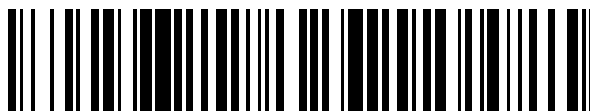


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 306**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 9/10</b>	(2006.01) <b>A23C 9/13</b>	(2006.01)
<b>C12P 19/04</b>	(2006.01) <b>A23C 9/154</b>	(2006.01)
<b>C12P 19/18</b>	(2006.01) <b>A23L 29/30</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/06</b>	(2006.01) <b>A23L 9/20</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/09</b>	(2006.01) <b>A23L 11/00</b>	(2006.01)
<b>C08B 37/00</b>	(2006.01) <b>A23L 33/18</b>	(2006.01)
<b>A21D 2/18</b>	(2006.01) <b>A61K 31/718</b>	(2006.01)
<b>A23L 2/39</b>	(2006.01)	
<b>A61K 8/73</b>	(2006.01)	
<b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2008 E 16180411 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3115452**

54 Título: **Alfa-glucano ramificado, alfa-glucosiltransferasa que forma glucano, su preparación y usos**

30 Prioridad:

**26.04.2007 JP 2007117369**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**28.05.2020**

73 Titular/es:

**HAYASHIBARA CO., LTD. (100.0%)  
675-1, Fujisaki, Naka-ku  
Okayama-shi, Okayama, JP**

72 Inventor/es:

**WATANABE, HIKARU;  
YAMAMOTO, TAKUO;  
NISHIMOTO, TOMOYUKI;  
TSUSAKI, KEIJI;  
OKU, KAZUYUKI;  
CHAEN, HIROTO y  
FUKUDA, SHIGEHARU**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 763 306 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Alfa-glucano ramificado, alfa-glucosiltransferasa que forma glucano, su preparación y usos

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un uso de una  $\alpha$ -glucosiltransferasa para formar un  $\alpha$ -glucano ramificado, a un microorganismo capaz de producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y a un proceso para producir el  $\alpha$ -glucano ramificado. El  $\alpha$ -glucano ramificado está formado por moléculas de glucosa y se ha caracterizado mediante análisis de metilación del siguiente modo:

(1) la relación entre 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol está en el intervalo de 1:0,6 a 1:4;

(2) el contenido total de 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol es un 60 % o más en los glucitol acetatos parcialmente metilados;

(3) el contenido de 2,4,6-trimetil-1,3,5-triacetil-glucitol es de 0,5 % o mayor, pero inferior al 10 % en los glucitol acetatos parcialmente metilados; y

(4) el contenido de 2,4-dimetil-1,3,5,6-tetraacetil-glucitol es de 0,5 % o mayor en el glucitol acetato parcialmente metilado.

20 **Técnica anterior**

La expresión "fibra de la dieta" significa inherentemente componentes celulares de las plantas que apenas son digeribles por los animales, tales como celulosa, lignina, hemicelulosa, pectina etc., no obstante, en sentido amplio, incluye polisacáridos hidrosolubles poco digeribles que no son digeridos por las amilasas. Dichos polisacáridos hidrosoluble se denominan "fibra de la dieta hidrosoluble" (en lo sucesivo en el presente documento abreviado simplemente a "WSDF" en esta memoria descriptiva). Recientemente, la fibra dietética atrae la atención a sus funciones como prebióticos que mejoran la flora bacteriana en el intestino, además de sus funciones inherentes de regulación de las funciones del intestino, disminución de los niveles de colesterol en sangre y control de los niveles de azúcar en sangre. Sin embargo, en general se reconoce que la fibra dietética y el calcio son elementos nutricionales que están en cantidades insuficientes en la vida de la dieta japonesa. Se ha destacado que, actualmente, la ingesta promedio de WSDF en los japoneses es de únicamente del 50 al 80 % de la ingesta objetivo, de 20 a 25 g/día, recomendada en "Nutritional Requirement in Japanese", 5ª edición (1994) (Ref. "Market Trend of Dietary Fiber", Shokuhin-To-Kaihatsu (Food processing and ingredients), Vol. 34, N.º 2, pág. 24-27 (1999) (en japonés)). En estas circunstancias, se han propuesto diversos polisacáridos poco digeribles, que pueden utilizarse como materiales para diversos alimentos y bebidas y útiles como WSDF.

Por ejemplo, los polisacáridos presentes en la naturaleza o sus productos modificados, tales como almidón poco digerible (almidón de maíz de alto contenido en amilosa tratado con calor húmedo), hidrolizado de goma guar, glucomanano y alginato de bajo peso molecular están disponibles comercialmente como WSDF. Sin embargo, ya que tienen viscosidades relativamente altas y defectos de deterioro del gusto y la textura cuando se incorporan en alimentos y bebidas, sus usos se limitan a un abanico estrecho. Al mismo tiempo, "POLYDEXTROSE®" (desarrollado por Pfizer Inc., EE.UU.) y las dextrinas poco digeribles se utilizan ampliamente en el campo de los alimentos y las bebidas como WSDF con viscosidad baja. "POLYDEXTROSE®" es un polisacárido sintético obtenido mediante las etapas de calentar glucosa, sorbitol y ácido cítrico en una condición de alto vacío; y polimerizarlos mediante la reacción química. Se sabe que "POLYDEXTROSE®" tiene estructuras ramificadas complicadas de la unión de glucosas mediante enlaces 1,3-, 1,4-, 1, 6-, 1,2,6- y 1,4,6-glucosídicos. Por otro lado, la dextrina poco digerible es un polisacárido sintético cuya digestibilidad se reduce mediante la inducción de enlaces 1,1-, 2-, 1,3-, 1,2, 4-, y 1,3,4-glucosídicos, no presentes de forma inherente en el almidón, formados por transglucosilación y reacción inversa durante la hidrólisis química del almidón. La dextrina poco digerible se produce mediante las etapas de añadir una pequeña cantidad de ácido clorhídrico al almidón, calentar la mezcla en una forma de polvo para obtener dextrina tostada, disolver la dextrina tostada resultante en agua, hidrolizar la dextrina tostada mezclando con  $\alpha$ -amilasa, purificar la solución resultante con una viscosidad baja, concentrar la solución y secar la dextrina con un secador por pulverización. Como dextrina poco digerible, se ha comercializado otro producto, producido mediante las etapas de permitir que la glucoamilasa actúe sobre la dextrina poco digerible anterior hidrolizando la parte digerible en glucosa, eliminando glucosa resultante, purificando y secando la dextrina con secador por pulverización para reducir aún más la digestibilidad. Sin embargo, puesto que la dextrina poco digerible no se puede obtener con un rendimiento alto a partir de almidón de material y produce fácilmente el deterioro del color, estas características son problemas en la producción industrial de la dextrina poco digerible. Se ha informado de que los enlaces glucosídicos inducidos recientemente en "POLYDEXTROSE®" y la dextrina poco digerible incluyen ambas formas anoméricas  $\alpha$  y  $\beta$  y la reducción de la glucosa terminal de ellas se convierten parcialmente en 1,6-anhidro-glucosa (Ref. "Low-molecular weight water-soluble dietary fiber", parte de una serie de Science of Dietary Fibers, pág. 116-131, publicado por Asakura Shoten (1997)).

Entre los enlaces glucosídicos (en lo sucesivo en el presente documento "enlace glucosídico" se abrevia simplemente a "enlace" en la presente memoria descriptiva), que es un modo de unión de la glucosa en el glucano, el

enlace  $\alpha$ -1,6 es menos hidrolizable por la amilasa que el enlace  $\alpha$ -1,4. Por tanto, cabe esperar que el glucano rico en enlaces  $\alpha$ -1,6 se pueda utilizar como WSDF. Por ejemplo, el dextrano, producido a partir de sacarosa como material mediante la acción de la dextranosacarasa (EC 2,4.1,5) de *Leuconostoc mesenteroides*, perteneciente a las bacterias del ácido láctico, es un glucano donde las glucosas se polimerizan principalmente mediante enlaces  $\alpha$ -1,6 y pueden tener ramas mediante enlaces  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,3. En el caso de utilizar dextranosacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, el dextrano resultante tiene enlaces  $\alpha$ -1,6 en la relación del 90 % o superior en los enlaces del dextrano y cabe esperar que sea un glucano poco digerible. No obstante, el dextrano no se puede obtener en un rendimiento alto de sacarosa, requiere un complicado procedimiento de purificación debido a su elevada viscosidad y aumenta los costes. Por lo tanto, no se ha intentado usar el dextrano como WSDF.

Se ha propuesto un método para preparar WSDF permitiendo que la amilasa actúe sobre el almidón de bajo coste para hidrolizar el enlace  $\alpha$ -1,4 para aumentar relativamente el contenido los enlaces  $\alpha$ -1,6. La patente japonesa Kokai N.º 11,101/2001 divulgó un método para preparar una dextrina ramificada donde la proporción de enlaces alfa-1,6 y enlaces  $\alpha$ -1,4 se aumenta a de 10 a 20 % mediante las etapas de permitir que la  $\alpha$ -amilasa y la  $\beta$ -amilasa actúen sobre almidón licuado y recoger la dextrina residual. No obstante, el rendimiento de la dextrina ramificada a partir de almidón de material es relativamente bajo y la reducción de la digestibilidad no puede esperarse debido a que la dextrina ramificada se produce mediante un método para aumentar la proporción de enlaces  $\alpha$ -1,6, manteniendo las ramas inherentes (enlaces alfa-1,6) en el almidón y eliminando la cadena de glucosa donde las glucosas se polimerizan mediante enlaces  $\alpha$ -1,4. Al mismo tiempo, la dextrina dextranasa (EC 2,1.1,2) es una enzima bien conocida que actúa sobre el hidrolizado parcial de almidón (dextrina) e induce enlaces  $\alpha$ -1,6 en su molécula (ref. Kazuya Yamamoto et al., Bioscience, Biotechnology, y Biochemistry, Vol. 56, pág. 169-173 (1992) ). La dextrina dextranasa es una enzima que actúa sobre hidrolizado parcial de almidón y forma dextrano que tiene una estructura de glucosas polimerizantes mediante enlaces alfa-1,6 catalizando principalmente la reacción de transferencia de  $\alpha$ -1,6-glucosilo. Sin embargo, hay problemas en la dextrina dextranasa bien conocida de *Acetobacter capsulatum* perteneciente a las bacterias del ácido acético en cuanto a que la proporción del enlace  $\alpha$ -1,6 inducible en la molécula es relativamente baja (Ref. Masayuki Suzuki et al. Journal of Applied Glycoscience, Vol. 48, N.º. 2, pág. 143-151 (2001) ), y la enzima es inestable. Por lo tanto, la enzima no se ha utilizado en la práctica. En estas circunstancias, son muy deseados un nuevo glucano poco digerible y un proceso para producir el mismo se para aumentar las opciones de WSDF.

El documento US 5.344.824 desvela un compuesto alimentario para salvar la secreción de insulina que comprende un producto refinado de pirodextrina obtenido como un principio activo a través de un proceso de descomposición de almidón o hidrolizado de almidón mediante calentamiento en presencia de un ácido o sin ácido.

### 35 Divulgación de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un uso de una  $\alpha$ -glucosiltransferasa según la reivindicación 1. En otro aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo capaz de producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa según la reivindicación 4. En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona un proceso para producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa según la reivindicación 5. Aspectos adicionales de la invención proporcionan procesos para producir  $\alpha$ -glucanos ramificados según las reivindicaciones 6 y 11. Determinados aspectos más específicos se definen en las reivindicaciones dependientes.

Los presentes inventores han sometido a detección selectiva extensa de microorganismos capaces de producir una enzima que forma un  $\alpha$ -glucano ramificado que tiene un número relativamente grande de ramificaciones utilizando, como sustratos, maltosa y/o  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior. (en esta memoria descriptiva, "rama" significa enlace glucosídico distinto del enlace  $\alpha$ -1, 4 en el glucano.) Como resultado, los presentes inventores aislaron microorganismos, PP710 y PP349, a partir de muestras de suelo y encontraron que los microorganismos producen extracelularmente una nueva  $\alpha$ -glucosiltransferasa que forma un  $\alpha$ -glucano ramificado que tiene enlaces  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,6,  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4,6 y  $\alpha$ -1,3,6 en su estructura cuando se deja actuar sobre maltosa y/o  $\alpha$ -1, 4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior. Adicionalmente, los presentes inventores encontraron que la nueva enzima produce de manera eficiente el  $\alpha$ -glucano ramificado a partir de  $\alpha$ -glucano, tal como hidrolizado parcial de almidón y el  $\alpha$ -glucano ramificado que está construido por moléculas de glucosa y caracterizado mediante análisis de metilación del siguiente modo:

- (1) la relación entre 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol está en el intervalo de 1: 0,6 a 1: 4;
- (2) el contenido total de 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol es un 60 % o más en el los glucitol acetatos parcialmente metilados;
- (3) el contenido de 2,4,6-trimetil-1,3,5-triacetil-glucitol es de 0,5 % o mayor, pero inferior al 10 % en los glucitol acetatos parcialmente metilados; y
- (4) el contenido de 2,4-dimetil-1,3,5,6-tetraacetil-glucitol es de 0,5 % o mayor en los glucitol acetatos parcialmente metilados.

Asimismo, los presentes inventores encontraron que una amilasa que degrada el almidón está presente en la preparación en bruto de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida mediante el cultivo de PP710, como enzima concomitante.

Se descubrió que puede producirse un  $\alpha$ -glucano ramificado con un contenido de WSDF relativamente más alto mediante el uso de la preparación de la enzima en bruto o de la amilasa y la  $\alpha$ -glucosiltransferasa purificadas en combinación, en comparación con el caso de utilizar solo  $\alpha$ -glucosiltransferasa. Adicionalmente se descubrió que el peso molecular promedio en peso y el contenido en la WSDF de  $\alpha$ -glucano ramificado se pueden controlar mediante el uso de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa junto con amilasas y enzimas desramificantes de almidón bien conocidas como sustituyente de la amilasa. Además, los presentes inventores descubrieron que el  $\alpha$ -glucano ramificado, que puede obtenerse por los métodos anteriores, muestra una proporción relativamente mayor de enlaces alfa-1,6 que el  $\alpha$ -1,4 glucano del material; una digestibilidad significativamente baja que es útil como WSDF; y los efectos de la inhibición de la elevación del nivel de azúcar en sangre y disminución de los lípidos en los organismos vivos. Sobre la base de los conocimientos anteriores, los presentes inventores lograron la presente invención.

Se proporciona en el presente documento un  $\alpha$ -glucano ramificado, que está formado por moléculas de glucosa y se ha caracterizado mediante análisis de metilación del siguiente modo:

- (1) la relación entre 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol está en el intervalo de 1: 0,6 a 1: 4;
- (2) el contenido total de 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol es un 60 % o más en el los glucitol acetatos parcialmente metilados;
- (3) el contenido de 2,4,6-trimetil-1,3,5-triacetil-glucitol es de 0,5 % o mayor, pero inferior al 10 % en los glucitol acetatos parcialmente metilados; y
- (4) el contenido de 2,4-dimetil-1,3,5,6-tetraacetil-glucitol es 0,5 % o superior en los glucitol acetatos parcialmente metilados; una nueva  $\alpha$ -glucosiltransferasa que forma el  $\alpha$ -glucano ramificado; su preparación y usos.

De acuerdo con la presente invención se puede producir un  $\alpha$ -glucano, ramificado que tiene color blanco, baja digestibilidad y utilidad como WSDF con un rendimiento alto, gran cantidad y costes bajos.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una comparación de los cromatogramas de HPLC de filtración en gel de los glucanos A y B, preparados, respectivamente, a partir de hidrolizado parcial de almidón mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710 y a partir de *Arthrobacter globiformis* PP349, y el del hidrolizado parcial de almidón usado como sustrato para las enzimas

La figura 2 muestra los diagramas de referencia de las estructuras del hidrolizado parcial de almidón y del  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación.

La figura 3 muestra la temperatura óptima de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710.

La figura 4 muestra el pH óptimo de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710.

La figura 5 muestra la estabilidad térmica de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710.

La figura 6 muestra la estabilidad al pH de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710.

La figura 7 muestra la temperatura óptima de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349.

La figura 8 muestra el pH óptimo de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349.

La figura 9 muestra la estabilidad térmica de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349.

La figura 10 muestra la estabilidad al pH de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349.

La figura 11 muestra la temperatura óptima de la amilasa de *Bacillus circulans* PP710.

La figura 12 muestra el pH óptimo de la amilasa de *Bacillus circulans* PP710.

La figura 13 muestra la estabilidad térmica de la amilasa de *Bacillus circulans* PP710.

La figura 14 muestra la estabilidad al pH la amilasa de *Bacillus circulans* PP710.

La figura 15 muestra la comparación de los cromatogramas de HPLC en filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado mediante el uso de preparaciones purificadas de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y amilasa de *Bacillus circulans* PP710 en combinación, y el del hidrolizado parcial de almidón usado como sustrato para las enzimas.

La figura 16 muestra la comparación de los cromatogramas de HPLC en filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado mediante el uso de preparaciones purificadas de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y la isoamilasa de *Bacillus circulans* PP710 en combinación, y el del hidrolizado parcial de almidón usado como sustrato para las enzimas.

La figura 17 muestra la comparación de los cromatogramas de HPLC en filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado mediante el uso de preparaciones purificadas de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus circulans* PP710 en combinación, y el del hidrolizado parcial de almidón usado como sustrato para las enzimas.

La figura 18 muestra la comparación de los cromatogramas de HPLC en filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado mediante el uso de preparaciones purificadas de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y de *Bacillus circulans* PP710 y CGTasa en combinación, y el del hidrolizado parcial de almidón usado como sustrato para las enzimas.

La figura 19 muestra la comparación de los cromatogramas de HPLC en filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado mediante el uso de preparaciones purificadas de  $\alpha$ -glucosiltransferasa, isoamilasa de *Bacillus circulans* PP710 y CGTasa en combinación, y el del hidrolizado parcial de almidón usado como sustrato para las enzimas.

#### Explicación de los símbolos

En la figura 1 y las figures 15 a 19,

- A: Posición de elución que corresponde al peso molecular de 1.000.000 dalton  
 B: Posición de elución que corresponde al peso molecular de 100.000 dalton  
 C: Posición de elución que corresponde al peso molecular de 10.000 dalton  
 D: Posición de elución que corresponde al peso molecular de 1.000 dalton  
 E: Posición de elución que corresponde al peso molecular de 100 dalton

5

En la figura 1,

- 10 a: Cromatograma de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato  
 b: Cromatograma de HPLC de filtración en gel del glucano A  
 c: Cromatograma de HPLC de filtración en gel del glucano B

- 15 1: Posición que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 499  
 2: Posición que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 6,3  
 3: Posición que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 384  
 4: Posición que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 22,2  
 5: Posición que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 10,9  
 6: Posición que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 1  
 20 7: Posición que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 433  
 8: Posición que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 22,8  
 9: Posición que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 10,9  
 10: Posición que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 1

25 En la figura 2,

- 1: Diagrama de referencia del hidrolizado parcial de almidón  
 2: Diagrama de referencia del  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente invención

30 a: Resto de glucosa terminal no reductor

b: Resto de glucosa que implica enlaces  $\alpha$ -1,3

35 c: Resto de glucosa que implica enlaces  $\alpha$ -1,4

d: Resto de glucosa que implica enlaces  $\alpha$ -1,6

e: Resto de glucosa que implica enlaces  $\alpha$ -1,3,6

40 f: Resto de glucosa que implica enlaces  $\alpha$ -1,4,6

Línea diagonal discontinua: Enlace  $\alpha$ -1,3

Línea horizontal continua: Enlace  $\alpha$ -1,4

45

Línea vertical continua: Enlace  $\alpha$ -1,6

En la figura 13,

- 50 ●: En ausencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$   
 ○: En presencia de ion  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM

En la figura 15,

- 55 a: cromatograma de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato  
 b: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,1 unidades/g de sustrato de la amilasa  
 c: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,2 unidades/g de sustrato de la amilasa  
 60 d: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,5 unidades/g de sustrato de la amilasa  
 e: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 1 unidades/g de sustrato de la amilasa

65 En la figura 16,

- a: cromatograma de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato  
 b: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 50 unidades/g de sustrato de la isoamilasa  
 5 c: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 200 unidades/g de sustrato de la isoamilasa  
 d: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 500 unidades/g de sustrato de la isoamilasa  
 e: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 1.000 unidades/g de sustrato de la isoamilasa

10 En la figura 17,

- a: cromatograma de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato  
 15 b: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,1 unidades/g de sustrato de la  $\alpha$ -amilasa  
 c: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,2 unidades/g de sustrato de la  $\alpha$ -amilasa  
 d: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,5 unidades/g de sustrato de la  $\alpha$ -amilasa  
 20 e: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 1,0 unidades/g de sustrato de la  $\alpha$ -amilasa

En la figura 18,

- 25 a: cromatograma de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato  
 b: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,1 unidades/g de CGTasa  
 c: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,2 unidades/g de CGTasa  
 30 d: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,5 unidades/g de CGTasa  
 e: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 1,0 unidades/g de CGTasa

35 En la figura 19,

- a: cromatograma de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato  
 b: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 50 unidades/g de sustrato de la isoamilasa y 1 unidad/g de sustrato de CGTasa  
 40 c: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 200 unidades/g de sustrato de la isoamilasa y 1 unidad/g de sustrato de CGTasa  
 d: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 500 unidades/g de sustrato de la isoamilasa y 1 unidad/g de sustrato de CGTasa  
 45 e: cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado utilizando 10 unidades/g de sustrato de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 1.000 unidades/g de sustrato de la isoamilasa y 1 unidad/g de sustrato de CGTasa

50 **Descripción detallada**

El término "glucano", como se hace referencia en el presente documento significa un oligosacárido o polisacárido, con un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior, que está formado por moléculas de glucosa. El  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación es un  $\alpha$ -glucano construido por moléculas de glucosa y muestra las siguientes características mediante el análisis de metilación:

- (1) la relación entre 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol está en el intervalo de 1: 0.6 a 1: 4;  
 60 (2) el contenido total de 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol es un 60 % o más en el los glucitol acetatos parcialmente metilados;  
 (3) el contenido de 2,4,6-trimetil-1,3,5-triacetil-glucitol es de 0,5 % o mayor, pero inferior al 10 % en los glucitol acetatos parcialmente metilados; y  
 (4) el contenido de 2,4-dimetil-1,3,5,6-tetraacetil-glucitol es de 0,5 % o mayor en los glucitol acetatos parcialmente metilados.  
 65

La expresión "análisis de metilación", como se hace referencia en el presente documento, significa un método generalmente conocido para determinar los enlaces de monosacárido como el componente de polisacáridos u oligosacáridos. El análisis de los enlaces glucosídicos en un glucano mediante el análisis de metilación se lleva a cabo por las siguientes etapas de:

- 5 metilación de todos los grupos hidroxilo libres de los restos de glucosa que constituyen el glucano;
- Hidrólisis del glucano completamente metilados;
- reducción de las glucosas metilados resultantes para eliminar los anómeros para convertir en glucitoles metilados;
- 10 acetilación de los grupos hidroxilo libres de los glucitoles metilados para convertirlos en los glucitol acetatos parcialmente metilados (en adelante en el presente documento, "glucitol acetato parcialmente metilado" se puede abreviar a "producto parcialmente metilado" abreviando las posiciones acetiladas y "glucitol acetato" en esta memoria descriptiva) ; y
- 15 análisis de los productos parcialmente metilados resultantes mediante cromatografía de gases.

Varios productos parcialmente metilados, derivados de restos de glucosa, respectivamente, diferentes en el enlace glucosídico en el glucano, pueden representarse mediante el porcentaje (%) del área del pico por el área del pico total de todos los productos parcialmente metilados en el cromatograma de gases. Después, a partir del área del pico (%), se puede determinar la relación del resto de glucosa diferente en el enlace, es decir, la relación de cada enlace glucosídico. En esta memoria descriptiva, la "relación" de los productos parcialmente metilados se define como la relación del área del pico en el cromatograma de gases obtenido mediante el análisis de metilación. Asimismo, " %" de los productos parcialmente metilados se define como " % del área del pico" en el cromatograma de gases obtenido mediante el análisis de metilación.

- 25 2,3,6-Trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol (en lo sucesivo en el presente documento abreviado a "producto 2,3,6-trimetilado"), en el punto (1) anterior, significa los restos de glucosa cuya posición C-4 está implicada en el enlace 1,4 y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol (en lo sucesivo en el presente documento abreviado a "producto 2,3,4-trimetilado") significa los restos de glucosa cuya posición C-6 está implicada en el enlace 1,6. Asimismo, "la relación entre el producto 2,3, 6-trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado está en el intervalo de 1:0,6 a 1:4" significa que,
- 30 en el cromatograma de fases de los glucitol acetatos parcialmente metilados en el análisis de metilación, la relación entre los restos de glucosa cuyas posiciones C-6 y C-1 implican en enlace y el contenido total de los restos de glucosa cuyas posiciones C-4 y C-1 implican el enlace y los restos de glucosa cuyas posiciones C-6 y C-1 implican el enlace está en el intervalo de 37,5 a 80,0 %.

- 35 "El contenido total del producto 2,3,6-trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado es del 60 % o mayor en los productos parcialmente metilados", en el punto (2) anterior, significa que en el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación, el contenido total de restos de glucosa cuyas posiciones C-4 y C-1 implican el enlace y los restos de glucosa cuyas posiciones C-6 y C-1 implican el enlace es del 60 % o superior en todos los restos de glucosa que constituyen el glucano.

- 40 De la misma manera, "2,4,6-trimetil-1,3,5-triacetil-glucitol" (en adelante en el presente documento, abreviado como "producto 2,4,6-trimetilado"), en el punto (3) anterior, significa restos de glucosa cuya posición C-3 implica el enlace 1,3. Asimismo, "el contenido del producto 2,4,6-trimetilado es 0,5 % o más pero menos de 10 % en los productos parcialmente metilados" quiere decir que en el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación, el contenido de los restos de glucosa cuyas posiciones C-3 y C-1 implican el enlace es del 0,5 % o mayor pero menor del 10 % en todos los restos de glucosa que constituyen el glucano.

- 50 De un modo similar, "2,4-dimetil-1,3,5,6-tetraacetil-glucitol" (en adelante en el presente documento, abreviado como "producto 2,4-dimetilado"), en el punto (4) anterior significa restos de glucosa cuyas posiciones C-3 y C-6 implican, respectivamente, los enlaces 1,3 y 1,6. Asimismo, "el contenido del producto 2,4-dimetilado es 0,5 % o más en los productos parcialmente metilados" quiere decir que en el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación, el contenido de los restos de glucosa cuyas posiciones C-3 C-6 y C-1 implican el enlace es del 0,5 % o mayor pero menor del 10 % en todos los restos de glucosa que constituyen el glucano.

- 55 El  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación, que cumple las características anteriores (1) a (4), es un nuevo glucano hasta ahora desconocido. El orden de los restos de glucosa de unión en el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente invención no está específicamente limitado en la medida en que cumple las características (1) a (4) anteriores mediante análisis de la metilación.

- 60 Por lo general, el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación está en forma de una mezcla de alfa-glucanos ramificados que tienen varios grados de polimerización de glucosa de 10 o superior. El valor de dividir el peso molecular promedio en peso (Mw) con el peso molecular promedio en número (Mn), Mw/Mn, del  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente invención es, por lo general, menor de 20.

- 65 El  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación se caracteriza por que la isomaltosa se forma, por lo general, en una cantidad de 25 % (p/p) o más, pero menos de 50 % (p/p), en una base de sólido seco del hidrolizado, cuando la

isomaltodextranasa (CE 3.2.1.94), que es una enzima capaz de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4, y  $\alpha$ -1,6 en cuanto a que el enlace es adyacente al lateral terminal reductor de la estructura de la isomaltosa en un glucano, se deja actuar sobre el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación.

5 El  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación se caracteriza por que el contenido de WSDF es, por lo general, del 40 % (p/p) o superior cuando la WSDF se cuantifica de acuerdo con el método descrito en la Sección 8, Dietary fiber, (2) la cromatografía de líquidos de alta resolución (método enzima-HPLC), "Methods for analyzing nutritional components (Apéndice 1-3 de Nutrition Labeling Standard) en Nutrition Labeling Standard (notificación n.º 146 del Ministerio de Salud, trabajo y bienestar, 1986)". El esquema del método de cromatografía de líquidos de alta resolución anterior (en adelante en el presente documento, abreviado como "Método enzima-HPLC") es el siguiente:  
10 Una muestra se hidroliza por una serie de tratamientos enzimáticos usando una  $\alpha$ -amilasa, proteasa y amiloglicosidasa (glucoamilasa) termoestable. A continuación, las proteínas, los ácidos orgánicos y las sales inorgánicas se eliminan de la mezcla tratada con enzimas resultante utilizando resinas de intercambio iónico para hacer una solución de muestra para la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Sucesivamente, la solución de muestra se somete a HPLC de filtración en gel para medir áreas del pico del glucano y la glucosa no digeridos en el cromatograma HPLC. Después, el contenido de WSDF de la muestra se calcula en base a las áreas de los picos y la cantidad de glucosa en la solución de muestra, determinado por separado mediante el método de oxidasa-peroxidasa de glucosa convencional. El método enzima-HPLC también se explica con detalle en los Experimentos descritos más adelante.

20 Como se muestra en el Experimento 9 descrito más adelante, el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación apenas es digerido por la  $\alpha$ -amilasa salival, la  $\alpha$ -amilasa del páncreas y la  $\alpha$ -glucosidasa del intestino delgado cuando se ingiere por vía oral. En consecuencia, el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación se puede utilizar como un WSDF bajo en calorías con una digestibilidad baja, que no estimula la rápida elevación del nivel de azúcar en sangre y la secreción de insulina. Además, el  $\alpha$ -glucano ramificado tiene las características de no inducir la fermentación ácida por los microorganismos en la boca y la inhibición de la formación de glucanos insolubles, que es una causa de la placa dental cuando se utiliza junto con la sacarosa. Por lo tanto, el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación se puede utilizar ventajosamente como un sacárido de anti-cariogénico o de baja actividad cariogénica. Además, el  $\alpha$ -glucano ramificado no muestra toxicidad en el ensayo de toxicidad aguda usando ratones.

30 Como se muestra en los experimentos 20 y 21 descritos más adelante, ya que el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación inhibe la elevación del nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina cuando se ingiere, junto con una sustancia amilácea, en comparación con el caso de la ingestión de una sustancia amilácea solo, se puede utilizar como agente para inhibir la elevación del nivel de azúcar en sangre.

35 Como se muestra en el experimento 22 descrito más adelante, ya que el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación inhibe la acumulación excesiva de lípidos en los cuerpos vivos, que puede usarse como agente para disminuir los lípidos en los cuerpos vivos.

40 En los casos de uso del  $\alpha$ -glucano ramificado como el agente anterior para la inhibición de la elevación del nivel de azúcar en sangre o para la reducción de los lípidos en los cuerpos vivos, el  $\alpha$ -glucano ramificado con un contenido relativamente alto WSDF es preferible para ejercer los efectos. Por lo tanto, es preferible que el contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado sea, por lo general, 40 % (p/p) o superior, de manera deseable, 50 % (p/p) o superior, más deseablemente, 60 % (p/p) o mayor.

45 La " $\alpha$ -glucosiltransferasa", como se hace referencia en el presente documento, significa cualquier enzima que actúa sobre la maltosa y/o el  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior como sustrato y que forma  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación mediante la catálisis de la transferencia de glucosilo sin acción hidrolítica sustancial. La  $\alpha$ -glucosiltransferasa de la presente divulgación es diferente de la  $\alpha$ -glucosidasa conocida de hongos y dextrina-dextranasa del género *Acetobacter* en las características de mostrar actividad hidrolítica débil y actividad de transferencia eficiente en una concentración del sustrato baja y alta sin depender de la concentración del sustrato y de la formación de los enlaces  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,3,6.

50 La actividad enzimática de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de la presente divulgación puede analizarse del siguiente modo: se prepara una solución de sustrato disolviendo maltosa en tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) para dar una concentración final de 1 % (p/v). se añade 0,5 ml de una solución de enzima a 5 ml de la solución del sustrato, y se incuba la solución de la mezcla a 40 °C durante 30 minutos. Después de la reacción, 0,5 ml de la mezcla de reacción se mezclan con 5 ml de tampón de fosfato 20 mM (pH 7,0) y se llevan a ebullición durante 10 minutos para detener la reacción. Sucesivamente, la cantidad de glucosa en la solución se mide por el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa de acuerdo con el método convencional y se calcula la cantidad de glucosa formada en la mezcla de reacción. Una unidad de la actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa se define como la cantidad de enzima que forma un pmol de glucosa por minuto en las condiciones anteriores.

60 La  $\alpha$ -glucosiltransferasa usada en la presente invención tiene las siguientes propiedades fisicoquímicas.

65 (1) Peso molecular



- 90.000 ± 10.000 dalton cuando se determina mediante electroforesis en gel de SDS–poliacrilamida;
- (2) Temperatura óptima  
de 50 a 55 °C cuando se hace reaccionar a pH 6,0 durante 30 minutos;
- 5 (3) pH óptimo  
pH 5,0 a 6,3 cuando se hace reaccionar a 40 °C durante 30 minutos;
- (4) Estabilidad térmica  
Estable hasta 40 °C cuando se incuba a pH 6,0 durante 60 minutos; y
- (5) Estabilidad al pH  
Estable en el intervalo de pH de 3,5 a 8,4 cuando se incuba a 4 °C durante 24 horas;
- 10 Como un ejemplo concreto de la α-glucosiltransferasa usada en la presente invención, se puede enumerar la enzima que tiene las siguientes propiedades fisicoquímicas.
- (1) Peso molecular  
15 90.000 ± 10.000 dalton cuando se determina mediante electroforesis en gel de SDS–poliacrilamida;
- (2) Temperatura óptima  
Aproximadamente 50 °C cuando se hace reaccionar a pH 6,0 durante 30 minutos;
- (3) pH óptimo  
pH de aproximadamente 6,0 cuando se hace reaccionar a 40 °C durante 30 minutos;
- 20 (4) Estabilidad térmica  
Estable hasta 40 °C cuando se incuba a pH 6,0 durante 60 minutos; y
- (5) Estabilidad al pH  
Estable en el intervalo de pH de 4,0 a 8,0 cuando se incuba a 4 °C durante 24 horas;
- 25 La α-glucosiltransferasa usada en la presente invención procede de un microorganismo del género *Bacillus* o *Arthrobacter*. En particular, los microorganismos, PP710 y PP349, aislados del suelo por los presentes inventores pueden usarse, preferentemente, como la fuente. Las siguientes tablas 1 y 2 son los resultados de la identificación de las cepas PP710 y PP349, capaces de producir la α-glucosiltransferasa. La identificación de las cepas se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en "BISEIBUTSU–NO–BUNRUI–TO–DOTEI" (Clasificación e identificación de microorganismos), editado por Takeji Hasegawa, publicado por Japan Scientific Societies Press, Tokio, Japón
- 30 (1985).

