



CH 683 695 A5



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 683 695 A5

⑤① Int. Cl.⁵: C 12 P 21/06
A 23 J 1/00
A 23 J 3/00

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

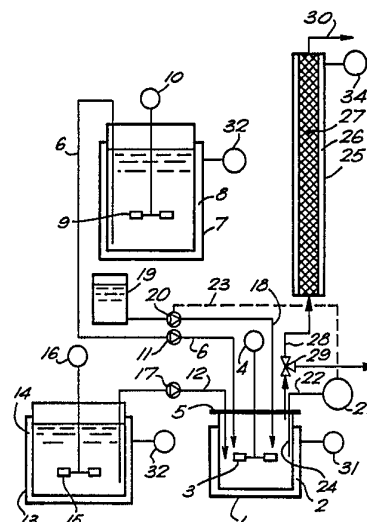
②① Numéro de la demande: 1160/92

②② Date de dépôt: 09.04.1992

②④ Brevet délivré le: 29.04.1994

④⑤ Fascicule du brevet
publié le: 29.04.1994⑦③ Titulaire(s):
Société des Produits Nestlé S.A., Vevey⑦② Inventeur(s):
Baensch, Johannes, Pully
Margot, Antoine, Lausanne
Meister, Niklaus, Grosshöchstetten
Renken, Albert, Lausanne
Wood, Robert Dustan, Lausanne
Woupeyi, Alfred, Yverdon**⑤④ Hydrolyse enzymatique.**

⑤⑦ Procédé et appareil d'hydrolyse enzymatique de protéines, dans lesquels on mélange une enzyme protéolytique et un substrat protéique, on réalise une première étape d'hydrolyse en cuve sous agitation, et l'on réalise une deuxième étape d'hydrolyse en tube garni d'éléments mélangeurs statiques.



CH 683 695 A5

Description

La présente invention a pour objet un procédé d'hydrolyse enzymatique de protéines et un appareil pour la mise en œuvre du procédé.

On connaît divers procédés d'hydrolyse enzymatique de protéines qui se distinguent par le choix du substrat, de l'enzyme, du degré d'hydrolyse et/ou du profil peptidique recherché, par exemple. Lorsque, pour des raisons d'assimilation de l'hydrolysât par la muqueuse intestinale, par exemple, un profil peptidique relativement bien défini, notamment un profil oligopeptidique étroit est recherché, les procédés d'hydrolyse connus comportent généralement au moins une étape de filtration ou tamisage de l'hydrolysât.

C'est ainsi que EP 226 221, par exemple, décrit un procédé de préparation de peptides hypoallergéniques de poids moléculaire compris entre 2000 et 6000 par une ou plusieurs étapes d'hydrolyse enzymatique de protéines réalisées chacune en discontinu en cuve de fermentation et terminées chacune par une étape d'ultrafiltration.

US 4 212 889 décrit un procédé de solubilisation de protéines de poisson, dans lequel on fait passer en continu un mélange de chair de poisson et d'enzyme au travers d'une installation comprenant plusieurs cuves d'hydrolyse branchées en série.

La présente invention a pour but de proposer un procédé d'hydrolyse qui tout en étant réalisé en continu permette d'approcher l'efficacité d'une hydrolyse en discontinu en cuve et qui de plus permette d'obtenir un hydrolysât protéique présentant un degré d'hydrolyse et/ou un spectre peptidique bien défini et reproductible.

A cet effet, dans le procédé d'hydrolyse enzymatique de protéines selon la présente invention, on mélange une enzyme protéolytique et un substrat protéique, on réalise une première étape d'hydrolyse en cuve sous agitation, et l'on réalise une deuxième étape d'hydrolyse en tube garni d'éléments mélangeurs statiques.

De même, l'appareil pour la mise en œuvre du présent procédé comprend une cuve d'hydrolyse à double manteau avec agitateur reliée en amont à un dispositif doseur de substrat et à un dispositif doseur d'enzyme, et reliée en aval à au moins un tube d'hydrolyse garni d'éléments mélangeurs statiques.

On a constaté qu'il était possible ainsi de produire en continu, avec une bonne efficacité et une bonne reproductibilité, un hydrolysât protéique présentant un degré d'hydrolyse et/ou un spectre peptidique bien défini.

