ROYAUME DE BELGIQUE

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

BREVET D'INVENTION

NUMERO DE PUBLICATION : 1010300A3

NUMERO DE DEPOT : 09600458

Classif. Internat. : A23J

Date de délivrance le : 05 Mai 1998

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 22 Mai 1996 à 24H00 à l 'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : PERSONNALITE JURIDIQUE DE LA STATION LAITIERE DE L'ETAT
chaussée de Namur 24, B-5030 GEMBLOUX(BELGIQUE)

représenté(e)(s) par : Mr.MODRIE, NOVAMARK & VIGNERON, Boulevard du Souverain 7 - B 1170 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE DE PREPARATION DE PEPTIDES EXEMPTS DE PHENYLALANINE.

INVENTEUR(S) : Laloux Jean, rue des Anémones 11, B-5030 Gembloux (BE); Moons Emmanuelle, place Arthur Lacroix 11, B-5030 Gembloux (BE); Baudart Evelyne, rue des Forsythias 17, B-5001 Belgrade (BE); Wathelet Bernard, Basse Montagne 15, B-5100 Wepion (BE)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 05 Mai 1998
PAR DELEGATION SPECIALE :

L. FUYTS
CONSEILLER

Procédé de préparation de peptides exempts de phénylalanine.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation de peptides exempts de phénylalanine, en particulier comme aliment protéique de complément pour malades atteints de phénylcétonurie.

La phénylcétonurie fait partie des maladies dites aminoacidopathies. Elle est la conséquence d'un dysfonctionnement complet ou partiel de l'enzyme phénylalanine hydroxylase dû à des mutations génétiques. Les personnes atteintes ne cataboli-sent plus normalement la phénylalanine (Phe) en tyrosine. La Phe s'accumule alors en excès dans le sang et son taux plasmatique élevé entraîne, au niveau du cerveau, une diminution de la synthèse de la myéline et des altérations de la croissance de certains axones. On constate, chez les enfants atteints, de nombreuses anomalies neurologiques affectant principalement les réflexes. L'épilepsie apparaît et ces enfants présentent une hyperactivité extrême, des états psychotiques ainsi qu'une nette diminution de leur quotient intellectuel.

En Belgique, on dénombre actuellement 350 phénylcétonuriques (PCU), ce qui représente une naissance sur 10.000. Aussi a-t-on rendu le dépistage obligatoire de la maladie, dès après la naissance, par détection de la Phe (Test de Guthrie), d'un métabolite (phénylpyruvate dans les urines) ou de la Phe dans le plasma sanguin.

Le traitement de cette maladie consiste à limiter, le plus tôt possible après la naissance et par un régime, les apports de Phe dans l'alimentation de l'enfant, tout en satisfaisant ses besoins en acides aminés essentiels, dont la Phe. Il est donc nécessaire de nourrir l'enfant avec des aliments naturels à faible teneur en protéines (fruits, légumes, céréales ...), de tenir compte de la teneur moyenne de ces aliments en

protéines et en Phe et de compléter les besoins en protéines par des aliments de complément appauvris ou exempts de Phe. Il est exclu d'utiliser les protéines naturelles (viande, oeufs, lait, fromage), car elles contiennent en moyenne plus de 4% de Phe.

On connaît déjà des procédés de fabrication d'aliments protéiques de complément dont les plus anciens sont obtenus par hydrolyse acide des protéines en acides aminés, les acides aminés aromatiques, y compris la Phe, étant éliminés notamment par passage sur des colonnes de charbon activé. La mise en oeuvre de ces procédés présente l'inconvénient d'entraîner la destruction du tryptophane et la perte des acides aminés aromatiques. Ces procédés sont pratiquement abandonnés à l'heure actuelle.

On a aussi déjà pensé à produire, d'une part, des aliments de complément en mélangeant des acides aminés purifiés qui sont obtenus par fermentation (sans Phe) et, d'autre part, des aliments complets qui comprennent, outre lesdits acides aminés purifiés, des matières grasses, des hydrates de carbone, des vitamines, etc.... Ces aliments, qu'ils soient de complément ou complets, présentent des inconvénients majeurs. En effet, ils sont amers et ils provoquent le dégoût. C'est pourquoi les malades et surtout, parmi ceux-ci, les enfants ne montrent aucun appétit pour ces aliments. En outre, l'ingestion de ces derniers déclenche l'arrivée, en grande quantité, des acides aminés libres au niveau intestinal, d'où surcharge et perturbation des mécanismes d'absorption et de transport transmembranaire.