Tabla 1

<A: Morfología>	
Características de las células cuando se incuban a 27 °C en agar nutriente	Existentes por lo general en forma de bastón de 0,5 x 1,0 a 2,0 x 6,0 m, no poseen motilidad, forman esporas, Grampositivas,
<B: Propiedad de cultivo>	
Características de las colonias formadas cuando se incuban a 27 °C en placas con agar nutriente	
Forma*	Colonia circular con un diámetro de 1 a 2 mm tras 2 días de incubación
Borde	Todo
Proyección	Semilenticular
Brillo	Mate
Superficie	Lisa
Color	Traslúcido, gris
Características de las colonias formadas cuando se incuban a 27 °C en cultivo inclinado con agar nutriente	
Crecimiento	Medio
Forma*	De tipo hilo
Características de las colonias formadas cuando se incuban a 27 °C en cultivo por picadura con gelatina nutriente	No licuado
<C: Propiedades fisiológicas>	
Prueba VP	Negativa
Formación de indol	Negativa
Formación de dihidroxilacetona	Negativa
Hidrólisis de almidón	Positiva
Formación de pigmentos	No forma pigmentos solubles
Ureasa	Negativa
Oxidasa	Negativa
Catalasa	Positiva
Intervalo de crecimiento	pH: de 5,5 a 10,0, temperatura: de 15 a 37 °C

(continuación)

<A: Morfología>	
Formación de ácidos a partir de D-glucosa	Positiva
Formación de ácidos a partir de D-glucosa	Negativa
Utilización de ácido cítrico	Positiva
Descomposición de tirosina	Negativa
Desaminación de fenilalanina	Negativa
Reducción de nitrato	Positiva
Requisitos de oxígeno	Aerobia
Crecimiento en presencia de lisozima	Positivo
% en moles de guanina (G) más citosina (C) de ADN	53,4 %

Tabla 2

<A: Morfología>	
Características de las células cuando se incuban a 27 °C en agar nutriente	Existentes normalmente en forma de cocos o bacilos de 0,4 x 1,0 a 0,6 x 3,0 µm
	Exhiben polimorfismo que muestra ciclo de bacilo-coco (fase temprana: forma de bacilo, fase tardía: forma de bacilo corto o coco), no poseen motilidad, forman esporas, grampositivos
<B: Propiedad de cultivo>	
Características de las colonias formadas cuando se incuban a 27 °C en placas con agar nutriente	
Forma*	Colonia circular con un diámetro de 1 a 2 mm tras 2 días de incubación
Borde	Todo
Proyección	Semilenticular
Brillo	Brillo húmedo
Superficie	Lisa
Color	Translúcido, maíz
Características de las colonias formadas cuando se incuban a 27 °C en cultivo inclinado con agar nutriente	
Crecimiento	Medio
Forma*	Homogénea
Características de las colonias formadas cuando se incuban a 27 °C en cultivo por picadura con gelatina nutriente	No licuado
<C: Propiedades fisiológicas>	
Requisitos de oxígeno	Aerobia
Diaminoácido mayoritario en la pared celular	Lisina
Peptidoglucano	Lisina, alanina
Tipo N-acilo de la pared celular	Acetilo
Componentes de azúcar mayoritarios que construyen la pared celular	D-Galactosa, D-Glucosa
Catalasa	Positivo
ADNasa extracelular	Positivo
Hidrólisis de almidón	Positivo
Requisito de vitamina	Negativa
Homología del ARNr 16S con el del cultivo de tipo <i>Arthrobacter globiformis</i> (DSM20124)	97 %

- 5 Las propiedades bacteriológicas anteriores de las cepas PP710 y PP349 se compararon con las de los microorganismos conocidos con referencia a "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2 (1986)" y "Ribosomal Database (URL: <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Como resultado, se reveló que las cepas PP710 y PP349 se identificaron, respectivamente, como *Bacillus circulans* y *Arthrobacter globiformis*. Basándose en estos resultados, los presentes inventores nombraron las dos cepas como "*Bacillus circulans* PP710" y "*Arthrobacter globiformis* PP349", y los depositaron el 1 de febrero de 2006, en Patent Organism, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken Japón, y aceptados bajo los números de acceso FERM BP-10771 y FERM BP-10770, respectivamente. Los microorganismos capaces de producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa usada en la presente invención incluyen las cepas anteriores y sus mutantes capaces de producir la enzima en gran cantidad, que son obtenibles mediante inducción de mutaciones en las cepas anteriores y la detección selectiva de mutantes hiperproductores de enzimas.

Se puede utilizar cualquier medio de cultivo nutriente para el cultivo de cualquier microorganismo capaz de producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa usada en la presente invención, siempre que pueda crecer en el mismo y producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa: Por ejemplo, los medios de cultivo naturales y sintéticos pueden utilizarse como medios de cultivo nutrientes. Se puede usar cualquier fuente de carbono siempre que sea utilizado por los microorganismos: Ejemplos de tales fuentes de carbono son sacáridos tales como almidón y fitoglucógeno, obtenible a partir de plantas; glucógeno y pululano, obtenibles a partir de animales y microorganismos; hidrolizados de los mismos, jarabes de glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, y sacáridos; y ácidos orgánicos tales como ácido cítrico y ácido succínico. Las concentraciones de estas fuentes de carbono en medio de cultivo nutriente se eligen apropiadamente. Las fuentes de nitrógeno utilizables son, por ejemplo, compuestos de nitrógeno inorgánico, tales como sales de amonio y nitratos; compuestos de nitrógeno orgánico tales como urea, licor de macerado de maíz, caseína, peptona, extracto de levadura y extracto de carne. Los ingredientes inorgánicos utilizables son, por ejemplo, sales de calcio, sales de magnesio, sales de potasio, sales de sodio, fosfatos, sales de manganeso, sales de cinc, sales de hierro, sales de cobre, sales de molibdeno, y sales de cobalto. Si es necesario, se pueden usar adecuadamente aminoácidos y vitaminas.

Los microorganismos capaces de producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa usada en la presente invención se cultivan en condiciones aerobias, por lo general, a una temperatura en el intervalo de 15 a 37 °C y a un pH en el intervalo de 5,5 a 10, preferentemente, a una temperatura en el intervalo de 20 a 34 °C y a un pH en el intervalo de 5,5 a 8,5. El tiempo de cultivo se establece en un tiempo más largo que el requerido para el crecimiento de los microorganismos, preferentemente de 10 a 150 horas. La concentración de oxígeno disuelto no se limita específicamente, pero, por lo general, es de 0,5 a 20 ppm. La concentración de oxígeno disuelto se puede mantener dentro del intervalo anterior mediante el control de la aireación y agitación. El cultivo puede llevarse a cabo por lotes o de manera continua.

Después de cultivar los microorganismos capaces de producir el  $\alpha$ -glucosiltransferasa de acuerdo con el método descrito anteriormente, se recupera el cultivo que contiene la enzima usada en la presente invención. La principal actividad de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa se encuentra en el sobrenadante libre de células en ambos casos de *Bacillus circulans* PP710, FERM BP-10771 y *Arthrobacter globiformis* PP349, FERM BP-10770. Tanto el sobrenadante libre de células como el caldo de cultivo se pueden utilizar como una preparación de enzima en bruto. Se pueden usar métodos de separación líquido-sólido convencionales para eliminar las células del cultivo. Por ejemplo, los métodos para centrifugar directamente el cultivo resultante, así como aquellos para filtrar el cultivo con filtros recubiertos previamente o para separar las células por filtración de membrana utilizando filtros planos o fibras huecas se pueden usar adecuadamente. Mientras que los sobrenadantes libres de células obtenidos de este modo se pueden usar intactos como una solución de enzima bruta, pueden concentrarse antes de su uso. Los métodos de concentración que puedan utilizarse son, por ejemplo, desplazamiento salino con sulfato de amonio, sedimentación utilizando acetona o alcohol, y concentración usando membranas, tales como filtros planos y fibras huecas.

La  $\alpha$ -glucosiltransferasa puede someterse a la inmovilización convencional usando sobrenadantes libres de células y sus concentrados. Los ejemplos de tales métodos convencionales son métodos de conjugación que usan intercambiadores iónicos, enlaces covalentes y adsorciones utilizando resinas y membranas, y los métodos de inclusión que utilizan sustancias de peso molecular alto.

Como se ha descrito anteriormente, se puede usar una solución de enzima en bruto intacta después de concentrarla como la  $\alpha$ -glucosiltransferasa. Si es necesario, la enzima se puede usar ventajosamente después de la separación o la purificación de la solución de enzima bruta mediante métodos convencionales adecuados usados en el material, por ejemplo, desplazamiento salino, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis preparativa, etc.

El  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior, que puede usarse como un sustrato para la  $\alpha$ -glucosiltransferasa usada en la presente invención incluye almidón, amilosa, amilopectina, glucógeno y sus hidrolizados parciales tales como amilodextrinas, maltodextrinas, maltooligosacáridos, que se pueden obtener mediante hidrólisis parcial con amilasas y ácidos. Los hidrolizados parciales que se pueden obtener por hidrólisis de almidón, amilosa, amilopectina y glucógeno mediante el uso de amilasa, tal como  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1),  $\alpha$ -amilasa, (EC 3.2.1.2), amilasa formadora de maltotetraosa (EC 3.2.1.60), amilasa formadora de maltopentaosa, amilasa formadora de maltohexaosa (EC3.2.1.98), ciclomaltodextrina glucanotransferasa (EC 2.4.1.19, en lo sucesivo en el presente documento abreviado como "CGTasa" en esta memoria descriptiva), etc., descritos en "Handbook of Amylases and Related Enzymes" publicado por Pergamon Press Inc., (Tokio), 1988; se pueden usar como los hidrolizados parciales. Adicionalmente, las enzimas desramificantes de almidón, tales como pululanasa (EC 3.2.1 41) e isoamilasa (EC 3.2.1.68) se pueden usar arbitrariamente para la preparación de los hidrolizados parciales. Tanto los almidones subcelestiales tales como los de maíz, trigo, arroz, etc., como los almidones subterráneos tales como los de patata, boniato, tapioca, etc., pueden usarse como sustratos amiláceos. El sustrato se puede utilizar, preferentemente, en forma de una solución preparada mediante gelatinización y/o licuación del almidón anterior. Adicionalmente, se pueden usar almidón modificado químicamente, obtenido mediante modificación química de una parte de almidón, tal como almidón eterificado (hidroxipropil-almidón, carboximetil-almidón, acetil-almidón, etc.), almidón esterificado (almidón fosforilado, éster de octenilsuccinato de almidón, etc.), almidón reticulado (almidón reticulado mediante acetiladipato, almidón reticulado mediante fosfato,

almidón reticulado mediante hidroxipropilfosfato, etc.), etc., como sustrato de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa.

Cuando se permite que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa usada en la presente invención actúe sobre un sustrato, la concentración del sustrato no está restringida específicamente. Por ejemplo, la reacción mediante la  $\alpha$ -glucosiltransferasa procede a formar el  $\alpha$ -glucano ramificado, incluso en el caso de utilizar una solución de sustrato con una concentración relativamente baja, tal como 0,5 % (p/v). Para la producción industrial, la concentración del sustrato es preferible que sea, por lo general, 1 % (p/v) o superior, preferentemente, de 5 a 60 % (p/v), más preferentemente, de 10 a 50 % (p/v); y el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación se puede producir ventajosamente en dicha condición. La temperatura de reacción usada en la presente reacción enzimática se puede ajustar a una temperatura a la que tiene lugar la reacción, es decir, una temperatura de hasta aproximadamente 60 °C, preferentemente, una temperatura en el intervalo de 30 a 50 °C. El pH de la reacción está controlado en el intervalo de, por lo general, 4 a 8, preferentemente, 5-7. Como la cantidad de enzima y el tiempo de reacción están estrechamente relacionados, las condiciones se eligen de manera adecuada con respecto al progreso de la reacción enzimática objetivo.

El mecanismo de formación del  $\alpha$ -glucano ramificado, cuando se permite que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa actúe en una solución acuosa de almidón, hidrolizado parcial de almidón o amilosa, se estima como sigue:

(1) La enzima actúa sobre la maltosa y/o el  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior como el sustrato y forma el  $\alpha$ -1,4 glucano donde un resto de glucosa se une a través de un enlace  $\alpha$  al grupo hidroxilo en la posición C-4 o C-6 del resto de glucosa terminal no reductor ( $\alpha$ -glucano cuyo grado de polimerización de glucosa se incrementa en uno y el  $\alpha$ -1,4 glucano de polimerización de glucosa se disminuye en uno, principalmente transfiriendo el resto de glucosa terminal no reductor del otro  $\alpha$ -1,4 glucano mediante transglucosilación  $\alpha$ -1,4 o  $\alpha$ -1,6.

(2) La enzima actúa además sobre el  $\alpha$ -1,4 glucano, cuyo grado de polimerización de glucosa se reduce en uno, formado en la etapa (1) anterior; y transfiere un resto de glucosa al grupo hidroxilo en C-4 o C-6 del resto de glucosa terminal no reductor del  $\alpha$ -glucano cuyo grado de polimerización de glucosa se incrementa en uno, también formado en la etapa anterior (1), mediante transglucosilación intermolecular  $\alpha$ -1,4 o  $\alpha$ -1,6 para alargar la cadena de glucosa.

(3) Mediante la repetición de las reacciones en las etapas anteriores (1) y (2), la enzima forma un glucano que tiene enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 de la maltosa y/o  $\alpha$ -glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior.

(4) Aunque la frecuencia es baja, la enzima forma un glucano que tiene enlaces  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4,6 y  $\alpha$ -1,3,6, además de los enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 catalizando la transglucosilación  $\alpha$ -1,3 y la transglucosilación  $\alpha$ -1,4 o  $\alpha$ -1,3 a los restos internos de glucosa que implican enlaces  $\alpha$ -1,6, en el glucano

(5) Como resultado de la repetición de las reacciones en las etapas anteriores (1) a (4), la enzima forma el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación, donde la glucosa está unida principalmente a través de  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 y que tiene enlaces  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4,6 y enlaces  $\alpha$ -1,3,6 en una frecuencia baja.

Se reveló que *Bacillus circulans* PP710, FERM BP-10771, capaz de producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa usada en la presente invención, también produce una amilasa junto con la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de forma simultánea. También se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado con un alto contenido de WSDF puede producirse de forma inesperada cuando se permitió que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y la amilasa actuaran en la maltosa y/o  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o más alta en combinación, en comparación con el caso de utilizar solo la  $\alpha$ -glucosiltransferasa.

Como ejemplo de tal amilasa producida por *Bacillus circulans* PP710, FERM BP-10771, se puede usar la enzima que tiene las siguientes propiedades fisicoquímicas.

(1) Acción

Catalizar la hidrólisis del almidón y la transferencia de grupo glucosilo, formando ciclodextrinas e hidrolizando el pululano para formar panosa;

(2) Peso molecular

58.000  $\pm$  10.000 dalton cuando se determina en

electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida;

(3) Temperatura óptima

55 °C cuando se hace reaccionar a pH 6,0 durante 30 minutos;

(4) pH óptimo

pH 6 a 7 cuando se hace reaccionar a 35 °C durante 30 minutos;

(5) Estabilidad térmica

Estable hasta 40 °C cuando se incuba a pH 6,0 durante 60 minutos; estable hasta 50 °C cuando se incuba a pH 6,0 en presencia de ion  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM; y

(6) Estabilidad al pH

Estable en el intervalo de pH de 4,0 a 8,0 cuando se incuba a 6,0 °C durante 24 horas;

La razón por la que el contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido a partir de hidrolizado parcial de

almidón utilizando la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y la amilasa en combinación, es mayor que el del  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido mediante el uso de solo  $\alpha$ -glucosiltransferasa, se ha sugerido que es que la amilasa transfiere además grupos glucosilo al  $\alpha$ -glucano ramificado formado por la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y el grado de ramificación en el glucano se incrementa.

5 Cuando el  $\alpha$ -glucano ramificado se prepara mediante la reacción enzimática, la distribución del peso molecular del  $\alpha$ -glucano ramificado puede controlarse ventajosamente mediante el uso de una amilasa bien conocida en combinación con la  $\alpha$ -glucosiltransferasa. Asimismo, la digestibilidad o el poder reductor del  $\alpha$ -glucano ramificado se pueden disminuir ventajosamente mediante el uso combinado de las enzimas. Por ejemplo, el  $\alpha$ -glucano ramificado  
10 con una estrecha distribución de peso molecular, baja viscosidad y alto contenido de enlaces  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,6 y  $\alpha$ -1,3,6, que implican la baja digestibilidad, se pueden preparar ventajosamente permitiendo que una enzima, que hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4 internos del almidón en restos de glucosa terminales no reductores recién formados, tales como  $\alpha$ -amilasa y CGTasa, actúe sobre almidón licuado en combinación con la  $\alpha$ -glucosiltransferasa. Además, se puede usar una enzima desramificante de almidón, tal como isoamilasa junto con la  $\alpha$ -glucosiltransferasa para la reducción del intervalo de distribución de peso molecular y la reducción de la viscosidad. Una enzima formadora de sacáridos no reductora (alias "sintasa maltooligosiltrehalosa", (CE 5.4.99.15), divulgada en la patente japonesa Kokai N.º 143,876/95, se puede utilizar junto con la  $\alpha$ -glucosiltransferasa para disminuir el poder reductor del  $\alpha$ -glucano ramificado mediante la conversión parcial de las partes terminales reductoras en la estructura de trehalosa.

20 Además, el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación se puede producir mediante las etapas de cultivar un microorganismo capaz de producir el  $\alpha$ -glucosiltransferasa usada en la presente invención en un medio de cultivo que comprende maltosa y/o  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior y de recoger el  $\alpha$ -glucano ramificado formado a partir del caldo de cultivo.

25 La mezcla de reacción obtenida de este modo mediante la reacción anterior se puede como un producto de  $\alpha$ -glucano ramificado. Opcionalmente, el  $\alpha$ -glucano ramificado que tiene baja digestibilidad se puede preparar mediante las etapas de hidrolizar las partes digestivas en el glucano permitiendo que una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa y  $\alpha$ -glucosidasa actúen sobre la mezcla de reacción, recogieran la fracción no digestiva resultante mediante la separación de métodos, eliminaran los hidrolizados resultantes, tales como glucosa, mediante un tratamiento de fermentación utilizando levadura. Por lo general, la mezcla de reacción que comprende el  $\alpha$ -glucano ramificado se usa después de la purificación. Los métodos convencionales utilizados para la purificación de sacáridos pueden seleccionarse de forma arbitraria como el método de purificación. Por ejemplo, uno o más métodos de purificación seleccionados del grupo que consiste en decoloración con un carbón vegetal activado; desplazamiento salino con resinas de intercambio iónico en forma de H y OH; separación usando disolventes orgánicos tales como alcohol y acetona; y separación utilizando una membrana que tiene una separabilidad adecuada; se pueden utilizar de forma arbitraria.

35 La  $\alpha$ -glucosiltransferasa usada en la presente invención apenas produce oligosacáridos de bajo peso molecular, tales como glucosa y maltosa, cuando se deja que actúe sobre almidón gelatinizado o hidrolizado parcial de almidón con un DE (equivalente de dextrosa) relativamente bajo, preferentemente, DE inferior a 20. Por lo tanto, no es necesario purificar el producto de reacción por cromatografía en columna. Sin embargo, el producto de reacción puede purificarse de forma arbitraria para cualquier propósito. Cuando se utiliza cromatografía de intercambio iónico para la purificación del  $\alpha$ -glucano ramificado, la cromatografía en columna usando una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida, que se describe en las patentes japonesas Kokai n.º 23, 799/83 y 72, 598/83, se pueden usar de forma ventajosa. En este caso, se puede usar uno cualquiera de los métodos de lecho fijo, lecho móvil, y de lecho semimóvil.

40 La solución que contiene el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación obtenido de este modo se puede utilizar intacta. Sin embargo, es preferible hacer el  $\alpha$ -glucano ramificado en forma de polvo mediante secado para la conservación y manipulación. Por lo general, se pueden usar diversos métodos tales como liofilización, secado por pulverización, secado en tambor para el secado. Opcionalmente, el  $\alpha$ -glucano ramificado seco se puede preparar de forma arbitraria en polvo con un tamaño de partícula específica por pulverización, tamizado y granulación.

55 El  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación presenta diversas propiedades, tales como la propiedad de control de la presión osmótica, la propiedad de excipiente, la propiedad que imparte brillo, la propiedad de retención de humedad, la propiedad que imparte viscosidad, la propiedad de adhesión, la propiedad que inhibe la cristalización para otros sacáridos, la propiedad de baja fermentación, etc. Por lo tanto, el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación y las composiciones de sacáridos que comprenden el mismo se puede utilizar ventajosamente como WSDF, agente mejorador de la calidad, estabilizante, excipiente, etc., para diversas composiciones tales como alimentos y bebidas, productos favoritos, piensos, cebos, cosméticos y productos farmacéuticos.

60 El  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación se puede utilizar en combinación con otros edulcorantes, por ejemplo, jarabe de polvo, glucosa, fructosa, azúcar isomerizado, sacarosa, maltosa, trehalosa, miel, azúcar de arce, sorbitol, maltitol, dihidrochalcona, estevióside, esteviosido alfa-glucosilo, edulcorante de *Momordica grosvenori*, glicirricina, taumatina, sucralosa, éster metílico de L-fenilalanina L-aspartilo, sacarina, glicina y alanina; y materiales de carga tales como dextrina, almidón, dextrano y lactosa.

Además, los productos en polvo del  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación se pueden usar arbitrariamente intactos o, si es necesario, después de la mezcla con cargas, excipientes, aglutinantes, etc., y, después, conformarse en varias formas tales como gránulos, esferas, varillas, placas, cubos, etc.

5 Dado que el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación no es apenas digerible cuando se ingiere por vía oral, se puede utilizar ventajosamente como WSDF para productos alimenticios en general. Por ejemplo, se puede utilizar ventajosamente como un agente mejorador de la calidad para diversos condimentos tales como salsa de soja, salsa de soja en polvo, miso, "*funmatsu-miso*" (un miso en polvo), "*moromi*" (un sake refinado), "*hishio*" (una salsa de soja refinada), "*furikake*" (una harina de pescado especiada), mayonesa, aderezos, vinagre, "*sanbai-zu*" (una salsa de azúcar, salsa de soja y vinagre), "*funmatsu-sushi-zu*" (vinagre en polvo para sushi), "*chuka-no-moto*" (una mezcla instantánea para platos chinos), "*tentsuyu*" (salsa para alimentos desecados con grasa japoneses), "*mentsuyu*" (salsa para fideos japoneses), salsa, ketchup, "*yakiniku-no-tare*" (salsa para carne a la parrilla japonesa), curry japonés, mezcla de estofado instantáneo, mezclas de sopa instantánea, "*dashi-no-moto*" (mezcla almacenada instantánea), condimento mixto, "*mirin*" (un sake dulce), "*shin-mirin*" (un mirin sintético), azúcar de mesa y azúcar de café. Además, el  $\alpha$ -glucano ramificado se puede utilizar ventajosamente como WSDF, que puede incorporarse en diversos "*wagashi*" (pasteles japoneses) tales como "*senbei*" (una tortita de arroz), "*arare*" (un cubo de pastel de arroz), "*okoshi*" (un pastel de mijo y arroz), "*gyuhi*" (una pasta de almidón), "*mochi*" (una pasta de arroz) y similares, "*manju*" (bollo con mermelada de judías), "*uiro*" (una gelatina de arroz dulce), "*an*" (mermelada de judías) y similares, "*yokan*" (una gelatina dulce de judías), "*mizu-yokan*" (gelatina blanda de azuki-judías), "*kingyoku*" (un tipo de yokan), gelatina, pao de Castilla, y "*amedama*" (un caramelo japonés); dulces occidentales tales como un bollo, bizcocho, galleta salada, galletas, pastel, pudín, crema de mantequilla, crema pastelera, profiterol, gofre, bizcocho, donut, chocolate, chicle, caramelo, turrón y caramelos; postres congelados tales como helado y sorbetes; jarabes tales como un "*kajitsu-no-syrup-zuke*" (una fruta conservada) y "*korimitsu*" (un jarabe de azúcar para hielo rallado); pastas tales como pasta de harina, pasta de cacahuete y pasta de fruta; frutas y verduras procesadas tales como confitura, mermelada, "*syrup-zuke*" (escabeches de frutas) y "*toka*" (conservas); encurtidos y productos de encurtidos tales como "*fukujin-zuke*" (encurtidos de rábano de color rojo), "*bettara-zuke*" (un tipo de encurtidos de rábano fresco), "*senmai-zuke*" (un tipo de encurtidos de rábano fresco laminado) y "*rakkyo-zuke*" (chalotas en escabeche); premezcla para encurtidos y productos de encurtidos tales como "*takuan-zuke-no-moto*" (una premezcla para rábano en escabeche), y "*hakusai-zuke-no-moto*" (una premezcla para encurtidos de rape blanco); productos cárnicos tales como jamón y salchicha; productos de carne de pescado, tal como jamón de pescado, salchicha de pescado, "*kamaboko*" (una pasta de pescado al vapor), "*chikuwa*" (un tipo de pasta de pescado), y "*tempura*" (una pasta de pescado frita en grasa japonesa); "*chinmi*" (salsa de pepinillo) tal como "*uni-no-shiokara*" (intestinos salados de erizo de mar), "*ika-no-shiokara*" (intestinos salados de calamar), "*su-konbu*" (tangle procesado), "*saki-surume*" (tiras de calamar desecado), "*fugu-no-mirin-boshi*" (pez globo condimentado con mirin desecado), harina de pescado condimentada tal como bacalao del Pacífico, besugo, gamba, etc.; "*tsukudani*" (alimentos hervidos en salsa de soja) tales como los de laver, plantas silvestres comestibles, calamar desecado, peces pequeños y marisco; platos diarios tales como "*nimame*" (judías cocinadas), ensalada de patata y "*konbu-maki*" (un rollo de TANGLE); productos lácteos; productos enlatados y en conserva tales como de carne, carne de pescado, fruta y verduras; bebidas alcohólicas tales como sake sintético, licor fermentado, sake, licor de frutas, cerveza con bajo contenido en malta y cerveza; refrescos tales como café, cacao, zumo, bebidas carbonatadas, bebida de leche agria y bebidas que contienen una bacteria de ácido láctico; productos de alimentos tales como mezcla para pudín instantáneo, mezcla para pasteles calientes instantáneos, zumo instantáneo, café instantáneo, "*sokuseki-shiruko*" (una mezcla instantánea de sopa de judías-azuki con torta de arroz), y mezcla para sopas instantáneas; y otros alimentos y bebidas tales como alimentos sólidos para lactantes, alimentos para terapia, bebidas, alimentos peptídicos y alimentos congelados.

El  $\alpha$ -glucano ramificado se puede usar arbitrariamente como piensos y alimentos para animales domésticos para mejorar las funciones del intestino, mejorar el estreñimiento, inhibir la obesidad de los animales y las mascotas tales como animales domésticos, aves de corral, abejas, gusanos de seda y peces. Asimismo, el  $\alpha$ -glucano ramificado se puede utilizar ventajosamente como un agente mejorador de la calidad y el estabilizador para diversas composiciones, incluyendo productos preferidos, cosméticos y productos farmacéuticos en forma de pasta o líquida, tal como tabaco, cigarrillos, pasta de dientes, lápiz de labios, colorete, crema de labios, medicina líquida interna, comprimido, trocisco, aceite de hígado de bacalao en forma de gotas, refrigerante oral, catechu y gárgaras.

55 Cuando se utiliza como un agente mejorador de la calidad o estabilizante, el  $\alpha$ -glucano ramificado se puede utilizar ventajosamente en sustancias biológicamente activas susceptibles de perder sus ingredientes y actividades eficaces, así como en alimentos para la salud, alimentos funcionales y productos farmacéuticos que contienen las sustancias biológicamente activas. Ejemplos de tales sustancias biológicamente activas son preparaciones líquidas que contienen linfocinas tales como  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y gamma-interferones, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), factor de necrosis tumoral- $\beta$  (TNF- $\beta$ ), factor inhibidor de la migración de macrófagos, factor estimulante de colonias, factor de transferencia e interleucina 2; preparaciones líquidas que contienen hormonas tales como insulina, hormona del crecimiento, prolactina, eritropoyetina, y hormona estimulante del folículo; preparaciones biológicas líquidas, tales como la vacuna BCG, vacuna contra la encefalitis japonesa, vacuna contra el sarampión, vacuna contra la polio con microorganismos vivos, vacuna contra la viruela, toxoide tetánico, antitoxina Trimeresurus e inmunoglobulina humana; preparaciones líquidas que contienen antibióticos, tales como penicilina, eritromicina, cloranfenicol,

tetraciclina, estreptomina, y sulfato de kanamicina; preparaciones líquidas que contienen vitaminas tales como tiamina, riboflavina, ácido L-ascórbico, aceite de hígado de bacalao, carotenoides, ergosterol, tocoferol; ácidos grasos altamente insaturados y sus derivados, tales como EPA, DHA y ácido araquidónico; solución de enzimas tales como lipasa, esterasa, uroquinasa, proteasa,  $\beta$ -amilasa, isoamilasa, glucanasa y lactasa; extractos tales como el extracto de ginseng, extracto de tortuga, extracto de *Chlorella*, extracto de aloe y extracto de propóleo; sustancias biológicamente activas tales como pasta de virus de microorganismos vivos, bacterias de ácido láctico, y levadura, y jalea real. Mediante el uso de  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación como un agente mejorador de la calidad o estabilizante, las sustancias biológicamente activas anteriores pueden prepararse de forma arbitraria en alimentos para la salud, alimentos funcionales y productos farmacéuticos en forma de líquido, pasta o sólido, que tienen una estabilidad y calidad satisfactoriamente altas con menos temor a perder o desactivar sus ingredientes y actividades eficaces.

Los métodos para la incorporación del  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación en las composiciones mencionadas anteriormente son aquellos que lo pueden incorporar antes de la terminación de su procesamiento, y que se pueden seleccionar apropiadamente a partir de los siguientes métodos convencionales; mezclar, amasar, disolver, fundir, empapar, penetrar, dispersar, aplicar, recubrir, pulverizar, inyectar, cristalizar y solidificar. La cantidad del  $\alpha$ -glucano ramificado para incorporar preferentemente en las composiciones finales está por lo general, en una cantidad de 0,1 % o superior, deseablemente, 1 % o superior.

Además, dado que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa usado en la presente invención convierte el  $\alpha$ -1,4 glucano en el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente invención cuando se permite que la enzima actúe en una composición que comprende maltosa y/o  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior, la enzima se puede utilizar como agente mejorador de la calidad para la composición que comprende maltosa y/o  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior.

Además, la  $\alpha$ -glucosiltransferasa usado en la presente invención convierte la maltosa y/o el  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior en el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación y mientras se forma un 25 % (p/p) o superior, pero el 50 % (p/p) o menor, sobre una base de sustrato seco, de isomaltosa mediante hidrólisis del  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación mediante el uso de isomaltodextranasa (CE 3.2.1.94). En consecuencia, se puede producir isomaltosa o una composición de sacárido que comprende la misma a partir de maltosa y/o  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior como material mediante las reacciones de enzima de dos etapas utilizando la  $\alpha$ -glucosiltransferasa e isomaltodextranasa.

Los experimentos siguientes explican la invención con detalle.

#### Experimento 1

Preparación de un glucano usando  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710 (FERM BP-10771)

#### Experimento 1-1

Preparación de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710 (FERM BP-10771)

Se introdujo un medio de cultivo líquido consistente en 1,5 % (p/v) de "PINEDEX® # 4", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, 0,5 % (p/v) de "POLYPEPTONE®", un extracto de levadura comercializado por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokio, Japón, 0,1 % (p/v) de "EXTRACTO DE LEVADURA", un extracto de levadura comercializado por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokio, Japón, 0,1 % (p/v) de fosfato dipotásico, 0,06 % (p/v) de dihidrato de fosfato de sodio, 0,05 % (p/v) de sulfato de magnesio heptahidrato, 0,001 % (p/v) de sulfato de manganeso pentahidrato, 0,001 % (p/v) de sulfato ferroso heptahidrato y agua en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml en una cantidad de 100 ml, esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, y se enfrió. Sucesivamente, el medio de cultivo se inoculó con *Bacillus circulans* PP710, FERM BP-10771, y seguido por el cultivo en condiciones de agitación rotatorio a 27 °C y 230 rpm durante 48 horas para obtener un cultivo de siembra.

Una preparación reciente del mismo medio de cultivo se introdujo en doce matraces Erlenmeyer de 500 ml en cantidades respectivas de 100 ml, se esterilizó por calentamiento y se enfrió a 27 °C. Sucesivamente, un mililitro de cada uno de los cultivos de siembra anteriores se inoculó en el medio y le siguió cultivo en condiciones de agitación rotatoria a 27 °C durante 24 horas. Después de completado el cultivo, el caldo de cultivo se retiró de cada uno de los matraces Erlenmeyer y se centrifugó a 8.000 rpm durante 20 minutos para eliminar las células. La actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa del sobrenadante del cultivo resultante se analizó y se determinó que era de 2,8 unidades/ml. Aproximadamente un litro del sobrenadante del cultivo se sometió a desplazamiento salino mediante la adición de sulfato de amonio para dar, finalmente, 80 % de saturación y mediante reposo a 4 °C durante 24 horas. Los precipitados resultantes se recogieron por centrifugación a 11.000 rpm durante 30 minutos, se disolvieron en tampón de acetato 20 mM (pH 4,5) y se dializaron frente a una preparación fresca del mismo tampón para obtener aproximadamente 20 ml de una solución de enzima en bruto. La solución de enzima en bruto se sometió a

cromatografía en columna de intercambio catiónico utilizando 20 ml de gel "CM Toyopearl 650S™", un gel de intercambio catiónico comercializado por Tosoh Corporation, Tokio, Japón, pre-equilibrada con tampón de acetato 20 mM (pH 4,5). Después de eluir las proteínas no absorbidas, las fracciones activas se eluyeron mediante un gradiente lineal de cloruro de sodio 0-0,5 M. Las fracciones activas, eluidas a aproximadamente 0,18 a 0,45 M de cloruro de sodio, se recogieron y se dializaron frente a tampón de acetato 20 mM (pH 6,0). El dializado resultante se utiliza como una preparación de  $\alpha$ -glucosiltransferasa.

#### Experimento 1-2

##### 10 Preparación de un $\alpha$ -glucano ramificado utilizando $\alpha$ -glucosiltransferasa

Cien mililitros de la preparación de  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida en el Experimento 1-1, se utilizó como una solución de enzima. "PINEDEX® #100", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, se mezcló con la solución de enzima para dar una concentración final de 30 % (p/v), seguido de la reacción enzimática a 40 °C durante 72 horas, y después se calentó a aproximadamente 100 °C durante 10 minutos para detener la reacción. Después de eliminar las sustancias insolubles resultantes por filtración, el filtrado se decoloró y se sometió a desplazamiento salino usando "DIAION™ SK-1B" y "DIAION™ WA30", resinas de intercambio iónico comercializadas por Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japón, y "IRA 411", una resina de intercambio aniónico comercializada por Organo Corporation, Tokio, Japón. La solución resultante se filtró y se concentró usando un evaporador, y se obtuvo una solución de glucano al 30 % (p/p) con un rendimiento de 85,8 %, sobre una base de sólido seco, del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato.

