %, preferentemente entre 20 % y 44 %, aun con mayor preferencia entre 30 % y 45 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces alfa(1,6), es al menos 21 %, preferentemente al menos 22 %, aun con mayor preferencia al menos 23 %, al menos 24 %, al menos 25 %, al menos 26 %, al menos 27 %, al menos 28 %, al menos 29 %, al menos 30 %, al menos 31 %, al menos 32 %, al menos 33 %, al menos 34 %, al menos 35 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces alfa(1,6) es como máximo 40 %, preferentemente como máximo 36 %, como

máximo 35 %, como máximo 34 %, como máximo 33 %, como máximo 32 %, como máximo 31 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces $\alpha(1,6)$ está entre 20 % y 40 %, preferentemente entre 20 % y 35 %, con mayor preferencia entre 25 % y 35 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces $\alpha(1,3)$ es al menos 2 %, preferentemente al menos 3 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces $\alpha(1,3)$ es como máximo 6 %, preferentemente como máximo 5 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces $\alpha(1,3)$ está entre 2 % y 8 %, preferentemente entre 3 % y 5 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces $\alpha(1,2)$ es al menos 1 %, preferentemente al menos 2 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces $\alpha(1,2)$ es como máximo 8 %, preferentemente como máximo 6 %, como máximo 5 %, como máximo 4 % o como máximo 3 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces $\alpha(1,4)$ es como máximo 80 %, preferentemente como máximo 70 %, como máximo 65 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces $\alpha(1,4)$ es al menos 50 %, preferentemente al menos 55 %, al menos 60 %.

Preferentemente, el porcentaje de enlaces $\alpha(1,4)$ está entre 50 % y 80 %, preferentemente entre 55 % y 70 %, con mayor preferencia entre 55 % y 65 %.

Preferentemente, la mezcla de alfa-glucanos, que es preferentemente una mezcla de maltodextrinas ramificadas, se caracteriza porque tiene:

- un contenido de fibras hidrolizables de menos de 55 %, preferentemente menos de 50 %, aun con mayor preferencia menos de 45 %,
- y tiene una o más de las siguientes características:
 - entre 20 % y 40 % de enlaces alfa(1,6),
 - entre 20 % y 40 % de enlaces alfa(1,3),
 - entre 2 % y 8 % de enlaces alfa(1,2),
 - entre 50 % y 80 % de enlaces alfa(1,4),

en donde el contenido de fibra corresponde a la fracción hidrolizable (es decir, no resistente) de acuerdo con el método AOAC 2002.02 y el porcentaje de enlaces alfa(1,6), alfa(1,3), alfa(1,2) o alfa(1,4) representa el porcentaje molar de dicho tipo de enlaces en relación con el número total de enlaces glicosídicos, medido mediante el método de Hakomori.

Preferentemente, dicho contenido de enlaces alfa(1,6), alfa(1,3), alfa(1,2) o alfa(1,4) es tal que la suma de su porcentaje molar es igual a 100 %.

La presente invención también se relaciona con el uso de una mezcla de alfa-glucanos obtenidos de acuerdo con

el método descrito anteriormente y de una mezcla de alfa-glucanos que tienen las propiedades descritas anteriormente para la preparación de alimentos para la nutrición humana o animal.

Típicamente, la mezcla de alfa-glucanos de acuerdo con la invención puede usarse para promover la salud intestinal, el manejo de la glucosa sanguínea, el manejo de la saciedad y del peso, y la liberación sostenida de energía.

Finalmente, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de una glucanotransferasa capaz de escindir los enlaces alfa(1,4) glicosídicos y de crear enlaces alfa(1,6) glicosídicos para reducir la digestibilidad de una mezcla de la alfa-glucanos, dicha glucanotransferasa tiene la sec. con núm. de ident.:1 o una proteína que tiene al menos 90 % de identidad con la proteína que tiene la sec. con núm. de ident.:1

En este aspecto de la invención, la mezcla de alfa-glucanos es preferentemente un jarabe rico en oligosacáridos, en particular, un jarabe rico en oligosacáridos que tienen un DP de 4 como se describe en el primer aspecto de la invención.

Preferentemente, la disminución en la digestibilidad es una disminución en un factor de al menos 2, preferentemente de al menos 2,5, aun con mayor preferencia de

al menos 3 de la fracción hidrolizable, medida de acuerdo con el método AOAC 2002.02 en relación con el sustrato de partida.

La invención se entenderá mejor con la ayuda de los siguientes ejemplos, que están destinados a ser ilustrativos y no limitantes.