Pour pallier à ces inconvénients, des procédés de fabrication mettant en oeuvre une hydrolyse enzymatique des protéines à l'aide de deux enzymes ont été imaginés. La première de ces enzymes est une endopeptidase, choisie pour rompre de nombreuses liaisons peptidiques notamment du côté carboxyle des acides aminés aromatiques, tandis que la seconde enzyme est une exopeptidase qui sépare bon nombre d'acides aminés. L'hydrolysat est composé essentiellement d'acides aminés libres et de très petits peptides dont la Phe doit être extraite par passage sur

colonne chromatographique de séparation.

Ces derniers procédés présentent à leur tour un inconvénient de taille. Les produits obtenus selon ces procédés ne sont pas commercialisables compte tenu de leur coût de fabrication particulièrement élevé.

Donc, en résumé, on ne trouve actuellement, sur le marché, que deux types d'aliments pour malades atteints de phénylcétonurie, à savoir les aliments obtenus uniquement à partir de mélange d'acides aminés libres dépourvus de Phe et ceux obtenus à partir d'hydrolysats de protéines du lait, tels que les compléments connus sous les noms de "P.K.U. drink" (qui contient le glycomacropeptide) et de "Lophénalac". Tous ces aliments ont un si mauvais goût que leur ingestion suscite de très grandes réticences. La seule parade envisagée à ce jour pour remédier à cet état de fait consiste, lorsque lesdits aliments se présentent sous forme de poudre, à en garnir des gélules qui sont à absorber, en grand nombre, chaque jour.

Indépendamment de la préparation d'aliments de complément pour PCU, on connaît actuellement des procédés de séparation des peptides phosphorylés ou caséinophosphopeptides (CPP) rangés en deux catégories, à savoir : la séparation en masse et la séparation par chromatographie.

La séparation en masse, par agrégation phosphocalcique et soit précipitation en présence d'éthanol, soit séparation par ultrafiltration et diafiltration, ne permet pas de séparer les CPP avec un grand degré de pureté. Par contre, les techniques chromographiques, qui sont beaucoup plus spécifiques, le permettent.

Aucun de ces derniers procédés ne vise à séparer spécifiquement les CPP dans le but de les utiliser comme aliment de complément protéique pour les PCU, pas plus, qu'il ne vise, d'une part, à doser la Phe dans les CPP séparés et, d'autre part, à séparer les CPP exempts de Phe des CPP renfermant encore des résidus de Phe.

L'invention a pour but de remédier aux inconvénients

précités et de procurer un procédé simple qui permet la production, à coût réduit, d'aliments de complément pour PCU, dont le goût est nettement moins prononcé et moins désagréable que celui des aliments de complément connus, ceci étant dû au fait que la mise en oeuvre dudit procédé ne requiert qu'une seule enzyme et que l'élution chromatographique des phosphopeptides s'effectue donc en une seul étape. Parmi les autres avantages présentés par le procédé suivant l'invention, on retiendra, d'une part, que le groupement phosphorylé a la propriété de se lier aux cations bivalents Ca^{++}, Fe^{++}, Zn^{++}, etc ... et, d'autre part, que les peptides, de par leur nature, sont digérés plus lentement et mieux absorbés au niveau intestinal et que, contrairement au mélange d'acides aminés libres, ils peuvent se prêter à diverses préparations culinaires.

A cet effet, suivant l'invention, on hydrolyse de la caséine par la trypsine, on inactive ladite enzyme, on clarifie l'hydrolysat, on abaisse le pH de ce dernier, après avoir préalablement déterminé la charge électrique et le point isoélectrique des peptides trypsiques, jusqu'à une valeur de 2,7 à 2,5, on charge alors l'hydrolysat dans une colonne de chromatographie garnie d'une résine échangeuse d'anions choisie pour que seuls les caséinophosphopeptides exempts de phénylalanine s'y fixent tandis que les autres peptides percolent directement et qu'enfin on élue les caséinophosphopeptides fixés sur la résine soit en les entraînant par une solution tamponnée de force ionique supérieure à celle de l'hydrolysat introduit dans la colonne, soit au moyen d'une solution de pH inférieur à celui de l'hydrolysat chargé dans la colonne.