#### Experimento 2

##### 25 Preparación de un glucano usando $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349 (FERM BP-10770)

#### Experimento 2-1

##### 30 Preparación de $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349 (FERM BP-10770)

A excepción de la inoculación de *Arthrobacter globiformis* PP349, FERM BP-10770, en lugar de *Bacillus circulans* PP710, FERM BP-10771, se preparó un cultivo de siembra de acuerdo con el método del Experimento 1-1.

Una preparación reciente del mismo medio de cultivo usado para el cultivo de siembra se introdujo en doce matraces Erlenmeyer de 500 ml en cantidades respectivas de 100 ml, se esterilizó por calentamiento y se enfrió a 27 °C. Sucesivamente, un mililitro de cada uno de los cultivos de siembra anteriores se inoculó y le siguió cultivo en condiciones de agitación rotatoria a 27 °C durante 24 horas. Después de completado el cultivo, el caldo de cultivo se retiró de cada uno de los matraces Erlenmeyer y se centrifugó a 8.000 rpm durante 20 minutos para eliminar las células. La actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa del sobrenadante del cultivo resultante se analizó y se determinó que era de 0,53 unidades/ml. Aproximadamente un litro del sobrenadante del cultivo se sometió a desplazamiento salino mediante la adición de sulfato de amonio para dar, finalmente, 80 % de saturación y mediante reposo a 4 °C durante 24 horas. Los precipitados resultantes se recogieron por centrifugación a 11.000 rpm durante 30 minutos, se disolvieron en tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) y se dializaron frente al mismo tampón para obtener aproximadamente 20 ml de una solución de enzima en bruto. La solución de enzima en bruto se sometió a cromatografía en columna de intercambio aniónico utilizando 20 ml de gel "DEAE-TOYOPEARL™ 650S", un gel de intercambio aniónico comercializado por Tosoh Corporation, Tokio, Japón, pre-equilibrada con tampón de acetato 20 mM (pH 6,0). Después de eluir las proteínas no absorbidas, las fracciones activas se eluyeron mediante un gradiente lineal de cloruro de sodio de cero a 0,5 M. Las fracciones activas, eluidas a aproximadamente 0,05 a 0,2 M de cloruro de sodio, se recogieron y se dializaron frente a tampón de acetato 20 mM (pH 6,0). El dializado resultante se utiliza como una preparación de  $\alpha$ -glucosiltransferasa.

#### Experimento 2-2

##### 55 Preparación de un $\alpha$ -glucano ramificado utilizando $\alpha$ -glucosiltransferasa

Cien mililitros de la preparación de  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida en el Experimento 2-1, se utilizó como una solución de enzima. "PINEDEX® #100", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, se mezcló con la solución de enzima para dar una concentración final de 30 % (p/v), seguido de la reacción enzimática a 40 °C durante 72 horas, y después se calentó a aproximadamente 100 °C durante 10 minutos para detener la reacción. Después de eliminar las sustancias insolubles resultantes por filtración, el filtrado se decoloró y se sometió a desplazamiento salino usando "DIAION™ SK-1B" y "DIAION™ WA30", resinas de intercambio iónico comercializadas por Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japón, y "IRA 411", una resina de intercambio aniónico comercializada por Organo Corporation, Tokio, Japón. La solución resultante se filtró y se concentró usando un evaporador, y se obtuvo una solución de glucano al 30 % (p/p) con un rendimiento de 83,6 %, sobre una base de sólido seco, del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato.



En los siguientes experimentos 3 y 4, los glucanos, obtenidos en los experimentos 1-2 y 2-2, se denominaron "glucano A" y "glucano B", respectivamente, para distinguirlos.

### Experimento 3 (proporcionado por referencia)

5

#### Evaluación del glucano A y B como WSDF

De acuerdo con el método descrito en la Sección 8, Dietary fiber, (2) cromatografía de líquidos de alta resolución (método enzima-HPLC), "Methods for analyzing nutritional components (Apéndice 1–3 de Nutrition Labeling Standard) en Nutrition Labeling Standard (notificación n.º 146 del Ministerio de Salud, trabajo y bienestar, mayo de 1986)", el contenido de WSDF de glucanos A y B se determinó como sigue: Se usó el "KIT DE CONTROL DE LA FIBRA DE LA DIETA, VALORACIÓN TOTAL", un kit para determinar la cantidad total de la fibra de la dieta, comercializado por Sigma-Aldrich Japón, como kit para tratamientos enzimáticos. "PINEDEX® #100", como control 1 se usó un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, que se utiliza para la preparación de glucanos A y B como sustrato. "PINEFIBER®", un glucano poco digerible disponible en el mercado comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, se utilizó como control 2.

20 <Preparación de la solución de muestra para análisis>

A un tubo de ensayo se tomaron muestras de 0,1 g de sólido seco de cada glucano y después se mezclaron con 5 ml de tampón de fosfato de sodio 0,08 M para ajustar el pH a 6,0. Sucesivamente, se mezclaron 0,01 ml de una solución de  $\alpha$ -amilasa termoestable (que deriva de *Bacillus licheniformis* y comercializada por Sigma-Aldrich Japón), unida al kit, con la solución anterior y, a continuación, el tubo que contenía la mezcla se envolvió con papel de aluminio y a ello le siguió la reacción enzimática en un baño de agua en ebullición con agitación a intervalos de 5 minutos durante 30 minutos. Después de la reacción, la mezcla de reacción se enfrió y se ajustó el pH a 7,5 añadiendo 1 ml de la solución de hidróxido sódico 0,275 M. La solución resultante se mezcló adicionalmente con 0,01 ml de una solución de proteasa (que deriva de *Bacillus licheniformis* y comercializada por Sigma-Aldrich Japón), unida al kit, y, a continuación, el tubo que contenía la mezcla se envolvió con papel de aluminio, y a ello le siguió la reacción enzimática en un baño de agua con agitación a 60 °C durante 30 minutos, y después se enfrió. Después de ajustar el pH de la solución resultante después del tratamiento con la proteasa a 4,3 mediante la adición de aproximadamente 1 ml de solución de ácido clorhídrico 0,325 M, la solución resultante se mezcló adicionalmente con 0,01 ml de la solución de amiloglucosidasa (que deriva de *Aspergillus niger* y comercializada por Sigma-Aldrich Japón), unida al kit, y, a continuación, el tubo que contenía la mezcla se envolvió con papel de aluminio, y a ello le siguió la reacción enzimática en un baño de agua con agitación a 60 °C durante 30 minutos, y después se enfrió. Sucesivamente, se sometieron aproximadamente 7 ml de la mezcla de reacción resultante a una columna de intercambio iónico, que se prepara mediante la mezcla de "AMBERLITE™ IRA-67" (forma OH) y "AMBERLITE™ 200CT" (forma H), ambos comercializados por Organo Corporation, Tokio, Japón, en una proporción de 1:1, se eluyó a 1,0 SV para el desplazamiento salino y se eluyó adicionalmente con un volumen de aproximadamente 3 veces de agua desionizada, y después se cargó hasta el volumen total de aproximadamente 28 ml. El eluato se concentró usando un evaporador, se filtró utilizando un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m y después se cargó hasta 25 ml para convertirlo en una solución de muestra para el análisis.

45 <Condiciones de la cromatografía de líquidos de alta resolución>

La solución de la muestra de ensayo, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se sometió a una cromatografía de líquidos de alta resolución en las siguientes condiciones:

50 Columna: "TSK gel™ G2500PWXL" (DI 7,8 mm x longitud 300 mm), producido por Tosoh Corporation, Tokio, Japón; dos columnas se conectaron en serie  
 Eluyente: Agua desionizada  
 Concentración de sacárido de la muestra de ensayo: 0,8 % (p/p)  
 Temperatura de la columna: 80 °C  
 Caudal: 0,5 ml/min  
 55 Detector: Detector del índice de refracción  
 Inyección: 20  $\mu$ l  
 Tiempo para el análisis: 50 minutos

60 <Cálculo del contenido de la fibra dietética en las muestras de ensayo>

En el cromatograma obtenido por la HPLC anterior, el glucano no digerido que permaneció después de los tratamientos enzimáticos se supuso que era WSDF. Se midieron las áreas de los picos de la WSDF y la glucosa formadas por la digestión, respectivamente. Por separado, la cantidad de glucosa en la muestra de ensayo se determinó por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa convencional. Utilizando los valores de las áreas de los picos anteriores y la cantidad de glucosa, la cantidad de la WSDF se calculó mediante la siguiente fórmula 1. Después, el contenido de WSDF en la muestra de ensayo se calculó mediante la siguiente fórmula 2.

Fórmula 1

La cantidad de WSDF\* (mg)

$$= \left\{ \frac{\text{el área del pico de WSDF}}{\text{el área del pico de glucosa}} \right\} \times (\text{La cantidad de glucosa en la solución de la muestra de ensayo})^{**}(\text{mg})$$

\*: Fibra de la dieta hidrosoluble

\*\* : Concentración de glucosa en la solución de la muestra de ensayo (mg/ml) x 25 ml

Fórmula 2

La cantidad de WSDF\* (% , p/p)

$$= \left\{ \frac{\text{La cantidad de WSDF en la muestra de ensayo (mg)}}{\text{La cantidad de la muestra de ensayo (mg)}} \right\} \times 100$$

El contenido de WSDF de los glucanos A y B, calculado por el método enzima-HPLC anterior fue del 42,1 % (p/p) y 41,8 % (p/p), respectivamente. Mientras, en el caso del hidrolizado parcial de almidón, control 1, se hidrolizó completamente en glucosa mediante los tratamientos enzimáticos y se estimó que el contenido de WSDF del hidrolizado parcial de almidón que era cero % (p/p). El de "PINEFIBER®", una dextrina poco digerible comercializada por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, Control 2, se estimó en 48,7 % (p/p). Estos resultados indican que un glucano que muestra el contenido de WSDF casi igual con una dextrina poco digerible comercial se puede preparar fácilmente de acuerdo con la invención permitiendo que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa actúe sobre un hidrolizado parcial de almidón, que no comprende WSDF, como sustrato.

Experimento 4 (proporcionado por referencia)Análisis estructurales de los glucanos A y BExperimento 4-1Análisis de la metilación

Según el método convencional, los glucanos A y B, obtenidos respectivamente en los experimentos 1-2 y 2-2, se sometieron a análisis de la metilación y los productos parcialmente metilados resultantes se sometieron a la cromatografía de gases en las siguientes condiciones, y los resultados se exponen en la Tabla 3.

<Condiciones para la cromatografía de gases>

Columna: "DB-15" (DI 0,25 mm x longitud 30 m, espesor de la película 1  $\mu$ m), una columna capilar producida por J&W Scientific, Tokio, Japón;

Gas portador: Helio

Temperatura de la columna: se mantuvo a 130 °C durante 2 minutos, se calentó a 250 °C a una velocidad de 5 °C/min, y después se mantuvo a 250 °C durante 20 minutos

Caudal: 1,0 ml/min

Detector: FID

Inyección: 3  $\mu$ l (división: 1/30)

Tiempo para el análisis: 46 minutos

Tabla 3

Producto parcialmente metilado	Glc correspondiente**	Composición (área del pico en %)		
		Hidrolizado parcial de almidón* (Material)	Glucano A	Glucano B
Producto 2,3,4,6-tetrametilado	Glc terminal no reductora	5,8	10,1	9,8
Producto 3,4,6-trimetilado	Glc que implica enlace 1,2	0,0	0,0	0,0
Producto 2,4,6-trimetilado	Glc que implica enlace 1,3	0,0	1,1	0,9
Producto 2,3,6-trimetilado	Glc que implica enlace 1,4	89,8	51,5	49,1
Producto 2,3,4-trimetilado	Glc que implica enlace 1,6	0,0	32,2	33,9

(continuación)

Producto metilado parcialmente	Glc correspondiente**	Composición (área del pico en %)		
Producto 2,4-dimetilado	Glc que implica enlace 1,3,6	0,0	0,8	1,1
Producto 2,3-dimetilado	Glc que implica enlace 1,4,6	4,4	4,5	5,2

\*: PINEDEX® #100, un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd.  
 \*\*: Resto de glucosa  
 Glucano A: glucano preparado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de la cepa PP710  
 Glucano B: glucano preparado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de la cepa PP349

Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 3, en ambos casos de los glucanos A y B, el producto 2,3,6-trimetilado se redujo significativamente y el producto 2,3,4-trimetilado aumentó significativamente a 30 % o más en comparación con los resultados de análisis de la metilación de los glucanos A y B, que se prepararon, respectivamente, utilizando  $\alpha$ -glucosiltransferasa derivada de *Bacillus cruculans* PP710 y *Arthrobacter globiformis* PP349; y los del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato. Estos resultados indican que el hidrolizado parcial de almidón que tiene una estructura de polimerización de glucosas principalmente a través de enlaces  $\alpha$ -1,4 se convierte en el  $\alpha$ -glucano ramificado que tiene 30 % o más de enlaces  $\alpha$ -1,6 mediante la reacción de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus cruculans* PP710 y *Arthrobacter globiformis* PP349. También se reveló que los extremos no reductores, los enlaces  $\alpha$ -1,3 y los enlaces  $\alpha$ -1,3,6, se formaron recientemente debido a que el producto 2,3,4,6-tetrametilado, el producto 2,4,6-trimetilado y el producto 2,4-dimetilado también se incrementaron. El contenido del producto 2,4,6-trimetilado y el producto de 2,4-dimetilado en los productos parcialmente metilados del glucano A fueron 1,1 % y 0,8 %, respectivamente. El contenido del producto 2,4,6-trimetilado y el producto de 2,4-dimetilado en los productos parcialmente metilados del glucano B fueron 0,9 % y 1,1 %, respectivamente. Además, se consideró que el contenido del enlace  $\alpha$ -1,4,6, que está inherentemente presente en el sustrato como un punto ramificado, no estaba tan cambiado porque los contenidos de producto 2,3-dimetilado en los productos parcialmente metilados de los glucanos A y B no eran tan diferentes a los del sustrato. A partir de estos resultados, se reveló que los glucanos A y B eran un glucano ramificado ( $\alpha$ -glucano ramificado) que tiene enlaces  $\alpha$ -1,4 y enlaces  $\alpha$ -1,6 como enlace glucosídico mayoritario y enlace  $\alpha$ -1,3 y enlace  $\alpha$ -1,3,6 como menor enlace glucosídico minoritario diferente del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato. También se reveló a partir de sus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtenidos mediante análisis de RMN que todas las formas anómericas de la posición C-1 de la glucosa, que constituyen los glucanos A y B, estaban en la forma  $\alpha$ .

#### 25 Experimento 4-2 (proporcionado por referencia)

##### Digestión con isomaltodextranasa del $\alpha$ -glucano ramificado A y B

Con el fin de caracterizar las estructuras de los  $\alpha$ -glucanos ramificados A y B, se llevó a cabo la digestión de las mismas con isomaltodextranasa. Una solución acuosa del  $\alpha$ -glucano ramificado A o B con una concentración final de 1 % (p/v) se mezcló con 100 unidades/g de sustrato sólido de isomaltodextranasa, derivados de *Arthrobacter globiformis* y se preparó en Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japón; y le siguió la reacción enzimática a pH 5,0 y 50 °C durante 16 horas. Después de detener la reacción, manteniendo a 100 °C durante 10 minutos, la composición de sacáridos en la mezcla de reacción resultante se determinó usando cromatografía de líquidos de alta resolución (en adelante en el presente documento, abreviado como "HPLC") y cromatografía de gases (en adelante en el presente documento, abreviado como "GC"). La HPLC se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

##### <Condiciones de HPLC>

40 Columna: "MCI GEL CK04SS", producido por Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japón; dos columnas se conectaron en serie  
 Eluyente: Agua  
 Temperatura de la columna: 80 °C  
 45 Caudal: 0,4 ml/min  
 Detector: "RID-10A", un detector de índice de refracción producido por Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón.  
 La GC se llevó a cabo después de la conversión de los sacáridos derivados de trimetilsililo (derivados de TMS) y en las siguientes condiciones:

##### 50 <Condiciones para GC>

Columna: "2 % de silicio OV-17 Chromosorb W/AW-DMS", producida por GL Science, Tokio, Japón;  
 Temperatura de la columna: se elevó 160 °C a 320 °C a una velocidad de 7,5 °C/min del gas portador: Nitrógeno  
 Detector: FID.

55

Mediante la digestión con isomaltodextranasa, no se formó isomaltosa a partir del hidrolizado parcial de almidón, el sustrato utilizado para la preparación de  $\alpha$ -glucano ramificado. Por el contrario, la isomaltosa en cantidades de 28,4 % (p/p) y 27,2 % (p/p) se formó a partir  $\alpha$ -glucano ramificado A y B, respectivamente, mediante la digestión. Estos resultados indican que el  $\alpha$ -glucano ramificado A y B tiene una estructura de isomaltosa en cantidades de

aproximadamente 28,4 % (p/p) y 27,2 % (p/p). Además, apoyan los resultados de los análisis de metilación en el Experimento 4-1, que muestran que la proporción de enlaces  $\alpha$ -1,6 está incrementada en el  $\alpha$ -glucano ramificado. Dado que la isomaltodextranasa tiene una especificidad de hidrolizar el enlace  $\alpha$ -glucosídico adyacente a los enlaces reducidos  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4, y  $\alpha$ -1,6, no está claro con detalle cómo la isomaltosa resultante está unida a través de uno cualquiera de los enlaces anteriores.

Experimento 4-3 (proporcionado por referencia)

Digestión doble con  $\alpha$ -glucosidasa/glucoamilasa del  $\alpha$ -glucano ramificado A y B

El ensayo de digestión doble con  $\alpha$ -glucosidasa/glucoamilasa del  $\alpha$ -glucano ramificado A o B se llevó a cabo dejando que "TRANSGLUCOSIDASA AMANO L",  $\alpha$ -glucosidasa de *Aspergillus niger* y glucoamilasa de *Rhizopus* sp. Actuaran simultáneamente en el  $\alpha$ -glucano ramificado A o B. La solución acuosa que contiene  $\alpha$ -glucano ramificado A o B se mezcló con 5.000 unidades/g de sustrato sólido de  $\alpha$ -glucosidasa y 100 unidades/g de sustrato sólido de glucoamilasa y a ello le siguió la reacción enzimática a pH 5,5 y 50 °C durante 16 horas. Después de detener la reacción manteniendo la mezcla de reacción a 100 °C durante 10 minutos, la composición de sacáridos de la mezcla de reacción se analizó por HPLC en las mismas condiciones en el Experimento 4-2. Como resultado, los  $\alpha$ -glucanos ramificados A y B se hidrolizaron sustancialmente en glucosa como en el caso del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato para la preparación de los  $\alpha$ -glucanos ramificados. Estos resultados indican que el  $\alpha$ -glucano ramificado tanto A como B son  $\alpha$ -glucanos construidos por moléculas de glucosa como azúcar componente.

Experimento 4-4 (proporcionado por referencia)

Análisis de la distribución del peso molecular

Las distribuciones de peso molecular de los  $\alpha$ -glucanos ramificados A y B se analizaron mediante la HPLC de filtración en gel convencional. La HPLC de filtración en gel se llevó a cabo mediante las siguientes condiciones:

<Condiciones de HPLC de filtración de gel>

- Columna: "TSK GEL  $\alpha$ -M", producido por Tosoh Corporation, Tokio, Japón; dos columnas se conectaron en serie
- Eluyente: Tampón fosfato sódico 10 mM (pH 7,0)
- Temperatura de la columna: 40 °C
- Caudal: 0,3 ml/min
- Detector: "RID-10A", un detector de índice de refracción producido por Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón.

El peso molecular de los glucanos en las muestras se calculó basándose en la curva de calibración del peso molecular preparada sometiendo al mismo análisis de HPLC de filtración en gel al "pululano estándar para medir el peso molecular", comercializado por Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japón. La figura 1 muestra cromatogramas comparativos de HPLC de filtración en gel de  $\alpha$ -glucanos ramificados A y B (símbolos "b" y "c" en la Figura 1), y "PINEDEX® # 100", el hidrolizado parcial de almidón (símbolo "a" en la Figura 1) que se utiliza como sustrato para la preparación de  $\alpha$ -glucano ramificado A y B. En la figura 1, los símbolos "A", "B", "C", "D", y "E" significan las posiciones del glucano que eluye que tiene un peso molecular de 1.000.000, 100.000, 10.000, 1.000, y 100 dalton, respectivamente. (Asimismo, en los casos de las Figuras 15 y 19 que se mencionan más adelante). Los resultados del análisis de la distribución de peso molecular de las muestras basándose en los cromatogramas de HPLC de filtración en gel se exponen en la Tabla 4.

Tabla 4

Datos analíticos	Hidrolizado parcial de almidón* (material)	Glucano A	Glucano B
Peso molecular promedio en número (Mn) (dalton)	6, 680	3.840	4.050
Peso molecular promedio en peso (Mw) (dalton)	98.890	59.000	65.700
Mw/Mn	14,8	15,4	16,2
Grado promedio de los picos de la polimerización de la glucosa	449 y 6,3	384, 22,2, 10,9, y 1	433, 22,8, 10,9, y 1

(continuación)

Datos analíticos	Hidrolizado parcial de almidón* (material)	Glucano A	Glucano B
*: PINEDEX® #100, un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón			
Glucano A: glucano preparado mediante el uso de $\alpha$ -glucosiltransferasa de la cepa PP710			
Glucano B: glucano preparado mediante el uso de $\alpha$ -glucosiltransferasa de la cepa PP349.			

En el análisis de la distribución del peso molecular, el hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato se caracterizó como una mezcla de sacáridos que muestra dos picos (símbolos "1" y "2" en el cromatograma "a" en la Figura 1) que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 499 y 6,3. Al mismo tiempo, el  $\alpha$ -glucano ramificado A se caracterizó como una mezcla de sacáridos que muestra cuatro picos (los símbolos "3", "4", "5" y "6" en el cromatograma "b" en la Figura 1) que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 384, 22,2, 10,9, y 1. El  $\alpha$ -glucano ramificado B se caracterizó como una mezcla de sacáridos que muestra cuatro picos (los símbolos "7", "8", "9", y "10" en el cromatograma "c" en la Figura 1) que corresponde al grado de polimerización de glucosa de 433, 22,8, 10,9, y 1. Los picos del símbolo "6" y "10" corresponden a la glucosa y los hechos que las cantidades de glucosa son bajas indican que la enzima de *Bacillus circulans* PP710 y *Arthrobacter globiformis* PP349 tiene una actividad hidrolítica relativamente débil. Como es evidente a partir de la Tabla 4, tanto el peso molecular promedio en número como el peso molecular promedio en peso del glucano A y B se redujeron a aproximadamente un 60 % de los del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato, y el glucano A y el glucano B se convirtieron en moléculas con un peso molecular bajo como un todo. El valor de dividir el peso molecular promedio en peso con el peso molecular promedio en número (Mw/Mn), que es un índice de la distribución del peso molecular, no se cambió tanto entre el hidrolizado parcial de almidón, glucano A y glucano B. A partir de los resultados, se consideró que los dos alfa-glucosiltransferasas de *Bacillus circulans* PP710 y *Arthrobacter globiformis* PP349 actúan específicamente sobre los extremos no reductores del hidrolizado parcial de almidón.

A partir de los resultados de la Tabla 3, se reveló que, en el hidrolizado parcial de almidón usado como sustrato, aproximadamente el 90 % de los enlaces glucosídicos son enlaces  $\alpha$ -1, 4 y enlaces  $\alpha$ -1, 4, 6 están ligeramente presentes en la molécula. Por el contrario, se reveló que, en los glucanos A y B, la proporción de enlaces alfa-1,6 con enlaces  $\alpha$ -1,4 es significativamente alta, y el glucano A y el glucano B también tienen enlaces  $\alpha$ 1,3 y enlaces  $\alpha$  1,3,6, además de los enlaces  $\alpha$ -1,4,6. El  $\alpha$ -glucano ramificado que tiene una estructura, como tal, ha sido hasta ahora desconocido.

La estructura del  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación se dedujo en base a los resultados obtenidos por el análisis de metilación. El diagrama de referencia del  $\alpha$ -glucano ramificado se muestra en la figura. 2 junto con el del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato. En la figura. 2, los símbolos "1" y "2" representan, respectivamente, los diagramas de referencia del hidrolizado parcial de almidón usado como sustrato y el  $\alpha$ -glucano ramificado. Además, en la figura 2, los símbolos "a", "b", "c", "d", "e", y "f" representan el resto de glucosa terminal no reductor, el resto de glucosa que implica el enlace  $\alpha$ -1,3 vinculación, que implica el enlace de  $\alpha$ -1,4, que implica el enlace  $\alpha$ -1,6, que implica el enlace  $\alpha$ -1,4,6, respectivamente, en el hidrolizado parcial de almidón y el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación. Además, en los diagramas de referencia, la línea diagonal discontinua, la línea continua horizontal y la línea sólida vertical, entre los restos de glucosa representan el enlace  $\alpha$ -1,3, el enlace  $\alpha$ -1,4, y el enlace  $\alpha$ -1,6, respectivamente

#### Experimento 5

##### Preparación de la $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710

Se introdujo un medio de cultivo líquido consistente en 1,5 % (p/v) de "PINEDEX® # 4", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, 0,5 % (p/v) de "POLYPEPTONE®", un extracto de levadura comercializado por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokio, Japón, 0,1 % (p/v) de "EXTRACTO DE LEVADURA", un extracto de levadura comercializado por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokio, Japón, 0,1 % (p/v) de fosfato dipotásico, 0,06 % (p/v) de dihidrato de fosfato de sodio, 0,05 % (p/v) de sulfato de magnesio heptahidrato, 0,001 % (p/v) de sulfato de manganeso pentahidrato, 0,001 % (p/v) de sulfato ferroso heptahidrato y agua en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml en una cantidad de 100 ml, esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, y se enfrió. Sucesivamente, el medio de cultivo se inoculó con *Bacillus circulans* PP710, FERM BP-10771, y seguido por el cultivo en condiciones de agitación rotatorio a 27 °C y 230 rpm durante 48 horas para obtener un cultivo de siembra.

Aproximadamente 20 l de una preparación reciente del mismo medio de cultivo líquido tal como se utiliza en el cultivo de siembra anterior se introdujeron en un fermentador de 30 l, se esterilizaron por calentamiento, y después se enfriaron a 27 °C y se inocularon con aproximadamente 200 ml del cultivo de siembra, a lo que le siguió el cultivo a 27 °C y a un pH de 5,5 a 8,0 durante 24 horas en condiciones de aireación-agitación. Después de completado el cultivo, el caldo de cultivo resultante se destiló del fermentador y se eliminaron las células mediante centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos y se obtuvieron aproximadamente 18 l de sobrenadante de cultivo. Las actividades de  $\alpha$ -glucosiltransferasa en el caldo de cultivo y el sobrenadante del cultivo se analizaron. Se detectaron

aproximadamente 2,7 unidades/ml y aproximadamente 2,6 unidades/ml de las actividades enzimáticas en el caldo de cultivo y el sobrenadante de cultivo, respectivamente. Se reveló que gran parte de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención, producido por *Bacillus circulans* PP710, se secretó extracelularmente.

5

#### Experimento 6

##### Purificación de la $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710

10 Aproximadamente cuatro litros (actividad total: aproximadamente 1.400 unidades) del sobrenadante del cultivo obtenido en el experimento 5 se sometió a desplazamiento salino mediante la adición de sulfato de amonio para dar, finalmente, 80 % de saturación y mediante reposo a 4 °C durante 24 horas. Los precipitados resultantes se recogieron por centrifugación a 11.000 rpm durante 30 minutos, se disolvieron en tampón de acetato 20 mM (pH 4,5) y se dializaron frente al mismo tampón para obtener aproximadamente 65 ml de una solución de enzima en bruto. La solución de enzima bruta tenía aproximadamente 74 unidades/ml (actividad total: aproximadamente 4.780 unidades) de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa. La solución de enzima en bruto se sometió a cromatografía en columna de intercambio catiónico utilizando 70 ml de gel "CM Toyopearl 650S™", un gel de intercambio catiónico comercializado por Tosoh Corporation, Tokio, Japón. La actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa se adsorbió sobre el gel "CM-TOYOPEARL™ 650S" pre-equilibrado con tampón de acetato 20 mM (pH 4,5) y se eluyó a aproximadamente 0,4 M de cloruro de sodio cuando la elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de cero a 0,5 M de cloruro de sodio. Las fracciones activas se recogieron y se mezclaron con sulfato de amonio para dar una concentración final de 1 M, y después se dejaron reposar a 4 °C durante 24 horas. La solución enzimática se centrifugó para eliminar los precipitados y se sometió a cromatografía en columna hidrofóbica usando 9 ml de gel "BUTYL-TOYOPEARL™ 650M", un gel comercializado por Tosoh Corporation, Tokio, Japón. La actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa se adsorbió sobre gel "BUTYL-TOYOPEARL™ 650M" pre equilibrado con tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) que contiene 1 M de sulfato de amonio y cuando se eluyó con un gradiente lineal decreciente de 1 M a cero M de amonio sulfato, la actividad enzimática eluyó a aproximadamente 0,2 M de sulfato de amonio. Se recogieron las fracciones activas, se dializaron frente a tampón acetato 20 mM (pH 4,5), y se sometieron a cromatografía en columna de intercambio catiónico utilizando 3,3 ml de gel "CM-5PW™", un gel comercializado por Tosoh Corporation, Tokio, Japón. La actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa se adsorbió sobre el gel "CM-5PW™" pre-equilibrado con tampón de acetato 20 mM (pH 4,5) y cuando eluyó a con un gradiente lineal de cero a 1 M de cloruro de sodio, la actividad enzimática eluyó a aproximadamente 0,4 M de cloruro de sodio. Las fracciones activas se recogieron y dializaron frente a tampón de acetato 20 mM (pH 6,0). La cantidad de actividad enzimática, la actividad específica y el rendimiento de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa en cada etapa de purificación se encuentran en la Tabla 5.

35

Tabla 5

Etapa de purificación	Actividad de $\alpha$ -Glucosil-transferasa (unidades)	Actividad específica de $\alpha$ -Glucosil-transferasa (unidades/mg de proteína)	Rendimiento (%)
Sobrenadante del cultivo	10.400	10	100
Solución dializada después del desplazamiento salino con sulfato de amonio	4.780	22,8	46,0
Eluato de la cromatografía de columna de intercambio iónico	3.960	265	38,1
Eluato de la cromatografía en columna hidrofóbica	3.800	307	36,5
Eluato de la cromatografía de columna de intercambio iónico	3.300	327	31,7

La preparación de enzima purificada finalmente de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa se analizó para determinar la pureza por electroforesis en gel usando un gradiente de 5-20 % (p/v) en gel de poliacrilamida y se detectó en el gel como una única banda de proteína, es decir, una preparación de alta pureza.

40

#### Experimento 7

##### Propiedades de la $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710 Experimento 7-1

45

##### Peso molecular

La preparación de enzima purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida por el método del Experimento 6, se sometió a SDS-PAGE (un gradiente en gel de 5 a 20 % (p v) ) y el peso molecular de la enzima se midió en comparación con los marcadores del peso molecular, comercializados por Bio-Rad Japan, Tokio, Japón. Se reveló que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa tiene un peso molecular de 90.000  $\pm$  10.000 dalton.

50

Experimento 7-2Temperatura óptima y el pH óptimo para la reacción enzimática

5 Los efectos de la temperatura y el pH sobre la actividad de la enzima se investigaron mediante la preparación de la enzima purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida por el método del Experimento 6, mediante la variación de la temperatura y el pH en el ensayo de la enzima. Los resultados están en la figura 3 (temperatura óptima) y la figura 4 (pH óptimo), respectivamente. Se reveló que la temperatura óptima de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa fue de 50 a 55 °C cuando se hizo reaccionar a pH 6,0 durante 30 minutos y el pH óptimo fue de 5,0 a 6,3 cuando se hizo reaccionar a 40 °C durante 30 minutos.

Experimento 7-3Estabilidades térmicas y al pH de la enzima

15 La estabilidad térmica y la estabilidad al pH de la enzima se investigaron usando la preparación de enzima purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida por el método del Experimento 6. La estabilidad térmica de la enzima se determinó mediante las etapas de incubar una solución de enzima (tampón de acetato 20 mM, pH 6,0) a diversas temperaturas durante 60 minutos, enfriar en agua, y medir actividad enzimática residual. La estabilidad al pH de la enzima se determinó mediante las etapas de incubar solución de enzima en tampón 20 mM a diversos valores de pH, y a 4 °C durante 24 horas, ajustando el pH a 6,0 y midiendo la actividad enzimática residual. Los resultados están en la figura 5 (estabilidad térmica) y la figura 6 (estabilidad al pH), respectivamente. Como es evidente a partir de los resultados en las figuras 5 y 6, la  $\alpha$ -glucosiltransferasa es estable hasta 40 °C y en el intervalo de pH 3,5 a 8,4.

Experimento 7-4Efectos de iones metálicos sobre la actividad de la enzima

30 Efectos de iones metálicos sobre la actividad de la enzima se investigaron usando la preparación de enzima purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida mediante el método del Experimento 6, en presencia de 1 mM de los respectivos iones metálicos de acuerdo con el método de ensayo. Los resultados se indican en la tabla 6.

35

Tabla 6

Sal metálica	Actividad relativa (%)	Sal metálica	Actividad relativa (%)
Ninguna	100	MgCl <sub>2</sub>	102
CaCl <sub>2</sub>	101	MnCl <sub>2</sub>	99
CoCl <sub>2</sub>	100	NiCl <sub>2</sub>	102
CuCl <sub>2</sub>	52	ZnCl <sub>2</sub>	101
FeCl <sub>2</sub>	91	PbCl <sub>2</sub>	97
FeCl <sub>3</sub>	94	EDTA	99
HgCl <sub>2</sub>	3		

Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 6, se reveló que la actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa fue notablemente inhibida por iones Hg<sup>2+</sup> y moderadamente por iones Cu<sup>2+</sup>, respectivamente.

40 Experimento 8Preparación de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP394 (FERM BP-10700)

45 A excepción de la inoculación de *Arthrobacter globiformis* PP349, FERM BP-10770, en lugar de *Bacillus circulans* PP710, FERM BP-10771, se preparó un cultivo de siembra de acuerdo con el método del Experimento 1-1.