Grâce à ce procédé et à cet appareil, il est en particulier possible de travailler avec une cuve de relativement faible dimension que l'on peut remplir complètement, sans laisser subsister d'espace de tête, et avec un tube de relativement grande dimension. On peut donc réaliser en continu une première étape relativement courte, en d'autres termes une étape de lancement de l'hydrolyse dans une relativement petite cuve, et une deuxième étape relativement longue, en d'autres termes une étape de finition de l'hydrolyse dans un tube présentant un volume relative-

ment grand. Il est ainsi possible de contrôler de manière précise et simple, par exemple par l'intermédiaire de pompes volumétriques, le temps de réaction, autrement dit le temps de résidence du substrat dans le volume total représenté par la somme du volume de la cuve et de celui du tube.

Si l'on désire en effet réaliser une hydrolyse en continu dans une seule grande cuve d'hydrolyse, le temps de résidence d'un volume élémentaire d'hydrolysât ne peut pas être défini de manière précise. Il n'est possible de définir qu'un temps de résidence moyen. Même dans un procédé tel que celui d'US 4 212 889 cité plus haut, le temps de résidence ne peut guère être défini de manière plus précise.

Par contre, il s'avère qu'avec le procédé et l'appareil selon la présente invention, le temps de résidence d'un volume élémentaire d'hydrolysât peut être défini de manière remarquablement précise, le courant de l'hydrolysât dans le tube d'hydrolyse garni d'éléments mélangeurs pouvant présenter un front très plat.

Dans le présent exposé, on définit un degré d'hydrolyse par l'intermédiaire de la quantité d'azote non protéique (NPN) déterminée comme le pourcentage de l'azote total non précipitable à l'acide trichloracétique à 13%.

Pour mettre en œuvre le présent procédé, on peut utiliser comme substrat protéique toute matière première alimentaire riche en protéines sous forme de particules ou de suspension telle que des farines ou semoules de graines ou de tourteaux d'oléagineuses, des levures ou bactéries alimentaires, de la chair animale ou de poisson hachée, ou des laits ou dérivés du lait, par exemple.

De préférence, ledit substrat protéique est un substrat lactosérique contenant les protéines du lactosérum, notamment un lactosérum doux de fromagerie ou un lactosérum acide de caséinerie, tel quel ou sous forme déminéralisée ou délactosée, liquide ou reconstitué.

De préférence également, on choisit l'enzyme dans le groupe formé par la trypsine, la chymotrypsine, la pancréatine, les protéases bactériennes, les protéases fongiques, et leurs mélanges.

On peut mélanger l'enzyme protéolytique et le substrat à raison d'une quantité d'enzyme présentant une activité de 0,1-12 unités Anson (AU) pour 100 g de matière sèche de substrat.

On réalise de préférence la première étape durant 20-40 min tout en ajustant le pH et la température à des valeurs favorables à l'activité de l'enzyme, et l'on réalise de préférence la seconde étape durant 1-8 h en ajustant la température à une valeur supérieure de 1-10°C à la température de la première étape.

Pour l'ajustement du pH, on utilise de préférence un réactif adéquat, soit alcalin, tel que KOH, NaOH ou Ca(OH)_2 , soit acide, tel que HCl ou HPO_4 , par exemple.

L'appareil pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention comprend donc une cuve d'hydrolyse à double manteau avec agitateur relié en amont à un dispositif doseur de substrat et à un dispositif doseur d'enzyme, et relié en aval à au

moins un tube d'hydrolyse garni d'éléments mélangeurs statiques.

Dans cet appareil, ledit tube est de préférence disposé verticalement, son extrémité inférieure étant reliée à ladite cuve et son extrémité supérieure débouchant sur une conduite de sortie.

De préférence également, lesdits dispositifs doseur de substrat et doseur d'enzyme comportent chacun un récipient d'alimentation relié à ladite cuve d'hydrolyse par l'intermédiaire d'une pompe volumétrique.

L'appareil peut comprendre en outre un dispositif doseur de réactif comportant un récipient d'alimentation relié à la cuve d'hydrolyse par l'intermédiaire d'une pompe volumétrique commandée par un pH mètre.

L'appareil peut également comprendre plusieurs tubes d'hydrolyse garnis d'éléments mélangeurs statiques, branchés en série en aval de la cuve par des conduites de liaison reliées en amont au dispositif doseur d'enzyme et au dispositif doseur de réactif.