D'autres détails et particularités de l'invention ressortiront de la description du procédé donnée ci-après, à titre d'exemple non limitatif.

L'hydrolyse enzymatique qui clive les protéines en peptides et ne détruit pas les acides aminés, convient bien pour la production d'un aliment protéique de complément amélioré pour PCU. Par l'action d'une enzyme naturelle très spécifique, telle

que la trypsine, sur les protéines, on obtient de longs peptides. Si on hydrolyse les caséines (protéines phosphorylées du lait) par la trypsine, on obtient des peptides trypsiques phosphorylés et des peptides trypsiques non phosphorylés. Les peptides phosphorylés ou caséinophosphopeptides (CPP) ne contiennent presque plus de Phe, la méthode d'extraction et de séparation chromatographique spécifique suivant l'invention, qui sera décrite ci-après, permettant d'obtenir des CPP exempts de Phe.

Le clivage de la caséine par la trypsine, du côté carboxyle des résidus arginine et lysine, donne lieu à l'apparition de nombreux peptides non phosphorylés ainsi qu'à une vingtaine de CPP.

Le tableau 1 reprend la description des peptides non phosphorylés renfermant un ou plusieurs résidus Phe et la valeur de leur point isoélectrique (PI). Ces calculs ont été effectués sur base de la séquence primaire de la caséine et du site de clivage de l'enzyme.

Tableau 1 - PI des peptides trypsiques non phosphorylés renfermant un ou plusieurs résidus Phe.

N°	Description	Résidus Phe	PI
1	αS1-CN (f37-58)	3	9,82
2	αS1-CN (f133-151)	2	3,95
3	αS1-CN (f152-193)	2	3,41
4	αS2-CN (f33-41)	1	6,56
5	αS2-CN (f81-91)	1	4,25
6	αS2-CN (f92-113)	1	6,13
7	αS2-CN (f161-165)	1	10,07
8	αS2-CN (f174-181)	1	9,50
9	β-CN (f49-69)	2	7,70
10	β-CN (f69-97)	1	6,45
11	β-CN (f108-113)	1	6,58
12	β-CN (f114-169)	2	5,74
13	β-CN (f184-190)	1	6,30
14	β-CN (f203-209)	1	5,13
15	κ-CN (f17-21)	2	6,17
16	κ-CN (f47-63)	1	9,62
17	κ-CN (f98-105)	1	7,80
18	κ-CN (f98-111)	1	9,84
19	pp 3 (f5-24)	1	3,91
20	pp 3 (f124-134)	2	7,52

Comme montré au tableau 2, les CPP se caractérisent par une proportion nettement moindre de Phe et par un PI plus bas que les autres peptides non phosphorylés. Seuls les CPP qui proviennent de la caséine ß (ß-CN1P (f33-48) et de la caséine α_{s2} (α_{s2}-CN1P (f137/138-149)) renferment un seul résidu de Phe.

En isolant spécifiquement tous les CPP et en extrayant de cet isolat les deux peptides précités, on obtient un produit peptidique sans Phe.

Tableau 2 - Valeurs des points isoélectriques et des charges à différents pH des peptides trypsiques phosphorylés.