50 Aproximadamente 20 l de una preparación reciente del mismo medio de cultivo líquido tal como se utiliza en el cultivo de siembra anterior se introdujeron en un fermentador de 30 l, se esterilizaron por calentamiento, y después se enfriaron a 27 ° C y se inocularon con aproximadamente 200 ml del cultivo de siembra, a lo que le siguió el cultivo a 27 ° C y a un pH de 5,5 a 7,0 durante 24 horas en condiciones de aireación-agitación. Después de completado el cultivo, el caldo de cultivo resultante se destiló del fermentador y se eliminaron las células mediante centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos y se obtuvieron aproximadamente 18 l de sobrenadante de cultivo. Las actividades de  $\alpha$ -glucosiltransferasa en el caldo de cultivo y el sobrenadante del cultivo se analizaron. Se detectaron aproximadamente 0,36 unidades/ml y aproximadamente 0,42 unidades/ml de las actividades enzimáticas en el caldo de cultivo y el sobrenadante de cultivo, respectivamente. Se reveló que gran parte de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, producida por *Arthrobacter globiformis* PP349, se secretó extracelularmente.

55

Experimento 9Purificación de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP394

- 5 Aproximadamente 18 litros (actividad total: aproximadamente 7.560 unidades) del sobrenadante del cultivo obtenido en el experimento 8 se sometió a desplazamiento salino mediante la adición de sulfato de amonio para dar, finalmente, 80 % de saturación y mediante reposo a 4 °C durante 24 horas. Los precipitados resultantes se recogieron por centrifugación a 11.000 rpm durante 30 minutos, se disolvieron en tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) y se dializaron frente al mismo tampón para obtener aproximadamente 500 ml de una solución de enzima en bruto.
- 10 La solución de enzima bruta tenía aproximadamente 14 unidades/ml (actividad total: aproximadamente 7.000 unidades) de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa. La solución de enzima en bruto se mezcló con sulfato de amonio para dar una concentración final de 2 M, se centrifugó para eliminar precipitados y después se sometió a cromatografía en columna hidrofóbica utilizando 300 ml de gel "PHENYL-TOYOPEARL™ 650M", un gel comercializado por Tosoh Corporation, Tokio, Japón. La actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa se adsorbió sobre gel "PHENYL-TOYOPEARL™ 650M" pre-equilibrado con tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) que contiene 2 M de sulfato de amonio y cuando se eluyó con un gradiente lineal decreciente de 2 M a cero M de amonio sulfato, la actividad enzimática eluyó a aproximadamente 0,6 M de sulfato de amonio. Se recogieron las fracciones activas, se dializaron frente a tampón acetato 20 mM (pH 6,0), y se sometieron a cromatografía en columna de intercambio aniónico utilizando 100 ml de gel "DEAE-TOYOPEARL™ 650S", un gel comercializado por Tosoh Corporation, Tokio, Japón. La actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa se adsorbió sobre el gel "DEAE-TOYOPEARL™ 650S" pre-equilibrado con tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) y cuando eluyó a con un gradiente lineal de cero a 0,5 M de cloruro de sodio, la actividad enzimática eluyó a aproximadamente 0,1 M de cloruro de sodio. La cantidad de actividad enzimática, la actividad específica y el rendimiento de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa en cada etapa de purificación se encuentran en la Tabla 7.

25

Tabla 7

Etapa de purificación	Actividad de $\alpha$ -Glucosil-transferasa (unidades)	Actividad específica de $\alpha$ -Glucosil-transferasa (unidades/mg de proteína)	Rendimiento (%)
Sobrenadante del cultivo	7.560	1,6	100
Solución dializada después del desplazamiento salino con sulfato de amonio	7.000	5,4	92,6
Eluato de la cromatografía en columna hidrofóbica	3.870	130	54,2
Eluato de la cromatografía de columna de intercambio iónico	2.710	415	35,8

La preparación de enzima purificada finalmente de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa se analizó para determinar la pureza por electroforesis en gel usando un gradiente de 5-20 % (p/v) en gel de poliacrilamida y se detectó en el gel como una única banda de proteína, es decir, una preparación de alta pureza.

30

Experimento 10Propiedades de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP39435 Experimento 10-1Peso molecular

- 40 La preparación de enzima purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349, obtenida por el método del Experimento 9, se sometió a SDS-PAGE (un gradiente en gel de 5 a 20 % (p/v)) y el peso molecular de la enzima se midió en comparación con los marcadores del peso molecular, comercializados por Bio-Rad Japan, Tokio, Japón. Se reveló que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa tiene un peso molecular de  $90.000 \pm 10.000$  dalton.

45 Experimento 10-2Temperatura óptima y el pH óptimo para la reacción enzimática

- Los efectos de la temperatura y el pH sobre la actividad de la enzima se investigaron mediante la preparación de la enzima purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349, obtenida por el método del Experimento 9, mediante la variación de la temperatura y el pH en el ensayo de la enzima. Los resultados están en la figura 7 (temperatura óptima) y la figura 8 (pH óptimo), respectivamente. Se reveló que la temperatura óptima de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa fue de aproximadamente 50 °C cuando se hizo reaccionar a pH 6,0 durante 30 minutos y el

50



pH óptimo fue de aproximadamente 6.0 cuando se hizo reaccionar a 40 °C durante 30 minutos.

Experimento 7-3

5 Estabilidades térmicas y al pH de la enzima

La estabilidad térmica y la estabilidad al pH de la enzima se investigaron usando la preparación de enzima purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida por el método del Experimento 9. La estabilidad térmica de la enzima se determinó mediante las etapas de incubar una solución de enzima (tampón de acetato 20 mM, pH 6,0) a diversas temperaturas durante 60 minutos, enfriar en agua, y medir actividad enzimática residual. La estabilidad al pH de la enzima se determinó mediante las etapas de incubar solución de enzima en tampón 20 mM a diversos valores de pH, y a 4 °C durante 24 horas, ajustando el pH a 6,0 y midiendo la actividad enzimática residual. Los resultados están en la figura 9 (estabilidad térmica) y la figura 10 (estabilidad al pH), respectivamente. Como es evidente a partir de los resultados en las figuras 9 y 10, la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención es estable hasta 40 °C y en el intervalo de pH 3,5 a 8,0.

Experimento 7-4

20 Efectos de iones metálicos sobre la actividad de la enzima

Efectos de iones metálicos sobre la actividad de la enzima se investigaron usando la preparación de enzima purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida mediante el método del Experimento 9, en presencia de 1 mM de los respectivos iones metálicos de acuerdo con el método de ensayo. Los resultados se indican en la tabla 8.

25

Tabla 8

Sal metálica	Actividad relativa (%)	Sal metálica	Actividad relativa (%)
Ninguna	100	MgCl <sub>2</sub>	104
CaCl <sub>2</sub>	104	MnCl <sub>2</sub>	103
CoCl <sub>2</sub>	98	NiCl <sub>2</sub>	100
CuCl <sub>2</sub>	45	ZnCl <sub>2</sub>	100
FeCl <sub>2</sub>	91	PbCl <sub>2</sub>	96
FeCl <sub>3</sub>	95	EDTA	99
HgCl <sub>2</sub>	2		

Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 6, se reveló que la actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa fue notablemente inhibida por iones Hg<sup>2+</sup> y moderadamente por iones Cu<sup>2+</sup>, respectivamente.

30 Experimento 11

Acción sobre diversos sacáridos

La especificidad de sustrato de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención se investigó usando varios sacáridos como sustratos. Las soluciones de sustrato se prepararon disolviendo metil- $\alpha$ -glucósido, metil- $\beta$ -glucósido, p-nitrofenil- $\alpha$ -glucósido, p-nitrofenil- $\beta$ -glucósido, glucosa, sacarosa, maltosa, isomaltosa, trehalosa, kojibiosa, nigerosa, neotrehalosa, celobiosa, lactosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa, isomaltotriosa, o isopanosa, en agua. Cada solución de sustrato se mezcló con tampón acetato (pH 6,0) para dar una concentración final de 20 mM y, después, cada una de la solución de sustrato resultante se mezcló adicionalmente con 10 unidades/g de sustrato sólido de la preparación purificada de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710, obtenida por el método del Experimento 6. Sucesivamente, la concentración de sustrato se fijó a 1 % (p/v), seguido de la reacción enzimática a 40 °C y pH 6,0 durante 24 horas. Para examinar los sacáridos en cada mezcla antes y después de la reacción, los sacáridos se separaron por cromatografía en capa fina de gel de sílice (en adelante en el presente documento, simplemente abreviada a "TLC"), utilizando "KIESELGEL™ 60", una placa de aluminio de TLC (10 X 20 cm) y un disolvente (n-butanol/ piridina/agua, relación en volumen de 6: 4: 1) y un método ascendente dos veces. Los sacáridos formados excepto para el sustrato en la placa se detectaron mediante la visualización de las manchas por pulverización de una solución de sulfato-metanol al 10 % y calentamiento. Mediante los análisis TLC anteriores se confirmaron la acción enzimática y el grado de la reacción de la enzima sobre cada sustrato. Los resultados se encuentran en la Tabla 9. Mientras, la especificidad de sustrato de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349 también se investigó mediante el mismo método descrito anteriormente y se confirmó que la especificidad de sustrato de la enzima era similar a la de la enzima a partir de *Bacillus circulans* PP710.

Tabla 9

Sustrato	Acción*	Sustrato	Acción*
Metil- $\alpha$ -glucósido	-	Celobiosa	-
Metil- $\beta$ -glucósido	-	Sacarosa	-

(continuación)

Sustrato	Acción*	Sustrato	Acción*
PNP*– $\alpha$ –glucósido	–	Lactosa	–
PNP*– $\beta$ –glucósido	–	Maltotriosa	++
Glucosa	–	Maltotetraosa	++
Trehalosa	–	Maltopentaosa	++
Neotrehalosa	+	Maltohexaosa	++
Kojibiosa	$\pm$	Maltoheptaosa	++
Nigerosa	+	Isomaltotriosa	+
Maltosa	++	Isopanosa	+
Isomaltosa	+		

Nota: El símbolo "-" significa "no actuó". El símbolo " $\pm$ " significa "actuó ligeramente". El símbolo "+" significa "Actuó". El símbolo "++" significa "Actuó bien".  
\*: p–nitrofenilo

Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 9, la  $\alpha$ -glucosiltransferasa que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención actuó sobre la maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa y maltoheptaosa, y también actuó en nigerosa, isomaltosa, neotrehalosa, isomaltotriosa e isopanosa entre los sacáridos analizados. Además, la enzima actuó ligeramente sobre la kojibiosa. A partir de estos sacáridos, se detectó la formación de productos de transferencia de glucosilo de con hidrolizados. Al mismo tiempo, la  $\alpha$ -glucosiltransferasa no actuó sobre metil- $\alpha$ -glucósido, metil- $\beta$ -glucósido, p-nitrofenil- $\alpha$ -glucósido, p-nitrofenil- $\beta$ -glucósido, trehalosa, celobiosa, sacarosa, lactosa, etc. A partir de estos resultados y el hecho de que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa forma el  $\alpha$ -glucano ramificado a partir del hidrolizado parcial de almidón, se reveló que la enzima actúa ampliamente sobre la maltosa y el  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior, y  $\alpha$ -gluco-oligosacáridos construidos por moléculas de glucosa.

#### Experimento 12

##### Mecanismo de acción

Para investigar el mecanismo de acción de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención, se investigó la estructura del sacárido que se forma al permitir que la enzima actúe sobre un sustrato mínimo, maltosa. Puesto que el resultado obtenido utilizando la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349 era casi igual que con el caso del uso de la enzima de *Bacillus circulans* PP710, este experimento muestra los resultados del caso de la utilización de la enzima a partir de *Bacillus circulans* PP710.

##### Experimento 12-1

##### Producto de maltosa mediante la reacción de la enzima

La solución acuosa de maltosa y tampón acetato (pH 6.0) se mezclaron para dar concentraciones finales de 1 % (p/v) y 10 mM, respectivamente, para preparar una solución de sustrato. La solución de sustrato se mezcló con 10 unidades/g de sustrato sólido de  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida por el método del Experimento 6, seguido de la reacción enzimática a 40 °C y a pH 6,0. Se tomaron muestras de partes alícuotas de la mezcla de reacción con el tiempo y la reacción se detuvo manteniéndola a 100°C durante 10 minutos. Las composiciones de sacáridos de las muestras se midieron por HPLC y GC. La HPLC y la GC se llevaron a cabo en las condiciones descritas en el Experimento 4-2. Los resultados están en la Tabla 10.

Tabla 10  
Composición de sacáridos (% p/p)

Tiempo de reacción (h)	Composición de sacáridos (% p/p)													
	DP1		DP2				DP3				DP4	DP5	DP 6s	
	Glucosa	Maltosa	Isomaltosa	Neotrehalosa	Maltotriosa	Panosa	Isopanosa	Isomaltotriosa						
0	0,0	99,2	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	12,1	55,0	0,7	0,0	13,2	16,1	0,0	0,0	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	18,4	33,5	1,0	0,0	14,4	24,1	0,0	0,0	7,6	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	23,7	17,3	2,5	0,0	10,0	29,3	0,0	0,0	13,0	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0
8	27,0	10,4	4,7	0,0	4,9	27,8	0,0	0,0	15,9	5,3	0,0	0,0	4,0	4,0
24	30,4	6,0	10,0	2,6	1,4	11,0	1,0	3,6	15,3	10,2	0,0	0,0	8,5	8,5
48	31,5	6,2	13,8	3,9	0,7	4,1	1,5	4,2	12,4	10,3	0,0	0,0	11,4	11,4

DP: Grado de polimerización de glucosa

- 5 Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 10, en la etapa inicial (después de una hora) de la reacción, se formaron glucosa, maltotriosa, y panosa como los principales productos de la reacción del sustrato, maltosa, mediante la acción de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa. Además, se formaron oligosacáridos con un grado de polimerización de glucosa de 4 y 5 cuando había transcurrido un tiempo de reacción de 2 a 4 horas. Acompañando con el progreso de la reacción, el contenido de maltotriosa alcanzó un máximo, 14,4 %, en 2 horas y después disminuyó; y el contenido de panosa alcanzó un máximo, 29,3 % a las 4 horas y después disminuyó; y el contenido de isomaltosa se incrementó con la disminución del contenido de maltotriosa y panosa. Además, el contenido de isomaltosa y oligosacáridos con un grado de polimerización de glucosa de 4 o más alto se incrementó hasta 48 horas.
- 10 A partir de estos resultados, se reveló que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención actúa sobre la maltosa y forma glucosa, maltotriosa y panosa catalizando la transferencia de glucosilo  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 en la etapa inicial de la reacción; y forma isomaltosa, que se forma mediante transferencia de  $\alpha$ -1,6 glucosilo a la glucosa, e isopanosa e isomaltotriosa, que se forman por transferencia de  $\alpha$ -1, 4 y  $\alpha$ -1 glucosilo a isomaltosa, acompañados del progreso de la reacción. Dado que la identificación de muchos tipos de oligosacáridos con grado de polimerización de glucosa de 4 o más alto es difícil en este experimento, el mecanismo de reacción de la enzima se investigó en el siguiente experimento 12-2 usando maltopentaosa, cuyo grado de polimerización de glucosa es superior al de la maltosa, como sustrato.

20 Experimento 12-2

Producto de maltopentaosa mediante la reacción de la enzima

- 25 Se preparó una solución de sustrato mezclando una solución acuosa de maltopentaosa y tampón acetato (pH 6,0), para dar concentraciones finales de 1 % (p/v) y 10 mM, respectivamente. Sucesivamente, la solución de sustrato resultante se mezcló con 10 unidades/g de sustrato sólido de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, obtenida mediante el método del Experimento 6, seguida de la reacción de la enzima a pH 6,0 y 40 °C. La evolución temporal de la reacción se investigó como sigue: Se extrajeron muestras de la mezcla de reacción en diversos momentos y se mantuvieron a 100 °C durante 10 minutos para detener la reacción. Las composiciones de sacáridos de las mezclas de reacción se determinaron por HPLC. El análisis de HPLC se llevó a cabo en las condiciones descritas en el Experimento 4-2.
- 30 Además, los sacáridos en la mezcla de reacción se sometieron al análisis de metilación convencional y los productos parcialmente metilados se analizaron mediante cromatografía de gases y la relación de los diversos enlaces glucosídicos en el sacárido se determinó con base en la composición de los productos parcialmente metilados. Además, los sacáridos en la mezcla de reacción se sometieron a digestión con isomaltodextranasa de manera similar al Experimento 4-2. La evolución temporal de la composición de sacáridos en la mezcla de reacción se encuentra en la Tabla 11. Los resultados del análisis de metilación y la digestión con isomaltodextranasa se encuentran en la Tabla 12.

Tabla 11

Tiempo de reacción (h)	Composición de sacáridos (% p/p)								
	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8	DP9 $\leq$
0	0,0	0,0	0,3	1,2	97,4	0,1	0,0	0,0	0,0
1	0,4	1,0	3,4	15,0	53,4	21,9	3,3	0,8	0,1
4	1,2	2,0	7,5	15,2	27,1	25,5	12,3	5,7	3,0
8	2,9	3,4	8,9	12,6	18,2	20,0	14,2	8,9	9,7
24	6,9	3,7	8,1	8,2	12,5	14,2	13,9	11,2	21,1

DP: Grado de polimerización de glucosa

Tabla 12

Tiempo de reacción (h)	Composición del producto parcialmente metilado (área del pico %)								Contenido de isomaltosa* (% p/p)	
	Producto 2,3,4,6-tetrametilado	Producto 3,4,6-trimetilado	Producto 2,4,6-trimetilado	Producto 2,3,6-trimetilado	Producto 2,3,4-trimetilado	Producto 2,4-dimetilado	Producto 2,3-dimetilado			
0	Glc terminal no reductora**	Glc que implica enlace 1,2	Glc que implica enlace 1,3	Glc que implica enlace 1,4	Glc que implica enlace 1,6	Glc que implica enlace 1,3,6	Glc que implica enlace 1,4,6	0,0	0,0	0,0
1	20,0	0,0	0,0	80,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7
4	20,9	0,0	0,1	76,9	1,7	0,0	0,4	0,0	0,4	11,9
8	24,2	0,0	0,8	67,5	7,2	0,0	0,3	0,0	0,3	23,3
24	26,1	0,0	1,0	55,4	16,1	0,7	0,8	0,7	0,8	40,9
	28,6	0,0	0,8	37,0	30,8	1,6	1,2	1,6	1,2	

\*: Después de la digestión isomaltodextranasa

\*\* : Resto de glucosa

Como es evidente a partir de los resultados de las Tablas 11 y 12, en la etapa inicial (después de una hora) de la reacción, se formaron, preferentemente, un oligosacárido cuyo grado de polimerización de glucosa es mayor en uno que el del sustrato y cuyo grado de polimerización de glucosa es inferior en uno que el del sustrato. Basándose en el hecho, se confirmó que la enzima cataliza la transglucosilación. Acompañando con el progreso de la reacción, se formaron productos de reacción con diversos grados de polimerización de glucosa y el contenido de glucanos con un grado de polimerización de glucosa de 9 o más alto alcanzó el 21,1 % a las 24 horas. A partir de los resultados del análisis de metilación, se reveló que acompañando al progreso de la reacción, el contenido de resto de glucosa que implica enlace 1, 4 se disminuyó con el aumento significativo del contenido de resto de glucosa que implica enlace 1,6; y el contenido del resto de glucosa que implica enlace 1,3, que implica enlace 1,4,6 y que implica enlace 1,3,6 aumentaron gradualmente en los productos de reacción. También se reveló que el contenido de isomaltosa después de la digestión con isomaltodextranasa del producto de reacción se incrementó de manera significativa acompañando al progreso de la reacción. Casi los mismos resultados se obtuvieron en el caso de utilizar la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349 para los mismos ensayos.

A partir de los resultados de los experimentos 12-1 y 12-2, el mecanismo de reacción de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención se estimó como sigue:

(1) La enzima actúa sobre la maltosa y/o el  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior como el sustrato y forma el  $\alpha$ -1,4 glucano donde un resto de glucosa se une a través de un enlace  $\alpha$  al grupo hidroxilo en la posición C-4 o C-6 del resto de glucosa terminal no reductor ( $\alpha$ -glucano cuyo grado de polimerización de glucosa se incrementa en uno y el  $\alpha$ -1,4 glucano de polimerización de glucosa se disminuye en uno, principalmente transfiriendo el resto de glucosa terminal no reductor del otro  $\alpha$ -1,4 glucano mediante transglucosilación  $\alpha$ -1,4 o  $\alpha$ -1,6.

(2) La enzima actúa además sobre el  $\alpha$ -1,4 glucano, cuyo grado de polimerización de glucosa se reduce en uno, formado en la etapa (1) anterior; y transfiere un resto de glucosa al grupo hidroxilo en C-4 o C-6 del resto de glucosa terminal no reductor del  $\alpha$ -glucano cuyo grado de polimerización de glucosa se incrementa en uno, también formado en la etapa anterior (1), mediante transglucosilación intermolecular  $\alpha$ -1, 4 o  $\alpha$ -1, 6 para alargar la cadena de glucosa.

(3) Mediante la repetición de las reacciones en las etapas anteriores (1) y (2), la enzima forma un glucano que tiene enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 de la maltosa y/o  $\alpha$ -glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior.

(4) Aunque la frecuencia es baja, la enzima forma un glucano que tiene enlaces  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4,6 y  $\alpha$ -1,3,6, además de los enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 catalizando la transglucosilación  $\alpha$ -1,3 y la transglucosilación  $\alpha$ -1,4 o  $\alpha$ -1,3 a los restos internos de glucosa que implican enlaces  $\alpha$ -1,6, en el glucano

(5) Como resultado de la repetición de las reacciones en las etapas anteriores (1) a (4), la enzima forma el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación, donde la glucosa está unida principalmente a través de  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 y que tiene enlaces  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4,6 y enlaces  $\alpha$ -1,3,6 en una frecuencia baja.

### Experimento 13

#### Reacción de transferencia de la $\alpha$ -glucosilo y el cambio del poder reductor de la mezcla de reacción

Se prepararon soluciones de sustrato mezclando una solución acuosa de maltosa y tampón acetato (pH 6,0), para dar concentraciones finales de 1 % o 30 % (p/v) y 20 mM, respectivamente. Sucesivamente, la solución de sustrato resultante se mezcló con 4 unidades/g de sustrato sólido de la preparación purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710, obtenida mediante el método del Experimento 6, seguida de la reacción de la enzima a pH 6,0 y 40 °C. La evolución temporal de la reacción se investigó como sigue: Se extrajeron muestras de la mezcla de reacción en diversos momentos y se mantuvieron a 100 °C durante 10 minutos para detener la reacción. La cantidad de maltosa residual en las mezclas de reacción se determinó mediante HPLC y GC descritas en el Experimento 4-2. Las cantidades de sacárido reductor y el sacárido totales se determinaron mediante el método de Somogyi-Nelson y el método de antrona-ácido sulfúrico, respectivamente; y, después, se calculó el poder reductor de la mezcla de reacción usando la siguiente fórmula:

Poder reductor =

$$\{(La\ cantidad\ de\ sacárido\ reductor/La\ cantidad\ de\ sacárido\ total)\} \times 100$$

Los resultados se indican en la tabla 13.

Tabla 13

Tiempo de reacción (h)	Concentración de maltosa			
	1 % (p/p)		30 % (p/p)	
	Cantidad de maltosa residual (%)	Poder reductor (% relativa)	Cantidad de maltosa residual (%)	Poder reductor (% relativa)
0	99,7	43,6 (100 %)	99,7	43,6 (100 %)

(continuación)

Tiempo de reacción (h)	Concentración de maltosa			
	1 % (p/p)		30 % (p/p)	
	Cantidad de maltosa residual (%)	Poder reductor (% relativa)	Cantidad de maltosa residual (%)	Poder reductor (% relativa)
4	64,2	45,0 (103 %)	68,8	43,6 (100 %)
8	43,0	46,0 (106 %)	51,8	43,6 (100 %)
16	20,9	46,7 (107 %)	28,8	43,7 (100 %)
24	8,1	47,9 (109 %)	13,3	43,8 (101 %)

Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 13, cuando se permitió que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención actuara sobre maltosa, el poder reductor de la mezcla de reacción se aumentó ligeramente en el caso de utilizar el sustrato con una concentración relativamente baja, 1 % (p/v) y no aumentó sustancialmente en el caso de utilizar el sustrato con una concentración relativamente alta, 30 % (p/v). El hecho de que el poder reductor de la mezcla de reacción aumentó solo ligeramente mayor en el caso de la concentración de sustrato relativamente baja y la cantidad de maltosa residual era de menos de 10 % significa que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa es una enzima que cataliza de forma inherente la reacción de transferencia y casi no hidroliza el sustrato durante la reacción. Casi los mismos resultados se obtuvieron en el caso de utilizar la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* PP349 para los mismos ensayos.

#### Experimento 14

#### 15 Comparación de la $\alpha$ -glucosiltransferasa purificada y la enzima en bruto en la formación del $\alpha$ -glucano ramificado

Desde el punto de vista de la producción industrial del  $\alpha$ -glucano ramificado la enzima en bruto de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa es preferible siempre que se pueda usar para la producción, ya que no es necesario purificar la enzima. En consecuencia, se investigó si el  $\alpha$ -glucano ramificado que tiene características casi iguales con glucano A, preparado en el Experimento 1-2, se puede obtener o no mediante el uso de la enzima en bruto de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans*. La solución de  $\alpha$ -glucosiltransferasa en bruto se preparó mediante las etapas de cultivo de *Bacillus circulans* PP710 mediante el método del Experimento 1-1, desplazamiento salino del sobrenadante del cultivo resultante con sulfato de amonio y diálisis de los precipitados resultantes contra tampón acetato 20 mM (pH 4,5). Se dejó que la solución de enzima en bruto actuara sobre "PINEDEX #100®", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, y se obtuvo una solución de glucano con una concentración de 30 % (p/p) a partir del hidrolizado parcial de almidón como sustrato con un rendimiento de 88,2 %, sobre una base sólida seca. El  $\alpha$ -glucano ramificado resultante se denominó "Glucano C" y se sometió al análisis de metilación. El resultado se encuentra en la Tabla 14. La distribución del peso molecular y el contenido de glucano C de WSDF, medido mediante los métodos descritos en los Experimentos 3 y 4, se encuentran en la Tabla 15. En las tablas 14 y 15, los datos del hidrolizado parcial de almidón utilizado como material y glucano A preparado utilizando  $\alpha$ -glucosiltransferasa parcialmente purificada se copiaron de las tablas 3 y 4 como datos comparativos.

Tabla 14

Producto metilado parcialmente	Glc correspondiente**	Composición (área del pico en %)		
		Hidrolizado parcial de almidón* (material)	Glucano A	Glucano C
Producto 2,3,4,6-tetrametilado	Glc terminal no reductora	5,8	10,1	16,0
Producto 3,4,6-trimetilado	Glc que implica enlace 1,2	0,0	0,0	0,0
Producto 2,4,6-trimetilado	Glc que implica enlace 1,3	0,0	1,1	3,0
Producto 2,3,6-trimetilado	Glc que implica enlace 1,4	89,8	51,5	30,0
Producto 2,3,4-trimetilado	Glc que implica enlace 1,6	0,0	32,2	40,3
Producto 2,4-dimetilado	Glc que implica enlace 1,3,6	0,0	0,8	4,8
Producto 2,3-dimetilado	Glc que implica enlace 1,4,6	4,4	4,5	5,8

\*: "PINEDEX® #100", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón.

\*\* : Resto de glucosa

Glucano A: glucano preparado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa (enzima parcialmente purificada) de la cepa PP710 Glucano C: glucano preparado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa (enzima en bruto) de la cepa PP7

Tabla 15

Datos analíticos	Hidrolizado parcial de almidón* (Material)	Glucano A	Glucano C
Peso molecular promedio en número (Mn) (dalton)	6.680	3.840	2.840
Peso molecular promedio en peso (Mw) (dalton)	98.890	59.000	6.220
Mw/Mn	14,8	15,4	2,2
Grado promedio de los picos de la polimerización de la glucosa	449 y 6,3	384, 22,2, 10,9, y 1	26,7 y 1
Contenido de WSDF (%)	0,0	42,1	75,8

\*: "PINEDEX® #100", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón.  
 Glucano A: glucano preparado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa (enzima parcialmente purificada) de la cepa PP710  
 Glucano C: glucano preparado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa (enzima en bruto) de la cepa PP710

5 Como se muestra en la Tabla 14, en el caso del glucano C, preparado mediante el uso de la preparación de enzima en bruto de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710, el contenido del producto 2,3,4,6-tetrametilado, correspondiente al resto de glucosa terminal no reductor, y el producto 2,3,4-trimetilado, correspondiente al resto de glucosa que implica enlaces  $\alpha$ -1,6, aumentaron inesperadamente en el análisis de metilación en comparación con el caso de glucano A. los resultados indican que el glucano C tiene muchos extremos no reductores y contiene muchos mas enlaces  $\alpha$ -1,6 que el glucano A. Además, el contenido de producto 2,4-dimetilado fue 4,8 %, que es mayor que el del glucano A, 0,8 %. El resultado indica que el resto de glucosa que implica enlaces tanto 1, 3 como 1, 6 se incrementa en el glucano C.

10 Como es evidente de la Tabla 15, el glucano C mostró valores más bajos de peso molecular promedio en número y el peso molecular promedio en peso (grado de polimerización de glucosa más bajo), y un contenido de WSDF significativamente mayor que el glucano A. Estos resultados sugieren que otra enzima distinta de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa es concomitante en la preparación de enzima en bruto de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710, y la enzima concomitante implica el aumento del enlace  $\alpha$ -1, 6 y el resto de glucosa que implica enlaces tanto 1,3 como 1,6; la reducción del peso molecular; y el aumento del contenido de WSDF.

#### 15 Experimento 15 (proporcionado por referencia)

##### 20 Caracterización y purificación de la enzima concomitante en la preparación de enzima bruta de $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710

25 La enzima, que coexiste en la preparación de enzima bruta de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710 e implica el aumento de los enlaces  $\alpha$ -1,6 y resto de glucosa que implica enlaces tanto 1,3 como 1,6, la disminución del peso molecular, y el aumento del contenido de WSDF; se caracterizó y se purificó en los siguientes experimentos.

##### 30 Experimento 15-1 (proporcionado por referencia)

##### Caracterización de la enzima concomitante y ensayo de la actividad de la enzima

35 *Bacillus circulans* PP710, FERM BP-10771, se cultivó mediante el método del Experimento 1-1, y aproximadamente 3 l del sobrenadante de cultivo resultante se sometieron a desplazamiento salino con sulfato de amonio. Después, el precipitado resultante se disolvió en agua, se dializó frente a tampón Tris-HCl 20 mM que contiene CaCl<sub>2</sub> 1 mM y se recogieron aproximadamente 40 ml del dializado resultante como una solución de enzima en bruto. La solución de la enzima en bruto se mezcló con 2 % (p/v) de la solución de almidón soluble o 2 % (p/v) de solución de pululano, seguido de la reacción de la enzima a pH 6,0 y a 40 °C durante 16 horas. Después de detener la reacción por calentamiento a 100 °C durante 10 minutos, la mezcla de reacción se sometió a TLC usando "SILICAGEL™ 60F<sub>254</sub>", una placa de TLC (10 x 20 cm) comercializada por Merck. La TLC se llevó a cabo utilizando un disolvente (n-butanol/piridina/agua, relación en volumen de 6:4:1) y un método ascendente dos veces. Los productos de la placa se detectaron mediante la visualización de las manchas por pulverización de una solución de sulfato-metanol al 20 % y calentamiento a 100 °C durante 5 minutos. Mediante el análisis de la TLC se reveló que la maltosa y el  $\alpha$ -1, 4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior se formaron a partir de almidón soluble, y se formaron pequeñas cantidades de isomaltosa y panosa a partir de pululano. reveló que una amilasa que hidroliza almidón y pululano estaba presente en la enzima en bruto de *Bacillus circulans* PP710, FERM BP-10771, como una enzima concomitante.

50 La actividad de la amilasa concomitante se analizó como sigue: Se prepara una solución de sustrato disolviendo "AMILOSA EX-I", una amilosa de cadena corta con un grado de polimerización de glucosa promedio de 17,



comercializada por Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japón, en tampón acetato 50 mM (pH 6,0) que contiene  $\text{CaCl}_2$  mM para dar una concentración final de 1 % (p/v). En 2 ml de la solución de sustrato, se mezclan 0,2 ml de la solución de la enzima, seguido de la reacción enzimática a 35 °C durante 30 minutos. Después de la reacción, se retiran 0,2 ml de la mezcla de reacción y se mezclan con 8 ml de solución acuosa de ácido sulfúrico 0,02 N para detener la reacción. Después de añadir 0,2 ml de la solución de yodo 0,1 N de a la solución resultante, la mezcla resultante se mantiene a 25 °C durante 15 minutos y se mide la absorbancia a 660 nm de la mezcla. Por separado, una mezcla de reacción al tiempo de reacción de cero se trata de la misma manera y se mide la absorbancia a 660 nm de la mezcla. Mediante el uso de ambos valores se calcula la disminución la tinción de yodo por minuto. Una unidad de la actividad de la amilasa se define como la cantidad por 10 de la enzima que disminuye el 10 % de la absorbancia a 660 nm (tinción de yodo), correspondiente a 20 mg de amilosa de cadena corta, en las condiciones anteriores.

#### Experimento 15-2 (proporcionado por referencia)

##### 15 Purificación de la amilasa concomitante

La solución de enzima en bruto, preparada en el experimento 15-1, se sometió a cromatografía en columna de intercambio aniónico utilizando 70 ml de gel "DEAE-TOYOPEARL™ 650S", un gel de intercambio catiónico comercializado por Tosoh Corporation, Tokio, Japón. La actividad de la amilasa no se adsorbió sobre el gel "DEAE-TOYOPEARL™ 650S" preequilibrado con tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) que contiene  $\text{CaCl}_2$  1 mM y se eluyó como fracciones no absorbentes. Las fracciones activas se recogieron, se añadió sulfato de amonio para dar una concentración final de 1,5 M, y después se dejaron reposar a 4 °C durante 24 horas. Sucesivamente, la solución enzimática se centrifugó para eliminar las sustancias insolubles y se sometió a cromatografía en columna hidrofóbica utilizando 1 ml de gel "RESOURCE™ PHE" comercializado por Pharmacia Biotech. La actividad de amilasa se adsorbió sobre gel "RESOURCE™ PHE" preequilibrado con tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) que contiene sulfato de amonio 1,5 M y  $\text{CaCl}_2$  1 mM y cuando se eluyó con un gradiente lineal decreciente de 1,5 M a cero M de amonio sulfato, la actividad enzimática eluyó a aproximadamente 0,3 M de sulfato de amonio. Se recogieron las fracciones activas, se concentraron, y se sometieron a cromatografía en columna de filtración en gel utilizando 118 ml de gel "SUPERDEX™ 200pg", un gel comercializado por Pharmacia Biotech. La actividad de amilasa se eluyó usando tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) que contenía cloruro de sodio 0,2 M y  $\text{CaCl}_2$  1 mM. Se recogieron las fracciones activas y se sometieron a cromatografía en columna de intercambio aniónico utilizando 1 ml de gel "RESOURCE™ Q", un gel comercializado por Pharmacia Biotech. La actividad de la amilasa no se adsorbió sobre el gel "RESOURCE™ Q" preequilibrado con tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) que contiene  $\text{CaCl}_2$  1 mM y se eluyó como fracciones no absorbentes. Las fracciones activas se recogieron como la preparación de la amilasa purificada. La cantidad de actividad enzimática, la actividad específica y el rendimiento de la amilasa en cada etapa de purificación se encuentran en la Tabla 16.