Ejemplo 1: Preparación de maltodextrinas ramificadas a partir de un jarabe rico en DP4: material y métodos

1. Preparación de una solución de sustrato de DP4

El sustrato de partida usado fue un jarabe rico en DP4, que tenía las características descritas en la Tabla 1:

[Tabla 1]

Criterios	Subcriterios	Método de medición	Unidad	Valor
Peso Molecular	Mn (eq. pululano)	MCL1439	Da	615
Peso Molecular	Mw (eq. pululano)	MCL1439	Da	1045
Distribución de carbohidratos	DP1	MCL190A	% Relativo	2,5
Distribución de carbohidratos	DP2	MCL190A	% Relativo	6,1
Distribución de carbohidratos	DP3	MCL190A	% Relativo	7,4
Distribución de carbohidratos	DP4	MCL190E	% Relativo	55,7
Distribución de carbohidratos	DP5	MCL190E	% Relativo	2,3
Distribución de carbohidratos	DP6	MCL190E	% Relativo	2,1
Distribución de carbohidratos	DP7	MCL190E	% Relativo	2,3
Distribución de carbohidratos	DP8	MCL190E	% Relativo	5,5

Distribución de carbohidratos	DP9	MCL190E	% Relativo	1,4
Distribución de carbohidratos	DP10	MCL190E	% Relativo	1,3
Distribución de carbohidratos	>DP10	MCL190E	% Relativo	13,4
Azúcares reductores	Equivalente de dextrosa (DE)	MCL050B		33,4
Material seco	Pérdida de masa después del secado	MCL209A	%	30,2

Se prepararon diversas soluciones de sustrato (jarabe rico en DP4) en regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75, a concentraciones de 100 g/L, 200 g/L o 400 g/L.

2. Producción de enzimas recombinantes.

Se produjeron recombinantemente las siguientes enzimas;

- Enzima GT núm. 11: alfa-4,3 glucanotransferasa de NC2970 de *Lactobacillus fermentum* que tiene como secuencia de aminoácidos la secuencia listada en el Genbank con la referencia AOR73699.1 (sec. con núm. de ident.:2),
- Enzima GT núm. 19: glicósido hidrolasa GH70 de *Lactobacillus mucosae* que tiene como secuencia de aminoácidos la secuencia listada en el Genbank con la referencia WP_053069107.1. (sec. con núm. de ident.: 1)

Se cultivaron células BL21 Star de *E. coli* que contenían el plásmido pET-21 a-enzima núm. X (para producir diversas enzimas, incluidas las GT núm. 11 y GT núm. 19) en medio ZYM-5052 que contenía 1 % de glicerol y 1 % de lactosa. Al final del cultivo, las células se centrifugaron a 6500 g durante 10 minutos, las pellas celulares se resuspendieron a una DO 600 nm de 80 en un regulador de fosfato 20 mM, pH = 7,4, que contenía 300 mM de NaCl y 20 mM de imidazol, y las células se lisaron mediante sonicación en frío usando 4 ciclos de 20 segundos a 30 % de amplitud, seguido de 4 minutos de descanso. Los restos celulares se separaron de las proteínas solubilizadas mediante centrifugación durante 30 minutos a 10.000 g.

3. Purificación de enzimas

La purificación de las proteínas de interés se llevó a cabo sobre una resina de cobalto (Invitrogen) cargada con iones cobalto divalentes (Co^{2+}), por los cuales la etiqueta de polihistidina tiene afinidad. Se llevó a cabo la elución mediante la creación de una competencia entre la etiqueta de polihistidina y concentraciones crecientes de imidazol. En resumen, se pusieron en contacto 10 a 35 mL de extracto celular de *E. coli* durante 1 hora con 1 mL de resina de cobalto equilibrada de antemano con 25 mL de regulador de

fosfato 20 mM, pH = 7,4, que contenía 300 mM de NaCl y 20 mM de imidazol. La filtración de la resina sobre el vidrio sinterizado permite eliminar todas las proteínas no unidas. Después, la resina se lavó 5 veces con 40 mL de regulador de fosfato 20 mM, pH = 7,4, que contenía 300 mM de NaCl y 20 mM de imidazol. Finalmente, se llevó a cabo la elución con 3 mL de regulador de fosfato 20 mM, pH = 7,4, que contenía 300 mM de NaCl y 250 mM de imidazol durante 5 minutos para despegar las enzimas de interés. Después, las soluciones enzimáticas se dializaron (membrana de corte de peso molecular 10 kDa) contra 5 L de regulador de acetato de sodio 50 mM, pH = 5,75 (durante la noche, 4 °C con agitación) para eliminar el NaCl e imidazol. Las diversas soluciones de proteína se analizaron midiendo su absorbancia a 280 nm con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher). Los coeficientes de extinción molecular ϵ se determinaron mediante la aplicación ProtParam del portal de recursos bioinformáticos ExPASy.

4. Reacciones enzimáticas

Las reacciones se llevaron a cabo con 0,1 mg/mL de enzima purificada y se dializaron en presencia de 10 %, 20 % o 40 % de sustrato en regulador de acetato de sodio 50 mM, pH = 5,75. Las reacciones se incubaron con agitación durante 24 horas a 37 °C. Las reacciones se detuvieron mediante

calentamiento (95 °C durante 5 minutos). Las muestras se tomaron en los tiempos inicial y final para analizar la especificidad de las enzimas mediante diferentes técnicas analíticas (HPAEC-PAD, RMN).