				Charge			
N°	Description	Res. Phe	P.I.	à pH 2,5	à pH 2,75	à pH 3,0	à pH 8,0
1	β-CN 4P (f1-25)	0	1,80	-1,45	-1,80	-2,12	-12,98
2	β-CN 4P (f1-28)	0	2,24	-0,44	-0,80	-1,12	-11,99
3	β-CN 4P (f2-28)	0	1,80	-1,44	-1,80	-2,12	-12,92
4	β-CN 1P(f33-48)	1	2,74	+0,25	-0,02	-0,29	-7,05
5	αS1-CN 2P (f37-58)	0	2,73	+0,32	-0,03	-0,38	-8,98
6	αS1-CN 2P (f43-58)	0	2,01	-0,68	-0,99	-1,33	-8,97
7	αS1-CN 7P (f43-79)	0	1,34	-4,13	-4,88	-5,45	-22,85
8	αS1-CN 5P (f59-79)	0	1,28	-3,31	-3,68	-3,98	-13,95
9	αS1-CN 1P (f104-119)	0	3,95	+1,35	+1,16	+1,00	-3,06
10	αS1-CN 1P (f106-119)	0	2,99	+0,35	+0,16	+0,00	-4,00
11	αS2-CN 4P (f1-21)	0	2,26	-0,39	-0,70	-0,96	-10,01
12	αS2-CN 4P (f46-70)	0	1,43	-2,46	-2,83	-3,17	-15,05
13	αS2-CN 3P (f46-70)	0	1,64	-1,46	-1,83	-2,20	-13,07
14	αS2-CN 2P (f126-136)	0	2,04	-0,55	-0,78	-0,97	-5,97
15	αS2-CN 1P (f137-149)	1	3,82	+1,33	+1,13	+0,93	-3,08
16	αS2-CN 1P (f138-149)	1	2,91	+0,33	+0,13	-0,07	-3,98
17	κ-CN 1P (f112-169)	0	3,25	+1,26	+0,93	+0,53	-10,08
18	κ-CN 1P (f113-169)	0	2,70	+0,26	-0,07	-0,47	-11,11
19	κ-CN 1P (f117-169)	0	1,87	-0,70	-1,00	-1,34	-10,98
20	αS0-CN 3P (f37-58)	0	2,13	-0,60	-0,97	-1,35	-10,96
21	PP3(f 25-35)	0	2,04	-0,56	-0,79	-0,98	-5,09
22	PP3(f 36-47)	0	2,95	+0,42	+0,18	-0,04	-5,20

Les matières premières qui peuvent être utilisées pour la mise en oeuvre du procédé suivant l'invention contiennent les caséines du lait. Ces matières sont soit du lait écrémé liquide ou en poudre, soit du caséinate de sodium en poudre, qui, mises en solution, peuvent être hydrolysées. La trypsine, qui est une protéase appartenant à la famille des sérines actives, est une enzyme naturelle de la digestion, présente dans le pancréas. Elle est très connue, très utilisée et très spécifique. Elle clive les liens peptidiques des protéines du côté carboxyle de la lysine et de l'arginine. Agissant sur les protéines du lait, elle produit de grands peptides dont la taille ne peut plus être réduite.

Les produits en poudre sont reconstitués à 10% pour le lait écrémé et de préférence à 3 à 5% pour le caséinate de sodium avant d'être soumis à l'hydrolyse.

L'hydrolyse trypsique peut être effectuée de deux manières, à savoir hydrolyse sous agitation dans une cuve et hydrolyse dans un réacteur enzymatique.

Dans le cas où l'hydrolyse est effectuée sous agitation, à l'aide d'un agitateur à pales, dans une cuve, la température d'hydrolyse doit être fixée, pour obtenir un bon rendement, entre 37 et 55°C et le pH doit être neutre ou légèrement alcalin. On utilise de préférence une température de l'ordre de 50°C et un pH de 8,0. Ce pH est maintenu constant à l'aide d'un système pH-stat à électrode qui, par addition automatique de soude, maintient l'hydrolysat au pH choisi. Le rapport enzyme/substrat est de 1:1000 (m/v). La durée de l'hydrolyse peut varier d'une à trois heures.

Dès que l'hydrolyse est terminée, l'hydrolysat subit un traitement thermique, pour inactiver l'enzyme et pour pasteuriser les caséinophosphopeptides, à une température de 80°C pendant un laps de temps de 10 minutes. Le pH de l'hydrolysat est ensuite abaissé jusqu'à 4,6 point isoélectrique de la caséine. On centrifuge alors la solution afin d'éliminer les fractions protéiques insolubles et de clarifier ainsi l'hydrolysat.