Tabla 16

Etapa de purificación	Actividad amilasa (unidades)	Actividad específica de amilasa (unidades/mg de proteína)	Rendimiento (%)
Solución dializada después del desplazamiento salino con sulfato de amonio	358	3,4	100
Eluato de la cromatografía de columna de intercambio iónico	174	30,9	48,6
Eluato de la cromatografía en columna hidrofóbica	56,8	42,5	15,9
Eluato de la cromatografía en columna de filtración en gel	34,4	51,8	9,6
Eluato de la cromatografía de columna de intercambio iónico	32,8	52,6	9,2

40 La preparación de enzima purificada finalmente de la amilasa se analizó para determinar la pureza por electroforesis en gel usando un gradiente de 5-20 % (p/v) en gel de poli(acrilamida) y se detectó en el gel como una única banda de proteína, es decir, una preparación de alta pureza.

#### Experimento 16 (proporcionado por referencia)

45

##### Propiedades de la amilasa de *Bacillus circulans* PP710

#### Experimento 16 (proporcionado por referencia)

##### 50 Peso molecular

La preparación de enzima purificada de la amilasa, obtenida por el método del Experimento 15-2, se sometió a SDS-PAGE (un gradiente en gel de 5 a 20 % (p v) ) y el peso molecular de la enzima se midió en comparación con los

marcadores del peso molecular, comercializados por Bio-Rad Japan, Tokio, Japón. Se reveló que la amilasa tiene un peso molecular de  $58.000 \pm 10.000$  dalton.

#### Experimento 16-2 (proporcionado por referencia)

5

##### Temperatura y pH óptimos de la amilasa

Los efectos de la temperatura y el pH sobre la actividad de la enzima se investigaron mediante la preparación de la enzima purificada de la amilasa de *Bacillus circulans* PP710, obtenida por el método del Experimento 15-2, mediante la variación de la temperatura y el pH en el ensayo de la enzima. Los resultados están en la figura 11 (temperatura óptima) y la figura 12 (pH óptimo), respectivamente. Se reveló que la temperatura óptima de la amilasa fue de aproximadamente 55 °C cuando se hizo reaccionar a pH 6,0 durante 30 minutos y el pH óptimo fue de aproximadamente 6,0 a 7,0 cuando se hizo reaccionar a 35 °C durante 30 minutos.

#### Experimento 16-3 (proporcionado por referencia)

##### Estabilidades térmicas y al pH de la amilasa

La estabilidad térmica y la estabilidad al pH de la enzima se investigaron usando la preparación de enzima purificada de la amilasa, obtenida por el método del Experimento 15-2. La estabilidad térmica de la enzima se determinó mediante las etapas de incubar una solución de enzima (tampón de acetato 20 mM, pH 6,0 o el mismo tampón que contiene  $\text{CaCl}_2$  1 mM) a diversas temperaturas durante 60 minutos, enfriar en agua, y medir actividad enzimática residual. La estabilidad al pH de la enzima se determinó mediante las etapas de incubar la solución de enzima en tampón 20 mM a diversos valores de pH, y a 4 °C durante 24 horas, ajustando el pH a 6,0 y midiendo la actividad enzimática residual. Los resultados están en la figura 13 (estabilidad térmica) y la figura 14 (estabilidad al pH), respectivamente. Como es evidente a partir de los resultados en las figuras 13 y 14, la amilasa es estable hasta 40 °C en ausencia de iones de calcio y hasta 50 °C en presencia de iones de calcio 1 mM, y estable en el intervalo de pH 6,0 a 8,0.

#### Experimento 16-5 (proporcionado por referencia)

##### Especificidad de sustrato de la amilasa

La acción de la amilasa sobre varios sustratos se investigó mediante la preparación purificada de la amilasa, obtenida mediante el método del Experimento 15-2. Como resultado, se reveló que la amilasa hidroliza almidón, maltosa, y  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o superior, y también cataliza la transglucosilación. También se reveló que la amilasa forma ciclodextrinas a partir de almidón y formas panosa mediante hidrólisis de pululano.

#### Experimento 17

##### Preparación del $\alpha$ -glucano ramificado mediante el uso de $\alpha$ -glucosiltransferasa y la amilasa en combinación

Uso de la preparación purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710, obtenida mediante el método del Experimento 6 y la preparación purificada de la amilasa, obtenida mediante el método del Experimento 15-2, se investigó si el glucano C en el Experimento 14, que se produjo mediante el uso de la preparación de enzima bruta de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710, se puede producir o no. "PINEDEX® #100", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, se disolvió en agua para dar una concentración de 30 % (p/p) y se ajustó el pH de la solución a 6,0. A la solución de sustrato, se añadieron 10 unidades/g de sólido de la preparación purificada de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710, obtenida mediante el método del Experimento 6; y 0,1, 0,2, 0,5 o 1,0 unidades/g de sólido de la amilasa obtenida mediante el método en 15-2, seguido de la reacción de la enzima a pH 6,0 y 40 °C durante 72 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se llevó a ebullición durante 10 minutos para detener la reacción. Las mezclas de reacción que contienen el  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido mediante las respectivas condiciones de reacción, se sometieron a HPLC de filtración en gel descrita en el Experimento 4-4 y los cromatogramas se muestran en la figura 15 junto con el del hidrolizado parcial de almidón usado como sustrato. En la figura 15, el símbolo "a" es la cromatografía de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato y los símbolos "b", "c", "d" y "e" son los de los  $\alpha$ -glucanos ramificados obtenidos mediante el uso de 10 unidades/g de sólido de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,1, 0,2, 0,5, o 1,0 unidades/g de sólido de la amilasa, respectivamente. (Puesto que el cromatograma de HPLC de filtración en gel del  $\alpha$ -glucano ramificado, que se obtiene mediante el uso de 10 unidades/g de sólido de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa solamente, es casi igual al del glucano A en la figura 1, se omite en la figura 15, y también en las siguientes figuras 16 a 19.) Los resultados de los análisis de la distribución del peso molecular basados en los cromatogramas de HPLC de filtración en gel y el contenido de WSDF medido mediante el método enzima-HPLC en el Experimento 3 de los  $\alpha$ -glucanos ramificados están en la Tabla 17. Los del hidrolizado parcial de almidón se utilizan como sustrato (cero unidad/g de sólido de  $\alpha$ -glucosiltransferasa, y cero unidad de amilasa) también se encuentran en la Tabla 17.

Tabla 17

Cantidad de enzima (unidad/g de sustrato)		Distribución del peso molecular de glucano			Contenido de WSDF (% p/p)
$\alpha$ -Glucosil transferasa	Amilasa	Peso molecular promedio en número (Mn) (dalton)	Peso molecular promedio en peso (Mw) (dalton)	Mw/Mn	
0	0,0	6.670	100.340	15,0	0,0
10	0,0	5.530	97.450	17,6	41,1
10	0,1	3.235	7.799	2,4	71,5
10	0,2	3.013	6.627	2,2	73,7
10	0,5	2.789	5.894	2,1	76,7
10	1,0	2.544	5.304	2,1	76,8

Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 17, en el caso de la utilización de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y la amilasa en combinación, el peso molecular del  $\alpha$ -glucano ramificado formado se disminuyó y el contenido de WSDF se incrementó de manera significativa. El peso molecular promedio en número, el peso molecular promedio en peso, y el valor de la división del peso molecular promedio en peso con el peso molecular promedio en número, Mw/Mn, del  $\alpha$ -glucano ramificado se redujeron con el aumento de la cantidad de la amilasa. A partir de los resultados, se reveló que el intervalo de la distribución del peso molecular del  $\alpha$ -glucano ramificado se convirtió en más estrecha con el aumento de la cantidad de la amilasa. En el caso de la utilización de 0,5 unidades/g de sólido de la amilasa, el valor de Mw/Mn se disminuyó a 2,1. Además, en los casos de la utilización de 0,5 unidades /g de sólido o superior de la amilasa, el contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado se alcanzó aproximadamente al 76 % (p/p) .

De los resultados, se confirmó que la disminución del peso molecular y el aumento del contenido de WSDF en el glucano C, obtenido en el Experimento 14 mediante el uso de la preparación de enzima en bruto de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710, se produjo por la amilasa concomitante en la preparación de enzima en bruto. Se considera que la amilasa concomitante hidroliza parcialmente el hidrolizado parcial de almidón como sustrato y el  $\alpha$ -glucano como un producto por la  $\alpha$ -glucosiltransferasa para disminuir el peso molecular y actúa para aumentar el contenido de WSDF mediante la transferencia de grupo glucosilo al  $\alpha$ -glucano ramificado. Además, los resultados indican que el  $\alpha$ -glucano ramificado, que tiene un peso molecular bajo y un alto contenido de WSDF se puede producir mediante el uso de la amilasa y la  $\alpha$ -glucosiltransferasa en combinación.

#### Experimento 18

##### Preparaciones del $\alpha$ -glucano ramificado mediante el uso de $\alpha$ -glucosiltransferasa y otras amilasas bien conocidas en combinación

Se prepararon varios  $\alpha$ -glucanos ramificados dejando que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención y otras amilasas conocidas actuaran en combinación sobre el hidrolizado parcial de almidón y se investigaron las características y los contenidos de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado. Se obtuvieron resultados casi iguales en los casos de utilización de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710 y de *Arthrobacter globiformis* PP349. Por lo tanto, en este experimento, se describieron los resultados obtenidos mediante el uso de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de *Bacillus circulans* PP710.

##### Experimento 18-1

##### Preparación del $\alpha$ -glucano ramificado mediante el uso de $\alpha$ -glucosiltransferasa e isoamilasa en combinación; y distribución del peso molecular y el contenido de WSDF del $\alpha$ -glucano ramificado resultante

Excepto por la utilización de cero, 50, 200, 500, o 1000 unidades/g de sólido de isoamilasa de *Pseudomonas amyloclavata*, preparado por Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japón, como un sustituto de la amilasa de *Bacillus circulans* PP710, el  $\alpha$ -glucano ramificado se preparó según el método del Experimento 17. Cada  $\alpha$ -glucano ramificado, preparado mediante cada condición de reacción, se sometió a HPLC de filtración en gel en el Experimento 4-4, y el cromatograma se mostró en las figuras 16 junto con el del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato. En la figura 16, el símbolo "a" es un cromatograma de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato y los símbolos "b", "c", "d" y "e" son cromatogramas de HPLC de filtración en gel de los  $\alpha$ -glucanos ramificados obtenidos mediante el uso de 10 unidades/g de sólido de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 50, 200, 500, y 1.000 unidades/g de sólido de la isoamilasa en combinación, respectivamente. Los resultados de los análisis de la distribución de peso molecular análisis basados en los cromatogramas de HPLC de filtración en gel y el contenido de WSDF determinados mediante el método Enzima-HPLC en el Experimento 3 están en la Tabla 18.

Tabla 18

Cantidad de enzima (unidad/g de sustrato)		Distribución del peso molecular de glucano			Contenido de WSDF (% p/p)
$\alpha$ -Glucosil transferasa	Isoamilasa	Peso molecular promedio en número (Mn) (dalton)	Peso molecular promedio en peso (Mw) (dalton)	Mw/Mn	
0	0	6.670	100.340	15,0	0,0
10	0	5.530	97.450	17,6	41,1
10	50	3.490	19.980	5,7	40,6
10	200	2.560	6.580	2,6	42,7
10	500	2.230	4.340	1,9	43,7
10	1.000	2.140	4.020	1,9	41,6

- 5 Como es evidente a partir del resultado en el caso de permitir que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa actuara solamente sobre el hidrolizado parcial de almidón en la Tabla 18, la  $\alpha$ -glucosiltransferasa no ejerció una influencia en la distribución del peso molecular del  $\alpha$ -glucano ramificado. Sin embargo, como se desprende de los resultados de la Tabla 18 y la figura 16, tanto el peso molecular promedio en número como el peso molecular promedio en peso, y Mw/Mn, el valor de la división del peso molecular promedio en peso por el peso molecular promedio en número se redujo con el aumento de la cantidad de isoamilasa. A partir de los resultados, se reveló que el intervalo de la distribución del peso molecular del  $\alpha$ -glucano ramificado se convirtió en más estrecha con la acción de la isoamilasa. En el caso de la utilización de 1.000 unidades/g de sólido de la isoamilasa, Mw/Mn del  $\alpha$ -glucano ramificado se redujo a 1,9 y el  $\alpha$ -glucano ramificado mostró una distribución del peso molecular con un pico en grado de polimerización de glucosa de 20,2. Mientras, el contenido de WSDF de los  $\alpha$ -glucanos ramificados, obtenidos por las condiciones de reacción, no se vieron influidos por la cantidad de isoamilasa y eran aproximadamente de 40 a 44 % (p/p).
- 10
- 15 A partir de estos resultados, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado con un peso molecular bajo puede producirse sin alterar el contenido de WSDF al permitir que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y la isoamilasa actuaran en combinación sobre el hidrolizado parcial de almidón.

#### 20 Experimento 18-2

Preparación del  $\alpha$ -glucano ramificado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y  $\alpha$ -amilasa en combinación; y distribución del peso molecular y el contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado resultante

- 25 Excepto por la utilización de cero, 0,1, 0,2, 0,5, o 1,0 unidades/g de sólido de "NEOSPITASE PK2", una  $\alpha$ -amilasa comercializada por Nagase ChemteX Corporation, Osaka, Japón, como sustituto de isoamilasa de *Pseudomonas amyloclavata*, como un sustituto de la amilasa de *Bacillus circulans* PP710, el  $\alpha$ -glucano ramificado se preparó según el método del Experimento 18-º. Cada  $\alpha$ -glucano ramificado, preparado mediante cada condición de reacción, se sometió a HPLC de filtración en gel en el Experimento 4-4, y el cromatograma se mostró en las figuras 17 junto con el del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato. En la figura 17, el símbolo "a" es un cromatograma de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato y los símbolos "b", "c", "d" y "e" son cromatogramas de HPLC de filtración en gel de los  $\alpha$ -glucanos ramificados obtenidos mediante el uso de 10 unidades/g de sólido de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,1, 0,2, 0,5, y 1,0 unidades/g de  $\alpha$ -amilasa en combinación, respectivamente. Los resultados de los análisis de la distribución de peso molecular análisis basados en los cromatogramas de HPLC de filtración en gel y el contenido de WSDF determinados mediante el método Enzima-HPLC en el Experimento 3 están en la Tabla 19.
- 30
- 35

Tabla 19

Cantidad de enzima (unidad/g de sustrato)		Distribución del peso molecular de glucano			Contenido de WSDF (% p/p)
$\alpha$ -Glucosil transferasa	Isoamilasa	Peso molecular promedio en número (Mn) (dalton)	Peso molecular promedio en peso (Mw) (dalton)	Mw/Mn	
0	0	6.670	100.340	15,0	0,0
10	0	5.530	97.450	17,6	41,1
10	50	3.490	19.980	5,7	40,6
10	200	2.560	6.580	2,6	42,7
10	500	2.230	4.340	1,9	43,7
10	1.000	2.140	4.020	1,9	41,6

- 40 Como es evidente a partir de los resultados en la figura 17 y la tabla 19 tanto el peso molecular promedio en número como el peso molecular promedio en peso, y Mw/Mn, el valor de la división del peso molecular promedio en peso por el peso molecular promedio en número se redujo con el aumento de la cantidad de  $\alpha$ -amilasa. A partir de los resultados, se reveló que el intervalo de la distribución del peso molecular del  $\alpha$ -glucano ramificado se convirtió en más estrecha con la acción de la  $\alpha$ -amilasa. En el caso de la utilización de 1,0 unidades/g de sólido de la  $\alpha$ -amilasa (símbolo "e" en la figura 17), Mw/Mn del  $\alpha$ -glucano ramificado se redujo a 2,4 y el  $\alpha$ -glucano ramificado mostró una distribución del peso molecular con un pico en grado de polimerización de glucosa de 11,8. Mientras, el contenido de
- 45

WSDF de los  $\alpha$ -glucanos ramificados, obtenidos por las condiciones de reacción, mostraron una tendencia a aumentar con el aumento de la cantidad de  $\alpha$ -isoamilasa.

- 5 A partir de estos resultados, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado con un peso molecular bajo y contenido de WSDF aumentado puede producirse al permitir que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención y la amilasa actúen en combinación sobre el hidrolizado parcial de almidón.

#### Experimento 18-3

- 10 Preparación del  $\alpha$ -glucano ramificado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa t CGTasa en combinación; y distribución del peso molecular y el contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado resultante

15 Excepto por la utilización de cero, 0,1, 0,2, 0,5, o 1,0 unidades/g de CGTasa de *Bacillus stearothermophilus*, producida por "Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama como sustituto de isoamilasa de *Pseudomonas amyloclavata*, el  $\alpha$ -glucano ramificado se preparó según el método del Experimento 18-1. Cada  $\alpha$ -glucano ramificado, preparado mediante cada condición de reacción, se sometió a HPLC de filtración en gel en el Experimento 4-4, y el cromatograma se mostró en las figuras 18 junto con el del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato. En la figura 18, el símbolo "a" es un cromatograma de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato y los símbolos "b", "c", "d" y "e" son cromatogramas de HPLC de filtración en gel de los  $\alpha$ -glucanos ramificados obtenidos mediante el uso de 10 unidades/g de sólido de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 0,1, 0,2, 0,5, y 1,0 unidades/g de CGTasa en combinación, respectivamente. Los resultados de los análisis de la distribución de peso molecular análisis basados en los cromatogramas de HPLC de filtración en gel y el contenido de WSDF determinados mediante el método Enzima-HPLC en el Experimento 3 están en la Tabla 20.

25

Tabla 20

Cantidad de enzima (unidad/g de sustrato)		Distribución del peso molecular de glucano			Contenido de WSDF (% p/p)
$\alpha$ -Glucosiltransferasa	CGTasa	Peso molecular promedio en número (Mn) (dalton)	Peso molecular promedio en peso (Mw) (dalton)	Mw/Mn	
0	0,0	6.670	100.340	15,0	0,0
10	0,0	5.530	97.450	17,6	39,1
10	0,1	4.733	32.833	6,9	57,5
10	0,2	4.733	23.418	4,9	62,8
10	0,5	4.501	16.357	3,6	68,2
10	1,0	4.401	14.107	3,2	70,5

CGTasa: ciclomaltodextrina glucanotransferasa

30 Como se desprende de los resultados de la figura 18 y la Tabla 20, tanto el peso molecular promedio en número como el peso molecular promedio en peso, y Mw/Mn, el valor de la división del peso molecular promedio en peso por el peso molecular promedio en número se redujo con el aumento de la cantidad de CGTasa. A partir de los resultados, se reveló que el intervalo de la distribución del peso molecular del  $\alpha$ -glucano ramificado se convirtió en más estrecha con la acción de la CGTasa. En el caso de la utilización de 1,0 unidad/g de sólido de CGTasa (símbolo "e" en la Figura 18), el Mw/Mn del  $\alpha$ -glucano ramificado se redujo a 3,2 y el  $\alpha$ -glucano ramificado mostró una distribución de peso molecular con un pico en el grado de polimerización de glucosa de 79,1. Mientras, el contenido de WSDF de los alfa-glucanos ramificados, obtenidos mediante las condiciones de reacción, mostró una tendencia de aumento con el aumento de la cantidad de CGTasa. El contenido WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido mediante el uso de CGTasa en combinación, fue significativamente mayor en comparación con el caso de la utilización de  $\alpha$ -amilasa en el Experimento 18-2. En el caso de la utilización de 1,0 unidad/g de sólido de CGTasa, el contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado llegó a 70,5 % (p/p).

40 A partir de estos resultados, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado con un peso molecular bajo y un contenido de WSDF significativamente incrementado puede producirse sin alterar el contenido de WSDF al permitir que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa de la presente divulgación y la isoamilasa actúen en combinación sobre el hidrolizado parcial de almidón. Dado que la CGTasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces  $\alpha$ -1, 4 vinculación y también la transferencia de glucosilo, forma muchos restos de glucosa terminales no reductores en el  $\alpha$ -glucano ramificado sin disminuir significativamente el peso molecular en comparación con el caso de usar alfa-amilasa. Por lo tanto, se sugiere que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa es capaz de actuar con más frecuencia sobre el  $\alpha$ -glucano ramificado formado mediante el uso de CGTasa que el formado mediante el uso de  $\alpha$ -amilasa, y como resultado, puede obtenerse el  $\alpha$ -glucano ramificado con un mayor contenido de WSDF.

#### 50 Experimento 18-4

Preparación del  $\alpha$ -glucano ramificado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa isoamilasa y CGTasa en combinación; y distribución del peso molecular y el contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado resultante

Excepto por la adición de cero o 1,0 unidades/g de sólido de CGTasa de *Bacillus stearothermophilus*, al sistema de reacción en el Experimento 18-1. Cada  $\alpha$ -glucano ramificado, preparado mediante cada condición de reacción, se sometió a HPLC de filtración en gel en el Experimento 4-4, y el cromatograma se mostró en las figuras 19 junto con el del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato. En la figura 19, el símbolo "a" es un cromatograma de HPLC de filtración en gel del hidrolizado parcial de almidón utilizado como sustrato y los símbolos "b", "c", "d" y "e" son cromatogramas de HPLC de filtración en gel de los  $\alpha$ -glucanos ramificados obtenidos mediante el uso de 10 unidades/g de sólido y 1,0 unidad/g de sólido de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y CGTasa, y 50, 200, 500, y 1.000 unidades/g de sólido de la isoamilasa en combinación, respectivamente. Los resultados de los análisis de la distribución de peso molecular análisis basados en los cromatogramas de HPLC de filtración en gel y el contenido de WSDF determinados mediante el método Enzima-HPLC en el Experimento 3 están en la Tabla 21.

Tabla 21

Cantidad de enzima (unidad/g de sustrato)			Distribución del peso molecular de glucano			Contenido de WSDF (% p/p)
$\alpha$ -Glucosiltransferasa	Isoamilasa	CGTasa	Peso molecular promedio en número (Mn) (dalton)	Peso molecular promedio en peso (Mw) (dalton)	Mw/Mn	
0	0	0,0	6.670	100.340	15,0	0,0
10	0	0,0	5.530	97.450	17,6	41,1
10	0	1,0	4.401	14.107	3,2	70,5
10	50	1,0	2.423	5.445	2,2	74,0
10	200	1,0	1.956	4.021	2,1	73,8
10	500	1,0	1.705	3.367	2,0	72,3
10	1000	1,0	1.601	3.086	1,9	70,6

CGTasa: ciclomaltodextrina glucanotransferasa

Como es evidente por los resultados en la figura 19 y en la Tabla 21, la relación Mw/Mn, el valor de la división del peso molecular promedio en peso por el peso molecular promedio en número del  $\alpha$ -glucano ramificado, preparado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y 1,0 unidad/g de sólido de CGTasa en combinación, se disminuyó a 3,2. En el caso de la adición de 1.000 unidades/g de sólido de isoamilasa al sistema de reacción (símbolo "e" en la Figura 19), la relación Mw/Mn se redujo adicionalmente a 1,9. El contenido de WSDF en el  $\alpha$ -glucano ramificado, preparado utilizando la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y CGTasa en combinación, se incrementó hasta aproximadamente 70 % (p/p), y los contenidos mantuvieron los valores relativamente altos mediante la adición de isoamilasa a los sistemas de reacción.

A partir de estos resultados, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado con un peso molecular significativamente bajo y un contenido de WSDF significativamente incrementado puede producirse sin alterar el contenido de WSDF al permitir que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y la isoamilasa actuaran en combinación sobre el hidrolizado parcial de almidón.

Experimento 19 (proporcionado por referencia)

Funciones del  $\alpha$ -glucano ramificado

El  $\alpha$ -glucano ramificado, preparado en el Experimento 18-4 mediante el uso de 10 unidades/g de sólido de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, 50 unidades/g de sólido de la isoamilasa y 1,0 unidades/g de sólido de CGTasa en combinación se seleccionaron como el  $\alpha$ -glucano ramificado con el contenido de WSDF más alto y un peso molecular relativamente bajo; y se investigaron la digestibilidad, las características estructurales y las funciones del  $\alpha$ -glucano ramificado.

Experimento 19-1 (proporcionado por referencia)

Purificación del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado mediante el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa, isoamilasa y CGTasa en combinación

Una mezcla de reacción que contiene el  $\alpha$ -glucano ramificado se preparó mediante la misma reacción en el Experimento 18-4 usando 10 unidades/g de sólido de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, 50 unidades/g de sólidos de isoamilasa y 1,0 unidad/g de sólido de CGTasa en combinación. Después de eliminar las sustancias insolubles de la mezcla de reacción mediante filtración, el filtrado resultante se decoloró y se desionizó usando "DIAION™ SK-1B" y "DIAION™ WA30", ambas resinas de intercambio iónico comercializadas por Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japón, y "IRA 411", una resina de intercambio aniónico comercializada por Organo Corporation, Tokio, Japón y después se filtró usando una membrana y se concentró usando un evaporador. Mediante el procedimiento anterior se obtuvo una solución acuosa, que contiene el  $\alpha$ -glucano ramificado, con una concentración de 30 % con un rendimiento de 85,8 %, sobre una base sólida seca, del almidón de material. De acuerdo con el método del Experimento 4-2, se llevó a cabo el análisis de metilación del  $\alpha$ -glucano ramificado resultante y el resultado se muestra en la Tabla 22. Además, el resultado del análisis de la distribución del peso molecular, obtenido mediante

HPLC de filtración en gel descrito en el Experimento 4-1, el contenido de WSDF, medido mediante el método Enzima-HPLC descrito en el Experimento 3 y el resultado de la digestión con isomaltodextranasa, obtenido mediante el método descrito en el Experimento 4-2, del  $\alpha$ -glucano ramificado se resumen en la Tabla 23.

5

Tabla 22

Producto metilado parcialmente	Glc correspondiente**	Composición (área del pico en %)
Producto 2,3,4,6-tetrametilado	Glc terminal no reductora	13,7
Producto 3,4,6-trimetilado	Glc que implica enlace 1,2	0
Producto 2,4,6-trimetilado	Glc que implica enlace 1,3	1,6
Producto 2,3,6-trimetilado	Glc que implica enlace 1,4	22,8
Producto 2,3,4-trimetilado	Glc que implica enlace 1,6	54,7
Producto 2,4-dimetilado	Glc que implica enlace 1,3,6	2,4
Producto 2,3-dimetilado	Glc que implica enlace 1,4,6	4,8
*: Resto de glucosa		

Tabla 23

Distribución del peso molecular			Contenido de WSDF (% p/p)	Contenido de isomaltosa tras la digestión con isomaltodextranasa (% p/p)
Peso molecular promedio en número (Mn) (Dalton)	Peso molecular promedio en peso (Mw) (Dalton)	Mw/Mn		
2.400	5.480	2,3	68,6	36,4

Como es evidente a partir de los resultados de las Tabla 22 y 23, en el análisis de metilación del  $\alpha$ -glucano ramificado, los productos parcialmente metilados comprendieron el producto 2,3,6-trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado en una proporción de 1:2,4, y el contenido total del producto 2,3,6-trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado fue del 77,5 %. El contenido del producto 2,4,6-trimetilado y el producto de 2,4-dimetilado fue del 1,6 % y del 2,4 %, respectivamente, en los productos parcialmente metilados. El  $\alpha$ -glucano ramificado mostró el peso molecular promedio en peso de 5, 480 dalton y una Mw/Mn de 2,3. El contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado, medida mediante el método Enzima-HPLC, fue del 68,6 %. A partir del  $\alpha$ -glucano ramificado se formó un 36,4 % (p/p) de isomaltosa mediante digestión con isomaltodextranasa.

Con el fin de evaluar la utilidad del  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente invención, se investigaron la cariogenicidad, la digestibilidad, los efectos sobre el nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina y la toxicidad aguda del  $\alpha$ -glucano ramificado en el siguiente experimento 19-2 a 19-7 usando el  $\alpha$ -glucano ramificado preparado en el Experimento 19-1.

#### Experimento 19-2 (proporcionado por referencia)

#### 25 Prueba de-fermentación ácida del $\alpha$ -glucano ramificado usando bacterias cariogénicas

De acuerdo con el método de Ohshima et al. descrito en Infection and Immunity, vol. 39, pág. 43–49 (1983), se realizó una prueba de fermentación ácida del  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido en el Experimento 19-1, se usando bacterias cariogénicas. Se usaron dos cepas bacterianas, *Streptococcus sobrinus* 6715 y *Streptococcus mutans* OMZ-176, como bacterias cariogénicas. Se usó sacarosa como sacárido control y se analizó mediante el mismo método. Los resultados se indican en la tabla 24.

Tabla 24

Tiempo (min)	pH			
	<i>S. sobrinus</i>		<i>S. mutans</i>	
	Sacarosa (Control)	$\alpha$ -glucano ramificado (presente invención)	Sacarosa (Control)	$\alpha$ -glucano ramificado (presente invención)
0	6,7	6,7	6,8	6,8
5	4,3	5,9	6,0	6,1
15	4,0	6,1	4,6	6,2
30	3,9	6,1	4,4	6,2
60	3,9	6,1	4,3	6,1
90	4,0	6,1	4,2	6,1

Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 24, en el caso de la sacarosa, los valores de pH del caldo de cultivo inoculado con las bacterias cariogénicas se redujeron mediante la formación de ácido. Al mismo tiempo, en el caso del  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación, el sacárido no se fermentó para formar ácidos por *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutans* y los valores de pH del caldo de cultivo se mantuvieron a aproximadamente 6. El pH es mayor que 5,5, que es pH crítico de la descalcificación del esmalte de los dientes. A partir de los resultados se confirmó que el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación muestra una

cariogenicidad significativamente baja.

Experimento 19-3 (proporcionado por referencia)

5 Digestibilidad del  $\alpha$ -glucano ramificado

De acuerdo con el método de Okada et al., descrito en Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Sciences, vol. 43, pág. 23–29 (1990), se investigaron la digestibilidad del  $\alpha$ -glucano ramificado mediante  $\alpha$ -amilasa salival, el jugo gástrico artificial, amilasa pancreática y las enzimas del intestino delgado in vitro usando el  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido en el Experimento 19-1. Se usó "PINEFIBER®", una dextrina poco digerible comercializada por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, como control. Los resultados se indican en la tabla 25.

Tabla 25

Enzima digestiva	Digestión (%)	
	$\alpha$ -glucano ramificado (presente invención)	Dextrina poco digerible (control)
Amilasa salival	0,0	0,3
Jugo gástrico artificial	0,0	0,0
Amilasa pancreática	0,2	2,4
Enzimas del intestino delgado	16,4	41,1

15 Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 25, el  $\alpha$ -glucano ramificado no se digirió mediante ninguna de amilasa salival y el jugo gástrico artificial, y fue ligeramente digerido por la amilasa pancreática. La digestión (%) del  $\alpha$ -glucano ramificado por las enzimas del intestino delgado fue del 16,4 % y mucho menor que 41,4 %, de la de la dextrina poco digerible utilizada como control. Se reveló que la digestibilidad del  $\alpha$ -glucano ramificado es mucho menor que la de la dextrina poco digerible disponible comercialmente.

20

Experimento 19-4

Efectos de la ingestión del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre el nivel de azúcar en sangre y los niveles de insulina

25 Los efectos del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre la elevación del nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina se investigaron mediante el  $\alpha$ -glucano ramificado obtenido por el método del Experimento 19-1. Cinco ratas Wistar macho (siete semanas de edad) /grupo se dejaron preliminarmente en ayunas durante un día y, después, se administró a las ratas una solución acuosa que contiene  $\alpha$ -glucano ramificado por vía oral usando una sonda gástrica. La dosis se estableció en 1,5 g de sólido/kg de peso de la rata. Se extrajeron muestras de sangre de la vena caudal de ratas justo antes de la administración, 15 minutos después, 30 minutos después, 60 minutos después, y 120 minutos después de la administración. Cada muestra de sangre se recogió en un tubo tratado con heparina y después se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma sanguíneo. El nivel de azúcar en sangre en el plasma sanguíneo se midió mediante el método de glucosa oxidasa-peroxidasa y el nivel de insulina se midió usando un kit para la medición de la insulina en ratas, comercializado por Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Kanagawa, Japón. Se usaron glucosa y PINEFIBER®, una dextrina poco digerible comercializada por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, como control 1 y 2, respectivamente. El nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina de cada grupo de ensayo se encuentran en las tablas 26 y 27, respectivamente.

40

Tabla 26

	Nivel de azúcar en sangre (mg/dl)		
	$\alpha$ -glucano ramificado (presente invención)	Glucosa (Control 1)	Dextrina poco digerible (Control 2)
Justo antes de la ingestión	68 ± 17	76 ± 17	66 ± 15
15	121 ± 18	115 ± 24	109 ± 20
30	156 ± 29	210 ± 29	151 ± 18
60	150 ± 11	191 ± 8	150 ± 4
120	114 ± 9	144 ± 29	112 ± 15
180	80 ± 10	105 ± 17	90 ± 10

Tabla 27

	Nivel de insulina (ng/ml)		
	$\alpha$ -glucano ramificado (presente invención)	Glucosa (Control 1)	Dextrina poco digerible (Control 2)
Justo antes de la ingestión	0,14 ± 0,07	0,33 ± 0,06	0,24 ± 0,21
15	0,73 ± 0,29	1,06 ± 0,44	0,46 ± 0,12
30	0,89 ± 0,26	1,46 ± 0,29	0,95 ± 0,40
60	0,60 ± 0,09	1,00 ± 0,26	0,48 ± 0,25
120	0,63 ± 0,2	0,67 ± 0,21	0,31 ± 0,22



(continuación)

	Nivel de insulina (ng/ml)		
	$\alpha$ -glucano ramificado (presente invención)	Glucosa (Control 1)	Dextrina poco digerible (Control 2)
180	0,43 $\pm$ 0,12	0,47 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,1

Como es evidente a partir de los resultados de las Tablas 26 y 27, se reveló que, en el caso del  $\alpha$ -glucano ramificado, la elevación del nivel de azúcar en sangre y del nivel de insulina se inhibió como en el caso de dextrina poco digerible disponible comercialmente en comparación con el caso de la glucosa.

#### Experimento 19-5 (proporcionado por referencia)

##### Ensayo de toxicidad aguda

Mediante el uso de ratones, el  $\alpha$ -glucano ramificado obtenido por el método del Experimento 19-1 se administró por vía oral a los ratones durante su prueba de toxicidad aguda. Como resultado, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado es una sustancia segura con una toxicidad relativamente baja, y que ningún ratón murió incluso cuando se administró la dosis más alta posible. El valor de DL<sub>50</sub> del  $\alpha$ -glucano ramificado fue de 5 g/kg de peso del ratón o superior.