On peut également prévoir un tube garni d'éléments mélangeurs statiques entre lesdits dispositifs doseur d'enzyme, doseur de substrat et/ou doseur de réactif et ladite cuve.

L'appareil pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention est décrit ci-après en référence au dessin annexé qui en illustre, à titre d'exemple, deux formes de réalisation. Dans ce dessin,

- La fig. 1 représente schématiquement une première forme de réalisation de l'appareil, et
- La fig. 2 représente schématiquement une deuxième forme de réalisation de l'appareil.

Comme on le voit à la fig. 1, le présent appareil comprend une cuve d'hydrolyse 1 à double manteau 2 avec agitateur 3 entraîné par un moteur 4. Cette cuve est fermée de manière étanche par un couvercle 5 au travers duquel passent diverses conduites et l'axe de l'agitateur 3.

La cuve d'hydrolyse 1 est reliée en amont par une conduite 6 à un dispositif doseur de substrat 7-11, par une conduite 12 à un dispositif doseur d'enzyme 13-17, et par une conduite 18 à un dispositif doseur de réactif 19-24.

Le dispositif doseur de substrat comporte un récipient d'alimentation en substrat 7 à double manteau 8 et agitateur 9 entraîné par un moteur 10. Le récipient 7 est relié à la cuve d'hydrolyse 1 par l'intermédiaire de la pompe volumétrique 11 branchée sur la conduite 6.

Le dispositif doseur d'enzyme comporte un récipient d'alimentation en enzyme 13 à double manteau 14 et agitateur 15 entraîné par un moteur 16. Le récipient 13 est relié à la cuve d'hydrolyse 1 par l'intermédiaire de la pompe volumétrique 17 branchée sur la conduite 12.

Le dispositif doseur de réactif comporte un récipient d'alimentation en réactif 19 relié à la cuve d'hydrolyse 1 par l'intermédiaire d'une pompe volumétrique 20 branchée sur la conduite 18. Cette pompe volumétrique 18 est commandée par un pH

mètre 21 dont l'électrode de mesure 24 plonge dans la cuve 1 à travers le couvercle 5 et qui est relié électriquement (ligne hachurée 23) à un dispositif électronique de commande de la pompe 20 non représenté.

La cuve d'hydrolyse 1 est reliée en aval à un tube d'hydrolyse 25 à double manteau 26 garni d'éléments mélangeurs statiques 27 constitués de croissillons métalliques ou en plastique imbriqués les uns dans les autres. La cuve 1 est reliée au tube 25 par une conduite sur laquelle est branchée une vanne à trois voies 29 destinée à permettre des prélèvements d'hydrolysats dans la cuve.

Le tube 25 est disposé verticalement, son extrémité inférieure étant reliée à la cuve 1 et son extrémité supérieure débouchant sur une conduite de sortie 30.

La température d'un fluide circulant dans chacun des doubles manteaux est régulée par un dispositif représenté symboliquement en 31 pour la cuve 1, 32 pour le récipient 7, 33 pour le récipient 13, et 34 pour le tube 25.

A la fig. 2, les éléments de cette seconde forme de réalisation de l'appareil qui correspondent aux éléments de la première forme de réalisation selon la fig. 1 y sont désignés par les mêmes chiffres de référence.

Dans cette seconde forme de réalisation, l'appareil comprend plusieurs tubes d'hydrolyse 25, 35, 36 garnis d'éléments mélangeurs statiques 27, 37, 38 branchés en série en aval de la cuve 1 par des conduites de liaison 39, 40 reliées en amont au récipient d'alimentation en enzyme 13 par des conduites 41, 42 qui rejoignent la conduite 12 sur laquelle est branchée la pompe volumétrique 17.

Ces conduites de liaison 39, 40 sont également reliées en amont au récipient d'alimentation en réactif 19 par des conduites 43, 44 qui rejoignent la conduite 18 sur laquelle est branchée la pompe volumétrique 20.

Dans cette seconde forme de réalisation du présent appareil, on a également prévu un tube 45 garni d'éléments mélangeurs statiques entre les dispositifs doseur d'enzyme, doseur de substrat et doseur de réactif et la cuve 1.

Les différents récipients d'alimentation en enzyme, en substrat et en réactif sont reliés à ce tube 45 par des conduites 46, 47, 48 sur lesquelles sont respectivement branchés une pompe volumétrique 49 et les pompes volumétriques 11 et 20.