Lorsque l'hydrolyse est effectuée dans un réacteur enzymatique, on utilise un réacteur enzymatique à membranes, qui est un appareil pilote d'ultrafiltration composé d'une cuve d'alimentation, d'une pompe de circulation et de membranes d'ultrafiltration. Les membranes peuvent être en polysulfone (2^{e} génération) ou minérales (3^{e} génération). On choisit avantageusement des membranes de 3^{e} génération, de seuil de coupure de 50.000 D (daltons). La solution de protéines est déposée dans la cuve d'alimentation et, après ajout de l'enzyme, l'hydrolyse commence. La différence de taille entre, d'une part, les micelles de caséine, les protéines solubles et l'enzyme, et, d'autre part, les peptides trypsiques obtenus permet, selon le seuil de coupure de la membrane choisie, d'ultrafiltrer en permanence les peptides trypsiques qui passent dans le perméat alors que les composés de masse moléculaire plus importante ne peuvent franchir la membrane et sont retenus du côté rétentat. Si l'activité enzymatique diminue, on ajoute une quantité d'enzyme et de substrat afin de maintenir l'hydrolyse au niveau désiré.

L'utilisation d'un réacteur enzymatique permet de simplifier le procédé au niveau de l'hydrolyse, du fait que les étapes d'inactivation de l'enzyme et de centrifugation peuvent être supprimées, le perméat d'ultrafiltration étant clair et ne contenant que des peptides trypsiques.

Le procédé, suivant l'invention, utilise la chromatographie d'échange d'anions pour opérer une séparation efficace entre CPP et peptides non phosphorylés. Cette séparation est basée sur la charge et le point isoélectrique des peptides.

Depuis le milieu des années 1980, les séquences en acides aminés des fractions de caséine et les séquences des protéines solubles sont connues. En tenant compte de la spécificité de la trypsine, il est donc possible de déterminer les séquences des peptides trypsiques, d'en calculer la charge à différents pH et leur point isoélectrique (PI).

L'étape du procédé qui suit les étapes décrites ci-dessus consiste à isoler les CPP sans Phe. Elle est effectuée

par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions. Cette technique s'avère efficace et sélective; elle permet de séparer des protéines et des peptides avec un grand degré de pureté. Dans le domaine laitier, on a déjà utilisé industriellement ce genre de résine pour récupérer les protéines du lactoserum. Pour la séparation des CPP, on a testé plusieurs résines et finalement opté pour la résine échangeuse d'anions connue sous le nom "DEAE SPHERODEX".

Le procédé suivant l'invention est basé sur le fait que les peptides non phosphorylés ayant des résidus de Phe ont des PI largement supérieurs à 3,0, tandis que les CPP ont presque tous des PI inférieurs à 3,0 et que les CPP avec 1 résidus de Phe ont un PI supérieur à 2,7. Si on charge une colonne renfermant une résine échangeuse d'anions avec un hydrolysat trypsique à pH 3,0, les peptides non phosphorylés chargés positivement ne seront pas retenus, tandis que la plupart des CPP chargés négativement formeront des liaisons avec la résine et seront retenus sélectivement; ils pourront être ensuite élués; ce qui permet d'obtenir des peptides à taux réduit en Phe.

Conformément à l'invention, on charge une colonne, de même résine que dans le cas précédent, avec un hydrolysat trypsique porté à pH 2,7 ou 2,5, c'est-à-dire à des pH plus bas que les PI des 3 CPP renfermant encore un résidu de Phe. Ces 3 CPP ne seront pas retenus par la résine, ce qui permet d'isoler les seuls CPP absolument exempts de Phe.

Seuls les CPP chargés négativement sont retenus tandis que les autres peptides percolent directement à travers la colonne, Les CPP sont élués soit par augmentation de la force ionique, soit par diminution du pH. Si nécessaire, les peptides peuvent être dessalés par ultrafiltration et diafiltration en utilisant une membrane de seuil de coupure de 1000 D, telle qu'une membrane connue sous le nom "AMICON".

On trouvera, ci-après, deux exemples concernant l'obtention de peptides exempts de Phe obtenus à partir de deux

matières premières se présentant sous des formes différentes.

Exemple 1 : Obtention de peptides sans Phe à partir de caséinate de sodium et séparation sur colonne connue sous le nom "DEAE SPHERODEX" à pH 2,5.