#### Experimento 20 (proporcionado por referencia)

##### Efecto inhibitor del $\alpha$ -glucano ramificado sobre la elevación del nivel de azúcar en sangre

En el Experimento 19-4, se reveló que la elevación del nivel de azúcar en sangre y el valor de la insulina se inhibía mediante la ingestión del  $\alpha$ -glucano ramificado en comparación con el caso de la ingestión de glucosa. Basándose en los resultados, el efecto de la ingestión del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre la elevación del nivel de azúcar en sangre se investigó adicionalmente con detalle.

#### Experimento 20-1 (proporcionado por referencia)

##### Efectos de la ingestión del $\alpha$ -glucano ramificado sobre el nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina cuando el $\alpha$ -glucano ramificado se ingiere junto con el hidrolizado parcial de almidón

Se investigó el efecto del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre la elevación del nivel de azúcar en sangre después de la ingestión de "PINEDEX® # 1", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón. Tres grupos de cinco ratas macho Wistar (de siete semanas de edad) /grupo, adquiridas en Charles river Laboratories Japan Inc., Kanagawa, Japón, se criaron previamente durante una semana usando "AIN-93G", un alimento para ratas preparado en Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japón, (Ref. Journal of Nutrition, vol.123, pág. 1939–1951 (1993); en lo sucesivo en el presente documento denominado "dieta purificada") y, a continuación, se dejaron en ayunas durante un día. Sucesivamente, se administró a las ratas una solución acuosa preparada mediante disolución del hidrolizado parcial de almidón y el  $\alpha$ -glucano ramificado por vía oral utilizando una sonda gástrica. La dosis del hidrolizado parcial de almidón se estableció en 1,5 g de sólido/kg de peso corporal. Las dosis del  $\alpha$ -glucano ramificado se fijaron en 0,15, 0,30 o 0,75 g de sólido/kg de peso corporal para cada grupo. Se extrajeron muestras de sangre de la vena caudal de ratas justo antes de la administración, 15 minutos después, 30 minutos después, 60 minutos después, 120 minutos después, 180 minutos después y 240 minutos después de la administración. Cada muestra de sangre se recogió en un tubo tratado con heparina y después se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma sanguíneo. El nivel de azúcar en sangre y el nivel insulina en el plasma sanguíneo se midieron mediante el método descrito en el Experimento 19-4. Como control 1, se administraron cinco ratas (un grupo) con 1,5 g/kg de peso corporal del hidrolizado parcial de almidón. Como control 2 se usó "FIBERSOL®-2", una dextrina poco digerible comercializada por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, como un sustituto del  $\alpha$ -glucano ramificado y la dextrina poco digerible se administró a los dos grupos de ratas (cinco ratas/grupo) junto con el hidrolizado parcial de almidón. Las dosis de la dextrina poco digerible se fijaron en 0,15 y 0,75 g de sólido/kg de peso corporal para los dos grupos de ratas, respectivamente. El nivel de azúcar en la sangre, el valor de la AUC (área bajo la curva de concentración sanguínea-tiempo) del nivel de azúcar en sangre, el nivel de insulina, y el valor de la AUC de cada uno de los grupos se encuentran en las Tablas 28, 29, 30, y 31, respectivamente.

Tabla 28

Tiempo (min)	Nivel de azúcar en sangre (mg/dl)					
	Hidrolizado parcial de almidón solo (Control 1)	α-glucano ramificado (presente invención) (g/kg de peso corporal)			Dextrina poco digerible (Control 2) (g/kg de peso corporal)	
		0,15	0,30	0,75	0,15	0,75
Justo antes de la ingestión	50 ± 3	55 ± 10	60 ± 13	63 ± 4	56 ± 6	59 ± 3
15	124 ± 18	109 ± 14	105 ± 4	96 ± 4*	107 ± 14	120 ± 5
30	220 ± 37	171 ± 21	151 ± 11	130 ± 5*	164 ± 2	162 ± 12
60	175 ± 25	170 ± 23	162 ± 9	145 ± 6*	168 ± 24	187 ± 10
120	110 ± 9	122 ± 16	135 ± 16	126 ± 4*	134 ± 18	140 ± 16
180	91 ± 18	88 ± 11	99 ± 10	97 ± 5*	100 ± 13	112 ± 13
240	85 ± 17	72 ± 10	75 ± 3	69 ± 9	84 ± 12	76 ± 3

\*: Significativamente diferente del caso de una dextrina poco digerible (0,75 g/kg de peso corporal) (P<0,05 o P<0,01)

Tabla 29

	Valor de la AUC del nivel de azúcar en sangre (mg/dl min)					
	Hidrolizado parcial de almidón solo (Control 1)	α-glucano ramificado (presente invención)			Dextrina poco digerible (control 2)	
			0,15	0,30	0,75	0,15
Justo antes de la ingestión	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15	553 ± 119	410 ± 127	336 ± 90	254 ± 14*	383 ± 129	458 ± 30
30	2.377 ± 402	1.690 ± 206	1.358 ± 315	1.013 ± 54*	1.577 ± 299	1.687 ± 149
60	6.796 ± 1.028	5.165 ± 23	4.270 ± 825	3.264 ± 219*	4.869 ± 638	5.157 ± 457
120	12.354 ± 1.538	10.666 ± 1.385	9.612 ± 1.567	76.467 ± 494*	10.555 ± 1.711	11.457 ± 1.013
180	15.372 ± 1.760	13.698 ± 1.735	13.043 ± 2.306	10.585 ± 759*	14.215 ± 2.388	15.515 ± 1.558
240	17.612 ± 2.624	15.229 ± 1.788	14.679 ± 3.073	11.822 ± 1.144*	16.376 ± 2.428	17.637 ± 1.716

\*: Significativamente diferente del caso de una dextrina poco digerible (0,75 g/kg de peso corporal) (P<0,01)

Tabla 30

	Nivel de insulina (ng/ml)					
	Hidrolizado parcial de almidón solo (Control 1)	$\alpha$ -glucano ramificado (presente invención) (g/kg de peso corporal)			Dextrina poco digerible (Control 2) (g/kg de peso corporal)	
		0,15	0,30	0,75	0,15	0,75
Justo antes de la ingestión	0,67 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,10	0,68 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,06
15	1,14 $\pm$ 0,34	0,72 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,10	1,08 $\pm$ 0,33
30	2,54 $\pm$ 0,21	1,23 $\pm$ 0,36	1,14 $\pm$ 0,30	1,04 $\pm$ 0,04	1,65 $\pm$ 0,25	1,02 $\pm$ 0,07
60	1,06 $\pm$ 0,16	0,86 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,06	0,81 $\pm$ 0,11*	1,02 $\pm$ 0,19	0,95 $\pm$ 0,05
120	0,81 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,03*	0,82 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,60
180	0,50 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,08	0,56 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,26	0,57 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,04
240	0,51 $\pm$ 0,08	0,54 $\pm$ 0,05	0,53 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,03*	0,50 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,01

\*: Significativamente diferente del caso de una dextrina poco digerible (0,75 g/kg de peso corporal) (P<0,05)

Tabla 31

Tiempo (min)	Valor de la AUC del nivel de insulina (ng/ml min)					
	Hidrolizado parcial de almidón solo (Control 1)	$\alpha$ -glucano ramificado (presente invención) (g/kg de peso corporal)			Dextrina poco digerible (Control 2) (g/kg de peso corporal)	
		0,15	0,30	0,75	0,15	0,75
Justo antes de la ingestión	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15	3,5 $\pm$ 2,6	0,5 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 1,1	2,0 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 2,7
30	21,1 $\pm$ 5,9	5,4 $\pm$ 4,3	5,4 $\pm$ 2,2	4,9 $\pm$ 3,1	11,3 $\pm$ 2,1	8,8 $\pm$ 6,1
60	54,9 $\pm$ 6,1	17,1 $\pm$ 10,3	14,9 $\pm$ 6,1	12,7 $\pm$ 6,9	31,0 $\pm$ 6,6	18,2 $\pm$ 8,3
120	70,7 $\pm$ 4,6	26,2 $\pm$ 11,7	22,5 $\pm$ 7,2	19,7 $\pm$ 12,8	45,7 $\pm$ 12,4	30,2 $\pm$ 12,3
180	74,9 $\pm$ 6,8	30,8 $\pm$ 12,9	25,2 $\pm$ 8,6	23,0 $\pm$ 16,8	49,9 $\pm$ 13,1	34,0 $\pm$ 14,7
240	–	32,4 $\pm$ 13,8	–	24,2 $\pm$ 19,2	–	–

–: El valor de la AUC no se calculó porque el nivel de insulina se redujo al de justo antes de la ingestión.

- 5 Como es evidente a partir de los resultados de las Tablas 28 a 31, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación mostraba inhibición dependiente de la dosis de la elevación del nivel de azúcar en sangre, el valor de la AUC del nivel de azúcar en sangre, el nivel de insulina y el valor de la AUC del nivel de insulina cuando se cargó un sacárido (hidrolizado parcial de almidón) en comparación con el caso de la administración del hidrolizado parcial de almidón únicamente (control 1), de manera similar al caso de la administración de dextrina poco digerible (control 2). Comparando el grado de los efectos inhibidores entre el  $\alpha$ -glucano ramificado y la dextrina poco digerible, el  $\alpha$ -glucano ramificado muestra efectos relativamente más fuertes que la dextrina poco digerible.

#### Experimento 20-2 (proporcionado por referencia)

- 15 Efectos del peso molecular del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre el nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina cuando el  $\alpha$ -glucano ramificado se ingiere junto con el hidrolizado parcial de almidón

En el Experimento 20-1, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado inhibe la elevación del nivel de azúcar en sangre, el valor de la AUC de nivel de azúcar en sangre, el nivel de insulina, y el valor de la AUC del nivel de insulina cuando se ingirió junto con un sacárido (hidrolizado parcial de almidón). Sucesivamente, se investigó el efecto del peso molecular del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre el efecto inhibitorio sobre el nivel del azúcar en sangre y el nivel de insulina. Variando los tipos de hidrolizado parcial de almidón material y las cantidades de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa y la amilasa se prepararon diversos varios alfa-glucanos ramificados que tienen los pesos moleculares promedio en peso que se muestran en la Tabla 32. Del mismo modo que en el Experimento 20-1, nueve grupos de cinco ratas macho Wistar (de siete semanas de edad) /grupo, adquiridas en Charles River Laboratories Japan Inc., Kanagawa, Japón, se criaron previamente durante una semana utilizando la dieta purificada y después se dejaron en ayunas durante un día. Sucesivamente, se administró a los 8 grupos de ratas una solución acuosa preparada mediante disolución del hidrolizado parcial de almidón y uno cualquiera del  $\alpha$ -glucano ramificado mostrado en la tabla 32 por vía oral utilizando una sonda gástrica. Las dosis del hidrolizado parcial de almidón y el  $\alpha$ -glucano ramificado se establecieron, respectivamente, en 1,5 g de sólido/kg de peso corporal y 0,75 g de sólido/kg de peso corporal para cada grupo. Al grupo restante de las ratas se administraron 1,5 g/kg de peso de cuerpo del hidrolizado parcial de almidón por vía oral como un grupo de control. Se extrajeron muestras de sangre de la vena caudal de ratas justo

antes de la administración y 30 minutos después de la administración. Cada muestra de sangre se recogió en un tubo tratado con heparina y después se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma sanguíneo. El nivel de azúcar en la sangre y el nivel de insulina en el plasma sanguíneo se midieron y se indican en la Tabla 32. El momento de la extracción de la muestra de sangre después de la administración se estableció en 30 minutos después de la administración ya que el nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina alcanzaron los picos en el momento en que se administró el hidrolizado parcial de almidón.

Tabla 32

Nº de muestra	Peso molecular promedio en peso	Contenido de WSDF (% p/p)	Nivel de azúcar en sangre (mg/dl)		Nivel de insulina (ng/ml)	
			Antes de la ingestión	30 minutos después de la ingestión	Antes de la ingestión	30 minutos después de la ingestión
Hidrolizado parcial de almidón solo (Control)	–	–	62 ± 6	225 ± 40	0,66 ± 0,02	2,78 ± 0,03
1	1.168	58,1	64 ± 7	173 ± 30	0,65 ± 0,07	1,86 ± 0,05
2	2.670	75,5	63 ± 12	144 ± 27	0,65 ± 0,05	1,36 ± 0,06
3	4.242	80,4	56 ± 9	132 ± 15	0,67 ± 0,04	1,02 ± 0,07
4	25.618	72,4	61 ± 3	139 ± 15	0,59 ± 0,03	1,21 ± 0,12
5	44.151	64,2	62 ± 8	142 ± 25	0,65 ± 0,03	1,31 ± 0,09
6	60.000	42,3	59 ± 7	157 ± 19	0,62 ± 0,05	1,74 ± 0,06
7	100.000	36,5	61 ± 10	185 ± 28	0,58 ± 0,03	2,05 ± 0,05
8	200.000	30,1	58 ± 4	198 ± 22	0,65 ± 0,02	2,26 ± 0,05

10 Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 32, los alfa-glucanos ramificados que tienen los pesos moleculares promedio en peso en el intervalo de 1.168 a 200.000 inhibieron la elevación del nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina cuando se administró hidrolizado parcial de almidón por vía oral. Comparando el grado de inhibición de la elevación del nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina entre los  $\alpha$ -glucanos ramificados, el efecto inhibitor es significativo en los casos de utilización de los  $\alpha$ -glucanos ramificados que tienen los pesos moleculares en el intervalo de 1.168 a 60.000 (el contenido de WSDF en el intervalo de 58,1 a 80,4 % (p/p) ), y es más importante en los casos de utilización de los alfa-glucanos ramificados que tienen los pesos moleculares en el intervalo de 2.670 a 44.151 (el contenido WSDF en el intervalo de 64,2-80,4 % (p/p) ).

#### 20 Experimento 20-3 (proporcionado por referencia)

#### Efectos de la ingestión de período largo del $\alpha$ -glucano ramificado sobre el nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina cuando se ingiere el hidrolizado parcial de almidón

25 En el Experimento 20-1, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado inhibe la elevación del nivel de azúcar en sangre, el valor de la AUC de nivel de azúcar en sangre, el nivel de insulina, y el valor de la AUC del nivel de insulina cuando se ingirió junto con un sacárido (hidrolizado parcial de almidón). En este experimento, se investigó el efecto de una ingestión durante un periodo largo (8 semanas) del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre la inhibición de la elevación del nivel de azúcar en sangre, el valor de la AUC del nivel de azúcar en sangre, el nivel de insulina, y el valor de la AUC del nivel de insulina cuando se ingiere hidrolizado parcial de almidón. Cinco grupos de cinco ratas macho Wistar (de siete semanas de edad) /grupo, adquiridos en Charles River Laboratories Japan Inc., Kanagawa, Japón, se criaron preliminarmente durante una semana utilizando la dieta purificada. A continuación, se criaron tres grupos de ratas durante 8 semanas utilizando tres tipos de dietas de prueba incorporando el  $\alpha$ -glucano ramificado en una cantidad de 1, 2, o 5 % (p/p), mostrados en la Tabla 33. Se dejó que las ratas ingirieran la dieta de ensayo y agua libremente durante el periodo de ensayo. En el punto de la crianza de 4 semanas y 8 semanas, las ratas se mantuvieron en ayunas durante un día y, después, una solución acuosa preparada mediante disolución del hidrolizado parcial de almidón se administró por vía oral a las ratas utilizando una sonda gástrica para dar una dosis de 1,5 g de sólido/ kg de peso corporal. Se extrajeron muestras de sangre de la vena caudal de ratas justo antes de la administración, 15 minutos después, 30 minutos después, 60 minutos después, 120 minutos después, 180 minutos después y 240 minutos después de la administración. Cada muestra de sangre se recogió en un tubo tratado con heparina y después se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma sanguíneo. El nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina en el plasma sanguíneo se midieron mediante el método descrito en el Experimento 19-4. Como control 1, se crio un grupo de ratas (cinco ratas/grupo) usando solo la dieta purificada. Como Control 2, el grupo restante de ratas (cinco ratas/grupo) se crio usando una dieta con una fórmula en la Tabla 33, donde una parte del almidón de maíz en la dieta purificada se sustituyó por FIBERSOL-2®<sup>®</sup>, una dextrina poco digerible comercializada por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón. Dado que se obtuvieron casi los mismos resultados de las muestras en el punto de la crianza de 4 semanas y 8 semanas, los resultados de la medición del nivel de azúcar en sangre, el valor de la AUC del nivel de azúcar en sangre, el nivel de insulina y el valor de la AUC del nivel de insulina en el punto de crianza de 4 semanas para cada grupo se encuentran en las Tablas 34, 35, 36, y

37, respectivamente.

Tabla 33

Ingrediente	Composición (% p/p)				
	Dieta purificada	α-glucano ramificado (% p/p)			Dextrina poco digerible (% p/p)
		1	2	5	
Almidón de maíz	39,7486	38,7486	37,7486	34,7486	5
α-almidón	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Caseína	20	20	20	20	20
Sacarosa	10	10	10	10	10
Aceite de soja	7	7	7	7	7
Celulosa	5	5	5	5	5
Mezcla mineral	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mezcla de vitaminas	1	1	1	1	1
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitrato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
t-Butil-hidroquinona	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014
α-glucano ramificado	0	1	2	5	0
Dextrina poco digerible	0	0	0	0	5

Tabla 34

Tiempo (min)	Nivel de azúcar en sangre (mg/dl)				
	Dieta purificada (Control 1)	Dieta que contiene 1 % (p/p) α-glucano ramificado	Dieta que contiene 2 % (p/p) α-glucano ramificado	Dieta que contiene 5 % (p/p) α-glucano ramificado	Dieta que contiene 5 % (p/p) dextrina poco digerible (control 2)
Justo antes de la ingestión	80 ± 4	66 ± 5	53 ± 4	54 ± 4	59 ± 5
15	180 ± 8	123 ± 16	70 ± 8	79 ± 8*	97 ± 19
30	245 ± 11	184 ± 16	122 ± 17	120 ± 17	120 ± 14
60	218 ± 13	190 ± 15	142 ± 29	126 ± 29*	161 ± 26
120	149 ± 10	162 ± 12	108 ± 32	101 ± 32*	154 ± 12
180	115 ± 9	120 ± 9	88 ± 19	84 ± 19*	111 ± 9
240	91 ± 8	87 ± 10	71 ± 18	65 ± 18*	95 ± 4

\*: Significativamente diferente del caso de la dieta que contenía 5 % (p/p) de dextrina poco digerible (P<0,05 o P<0,01)

Tabla 35

Tiempo (min)	Valor de la AUC del nivel de azúcar en sangre (mg/dl min)				
	Dieta purificada (Control 1)	Dieta que contiene 1 % (p/p) de α-glucano ramificado	Dieta que contiene 2 % (p/p) de α-glucano ramificado	Dieta que contiene 5 % (p/p) de α-glucano ramificado	Dieta que contiene 5 % (p/p) de dextrina poco digerible (control 2)
Justo antes de la ingestión	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15	751 ± 59	427 ± 158	126 ± 26	184 ± 98	272 ± 69
30	2.746 ± 179	1.746 ± 299	772 ± 85	860 ± 272*	986 ± 268
60	7.303 ± 526	5.394 ± 273	3.147 ± 425	2.925 ± 510*	3.368 ± 820
120	13.525 ± 1.032	12.012 ± 1.177	7.457 ± 1.308	6.488 ± 1.002*	9.141 ± 2.311
180	16.661 ± 1.216	16.520 ± 1.476	10.153 ± 1.670	8.791 ± 1.450*	13.413 ± 3.479
240	18.073 ± 1.262	18.778 ± 1.717	11.771 ± 1.933	10.022 ± 1.734	15.939 ± 4.382

\*: Significativamente diferente del caso de la dieta que contenía 5 % (p/p) de dextrina poco digerible (P<0,05 o P<0,01)

Tabla 36

Tiempo (min)	Nivel de insulina (ng/ml)				
	Dieta purificada (control 1)	Dieta que contiene 1 % (p/p) de $\alpha$ -glucano ramificado	Dieta que contiene 2 % (p/p) de $\alpha$ -glucano ramificado	Dieta que contiene 5 % (p/p) de $\alpha$ -glucano ramificado	Dieta que contiene 5 % (p/p) de dextrina poco digerible (control 2)
Justo antes de la ingestión	0,61 $\pm$ 0,14	0,51 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,11	0,46 $\pm$ 0,07	0,53 $\pm$ 0,05
15	1,78 $\pm$ 0,40	1,16 $\pm$ 0,30	0,88 $\pm$ 0,16	0,90 $\pm$ 0,18*	1,26 $\pm$ 0,23
30	3,16 $\pm$ 0,29	1,99 $\pm$ 0,52	1,17 $\pm$ 0,36	1,28 $\pm$ 0,31*	1,72 $\pm$ 0,31
60	1,41 $\pm$ 0,23	1,23 $\pm$ 0,30	0,85 $\pm$ 0,14	0,79 $\pm$ 0,16*	1,15 $\pm$ 0,11
120	0,95 $\pm$ 0,23	0,82 $\pm$ 0,16	0,63 $\pm$ 0,17	0,64 $\pm$ 0,13	0,72 $\pm$ 0,86
180	0,63 $\pm$ 0,07	0,56 $\pm$ 0,09	0,58 $\pm$ 0,11	0,55 $\pm$ 0,17	0,67 $\pm$ 0,09
240	0,63 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,07	0,62 $\pm$ 0,10

\*: Significativamente diferente del caso de la dieta que contenía 5 % (p/p) de dextrina poco digerible (P<0,05 o P<0,01)

Tabla 37

Tiempo (min)	Valor de la AUC del nivel de insulina (ng/ml min)				
	Dieta purificada (control 1)	Dieta que contiene 1 % (p/p) de $\alpha$ -glucano ramificado	Dieta que contiene 2 % (p/p) de $\alpha$ -glucano ramificado	Dieta que contiene 5 % (p/p) de $\alpha$ -glucano ramificado	Dieta que contiene 5 % (p/p) de dextrina poco digerible (control 2)
Justo antes de la ingestión	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15	8,8 $\pm$ 3,0	4,9 $\pm$ 2,4	2,9 $\pm$ 1,4	3,3 $\pm$ 1,5*	5,5 $\pm$ 2,1
30	36,7 $\pm$ 5,8	20,9 $\pm$ 8,6	11,0 $\pm$ 3,1	12,7 $\pm$ 4,8*	19,9 $\pm$ 6,1
60	87,1 $\pm$ 11,2	53,9 $\pm$ 19,1	26,5 $\pm$ 5,7	29,8 $\pm$ 11,9*	46,0 $\pm$ 11,5
120	121,6 $\pm$ 14,0	84,7 $\pm$ 30,0	41,5 $\pm$ 10,0	45,0 $\pm$ 20,5*	71,0 $\pm$ 14,1
180	134,0 $\pm$ 17,2	95,8 $\pm$ 35,0	48,5 $\pm$ 15,2	53,9 $\pm$ 24,8*	80,7 $\pm$ 16,1
240	137,8 $\pm$ 23,5	98,7 $\pm$ 36,2	51,8 $\pm$ 16,7	57,4 $\pm$ 26,7*	87,4 $\pm$ 20,0

\*: Significativamente diferente del caso de la dieta que contenía 5 % (p/p) de dextrina poco digerible (P<0,05 o P<0,01)

- 5 Como es evidente a partir de los resultados de las Tablas 33 a 37, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado inhibía la elevación del nivel de azúcar en sangre, el valor de la AUC del nivel de azúcar en sangre, el nivel de insulina y el valor de la AUC del nivel de insulina cuando se cargó un sacárido (hidrolizado parcial de almidón) en comparación con el caso de la cría de ratas usando solo la dieta purificada (control 1), de manera similar al caso de la cría de ratas usando la dextrina poco digerible (control 2). También se reveló que el efecto inhibitor es dependiente de la
- 10 cantidad del  $\alpha$ -glucano ramificado incorporado a la dieta de prueba y el efecto inhibitor es significativo en el caso de la incorporación del  $\alpha$ -glucano ramificado en una cantidad de 2 % (p/p), y, más importante, en el caso de la incorporación del  $\alpha$ -glucano ramificado en una cantidad de 5 % (p/p). En el caso del uso de una dieta de prueba a la que se ha incorporado 5 % (p/p) de la dextrina poco digerible disponible comercialmente, el grado del efecto inhibitor fue casi igual con el caso del uso de una dieta de prueba a la que se ha incorporado 1 % (p/p) del  $\alpha$ -glucano ramificado. A partir de los resultados se confirmó que el  $\alpha$ -glucano ramificado es ventajoso en el efecto de
- 15 inhibir la elevación de nivel de azúcar en sangre, el valor de AUC del nivel de azúcar en sangre, el nivel de insulina y el valor de la AUC del nivel de insulina cuando se carga un sacárido (hidrolizado parcial de almidón), en comparación con la dextrina poco digerible. Comparando el nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina justo antes de la ingestión entre los grupos de ensayo, los valores en los grupos que ingirieron la dieta de ensayo a la que se incorporó 2 o 5 % (p/p) de  $\alpha$ -glucano ramificado son más bajos que los de los grupos que ingirieron la dieta control o la dieta de ensayo a la que se incorporó 5 % (p/p) de la dextrina poco digerible. A partir de los resultados, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado disminuía el nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina en ayunas de
- 20 manera eficaz cuando se utilizó durante un período prolongado que la dextrina poco digerible disponible comercialmente.
- 25 Al mismo tiempo, los pesos corporales de las ratas se compararon entre el grupo de ensayo y el grupo control en el punto cría de 4 y 8 semanas pero no se observó diferencia significativa en el peso corporal promedio entre los grupos. A partir de los resultados, se consideró que el efecto de la inhibición de la elevación del nivel de azúcar en

sangre y el nivel de insulina por el  $\alpha$ -glucano ramificado, confirmado por este experimento, no influía en la salud de las ratas.

Experimento 21 (proporcionado por referencia)

5 Efectos de la ingestión del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre el nivel de azúcar en sangre y los niveles de insulina de seres humanos

10 A partir de los experimentos anteriores con ratas, se reveló que las elevaciones de nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina se inhiben mediante la ingestión de  $\alpha$ -glucano ramificado junto con el hidrolizado parcial de almidón en comparación con el caso de la ingestión de únicamente el hidrolizado parcial de almidón. Sucesivamente se investigaron los efectos de la ingestión del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre el nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina en seres humanos del siguiente modo: Mediante el uso de "PINEDEX #1®", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, y el  $\alpha$ -glucano ramificado  
 15 preparado de acuerdo con el método del Ejemplo 5 que se describe más adelante, se investigó la elevación del nivel de azúcar en sangre y del nivel de insulina de los seres humanos. Doce voluntarios varones sanos (edad de 26 a 54 años, promedio de edad de  $41 \pm 1$ ) se utilizaron como sujetos y su ingestión de alimentos, excepto para el agua, se restringió desde las nueve de la noche del día anterior a las 9 de la mañana del día siguiente (momento de inicio de la prueba). Se dejó que los sujetos se ingirieran la preparación de la prueba, preparada disolviendo 50 g de sólido del hidrolizado parcial de almidón en agua y llenando hasta 200 ml, en un marco de tiempo de 2 minutos, y se recogieron las muestras de sangre en los puntos justo antes de la ingestión, 15 minutos después, 30 minutos después, 45 minutos después, 60 minutos después, 90 minutos después y 120 minutos después de la ingestión. Después de una semana o un intervalo mayor, se dejó que los mismos sujetos ingirieran la preparación de la prueba, preparada mediante disolución de 50 g de sólido del  $\alpha$ -glucano ramificado en agua y llenando hasta 200 ml,  
 20 y se recogieron las muestras de sangre de la misma manera. Se midieron el nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina de cada muestra de sangre en el Medical Center of Okayama Medical Association, un laboratorio clínico privado, Okayama, Japón. Los cursos de tiempo del nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina, el valor de la AUC del nivel de azúcar en sangre justo después de la ingestión a 120 minutos después de la ingestión ( $AUC^{0-2h}$  (H mg/dl)), el valor de la AUC de nivel de insulina del período ( $AUC^{0-2h}$  ( $\mu U$  h/dl)) y el aumento de los valores de la AUC del nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina del período ( $\Delta AUC^{0-2h}$ ) se resumen en la Tabla 38.

Tabla 38

Tiempo (min)	Nivel de azúcar en sangre (mg/dl)		Nivel de insulina ( $\mu U/ml$ )	
	Hidrolizado parcial de almidón (control)	$\alpha$ -glucano ramificado	Hidrolizado parcial de almidón (control)	$\alpha$ -glucano ramificado
Justo antes de la ingestión	87 $\pm$ 6	87 $\pm$ 1	5,7 $\pm$ 2,1	4,9 $\pm$ 1,7
15	113 $\pm$ 12	102 $\pm$ 8	22,7 $\pm$ 13,4	17,5 $\pm$ 15,3
30	132 $\pm$ 15	112 $\pm$ 10*	36,8 $\pm$ 13,3	25,6 $\pm$ 18,5
60	137 $\pm$ 21	113 $\pm$ 19*	40,9 $\pm$ 14,8	22,4 $\pm$ 9,6*
120	121 $\pm$ 20	108 $\pm$ 24	39,6 $\pm$ 17,1	18,8 $\pm$ 7,3*
180	90 $\pm$ 17	89 $\pm$ 12	26,9 $\pm$ 13,5	11,9 $\pm$ 4,6*
240	79 $\pm$ 17	80 $\pm$ 3	12,7 $\pm$ 7,2	6,7 $\pm$ 2,0*
$AUC^{0-2h}$	217 $\pm$ 23	197 $\pm$ 20*	57,3 $\pm$ 21,2	31,7 $\pm$ 11,1*
$\Delta AUC^{0-2h}$	47,4 $\pm$ 12,8	28,5 $\pm$ 15,2*	45,8 $\pm$ 17,5	22,0 $\pm$ 8,4*

\*: Significativamente diferente del caso de control (P <0,05 o P <0,01)

35 Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 38, en el caso de la ingestión del  $\alpha$ -glucano ramificado, se reveló que el nivel de azúcar en sangre, el valor de la AUC del nivel de azúcar en sangre, el nivel de insulina, y el valor de la AUC del nivel de insulina fueron significativamente bajos en comparación con el caso de la ingestión del hidrolizado parcial de almidón, de manera similar al caso en el Experimento 20 usando ratas.

40 Experimento 22 (proporcionado por referencia)

Efecto del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre la reducción de los lípidos en los cuerpos vivos

45 A partir de los resultados de experimentos 19-4 y 21, se reveló que la elevación del nivel de azúcar en sangre y el nivel de insulina se inhibía mediante la ingestión del  $\alpha$ -glucano ramificado. Sucesivamente, se investigó el efecto de la ingestión del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre la cantidad de lípidos en los cuerpos vivos.

Experimento 22-1 (proporcionado por referencia)

50 Efecto de la ingestión del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre la absorción de lípidos

Ratas macho Wistar de siete semanas de edad, adquiridas en Charles River Laboratories Japan Inc., Kanagawa,



Japón, se dividieron al azar en cuatro grupos, 15 ratas/grupo, y se criaron preliminarmente durante una semana utilizando la dieta purificada que se muestra en la Tabla 33. El  $\alpha$ -glucano ramificado preparado por el método del Ejemplo 5 descrito más adelante se utilizó en este experimento. A continuación, se criaron dos grupos de ratas de 4 semanas u 8 semanas de edad utilizando las dietas de ensayo a las que se ha incorporado el  $\alpha$ -glucano ramificado en una cantidad de 5 % (p/p), mostrados en la Tabla 33. Los dos grupos restantes de ratas se criaron durante 4 semanas u 8 semanas utilizando la dieta purificada como grupos de control. Después de la cría de 4 semanas u 8 semanas, las ratas en el grupo de ensayo criadas usando la dieta de ensayo a la que se ha incorporado el  $\alpha$ -glucano ramificado y se sacrificó a aquellas del grupo control mediante la obtención de sangre de la vena poscaval cpm anestesia con éter y se diseccionaron; y, después se investigó la cantidad de lípidos acumulados en el órgano interno, el nivel de lípidos séricos, el peso húmedo de la mucosa intestinal, el contenido en el ciego, etc. Los resultados se indican en la Tabla 39. Se crío a las ratas se midiendo el peso corporal y el consumo de alimento a un intervalo de 2 o 3 días y se dejó que ingirieran la dieta y agua libremente durante el período de ensayo. Se dejó a las ratas en ayunas durante una noche antes de su disección. La ganancia de peso corporal, el consumo de alimento, la eficacia de los alimentos (ganancia de peso corporal/consumo de alimento), el peso corporal en el momento de la disección, los pesos de los órganos, el peso de la mucosa intestinal, los pesos de los lípidos de los órganos internos, el peso del contenido del ciego, el contenido de humedad en el contenido del ciego y el pH del contenido del ciego se encuentran en la Tabla 39. Los niveles de lípidos en suero también se encuentran en la Tabla 39. En los lípidos séricos, los niveles de triglicéridos, de colesterol total y de HDL-colesterol se determinaron mediante el uso de "TRIGLYCERIDE E-TEST WAKO", un kit para la medición de los triglicéridos comercializado por Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón, "CHOLESTEROL E-TEST WAKO", un kit para medir el colesterol total comercializado por Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón, y "HDL-CHOLESTEROL E-TEST WAKO", un kit para la medición de HDL-colesterol comercializado por Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón, respectivamente. El nivel de LDL-colesterol se calculó restando el valor de HDL-colesterol del de colesterol total.