Les exemples ci-après sont présentés à titre d'illustration du procédé selon la présente invention. Les pourcentages et parties y sont donnés en poids.

Exemple 1

On met en œuvre le présent procédé à l'aide d'un appareil semblable à celui décrit en référence à la fig. 1, dans lequel la cuve d'hydrolyse présente un volume de 30 l et le tube d'hydrolyse garni d'éléments mélangeurs statiques présente un volume de 180 l pour une hauteur de 3 m.

On utilise comme substrat un concentré de protéines de lactosérum présentant une teneur en ma-

tière sèche de 20% et une teneur en protéine de 11% sur matière sèche.

On utilise comme enzyme de la trypsine porcine présentant une activité de 3 AU/g, à raison de 1 g d'enzyme pour 100 g de matière sèche du substrat, soit 3 AU pour 100 g de matière sèche du substrat.

On utilise comme réactif du KOH 2N.

On remplit tout d'abord la cuve de substrat, on y mélange l'enzyme et l'on démarre le processus d'hydrolyse en discontinu à pH 7,3 à 60°C durant 7 h, après quoi le substrat hydrolysé présente un NPN de 60%.

On poursuit alors le processus en continu à un débit tel que le temps de séjour moyen du substrat dans la cuve soit de 30 min et le temps de séjour de l'hydrolysate dans le tube soit de 3 h. On maintient dans la cuve une température de 55°C et un pH de 7,3 et dans le tube une température de 60°C et un pH flottant.

On atteint un régime stationnaire en 7 h.

L'hydrolysate présente un NPN de 59% au sortir de la cuve et de 65% au sortir du tube. Il est parfaitement comparable à l'hydrolysate que l'on obtiendrait par une hydrolyse en discontinu en cuve de 3,5 h à pH 7,3 à 60°C.

Exemple 2

On procède de manière semblable à celle décrite à l'exemple 1, à l'exception du fait que lors de trois essais distincts on varie le volume utile de la cuve de manière que le NPN obtenu après le passage du substrat dans la cuve soit respectivement de 15, 35 et 45%.

On obtient ainsi à la sortie du tube des hydrolysats présentant des NPN respectifs de 59, 63 et 66%.

Pour comparaison, dans les mêmes conditions en discontinu en cuve, à savoir à pH 7,3 à 60°C avec un substrat à 20% de matière sèche et une quantité d'enzyme présentant une activité de 3 AU pour 100 g de matière sèche du substrat, on obtient en 5 h un NPN de 60%.

En d'autres termes, avec le présent procédé, on obtient en continu un NPN supérieur à celui qu'on obtiendrait en discontinu dès que le substrat présente un NPN supérieur à environ 35% à l'entrée du tube.

Exemple 3

On procède de manière semblable à celle décrite à l'exemple 1, à l'exception du fait que l'on maintient dans la cuve un pH de 7,8.

On obtient à la sortie du tube un hydrolysate présentant un NPN de 70%.

Exemple 4

On met en œuvre le présent procédé à l'aide d'un appareil du même type que celui décrit en référence à la fig. 2.

On utilise comme substrat un concentrat de protéines de lactosérum présentant une teneur en matière sèche de 33% dont 7,5% de protéines.

On utilise comme enzyme une protéase alcaline bactérienne produite par *Bacillus licheniformis* et commercialisée par la firme Novo sous la désignation «alcalase 2.4 L», qui présente une activité de 2,4 AU/g. On utilise cette enzyme à raison d'une quantité totale de 4–8,6% sur protéine, soit 2,2–4,7 AU pour 100 g de matière sèche du substrat.

On utilise comme réactif du KOH 2N.

Après avoir démarré le processus de manière semblable à celle décrite à l'exemple 1, on poursuit le processus en continu. Le débit de substrat et les dimensions des tubes et de la cuve sont déterminés en sorte que les temps de séjour du substrat ou de l'hydrolysate soient respectivement de 5–10 min dans un tube de mélange préliminaire garni d'éléments mélangeurs statiques précédant la cuve, de 5–8 min dans un échangeur de chaleur (traitement thermique préliminaire) branché en série entre le tube de mélange préliminaire et la cuve, de 25–40 min dans la cuve (1ère étape d'hydrolyse), de 15–25 min dans un premier tube garni d'éléments mélangeurs statiques suivant la cuve (tube A de la 2ème étape d'hydrolyse), de 15–25 min dans un deuxième tube garni d'éléments mélangeurs statiques (tube B de la 2ème étape d'hydrolyse), et de 0–100 min dans un troisième tube garni d'éléments mélangeurs statiques (tube C de la 2ème étape d'hydrolyse), et de 5–20 min dans un échangeur de chaleur (échangeur d'inactivation) branché en série à la suite du tube C.