La matière première utilisée est le caséinate de sodium sous forme de poudre. 100 g de poudre de caséinate de sodium sont dissous dans 900 g d'eau distillée. Le rapport enzyme/substrat lors de l'hydrolyse est de 1/1000 (m/v). Après hydrolyse et séparation des CPP selon le procédé décrit précédemment, on obtient une poudre dont la composition en acides aminés est reprise dans le tableau 3 suivant.

Tableau 3. Dosage des acides aminés des phosphopeptides trypsiques de caséinate de sodium séparés sur "SPHERODEX".

	Ppept caséinate de Na	
% M.S.	93,34	
% N/M.F.	9,97	
% Prot./M.F.	63,61	
% N/M.S.	10,68	
% Prot./M.S.	68,15	
Par 100 g M.S.	g	%
ASP	5,446	6,98
THR	2,787	3,57
SER	11,683	14,98
GLU	26,376	33,82
PRO	3,539	4,54
GLY	0,989	1,27
ALA	2,817	3,61
CYS	-	-
VAL	5,711	7,32
MET	1,809	2,32
ILE	6,951	8,91
LEU	2,879	3,69
TYR	1,351	1,71
PHE	-	-
HIS	0,615	0,79
LYS	3,384	4,34
ARG	1,660	2,13
Total	77,997	100,00

La phénylalanine a totalement disparu du produit final, tandis que la concentration en sérine atteint une valeur élevée. Le rendement obtenu est de 5% du total des caséines de départ.

Exemple 2 : Obtention de peptides sans Phe à partir de lait écrémé et séparation sur colonne connue sous le nom "DEAE SPHERODEX" à pH 2,5.

Un litre de lait écrémé est hydrolysé par la trypsine et les phosphopeptides sont séparés selon la méthode décrite précédemment. On obtient une poudre dont la composition en acides aminés est reprise dans le tableau 4. La phénylalanine est absente. Le rendement expérimental obtenu est de 5% par rapport à la caséine.

Tableau 4. Dosage des acides aminés des phosphopeptides trypsiques de lait écrémé séparés sur "SPHERODEX".

	Ppept Lait écrémé	
% M.S.	95,95	
% N/M.F.	10,34	
% Prot./M.F.	65,94	
% N/M.S.	10,77	
% Prot./M.S.	68,72	
Par 100 g M.S.	g	%
ASP	5,118	6,28
THR	1,906	2,34
SER	11,131	13,67
GLU	30,743	37,74
PRO	3,339	4,10
GLY	0,838	1,03
ALA	2,610	3,20
CYS	0,876	1,08
VAL	6,442	7,91
MET	2,589	3,18
ILE	6,956	8,54
LEU	2,454	3,01
TYR	1,200	1,47
PHE	-	-
HIS	0,472	0,58
LYS	3,339	4,10
ARG	1,440	1,77
Total	81,453	100,00

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de peptides exempts de phénylalanine, en particulier comme aliment protéique de complément pour malades atteints de phénylcétonurie, caractérisé en ce qu'on hydrolyse de la caséine par la trypsine, on inactive ladite enzyme, on clarifie l'hydrolysat, on abaisse le pH de ce dernier, après avoir préalablement déterminé la charge électrique et le point isoélectrique des peptides trypsiques, jusqu'à une valeur de 2,7 à 2,5, on charge alors l'hydrolysat dans une colonne de chromatographie garnie d'une résine échangeuse d'anions choisie pour que seuls les caséinophosphopeptides exempts de phénylalanine s'y fixent tandis que les autres peptides percolent directement et qu'enfin on élue les caséinophosphopeptides fixés sur la résine soit en les entraînant par une solution tamponnée de force ionique supérieure à celle de l'hydrolysat introduit dans la colonne, soit au moyen d'une solution de pH inférieur à celui de l'hydrolysat chargé dans la colonne.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'on effectue l'hydrolyse trypsique sous agitation, à une température comprise entre 37 et 55°C et avec un pH neutre ou légèrement alcalin que l'on maintient sensiblement constant.

3. Procédé suivant l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'on inactive l'enzyme susdite, lorsque l'hydrolyse est terminée, en abaissant le pH de l'hydrolysat à une valeur de 4,5, ce qui permet la précipitation de la caséine non hydrolysée et des fractions protéiques insolubles à ce pH.