5. Prueba de digestibilidad

Las reacciones de transferencia se liofilizaron después del congelamiento a -80 °C durante 24 horas. Se tomaron 25 mg de productos liofilizados en 1 mL de regulador de maleato de sodio 100 mM que contenía 30 U de α -amilasa pancreática y 3 U de amiloglucosidasa (Starch resistant kit, Megazyme K-STAR 06/18, que implementa el método de AOAC 2002.02). Las reacciones se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Los productos se diluyeron en agua antes del análisis PAD HPAEC.

6. Análisis cromatográficos

Los productos obtenidos se analizaron mediante cromatografía de intercambio aniónico acoplada a un detector amperométrico pulsado (cromatografía de intercambio aniónico HPAEC PAD-ALTA Performance con detección amperométrica pulsada). Los análisis se llevaron a cabo en un sistema Thermo ICS6000 equipado con una columna analítica CarboPac™ PA100 (2 mm x 250 mm) acoplada con una precolumna de

protección CarboPac™ PA100 (2 mm x 50 mm). Se aplicó un gradiente de acetato de sodio en 150 mM de sodio a una velocidad de flujo de 0,250 mL.min⁻¹ de acuerdo con el siguiente perfil: 0-5 min, 0 mM; 5-35 min, 0-300 mM; 35-40 min, 300-450 mM; 40-42 min, 450 mM. La detección se realizó usando un electrodo de trabajo dorado y una célula de referencia de pH Ag/AgCl. Las muestras se diluyeron hasta una masa seca total de 1 g.L⁻¹ antes de la inyección.

7. RMN.

Los espectros de ¹H, ¹³C y HSQC se registraron en un equipo Bruker Avance de 500 MHz a 298 K con una sonda H-BB-D BBI de gradiente en Z de 5 mm. Los datos se adquirieron y procesaron usando el software TopSpin 3.

8. Método Hakomori

El método HAKOMORI (1964 HAKOMORI A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide) hace posible caracterizar químicamente los enlaces glucosídicos al diferenciar los grupos OH libres y los grupos unidos. Este es un método destructivo que comprende las etapas de metilación, hidrólisis, reducción con NaBD₄, acetilación y análisis mediante espectrometría de masa.

Ejemplo 2: Preparación de maltodextrinas ramificadas a partir de un jarabe rico en DP4: resultados

Los resultados de las diversas reacciones enzimáticas se presentan en la siguiente Tabla 2, que muestra los porcentajes de alfa-1,6; alfa-1,3 y alfa-1,4 enlaces medidos por RMN protónica o por el método Hakomori y porcentaje de hidrólisis (AOAC 2002,02) en los productos de reacción obtenidos.

[Tabla 2]

Enzima	Concentración g/l	NMR				HAKOMORI				% de hidrólisis (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	
RM	100	0 %	0 %	99 %	1 %	2,3 %	2,6 %	93,1 %	2,0 %	78,0 %
RM	200	0 %	0 %	99 %	1 %	2,3 %	2,6 %	93,1 %	2,0 %	80,0 %
RM	400	0 %	0 %	99 %	1 %	2,3 %	2,6 %	93,1 %	2,0 %	83,0 %
GT núm. 11	100	0 %	10 %	90 %	0 %	2,9 %	10,6 %	82,3 %	4,1 %	48,7 %
GT núm. 11	200	0 %	9 %	91 %	1 %	2,7 %	9,3 %	84,4 %	3,7 %	52,9 %
GT núm. 11	400	0 %	5 %	92 %	3 %	2,3 %	6,6 %	88,5 %	2,9 %	62,8 %
GT núm. 19	100	0 %	0 %	57 %	43 %	2,1 %	4,3 %	62,6 %	30,9 %	31,6 %
GT núm. 19	200	0 %	0 %	59 %	41 %	2,2 %	4,3 %	63,0 %	30,5 %	34,8 %
GT núm. 19	400	0 %	0 %	65 %	35 %	2,3 %	4,1 %	63,8 %	29,7 %	40,0 %

RM: Materia prima = jarabe DP4

Los inventores han demostrado que la enzima GT núm. 19 es capaz de modificar el jarabe rico en DP4 para hacerlo

poco digerible (porcentaje de hidrólisis de acuerdo con el método AOAC2002.02 menor que o igual a 45 %).

El producto obtenido mediante este tratamiento enzimático con enzima GT núm. 19 contiene significativamente menos enlaces alfa-1,4 y más enlaces alfa-1,6 que el punto de partida. El número de enlaces alfa-1,2 y alfa-1,3 permanece sin cambios. Por lo tanto, la enzima GT núm. 19 es una 4,6-alfa-glucanotransferasa.

Por el contrario, el tratamiento con otra GT, la enzima GT núm. 11, conduce a una reducción en el porcentaje de enlaces alfa-1,4 y la aparición de enlaces alfa-1,3. También se reduce la digestibilidad del producto obtenido mediante tratamiento con la enzima GT núm. 11 (53 y 55 %, para concentraciones iniciales de 100 y 200 mg/mL respectivamente, frente a 84 y 88 % para sustratos no tratados).

Ventajosamente, la mezcla de alfa-glucanos de acuerdo con la presente invención también tiene un interesante perfil de digestibilidad *in vitro* de acuerdo con el método Englyst.