25

Tabla 39

Medición		Cría de 4 semanas		Cría de 8 semanas	
		Dieta purificada (Control)	Dieta que contiene 5 % (p/p) de $\alpha$ -glucano ramificado	Dieta purificada (control)	Dieta que contiene 5 % (p/p) de $\alpha$ -glucano ramificado
Eficacia del alimento	Ganancia de peso corporal (g)	107,7 $\pm$ 9,0	109,0 $\pm$ 16,9	174,1 $\pm$ 21,2	171,8 $\pm$ 11,6
	ingesta (g)	486,7 $\pm$ 32,2	488,7 $\pm$ 53,1	938,2 $\pm$ 43,6	962,1 $\pm$ 80,7
	Eficacia	0,22 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,02
Peso del órgano interno	Peso corporal (g)	348,0 $\pm$ 11,6	345,0 $\pm$ 24,9	429,2 $\pm$ 22,6	424,6 $\pm$ 13,1
	Hígado	9,76 $\pm$ 0,85	9,59 $\pm$ 1,49	10,44 $\pm$ 0,74	10,42 $\pm$ 0,98
	Riñón	1,28 $\pm$ 0,11	1,23 $\pm$ 0,19	2,84 $\pm$ 0,30	2,43 $\pm$ 0,89
	Bazo	0,86 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,10	0,90 $\pm$ 0,08	0,85 $\pm$ 0,06
Peso de la mucosa intestinal	Mucosa del yeyuno (g)	1,06 $\pm$ 0,16	1,31 $\pm$ 0,25*	1,26 $\pm$ 0,14	1,55 $\pm$ 0,23**
	Mucosa del íleon (g)	0,96 $\pm$ 0,22	1,15 $\pm$ 0,12*	1,10 $\pm$ 0,22	1,51 $\pm$ 0,20**
	Tejido del ciego (g)	0,99 $\pm$ 0,18	1,03 $\pm$ 0,16	1,11 $\pm$ 0,20	1,46 $\pm$ 0,21**
Peso de los lípidos en el órgano interno	Alrededor del mesenterio (g)	4,37 $\pm$ 1,40	4,49 $\pm$ 0,84	6,02 $\pm$ 1,19	6,99 $\pm$ 1,37
	Alrededor del riñón (g)	6,24 $\pm$ 3,36	4,15 $\pm$ 0,98	8,05 $\pm$ 2,69	4,74 $\pm$ 1,70*
	Alrededor del testículo (g)	5,70 $\pm$ 1,86	3,32 $\pm$ 1,12*	9,25 $\pm$ 2,23	3,68 $\pm$ 0,84**
Contenido en el ciego	Peso (g)	2,17 $\pm$ 0,70	2,17 $\pm$ 0,70	2,37 $\pm$ 0,73	2,39 $\pm$ 0,74
	Contenido de humedad (%)	76,8 $\pm$ 3,0	76,3 $\pm$ 4,0	76,7 $\pm$ 3,1	77,2 $\pm$ 3,7
	pH	8,75 $\pm$ 0,23	8,59 $\pm$ 0,19	8,70 $\pm$ 0,35	8,28 $\pm$ 0,48*
Lípidos en suero	Triglicéridos (mg/dl)	55,7 $\pm$ 11,7	56,9 $\pm$ 14,9	58,2 $\pm$ 13,8	47,2 $\pm$ 10,5
	Colesterol total (mg/dl)	68,1 $\pm$ 11,3	59,2 $\pm$ 10,4	62,1 $\pm$ 10,2	54,7 $\pm$ 11,2
	HDL-colesterol (mg/dl)	53,1 $\pm$ 7,4	47,4 $\pm$ 9,3	37,6 $\pm$ 5,0	33,5 $\pm$ 5,5
	HDL-colesterol (mg/dl)	15,0 $\pm$ 4,9	11,8 $\pm$ 3,1	24,4 $\pm$ 6,1	21,2 $\pm$ 5,5

\*: Significativamente diferente del caso de control (P <0,05)  
 \*\*: Significativamente diferente del caso de control (P <0,01)

Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 39, en el caso de permitir que las ratas ingirieran la dieta de ensayo a la que se ha incorporado 5 % (p/p) del  $\alpha$ -glucano ramificado, los pesos de los lípidos alrededor del riñón y

los testículos eran inferiores en el punto de cría durante 4 semanas en comparación con el caso en que se permitió a las ratas que ingirieran solamente la dieta purificada. En el punto de cría durante 8 semanas, los pesos de los lípidos alrededor del riñón y los testículos fueron, en particular, el peso de los lípidos de alrededor del testículo fue significativamente menor que los de control. Asimismo, el peso de la mucosa intestinal fue significativamente mayor en el grupo de ensayo en el punto de cría para 4 y 8 semanas, y, más significativamente, en el punto de cría durante 8 semanas. Adicionalmente, el pH del contenido en el ciego en el grupo de ensayo se redujo significativamente en el punto de cría durante 8 semanas. En cuanto al nivel de lípidos en suero, el valor de los triglicéridos en el grupo de ensayo tendió a disminuir en el punto de cría de 8 semanas y los valores de colesterol total y de LDL-colesterol tendían a disminuir en los puntos de la cría de 4 y 8 semanas. Otros resultados a excepción de los descritos anteriormente eran casi iguales entre el grupo de prueba y el grupo control. El nivel de ácidos orgánicos en el ciego no fue diferente entre el grupo de prueba y el grupo control (datos no mostrados). Estos resultados descritos anteriormente indican que el  $\alpha$ -glucano ramificado ejerce el efecto de disminución de los lípidos en los cuerpos vivos. Además, el peso de la mucosa intestinal se incrementó en el grupo de prueba. A partir del resultado, se sugiere que el engrosamiento de la mucosa intestinal que acompaña al aumento de la secreción de mucina, la disminución de las actividades de las enzimas digestivas provocada por el engrosamiento, y la inhibición o el retraso de la digestión o la absorción de la glucosa y los lípidos desempeñan papeles importantes en la inhibición de la acumulación excesiva de lípidos y la mejora de la tolerancia a los carbohidratos, confirmado por los experimentos de 20 y 21.

Experimento 22-2 (proporcionado por referencia)

Efectos del peso molecular del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre la inhibición de la acumulación excesiva de lípidos en los cuerpos vivos

En el Experimento 22-1, se reveló que la ingestión del  $\alpha$ -glucano ramificado inhibe la acumulación excesiva de lípidos en los organismos vivos. Sucesivamente, se investigó el efecto del peso molecular promedio en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado sobre el efecto inhibitorio. Se prepararon ocho tipos de dietas de ensayo mediante la incorporación de 8 tipos de  $\alpha$ -glucano ramificado con un peso molecular promedio diferente peso, utilizado en el Experimento 20-2, en la dieta purificada para dar un contenido de 5 % (p/p). Cuarenta y cinco ratas macho Wistar (de siete semanas de edad) adquiridas en Charles River Laboratories Japan Inc., Kanagawa, Japón, se dividieron en 9 grupos, 5 ratas/grupo y se criaron preliminarmente durante una semana utilizando la dieta purificada. Ocho grupos de ratas se criaron durante 8 semanas utilizando una cualquiera de las dietas de ensayo (dieta n.º 1 a 8) a la que se incorporó  $\alpha$ -glucano ramificado con diferente peso molecular promedio en peso, que se muestra en la Tabla 40. El grupo restante de las ratas se crio con la dieta purificada durante 8 semanas como un grupo de control. Después de la cría de 8 semanas, se sacrificó 8 grupos de ratas como los grupos de prueba y un grupo de ratas como grupo de control mediante recogida de sangre con anestesia con éter; y, a continuación, los pesos de los lípidos (peso húmedo) alrededor del mesenterio, el riñón y el testículo, y los niveles de triglicéridos y de colesterol total se midieron por el mismo método del Experimento 22-1. Los resultados se encuentran en la Tabla 40.

Tabla 40

N.º de dieta de ensayo usada para la cría	$\alpha$ -glucano ramificado incorporado en la dieta purificada		Peso de los lípidos en el órgano interno (g)			Lípidos séricos (mg/dl)	
	Peso molecular promedio en peso	Contenido de WSDF (% p/p)	Alrededor del mesenterio	Alrededor del riñón	Alrededor de los testículos	Triglicéridos	Colesterol total
Criados usando solo la dieta purificada (control)	-	-	6,22 ± 1,09	8,65 ± 2,79	8,95 ± 2,15	60,1 ± 12,6	63,1 ± 9,8
1	1.168	58,1	6,24 ± 1,48	6,28 ± 1,79	7,28 ± 2,32	49,8 ± 9,1	54,7 ± 8,9
2	2.670	75,5	5,92 ± 1,29	5,12 ± 1,43	4,65 ± 1,01	45,4 ± 8,2	48,5 ± 9,1
3	4.242	80,4	5,64 ± 1,18	4,43 ± 1,55	3,26 ± 0,72	46,5 ± 11,5	50,1 ± 10,3
4	25.618	72,4	5,53 ± 1,32	4,86 ± 1,75	4,32 ± 1,25	47,1 ± 7,8	49,8 ± 8,9
5	44.151	64,2	5,78 ± 1,57	5,36 ± 1,88	5,89 ± 1,37	50,1 ± 6,9	53,2 ± 10,1
6	60.000	42,3	6,01 ± 1,41	5,86 ± 1,77	6,45 ± 1,96	52,9 ± 9,1	55,3 ± 9,4
7	100.000	36,5	6,35 ± 1,85	6,81 ± 2,06	7,22 ± 2,08	57,7 ± 8,6	58,7 ± 12,3
8	200.000	30,1	6,29 ± 1,98	7,45 ± 2,26	8,05 ± 2,13	58,3 ± 9,9	60,9 ± 8,2

Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 40, en el caso de permitir que las ratas ingirieran el  $\alpha$ -glucano ramificado, con diferente peso molecular promedio en peso, el peso de los lípidos en los órganos internos y en el suero se redujeron en uno cualquier uno de los grupos de prueba en comparación con los del grupo control. A partir de los resultados, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado inhibe el aumento de los pesos de los lípidos en los órganos internos y en el suero. Comparando el grado del efecto inhibitorio entre el  $\alpha$ -glucano ramificado con diferente

peso molecular promedio en peso, el efecto inhibitor es significativo en el caso de la utilización de los  $\alpha$ -glucanos ramificados con los pesos moleculares en el intervalo de 2,670 a 44.151, y es más importante en los casos de utilización de los  $\alpha$ -glucanos ramificados con los pesos moleculares en el intervalo de 2.670 a 25.618.

5 A partir de los resultados en los experimentos de 19-2 a 19-5, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado tiene características de baja cariogenicidad y poca digestibilidad y se puede utilizar ventajosamente como una WSDF baja en calorías. Además, a partir de los resultados en los experimentos 20 a 22, se reveló que el  $\alpha$ -glucano ramificado se puede utilizar como agente para la inhibición de la elevación del nivel de azúcar en sangre y para la reducción de los lípidos en los cuerpos vivos.

10 Los siguientes ejemplos 1 y 2 explican el proceso para la producción de  $\alpha$ -glucosiltransferasa que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos 3 a 6 explican el procedimiento para producir el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente invención. El Ejemplo de referencia 7 explica las propiedades fisicoquímicas del  $\alpha$ -glucano ramificado. El ejemplo de referencia 8 explica un agente mejorador de la calidad que contiene la  $\alpha$ -glucosiltransferasa. Además, los ejemplos 9 y 10 y los ejemplos de referencia de 11 a 22 explican las composiciones preparadas mediante la incorporación de  $\alpha$ -glucano ramificado.

#### Ejemplo 1

20 De acuerdo con el método del Experimento 5, se cultivó *Bacillus circulans* PP710 (FERM BP-10771) usando un fermentador durante aproximadamente 24 horas. Después de completado el cultivo, el sobrenadante del cultivo se recogió por centrifugación del caldo de cultivo y se mezcló con sulfato de amonio para dar una saturación del 80 % y se dejó reposar a 4 °C durante 24 horas. El precipitado resultante se recogió mediante centrifugación y se disolvió en tampón acetato 20 mM, pH 6,0. Después, la solución se dializó frente al mismo tampón y se concentró usando una membrana para convertirlo en una solución de enzima bruta concentrada. La actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa de la solución de enzima bruta concentrada fue de 200 unidades/ml. La solución de enzima bruta concentrada también contenía aproximadamente 25 unidades/ml de actividad de la amilasa. La solución de enzima bruta se puede usar ventajosamente de acuerdo con la invención para producir el  $\alpha$ -glucano ramificado a partir de sustratos amiláceos y se utiliza como agente mejorador de la calidad de materias amiláceas en alimentos y bebidas.

30

#### Ejemplo 2

De acuerdo con el método del Experimento 8, se cultivó *Arthrobacter globiformis* PP349 (FERM BP-10770) usando un fermentador durante aproximadamente 24 horas. Después de completado el cultivo, el sobrenadante del cultivo se recogió por centrifugación del caldo de cultivo y se mezcló con sulfato de amonio para dar una saturación del 80 % y se dejó reposar a 4 °C durante 24 horas. El precipitado resultante se recogió mediante centrifugación y se disolvió en tampón acetato 20 mM, pH 6,0. Después, la solución se dializó frente al mismo tampón y se concentró usando una membrana para convertirlo en una solución de enzima bruta concentrada. La actividad  $\alpha$ -glucosiltransferasa de la solución de enzima bruta concentrada fue de 50 unidades/ml. La solución de enzima bruta se puede usar ventajosamente de acuerdo con la invención para producir el  $\alpha$ -glucano ramificado a partir de sustratos amiláceos y se utiliza como agente mejorador de la calidad de materias amiláceas en alimentos y bebidas.

40

#### Ejemplo 3

45 "PINEDEX® #100", un hidrolizado parcial de almidón comercializado por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, se disolvió en agua para dar una concentración final de 30 % (p/v) y el pH de la solución se ajustó a 6,0. La solución de enzima bruta concentrada, obtenida mediante el método del ejemplo 1, se mezcló con la solución anterior, para dar una actividad de  $\alpha$ -glucosiltransferasa de 10 unidades/g de sólido seco de sustrato, seguido de la reacción enzimática a 40 °C durante 48 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se calentó a 95 °C durante 10 minutos, se enfrió y después se filtró. De acuerdo con los métodos convencionales, el filtrado resultante se decoloró con carbón activado, se desionizó usando resinas de intercambio iónico con H y OH, y se concentró para obtener la solución de  $\alpha$ -glucano ramificado con una concentración de 50 % (p/p). En el análisis de metilación del  $\alpha$ -glucano ramificado, la relación del producto 2,3,6-trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado fue de 1:1,3, y el contenido total del producto 2,3,6 trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado fue del 70,3 % en los productos parcialmente metilados. Adicionalmente, el contenido del producto 2,4,6-trimetilado y el producto de 2,4-dimetilado fue del 3,0 % y 4,8 %, respectivamente, en los productos parcialmente metilados. El peso molecular promedio en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado fue de 6.220 dalton y el valor de dividir el peso molecular promedio en peso por el peso molecular promedio en número (Mw/Mn) fue de 2,2. Además, 35,1 % (p/p) de isomaltosa, sobre una base sólida seca del hidrolizado, se formó del  $\alpha$ -glucano ramificado por digestión con isomaltodextranasa. El contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado fue 75,8 % (p/p) mediante el método Enzima-HPLC. Dado que el producto tiene una propiedad no cariogénica, es difícilmente digerible y tiene una viscosidad adecuada, puede usarse ventajosamente en diversas composiciones, tales como alimentos y bebidas, cosméticos y productos farmacéuticos como WSDF, sustituto de grasa de alimentos, bebidas y alimentos, como agente mejorador de la calidad, estabilizante, excipiente, espesante, y agente de carga.

65

#### Ejemplo 4

Se preparó un almidón de tapioca en una suspensión de almidón de 30 % (p/v), se mezcló con carbonato de calcio para dar una concentración de 0,1 % (p/p), se ajustó a pH 6,5, y se mezcló con 0,2 %/g de almidón de " THERMAMYL™ 60 L", una  $\alpha$ -amilasa comercializada por Novo Industries a/S, Copenhague, Dinamarca, y después se incubó a 95 °C durante 15 minutos. Después de tratamiento en autoclave a 120 °C durante 10 minutos, la mezcla de reacción se enfrió a aproximadamente 40 °C. La solución de almidón licuado se mezcló con 10 unidades/g de almidón sólido seco de la solución de enzima bruta concentrada que contiene  $\alpha$ -glucosiltransferasa, preparada por el método del Ejemplo 2, y una unidad/g de almidón sólido seco de CGTasa de *Bacillus stearothermophilus*, comercializado por Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japón, seguido de la reacción enzimática a pH 6,0 y 40 °C durante 72 horas. Después de calentar la mezcla de reacción a 95 °C durante 10 minutos, se enfrió y se filtró. De acuerdo con los métodos convencionales, el filtrado resultante se decoloró con carbón activado, se desionizó usando resinas de intercambio iónico con forma H y OH, se concentró y se secó por pulverización para obtener el  $\alpha$ -glucano ramificado en polvo. En el análisis de metilación del  $\alpha$ -glucano ramificado, la relación del producto 2,3,6-trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado fue de 1:1,6, y el contenido total del producto 2,3,6 trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado fue del 80,0 % en los productos parcialmente metilados. Adicionalmente, el contenido del producto 2,4,6-trimetilado y el producto de 2,4-dimetilado fue del 1,4 % y 1,7 %, respectivamente, en los productos parcialmente metilados. El peso molecular promedio en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado fue de 10.330 dalton y el valor de dividir el peso molecular promedio en peso por el peso molecular promedio en número (Mw/Mn) fue de 2,9. Además, 40,7 % (p/p) de isomaltosa, sobre una base sólida seca del hidrolizado, se formó del  $\alpha$ -glucano ramificado por digestión con isomaltodextranasa. El contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado fue 68,6 % (p/p) mediante el método Enzima-HPLC. Dado que el  $\alpha$ -glucano ramificado tiene una propiedad no cariogénica, es difícilmente digerible y tiene una viscosidad adecuada, puede usarse ventajosamente en diversas composiciones, tales como alimentos y bebidas, cosméticos y productos farmacéuticos como WSDF, sustituto de grasa de alimentos, bebidas y alimentos, como agente mejorador de la calidad, estabilizante, excipiente, espesante, y agente de carga.

#### Ejemplo 5

A 27,1 % (p/p) de almidón de maíz licuado (hidrólisis: 3,6 %), se añadió bisulfito de sodio y cloruro de calcio para dar concentraciones finales de 0,3 % (p/p) y 1 mM, respectivamente. A continuación, la solución se enfrió a 50 °C y se mezcló con 11,1 unidades/g de sólido de la solución de enzima bruta concentrada, preparada mediante el método del Ejemplo 1, seguido por la reacción de la enzima a pH 6,0 y 50 °C durante 68 horas. Después de calentar la mezcla de reacción a 80 °C durante 60 minutos, se enfrió y se filtró. De acuerdo con los métodos convencionales, el filtrado resultante se decoloró con carbón activado, se desionizó usando resinas de intercambio iónico con forma H y OH, se concentró y se secó por pulverización para obtener el  $\alpha$ -glucano ramificado en polvo. En el análisis de metilación del  $\alpha$ -glucano ramificado, la relación del producto 2,3,6-trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado fue de 1:2,5, y el contenido total del producto 2,3,6 trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado fue del 68,4 % en los productos parcialmente metilados. Adicionalmente, el contenido del producto 2,4,6-trimetilado y el producto de 2,4-dimetilado fue del 2,6 % y 6,8 %, respectivamente, en los productos parcialmente metilados. El peso molecular promedio en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado fue de 4.097 dalton y el valor de dividir el peso molecular promedio en peso por el peso molecular promedio en número (Mw/Mn) fue de 2,1. Además, 35,6 % (p/p) de isomaltosa, sobre una base sólida seca del hidrolizado, se formó del  $\alpha$ -glucano ramificado por digestión con isomaltodextranasa. El contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado fue 79,4 % (p/p) mediante el método Enzima-HPLC. Dado que el  $\alpha$ -glucano ramificado tiene una propiedad no cariogénica, es difícilmente digerible y tiene una viscosidad adecuada, puede usarse ventajosamente en diversas composiciones, tales como alimentos y bebidas, cosméticos y productos farmacéuticos como WSDF, sustituto de grasa de alimentos, bebidas y alimentos, como agente mejorador de la calidad, estabilizante, excipiente, espesante, y agente de carga.

#### Ejemplo 6

Excepto por el uso de  $\alpha$ -glucosiltransferasa purificada de *Bacillus circulans* PP710, FERM BP-10771, preparada mediante el método del Experimento 6, en lugar de la preparación de enzima bruta concentrada, y el uso de 1.000 unidades/g de sólido de la isoamilasa de *Pseudomonas amyloclavata*, comercializada por Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japón; el  $\alpha$ -glucano ramificado en polvo se obtuvo de acuerdo con el método del Ejemplo 5. En el análisis de metilación del  $\alpha$ -glucano ramificado, una proporción del producto 2,3,6-trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado fue de 1: 4, y el contenido total del producto 2,3,6-trimetilado y el producto 2,3,4-trimetilado fue del 67,9 % en los productos parcialmente metilados. Adicionalmente, el contenido del producto 2,4,6-trimetilado y el producto de 2,4-dimetilado fue del 2,3 % y 5,3 %, respectivamente, en los productos parcialmente metilados. El peso molecular promedio en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado fue de 2.979 dalton y el valor de dividir el peso molecular promedio en peso por el peso molecular promedio en número (Mw/Mn) fue de 2,0. Además, 40,6 % (p/p) de isomaltosa, sobre una base sólida seca del hidrolizado, se formó del  $\alpha$ -glucano ramificado por digestión con isomaltodextranasa. El contenido de WSDF del  $\alpha$ -glucano ramificado fue 77 % (p/p) mediante el método Enzima-HPLC. Dado que el  $\alpha$ -glucano ramificado tiene una propiedad no cariogénica, es difícilmente digerible y tiene una viscosidad adecuada, puede usarse ventajosamente en diversas composiciones, tales como alimentos y bebidas, cosméticos y productos farmacéuticos como WSDF, sustituto de grasa de alimentos, bebidas y alimentos, como agente mejorador de la calidad, estabilizante, excipiente, espesante, y agente de carga.

Ejemplo de referencia 7

- 5 De acuerdo con los métodos convencionales, se investigaron las propiedades fisicoquímicas del  $\alpha$ -glucano ramificado preparado en el Ejemplo 5 y los resultados se resumen en la Tabla 41 como un ejemplo de las propiedades del  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación.

Tabla 41

Aspecto	Polvo amorfo blanco insípido e inodoro
Solubilidad	No es soluble en alcohol, acetona, hexano, benceno, acetato de etilo, tetracloruro de carbono, cloroformo y éter. Soluble en agua, formamida y dimetilsulfóxido
pH de la solución acuosa	Ligeramente ácido
Azúcar componente	Solo glucosa
Rotación óptica específica	+194,1° a +194,4° (Concentración, 20 °C)
Reacción de color	Positiva: Reacción antrona-sulfato, reacción fenol-sulfato Negativa: Reacción de Biuret, reacción de Lowry-Foline, reacción de Elson-Morgan
Punto de fusión	No muestra el punto de fusión definido
Análisis de la metilación	Muestra la presencia de restos de glucosa que implican extremo no reductor, enlace 1,3, enlace 1,4, enlace 1,6, enlace 1,3,6 y enlace 1,4,6
Espectro de resonancia infrarroja	Muestra una absorción característica en el anómero $\alpha$ de la D-glucosa alrededor de 844 $\text{cm}^{-1}$
Espectro de RMN-C	Muestra una señal característica para el enlace alfa-1,6 aproximadamente a 68 ppm
Digestibilidad enzimática	Forma isomaltosa mediante tratamiento con dextranasa

10 Ejemplo de referencia 8Agente mejorador de la calidad

- 15 Cuatrocientas partes en peso de "FINETOSE®", una maltosa anhidro comercializada por Hayashibara Shoji Inc., Okayama, Japón, 200 partes en peso de "TREHA®", trehalosa comercializada por Hayashibara Shoji Inc., Okayama, Japón, y dos partes en peso de solución de  $\alpha$ -glucosiltransferasa purificada, preparada a partir de *Bacillus circulans* PP710 (FERM BP-10771) mediante el método del Ejemplo 6, se mezclaron hasta la homogeneidad y se secaron mediante secado por circulación convencional para obtener una preparación enzimática que comprende  $\alpha$ -glucosiltransferasa. El producto se puede utilizar para la modificación de sustancias amiláceas y la inhibición de la retrogradación del almidón mediante la incorporación en sustancias amiláceas para la producción de alimentos y bebidas. Por lo tanto, se puede utilizar ventajosamente como un agente mejorador de la calidad, en particular, como un agente inhibidor de la retrogradación de almidón.

25 Ejemplo 9"Mochi" (torta de arroz)

- 30 Quinientos partes en peso de "shiratamako" (Harina de arroz) y 500 partes en peso de "joshinko" (harina de arroz) se mezclaron hasta la homogeneidad, a continuación, se mezclaron 700 partes en peso de agua con la mezcla y se cocieron al vapor durante 40 minutos. Sucesivamente, la harina de arroz cocido al vapor se amasó hasta una pasta con "ACM20LVW", un mezclador comercializado por Aicoh, Saitama, Japón. Después de enfriar la pasta hasta aproximadamente 55 °C, 360 partes en peso de sacarosa y 240 partes en peso de "TREHA®", trehalosa comercializada por Hayashibara Shoji Inc., Okayama, Japón, se mezclaron con la pasta. A continuación, la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, purificada mediante el método del Experimento 6, se mezcló con la mezcla anterior para dar una actividad enzimática final de 50 unidades/g de sustancia de almidón dividiendo por cuatro. Sucesivamente, la mezcla se amasó adicionalmente durante tres minutos y después se le dio forma cargando la pasta en un recipiente de plástico con el diámetro interno de 60 mm y la altura de 22 mm, y se enfrió y se conservó. El producto es un "mochi" (torta de arroz) con una calidad alta, textura suave y capacidad de extensión, porque la sustancia amilácea en la pasta se convierte en  $\alpha$ -glucano ramificado por la acción de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa e inhibe la retrogradación del almidón.

45 Ejemplo 10"Ohagi" (nola de masa de arroz cubierta con mermelada de judías)

- 45 Trescientas cincuenta partes en peso de "SUNMALT®", maltosa comercializada por Hayashibara Shoji Inc., Okayama, Japón, y 150 partes en peso de "TREHA®", trehalosa comercializada por Hayashibara Shoji Inc.,

Okayama, Japón, se disolvieron en agua caliente para fabricar una solución de sacárido con una concentración de 70 % (p/p), y, después, se mantuvo a una temperatura de 55 °C. Sucesivamente, 1000 partes en peso de arroz glutinoso, que se había empapado en agua, se trataron con vapor por el método convencional utilizando un vaporero y después se enfrió a 55 °C. Con el arroz glutinoso cocido al vapor, 500 partes en peso de la solución de sacárido anterior y 25 unidades/g de sustancia de almidón de la  $\alpha$ -glucosiltransferasa, purificada por el método del Experimento 9, se mezclaron y se agitaron hasta homogeneidad. Después de mantener la mezcla a 45-50 °C durante aproximadamente una hora en un recipiente calentado, se convirtió en "ohagi" (bola de masa de arroz cubierta de la mermelada de judías) con mermelada de judías. El producto es "ohagi" con una alta calidad, lo que mantiene la textura suave justo después de la preparación y no muestra sinéresis cuando se descongela después de la refrigeración o congelación, porque el almidón gelatinizado se convierte en  $\alpha$ -glucano ramificado mediante la acción de  $\alpha$ -glucosiltransferasa e inhibe la retrogradación del almidón.

#### Ejemplo de referencia 11

##### 15 Leche condensada edulcorada

Dos partes en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido por el método del Ejemplo 3, y tres partes en peso de sacarosa se disolvieron en 100 partes en peso de leche del material. La mezcla resultante se esterilizó mediante calentamiento con un calentador de placas, se concentró hasta dar una concentración de 70 %, y después se envasó en una lata en condiciones de esterilidad para convertirlo en un producto. Dado que el producto tiene un dulzor suave y buen sabor, se puede usar ventajosamente como una leche condensada azucarada rica en WSDF para especiar frutas, café, cacao, té negro, y similares.

#### Ejemplo de referencia 12

##### 25 Bebida de bacterias de ácido láctico

Ciento setenta y cinco partes en peso de leche desnatada, 50 partes en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado en polvo, obtenido por el método del Ejemplo 4, y 50 partes en peso de "NYUKA-OLIGO®", un polvo con un contenido alto de lactosacarosa comercializado por Hayashibara Shoji Inc., Okayama, Japón, se disolvió en 1.500 partes en peso de agua, y, después, la mezcla resultante se esterilizó a 65 °C durante 30 minutos. Después de enfriar la mezcla a 40 °C, 30 partes en peso de una bacteria del ácido láctico se inocularon en la mezcla como iniciador de acuerdo con el método convencional, y se cultivaron a 37 °C durante ocho horas para obtener una bebida de bacterias de ácido láctico. El producto tiene un sabor satisfactorio y mantiene la bacteria del ácido láctico de forma estable porque comprende  $\alpha$ -glucano ramificado como una WSDF y oligosacárido. Además, el producto se usa, preferentemente, como una bebida de bacterias del ácido láctico que tiene una actividad promotora del crecimiento para las bifidobacterias y una actividad de regulación de la función del intestino.

#### Ejemplo de referencia 13

##### 40 Zumo en polvo

A 33 partes en peso de un zumo de naranja en polvo, producido por un método de secado por pulverización, 10 partes en peso de un polvo de  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido por el método del Ejemplo 4, 20 partes en peso de trehalosa cristalina hidratada, 20 partes en peso de maltitol cristalino anhidro, 0,65 partes en peso de ácido cítrico anhidro, 0,1 partes en peso de ácido málico, 0,2 partes en peso de ácido 2-O- $\alpha$ -glucosil-L-ascórbico, 0,1 partes en peso de sodio citrato, 0,5 partes en peso de pululano, y la cantidad adecuada de saborizante en polvo se mezclaron con agitación y la mezcla en polvo resultante se pulverizó para convertirla en un producto en polvo fino. A continuación, el producto en polvo se sometió a un granulador de lecho fluido y su temperatura de escape se fijó en 40 °C. Una cantidad adecuada de una solución que comprende  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido por el método del Ejemplo 2 se pulverizó como un aglutinante en el producto en polvo y se granuló durante 30 minutos, y el producto resultante se pesó y se embolsó para convertirlo en un producto. El producto es un jugo en polvo con un contenido de zumo de frutas de aproximadamente 30 %. Dado que el producto no muestra ningún sabor ni olor extraños, tiene una alta calidad y valor comercial como un zumo bajo en calorías rico en WSDF.

#### Ejemplo de referencia 14

##### Crema pastelera

Cien partes en peso de almidón de maíz, 30 partes en peso de la solución que comprende  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido por el método del Ejemplo 3, 70 partes en peso de trehalosa cristalina hidratada, 40 partes en peso de sacarosa, y una parte en peso de cloruro de sodio se mezclaron bien, y, después, 280 partes en peso de huevo entero se mezclaron adicionalmente con la mezcla. Sucesivamente, a 1.000 partes en peso de leche hervida se mezclaron gradualmente con la mezcla resultante y la solución resultante se agitó continuamente con llama abierta. El calentamiento se detuvo en el punto en que el almidón de maíz estaba completamente gelatinizado para dar una transparencia. Después de enfriar la mezcla, una cantidad adecuada de esencia de vainilla se mezcló con la mezcla,

se pesó y se embolsó para convertirla en un producto de crema pastelera. El producto es una crema pastelera de alta calidad con un brillo y sabor satisfactorios y rica en WSDF.

#### Ejemplo de referencia 15

5

#### "Ann" (mermelada de judías edulcorada)

De acuerdo con el método convencional, 10 partes en peso de judía adzuki material se hirvió en agua, y se eliminaron los astringentes, el lixiviado y los contaminantes solubles en agua, y se convirtieron en aproximadamente 21 partes en peso de adzuki "ann" (mermelada de judías). continuación, 14 partes en peso de sacarosa, 5 partes en peso de una solución que comprende  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenido por el método del Ejemplo 3, y cuatro partes en peso de agua se mezclaron con la mermelada de judías anterior y se llevaron a ebullición. Después de la adición de una pequeña cantidad de aceite para ensaladas, la mermelada de judías se amasó sin triturar la judía hasta convertirlo en aproximadamente 35 partes en peso del producto. Dado que el producto es mermelada de judías estable sin deterioro de color y sinéresis y rica en  $\alpha$ -glucano ramificado como WSDF, se puede usar, preferentemente, como material de confitería, tales como un bollo relleno de mermelada de judía, torta de mermelada de judía, leche helada y similares.

#### Ejemplo 16 de referencia

20

#### Pan

Cien partes en peso de harina de trigo, dos partes en peso de levadura, cinco partes en peso de sacarosa, 1 parte en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado obtenido por el método del Ejemplo 4, 0,1 partes en peso de sales inorgánicas y agua se mezclaron y se amasaron mediante el método convencional. A continuación, la pasta resultante se fermentó a 26 °C durante dos horas, se fermentó adicionalmente durante 30 minutos, y se horneó.

El producto muestra un color satisfactorio, una protuberancia suave y esponjosa, y rica en  $\alpha$ -glucano ramificado como WSDF. El producto es pan con una alta calidad que muestra una elasticidad y un dulzor suave satisfactorios.

30

#### Ejemplo 17 de referencia

#### Producto peptídico en polvo

A una parte en peso de "HI-NUTE S®", 40 % de solución de péptidos de soja para alimentos, comercializada por Fuji Oil Co., Ltd., Osaka, Japón, dos partes en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado en polvo, obtenido mediante el método en el Ejemplo 4, se mezcló y la mezcla resultante se colocó en una bandeja de plástico, se secó a 50 °C a presión reducida, y se pulverizó para hacer un producto peptídico en polvo. El producto tiene un sabor satisfactorio y es útil como material para productos de confitería con un nivel bajo de calorías y de premezcla, para postres helados. Además, el producto es útil como fibra dietética y antifatulento para una dieta de fluidos para ingesta oral o por sonda.

40

#### Ejemplo 18 de referencia

#### Crema cosmética

Según el método convencional, dos partes en peso de monoestearato de polioxietilenglicol, cinco partes en peso de monoestearato de glicerina autoemulsionado, dos partes en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado en polvo, obtenido por el método del Ejemplo 4, una parte en peso de " $\alpha$ G-RUTIN",  $\alpha$ -glucosilrutina, comercializado por Hayashibara Inc., Okayama, Japón, una parte en peso de parafina líquida, 10 partes en peso de trioctanoato de glicerina y una cantidad adecuada de conservante se mezclaron y se disolvieron por calentamiento. La mezcla resultante se mezcló adicionalmente con dos partes en peso de ácido L-láctico, cinco partes en peso de 1,3-butilenglicol y 66 partes en peso de agua purificada, y la mezcla resultante se emulsionó utilizando un homogeneizador. La mezcla homogeneizada se mezcló adicionalmente con una cantidad adecuada de aroma y se agitó para hacer una crema cosmética. El producto tiene una propiedad de retención de humedad satisfactoria porque comprende el  $\alpha$ -glucano ramificado. El producto tiene una estabilidad satisfactoria y se puede utilizar ventajosamente como un agente de cuidado de la piel preventivo de quemaduras solares y agente de blanqueamiento de la piel.

50

#### Ejemplo de referencia 19

60

#### Pasta de dientes

Cuarenta y cinco partes en peso de monohidrogenofosfato de calcio, 1,5 partes en peso de laurilsulfato de sodio, 25 partes en peso de glicerina, 0,5 partes en peso de laurato de polioxietileno sorbitán, 15 partes en peso de la solución que comprende  $\alpha$ -glucano ramificado, obtenidos por el método del Ejemplo 3, 0,02 parte en peso de sacarina, y 18 partes en peso de agua se mezclaron para hacer una pasta de dientes. El producto es pasta de dientes que muestra

65

una disponibilidad satisfactoria sin perder la propiedad de lavado de agente tensioactivo.