4. Procédé suivant l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'on inactive l'enzyme précitée, lorsque l'hydrolyse est terminée, en abaissant le pH de l'hydrolysat à une valeur de 4,5 et en chauffant ledit hydrolysat à une température de l'ordre de 80°C pendant un laps de temps de l'ordre de 10 minutes, ce qui permet la précipitation de la caséine non hydrolysée et des fractions protéiques insolubles et assure en outre la pasteurisation des caséinophosphopep-

tides.

5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on clarifie l'hydrolysat par centrifugation.

6. Procédé suivant l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'on inactive l'enzyme précitée et qu'on clarifie l'hydrolysat en faisant passer ce dernier dans un appareil d'ultrafiltration à membrane, utilisé comme réacteur enzymatique, dans lequel on ultrafiltre et diafiltre, le perméat clarifié, qui ne contient que des peptides trypsiques, étant éventuellement chauffé à une température de 80°C pendant un laps de temps d'environ 10 minutes pour pasteuriser lesdits peptides.

7. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on dessale les caséinophosphopeptides exempts de phénylalanine qui ont été élués.

8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on sèche les caséinophosphopeptides exempts de phénylalanine, soit par lyophilisation, soit par atomisation.

9. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la caséine susdite est de la caséine d'origine bovine se présentant soit sous la forme de poudre de caséinate de sodium provenant de lait écrémé, soit sous la forme de lait écrémé liquide ou en poudre.

Numero de la demande nationale

Office européen des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2 de la loi belge sur les brevets d'invention du 28 mars 1984

BO 6084
BE 9600458

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
X	WO 94 06822 A (KEM EN TEC AS ;MD FOODS AMBA (DK); LIHME ALLAN OTTO FOG (DK); AAGE) 31 Mars 1994 * page 1-5 * * page 17, ligne 29 - page 18, ligne 35; figure 2 * * revendications 13-21 *	1-9	A23J3/34
Y	FR 2 513 881 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) 8 Avril 1983 * le document en entier *	1-9	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 100, no. 25, 18 Juin 1984 Columbus, Ohio, US; abstract no. 207930, XP002024822 * abrégé * & RAKUNO KAGAKU, SHOKUHIN NO KENKYU, vol. 33, no. 1, 1984, page A5-A12	1-9	
A	EP 0 476 199 A (UNILEVER PLC) 25 Mars 1992 * le document en entier *	1-9	
A	EP 0 034 083 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH) 19 Août 1981 * revendications 1-7 * * figure 1; tableau I *	1-9	

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)

A23J

1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
7 Février 1997	De Jong, E

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.

BO 6084
BE 9600458

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

07-02-1997

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9406822	31-03-94	AU-A-	4814893	12-04-94
		EP-A-	0666866	16-08-95
		FI-A-	951274	17-03-95
		JP-T-	8509115	01-10-96
		NO-A-	951022	06-04-95
FR-A-2513881	08-04-83	FR-A-	2491334	09-04-82
		AT-T-	6032	15-02-84
		EP-A-	0049666	14-04-82
		WO-A-	8201131	15-04-82
		US-A-	4462990	31-07-84
EP-A-0476199	25-03-92	AUCUN		
EP-A-0034083	19-08-81	FR-A-	2474829	07-08-81
		AT-T-	4081	15-07-83
		AU-B-	548658	02-01-86
		AU-A-	6678381	06-08-81
		CA-A-	1178908	04-12-84
		JP-C-	1625942	18-11-91
		JP-B-	2051580	07-11-90
		JP-A-	56123922	29-09-81
		JP-C-	1724313	24-12-92
		JP-A-	2257853	18-10-90
		JP-B-	4009509	20-02-92
		JP-C-	1724314	24-12-92
		JP-A-	2257854	18-10-90
		JP-B-	4009510	20-02-92
		US-A-	4358465	09-11-82
		US-A-	5028589	02-07-91
		US-A-	4495176	22-01-85
		US-A-	5216123	01-06-93
		US-A-	4816398	28-03-89
		US-A-	4740462	26-04-88
		US-A-	5334408	02-08-94