On répartit ladite quantité totale d'enzyme en quatre parts, à savoir une première part de 5–15% du total mélangée au substrat dans le tube de mélange préliminaire, une deuxième part de 30–40% du total mélangée au substrat dans la cuve, une troisième part de 20–30% du total mélangée au substrat dans ledit tube A et une quatrième part de 20–30% du total mélangée au substrat dans ledit tube B.

On ajuste le pH du substrat à 7,3 jusqu'au dit tube B à partir duquel on laisse le pH flotter.

On ajuste la température à 75°C dans le tube de mélange préliminaire, 85°C pour le traitement thermique préliminaire, 70°C dans la cuve, 71°C dans le tube A et le tube B, et 80–105°C dans l'échangeur d'inactivation.

On recueille l'hydrolysate ainsi produit après l'échangeur d'inactivation.

Exemple 5

On met en œuvre le présent procédé à l'aide d'un appareil du même type que celui décrit en référence à la fig. 2.

On utilise comme substrat un concentrat de protéines de lactosérum présentant une teneur en matière sèche de 28% dont 7% de protéines.

On utilise comme enzyme l'alcalase 2.4 L à raison d'une quantité totale de 2–6% sur protéine, soit 1,2–3,6 AU pour 100 g de matière sèche du substrat.

On utilise comme réactif du KOH 2N.

Après avoir démarré le processus de manière semblable à celle décrite à l'exemple 1, on poursuit le processus en continu. Le débit du substrat et les

dimensions des tubes et de la cuve sont déterminés en sorte que les étapes successives se déroulent comme suit.

Dans un tube de mélange préliminaire garni d'éléments mélangeurs statiques précédant la cuve, on mélange 33% de la quantité totale d'enzyme avec le substrat à pH 8,5–9,0, à 7,5–9,5°C.

On réalise la première étape d'hydrolyse dans la cuve durant 10–20 min à 50–80°C, de préférence 63–73°C.

Dans un échangeur de chaleur branché en série à la sortie de la cuve, on chauffe à 80–120°C, de préférence à 90–95°C, durant 30 s à 10 min, de préférence durant 4–6 min, puis on refroidit à 55–80°C, de préférence 65–70°C.

Dans un tube garni d'éléments mélangeurs statiques branché en série à la sortie de l'échangeur suivant la cuve, ce tube pouvant être ou on subdivisé en plusieurs tubes branchés en série, on réalise la deuxième étape d'hydrolyse (après addition à l'entrée du tube des 66% restant de la quantité totale d'enzyme) durant 2–8 h à pH 7,0–8,0, de préférence pH 7,3–7,5, à 55–80°C, de préférence 65–70°C.

On inactive ensuite l'alkalase en deux étapes, notamment à l'aide d'un dispositif de chauffage par injection de vapeur, à 80–150°C durant 3 s–10 min.

On recueille ensuite l'hydrolysate après l'avoir refroidi.

Revendications

1. Procédé d'hydrolyse enzymatique de protéines, dans lequel on mélange une enzyme protéolytique et un substrat protéique, on réalise une première étape d'hydrolyse en cuve sous agitation, et l'on réalise une deuxième étape d'hydrolyse en tube garni d'éléments mélangeurs statiques.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on mélange l'enzyme protéolytique et le substrat à raison d'une quantité d'enzyme présentant une activité de 0,1–12 AU pour 100 g de matière sèche du substrat.

3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on réalise la première étape durant 20–40 min tout en ajustant le pH et la température à des valeurs favorables à l'activité de l'enzyme, et l'on réalise la seconde étape durant 1–8 h en ajustant la température à une valeur supérieure de 1–10°C à la température de la première étape.

4. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ledit substrat protéique est un substrat lactosérique contenant les protéines du lactosérum.

5. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'enzyme est choisie dans le groupe formé par la trypsine, la chymotrypsine, la pancréatine, les protéases bactériennes et les protéases fongiques.

6. Appareil pour la mise en œuvre du procédé selon la revendication 1, comprenant une cuve d'hydrolyse avec agitateur reliée en amont à un dispositif doseur de substrat et à un dispositif doseur d'enzyme, et reliée en aval à au moins un tube d'hydrolyse garni d'éléments mélangeurs statiques.

7. Appareil selon la revendication 6, dans lequel ledit tube est disposé verticalement, son extrémité

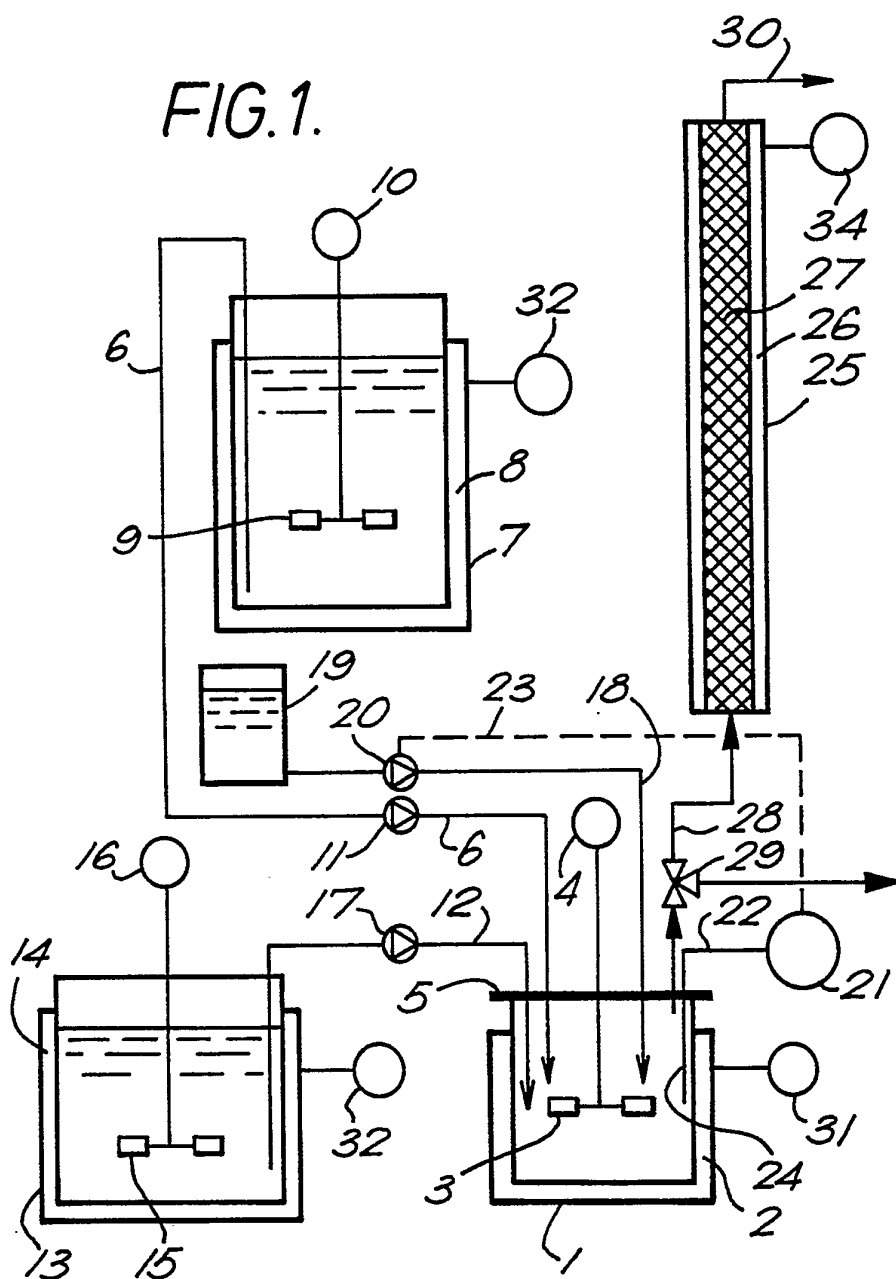
inférieure étant reliée à ladite cuve et son extrémité supérieure débouchant sur une conduite de sortie.