#### Ejemplo de referencia 20

##### 5 Agente sólido para una dieta fluida

Cien partes en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado en polvo, obtenido por el método del Ejemplo 4, 200 partes en peso de trehalosa cristalina hidratada, 200 partes en peso de polvo con un contenido alto de una maltotetraosa, 270 partes en peso de polvo de yema de huevo, 209 partes en peso de leche desnatada, 4,4 partes en peso de cloruro de sodio, 1,8 partes en peso de cloruro de potasio, cuatro partes en peso de sulfato de magnesio, 0,01 parte en peso de tiamina, 0,1 parte en peso de L-ascorbato sódico, 0,6 partes en peso de acetato de vitamina E y 0,04 partes en peso de ácido nicotínico-amida se mezclaron para hacer una composición. Veinticinco gramos de cada de la composición se envasaron en una bolsa de laminada a prueba de humedad y la bolsa se selló con calor para hacer un producto. El producto contiene WSDF y se puede utilizar ventajosamente para el suministro de energía para los cuerpos vivos como una dieta de fluido para regular la función del intestino mediante ingestión oral o a través de una sonda en la cavidad nasal, el estómago, y el intestino.

#### Ejemplo de referencia 21

##### 20 Comprimido

A 50 partes en peso de aspirina, 14 partes en peso de polvo de trehalosa cristalina hidratada y cuatro partes en peso del  $\alpha$ -glucano ramificado en polvo, obtenido por el método del Ejemplo 4, se mezclaron hasta la homogeneidad. De acuerdo con el método convencional, la mezcla resultante se convirtió en un comprimido con 680 mg/comprimido y un espesor de 5,25 mm usando una máquina de formación de comprimidos. El producto se fabricó usando el glucano apenas digerible y trehalosa como excipientes. El producto no muestra higroscopicidad ni una resistencia física satisfactoria, pero se rompe fácilmente en el agua. Además, puesto el  $\alpha$ -glucano ramificado actúa como WSDF, el comprimido se puede utilizar para regular las funciones del intestino.

##### 30 Ejemplo de referencia 22

#### Pomada para curar heridas

A 400 partes en peso de maltosa, 50 partes en peso de una solución de metanol que contiene tres partes en peso de yodo y 200 partes en peso de 10 % (p/v) de solución acuosa que contiene  $\alpha$ -glucano ramificado en polvo, obtenido por el método en el Ejemplo 4, se mezclaron para hacer una pomada para la curación de heridas con una propiedad de extensibilidad y adhesiva adecuadas. El producto muestra una viscosidad y propiedades de retención de humedad adecuadas, y es una pomada con un alto valor comercial y menos cambios en el tiempo. Puesto que el yodo en el producto tiene actividad antimicrobiana y la maltosa en el producto actúa como un suplemento de energía para las células, se acorta el período de curado y la superficie de la herida se cura completamente.

#### **Aplicabilidad industrial**

Dado que el  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación muestra una alta seguridad y casi igual digestibilidad con una dextrina poco digerible disponible en el comercio, se puede utilizar ventajosamente como WSDF. Además, dado que  $\alpha$ -glucano ramificado de la presente divulgación muestra efectos de la inhibición del aumento de nivel de azúcar en sangre y la reducción de los lípidos en los cuerpos vivos, es útil como alimento saludable. De acuerdo con la presente invención, el  $\alpha$ -glucano ramificado, teniendo una digestibilidad caso igual con la dextrina poco digerible que se ha producido a partir del almidón por reacción química o un método complicado e ineficiente, se puede producir eficazmente a gran escala mediante reacción enzimática.



## REIVINDICACIONES

1. Uso de una  $\alpha$ -glucosiltransferasa para formar un  $\alpha$ -glucano ramificado, que es construido por moléculas de glucosa y se **caracteriza por** análisis de metilación como los siguientes (1) a (4):

- 5 (1) la relación de 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol con respecto a 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol está en el intervalo de 1:0,6 a 1:4;  
 (2) el contenido total de 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol es del 60 % o mayor en los acetatos de glucitol parcialmente metilados;  
 10 (3) el contenido de 2,4,6-trimetil-1,3,5-triacetil-glucitol es de 0,5 % o mayor, pero inferior al 10 % en los acetatos de glucitol parcialmente metilados; y  
 (4) el contenido de 2,4-dimetil-1,3,5,6-tetraacetil-glucitol es de 0,5 % o mayor en los glucitol acetatos parcialmente metilados;

15 en donde dicha  $\alpha$ -glucosiltransferasa procede de un microorganismo del género *Bacillus* o *Arthrobacter* y tiene una actividad de formación de dicho  $\alpha$ -glucano ramificado transfiriendo un resto de  $\alpha$ -glucosa cuando se permite que actúe en maltosa y/o un  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o más; y tiene las siguientes propiedades fisicoquímicas (a) a (e):

- 20 (a) peso molecular  
 90.000  $\pm$  10.000 daltons en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida;  
 (b) temperatura óptima  
 de 50 a 55 °C cuando reacciona a pH 6,0 durante 30 min;  
 (c) pH óptimo  
 25 pH de 5,0 a 6,3 cuando reacciona a 40 °C durante 30 min;  
 (d) estabilidad térmica  
 estable hasta la temperatura de 40 °C cuando se incuba a pH 6,0 durante 60 min; y  
 (e) estabilidad del pH  
 estable en el intervalo de pH de 4,0 a 8,0 cuando se incuba a 4 °C durante 24 horas.

30 2. El uso según la reivindicación 1, en donde dicho microorganismo del género *Bacillus* es *Bacillus circulans* PP710 (Depositorio de organismos de patente internacional, Instituto nacional de ciencia y tecnología industrial avanzada, n.º de referencia FERM BP-10771).

35 3. El uso según la reivindicación 1, en donde dicho microorganismo del género *Arthrobacter* es *Arthrobacter globiformis* PP349 (Depositorio de organismos de patente internacional, Instituto nacional de ciencia y tecnología industrial avanzada, n.º de referencia FERM BP-10770).

40 4. Un microorganismo capaz de producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es *Bacillus circulans* PP710 (Depositorio de organismos de patente internacional, Instituto nacional de ciencia y tecnología industrial avanzada, n.º de referencia FERM BP-10771) o *Arthrobacter globiformis* PP349 (Depositorio de organismos de patente internacional, Instituto nacional de ciencia y tecnología industrial avanzada, n.º de referencia FERM BP-10770).

45 5. Un proceso para producir una  $\alpha$ -glucosiltransferasa, que comprende las etapas de:

cultivar un microorganismo capaz de producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa como se define en la reivindicación 4; y recoger la  $\alpha$ -glucosiltransferasa del cultivo resultante.

50 6. Un proceso para producir  $\alpha$ -glucano ramificado, en donde el  $\alpha$ -glucano ramificado es construido por moléculas de glucosa y **caracterizado por** análisis de metilación como los siguientes (1) a (4):

- (1) La relación de 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol con respecto a 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol está en el intervalo de 1:0,6 a 1:4;  
 55 (2) El contenido total de 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol es del 60 % o mayor en los acetatos de glucitol parcialmente metilados;  
 (3) El contenido de 2,4,6-trimetil-1,3,5-triacetil-glucitol es del 0,5 % o mayor pero menor del 10 % en los acetatos de glucitol parcialmente metilados; y  
 60 (4) El contenido de 2,4-dimetil-1,3,5,6-tetraacetilglucitol es del 0,5 % o mayor en los acetatos de glucitol parcialmente metilados;

que comprende las etapas de:

65 permitir que la  $\alpha$ -glucosiltransferasa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 actúe en maltosa y/o  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de 3 o más para formar el  $\alpha$ -glucano ramificado;  
 y

recoger el  $\alpha$ -glucano ramificado formado.

5 7. El proceso de la reivindicación 6, donde una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en amilasa, enzima de desramificación de almidón y ciclomaltodextrina glucanotransferasa se usan en combinación para formar el  $\alpha$ -glucano ramificado.

8. El proceso de la reivindicación 7, en donde dicha amilasa tiene las siguientes propiedades fisicoquímicas:

- 10 (1) acción  
hidrolizar almidón y transferir grupo de glucosilo; formar ciclodextrinas; e hidrolizar pululano para formar panosa;
- (2) peso molecular  
58.000  $\pm$  10.000 daltons en electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida;
- (3) temperatura óptima  
55 °C cuando reacciona a pH 6,0 durante 30 min;
- 15 (4) pH óptimo  
pH de 6 a 7 cuando reacciona a 35 °C durante 30 min;
- (5) estabilidad térmica  
estable hasta la temperatura de 40 °C cuando se incuba a pH 6,0 durante 60 min;  
estable hasta las temperaturas de 50 °C cuando se incuba a pH 6,0 en presencia de ion de  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM; y
- 20 (6) estabilidad de pH  
estable al menos en el intervalo de pH de 6,0 a 8,0 cuando se incuba a 4 °C durante 24 horas.

9. El proceso de la reivindicación 7 u 8, en donde dicha amilasa procede de un microorganismo del género *Bacillus*.

25 10. El proceso de la reivindicación 9, en donde dicho microorganismo del género *Bacillus* es *Bacillus circulans* PP710 (Depositorio de organismos de patente internacional, Instituto nacional de ciencia y tecnología industrial avanzada, n.º de referencia FERM BP-10771).

30 11. Un proceso para producir  $\alpha$ -glucano ramificado construido por moléculas de glucosa y **caracterizado por** análisis de metilación como los siguientes (1) a (4):

- (1) la relación de 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol con respecto a 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol está en el intervalo de 1:0,6 a 1:4;
- 35 (2) el contenido total de 2,3,6-trimetil-1,4,5-triacetil-glucitol y 2,3,4-trimetil-1,5,6-triacetil-glucitol es del 60 % o mayor en los acetatos de glucitol parcialmente metilados;
- (3) el contenido de 2,4,6-trimetil-1,3,5-triacetil-glucitol es del 0,5 % o mayor pero menor del 10 % en los acetatos de glucitol parcialmente metilados; y
- (4) el contenido de 2,4-dimetil-1,3,5,6-tetraacetilglucitol es del 0,5 % o mayor en los acetatos de glucitol parcialmente metilados;

40 que comprende las etapas de:

- 45 cultivar un microorganismo capaz de producir la  $\alpha$ -glucosiltransferasa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un medio nutriente que contiene maltosa y/o  $\alpha$ -1,4 glucano que tiene un grado de polimerización de glucosa de 3 o más; y  
recoger el  $\alpha$ -glucano ramificado formado del cultivo resultante.

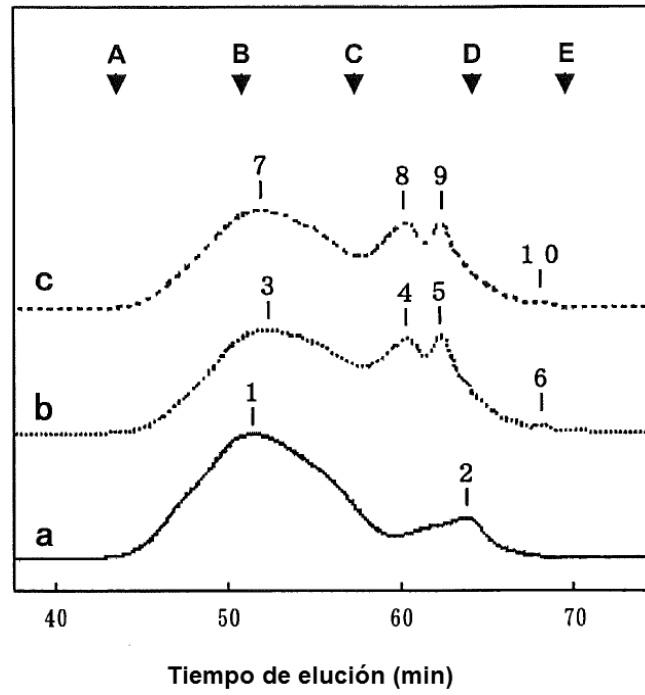


FIG. 1

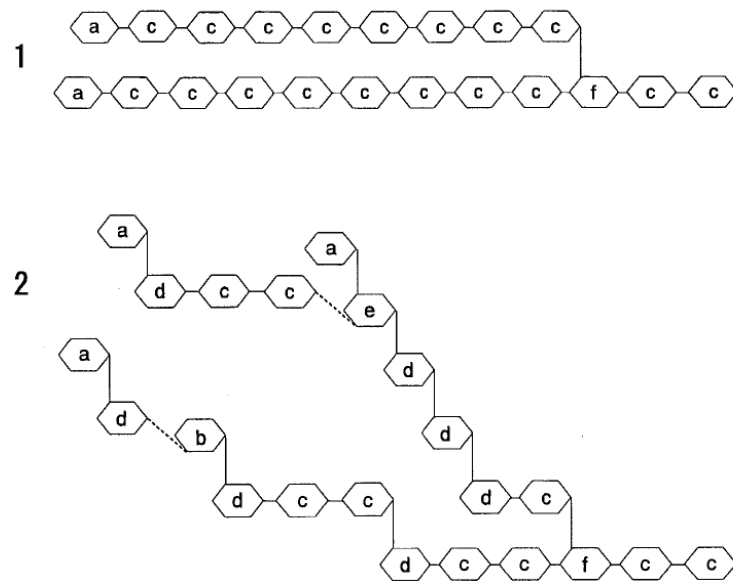


FIG. 2

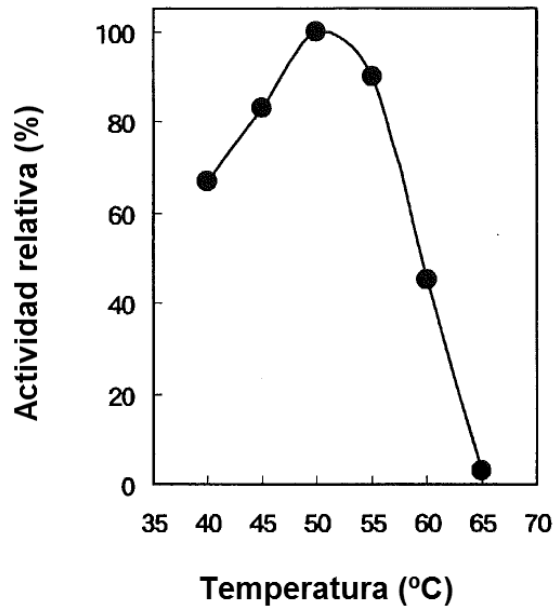


FIG. 3

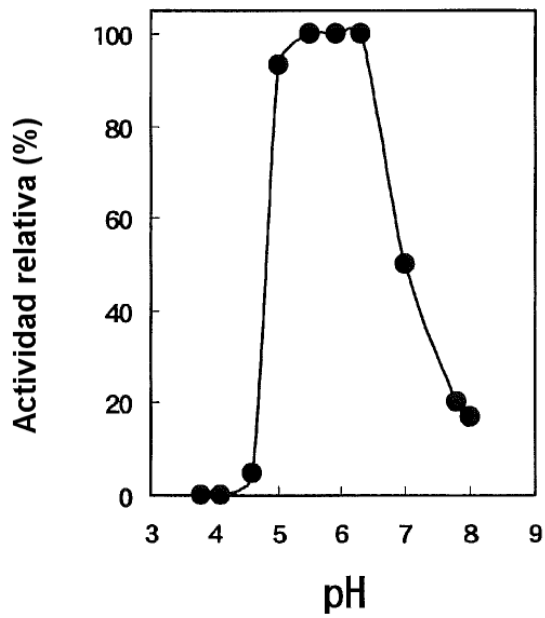


FIG. 4

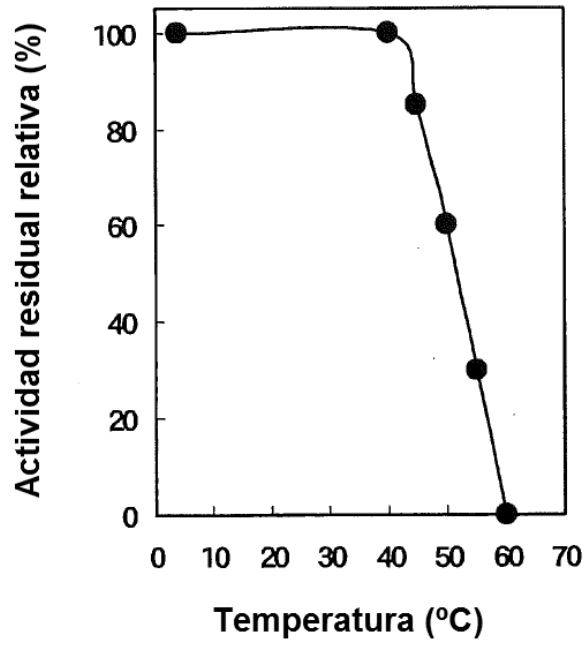


FIG. 5

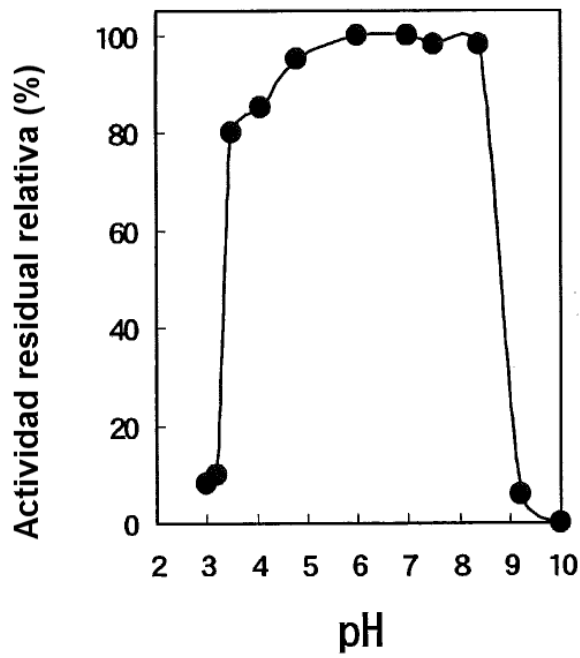


FIG. 6

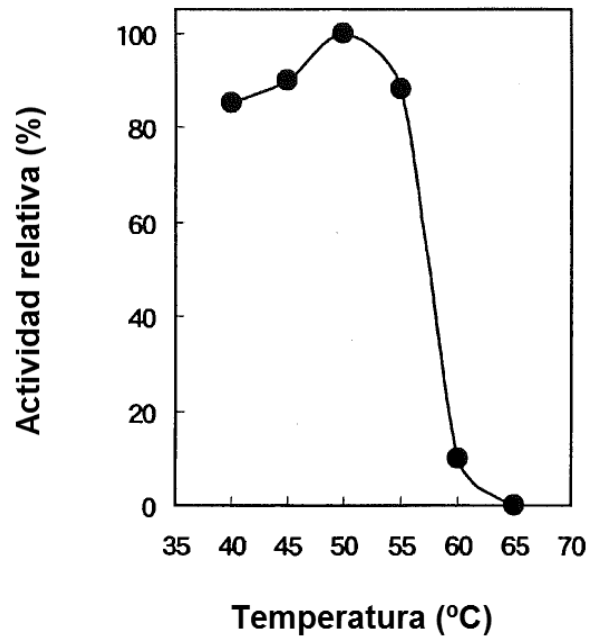


FIG. 7

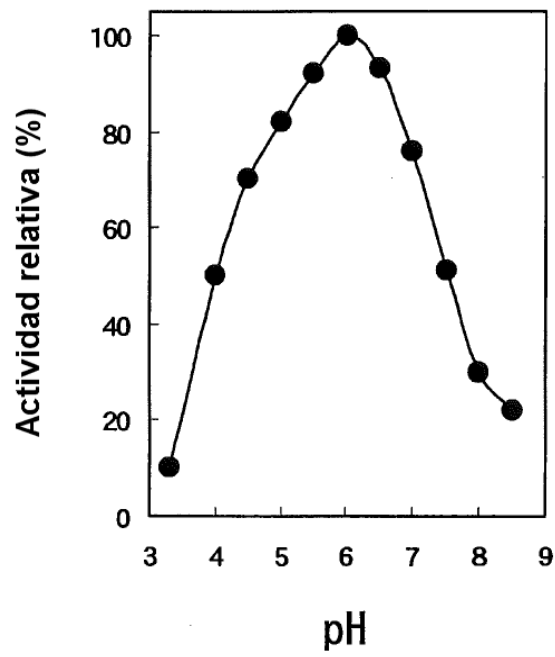


FIG. 8

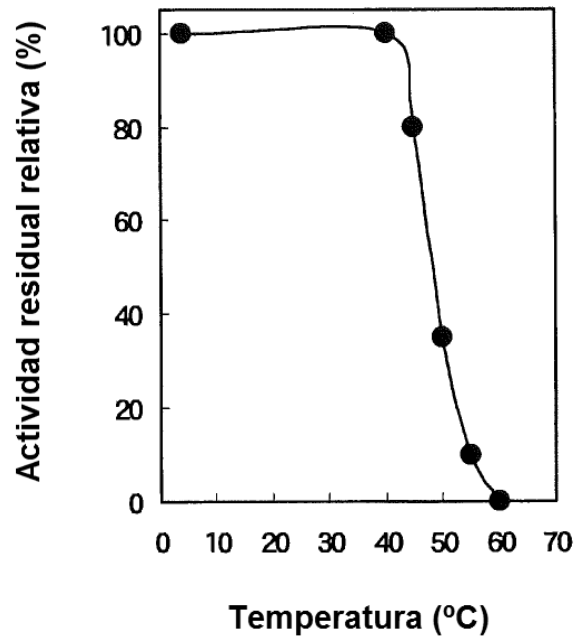


FIG. 9

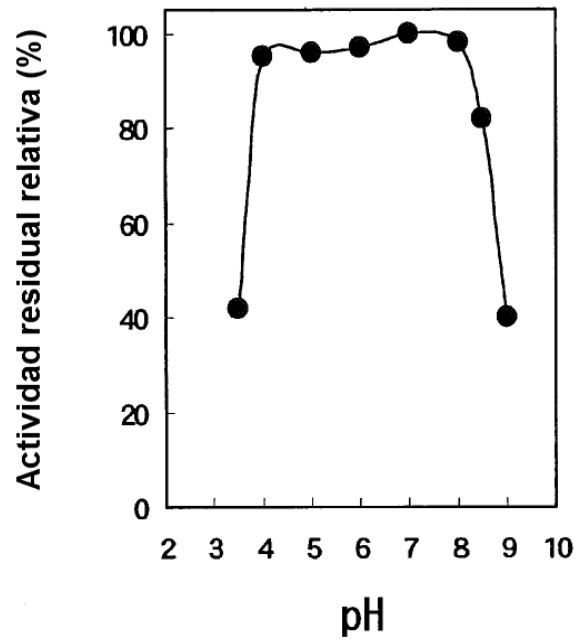


FIG. 10

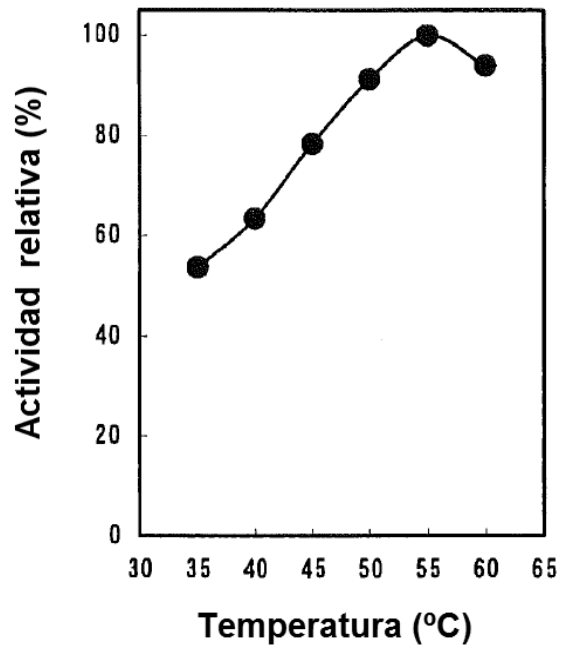


FIG. 11

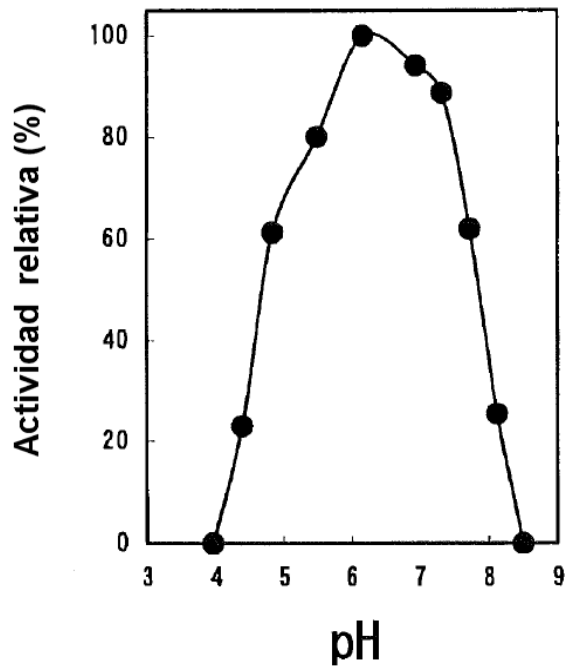


FIG. 12



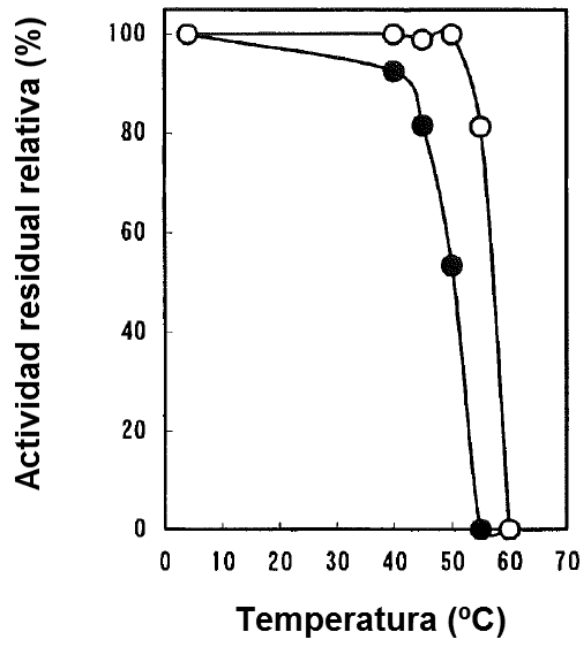


FIG. 13

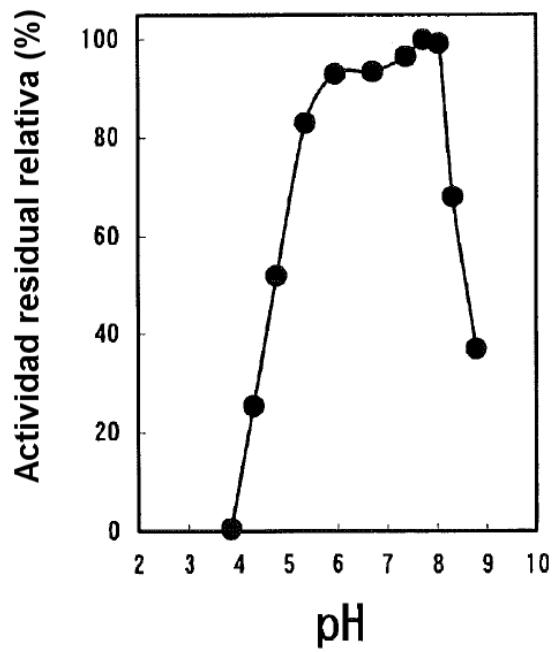


FIG. 14

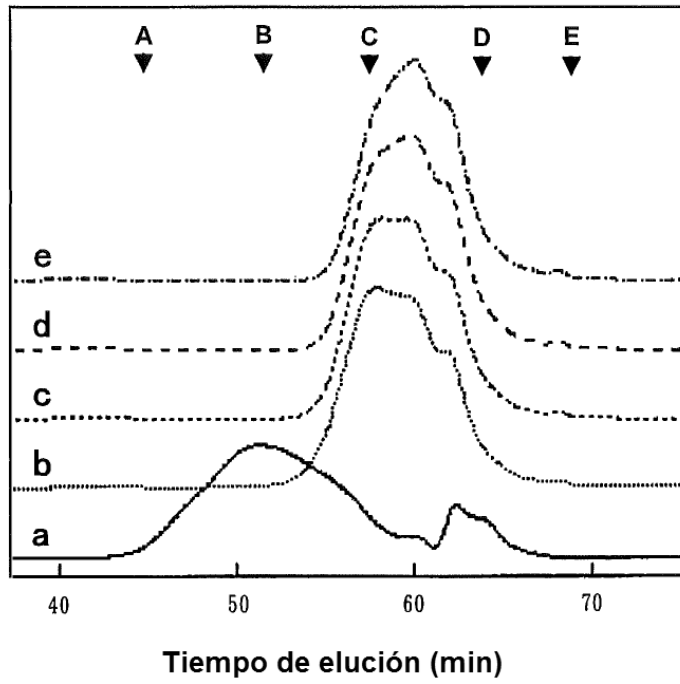


FIG. 15

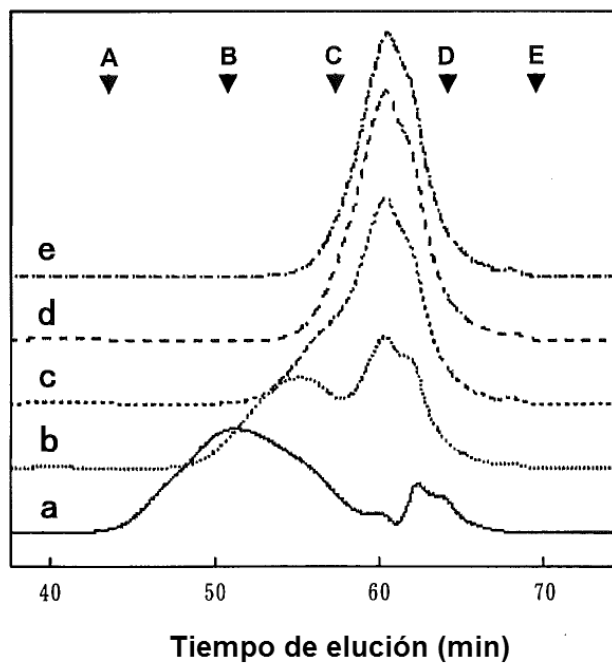


FIG. 16

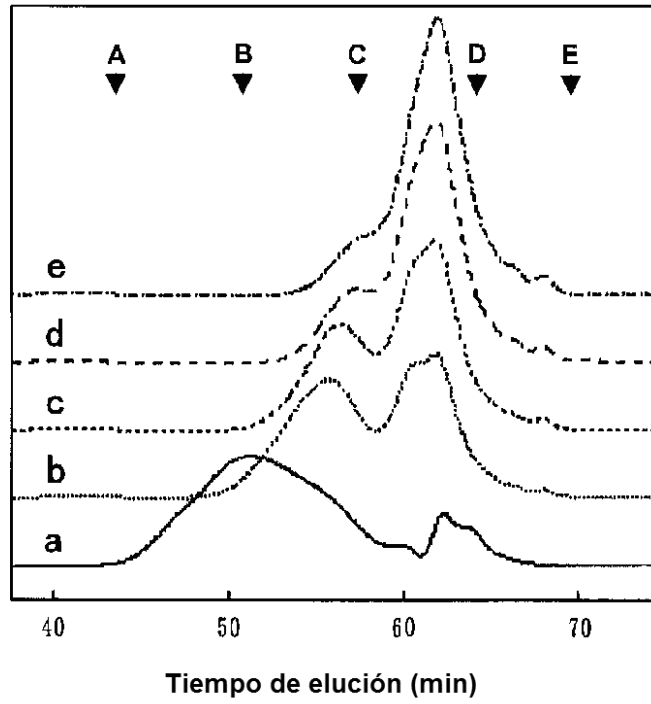


FIG. 17

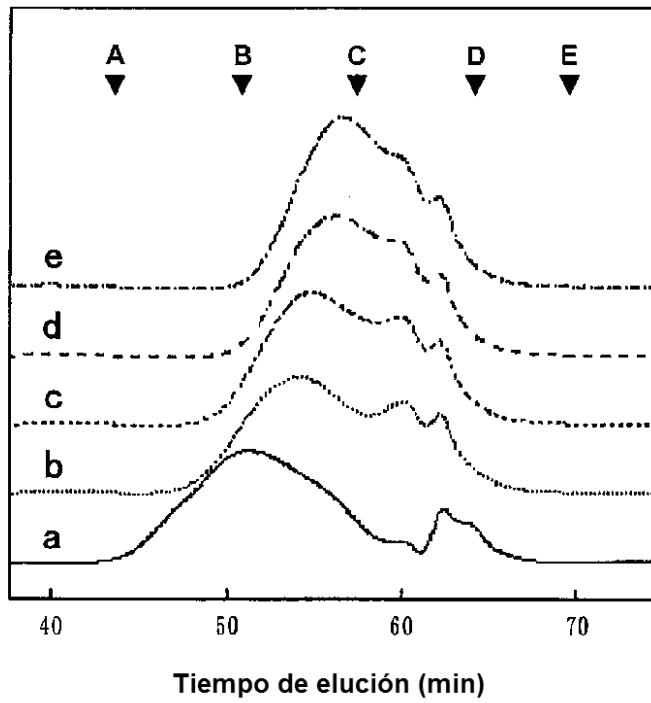


FIG. 18

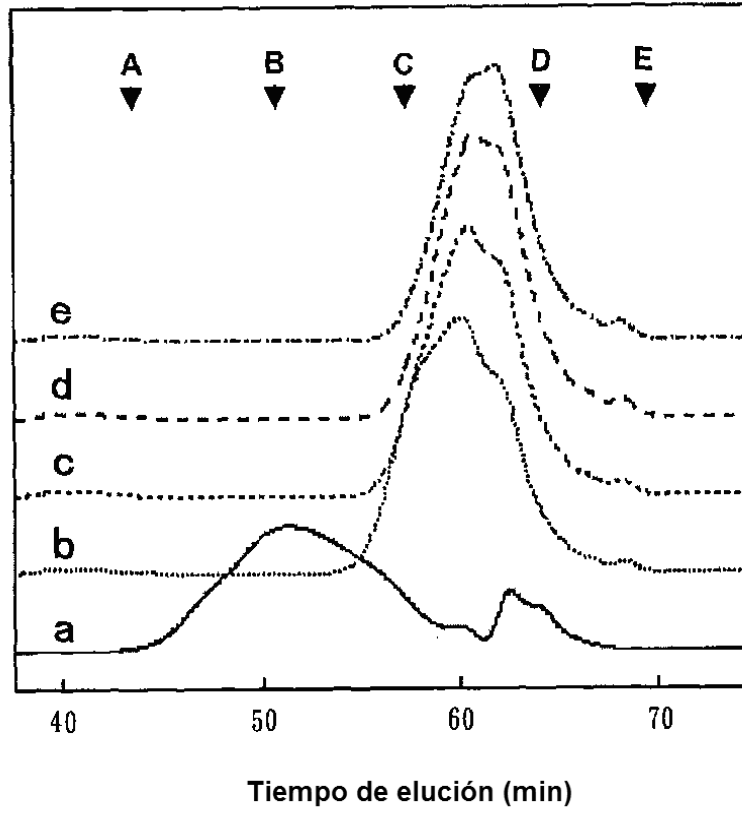


FIG. 19