8. Appareil selon la revendication 6, dans lequel lesdits dispositifs doseur de substrat et doseur d'enzyme comportent chacun un récipient d'alimentation relié à ladite cuve d'hydrolyse.

9. Appareil selon la revendication 8, comprenant en outre un dispositif doseur de réactif comportant un récipient d'alimentation relié à la cuve d'hydrolyse par l'intermédiaire d'une pompe volumétrique commandée par un pH mètre branché sur la cuve.

10. Appareil selon la revendication 9, comprenant plusieurs tubes d'hydrolyse garnis d'éléments mélangeurs statiques, branchés en série en aval de la cuve par l'intermédiaire de conduites de liaison reliées en amont au dispositif doseur d'enzyme et au dispositif doseur de réactif.

FIG. 1.



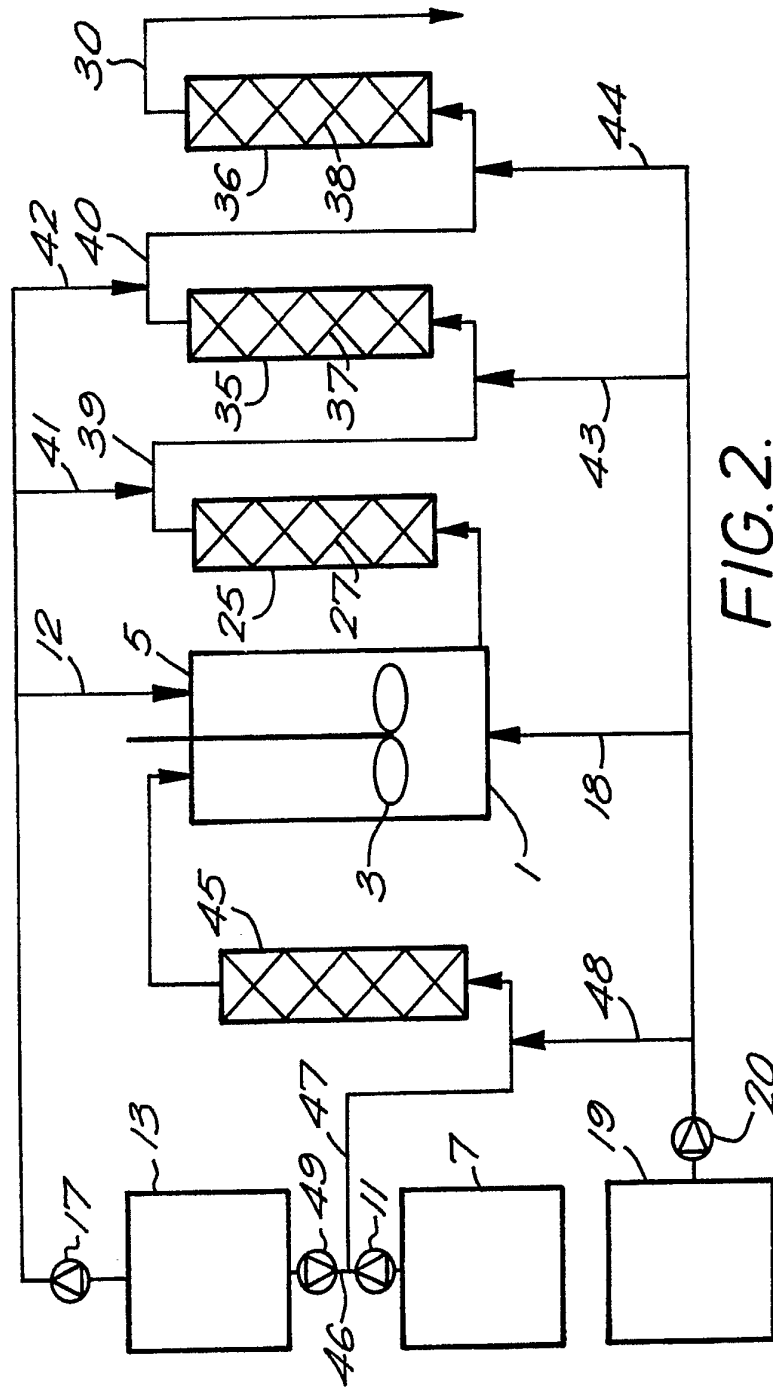


FIG. 2.