



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12P 21/06, A23J 3/34 A61K 7/00, 47/42, A23L 1/052 A61K 7/075</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 93/18180 (43) Date de publication internationale: 16 septembre 1993 (16.09.93)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00213 (22) Date de dépôt international: 2 mars 1993 (02.03.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/02789 9 mars 1992 (09.03.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ULICE [FR/FR]; ZAC "Les Portes de Riom", F-63200 Riom (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : AURIOL, Daniel, Henri [FR/FR]; 67, avenue de l'URSS, F-31400 Toulouse (FR). PAUL, François, Bernard [FR/FR]; 69, chemin Malepère, F-31400 Toulouse (FR). MONSAN, Pierre, Frédéric [FR/FR]; Renoufail, F-31700 Mondonville (FR).</p>	<p>(74) Mandataire: ERNEST GUTMANN-YVES PLASSE-RAUD S.A.; 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, FI, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: METHOD FOR ENZYMATICALLY SYNTHESIZING PEPTIDE ALKYL ESTERS, RESULTING PRODUCTS AND USE THEREOF (54) Titre: PROCÉDE DE SYNTHÈSE ENZYMATIQUE D'ESTERS ALKYLQUES DE PEPTIDES, PRODUITS AINSI OBTENUS ET UTILISATION DESDITS PRODUITS (57) Abstract A method for enzymatically synthesizing peptide alkyl esters, wherein an animal or plant protein substrate is simultaneously contacted both with at least one enzyme having both proteolytic and esterolytic activity on proteins or peptides, and with at least one alcohol which is either entirely water-miscible or at least partially water-soluble. The method is characterized in that the simultaneous contacting of the protein substrate, the enzyme and the alcohol is performed at a pH which allows peptide alkyl esters to be formed. (57) Abrégé L'invention concerne un procédé de synthèse enzymatique d'esters alkyliques de peptides comprenant la mise en contact simultanée d'un substrat protéique d'origine animale ou végétale avec, d'une part, au moins une enzyme ayant à la fois une activité protéolytique et une activité estérolytique sur des protéines ou sur des peptides et, d'autre part, avec au moins un alcool, ledit alcool étant soit entièrement miscible à l'eau, soit au moins partiellement soluble dans l'eau, caractérisé en ce que la mise en contact simultanée du substrat protéique, de l'enzyme et de l'alcool s'effectue à un pH permettant la formation d'esters alkyliques de peptides.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROCEDE DE SYNTHESE ENZYMATIQUE D'ESTERS ALKYLQUES DE
PEPTIDES, PRODUITS AINSI OBTENUS ET UTILISATION
DESDITS PRODUITS

La présente invention concerne un procédé de synthèse enzymatique, dit procédé d'alcoololyse enzymatique de protéines, permettant d'obtenir des esters de peptides. L'invention concerne également les produits obtenus par le procédé, ainsi que l'utilisation de ces produits en tant qu'additifs et ingrédients dans des produits agroalimentaires, cosmétologiques et pharmaceutiques et chimiques.

En raison de leur abondance et de leur propriétés intéressantes, les protéines d'origine animale (collagène, caséine, gélatine, etc...) et végétale, et leurs dérivés peptidiques constituent d'excellentes matières premières pour les industries chimiques, agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Par exemple, la demande de brevet international WO-A-90/03123 décrit la fabrication de microparticules de protéines, destinées à être utilisées comme substituts de graisses dans des produits alimentaires. Les microparticules sont fabriquées par l'addition d'une solution de protéines hydrophobes, par exemple une prolamine, en milieu alcoolique, à un milieu aqueux. La protéine est précipitée sous forme de microparticules. Avant d'être mise en contact avec le milieu aqueux, la protéine peut être soumise à une hydrolyse enzymatique. Dans ce cas, les microparticules sont constituées de polypeptides ayant une masse molaire d'environ 1 000 daltons.

En cosmétique, des préparations de peptides sont recherchées pour leur pouvoir émulsifiant, leur pouvoir de rétention d'eau, leur effet conditionneur

pour les shampoings et leur pouvoir adoucissant. Les peptides utilisés ont une masse molaire le plus souvent inférieure à 10 000 et plutôt inférieure à 5 000. Ils sont obtenus généralement par voie enzymatique.

L'emploi de protéines d'origine végétale en cosmétique est particulièrement recherché.

Par exemple, l'utilisation de peptides de gluten de masse molaire inférieure à 10 000, préférentiellement comprise entre 3 000 et 5 000, a été proposée en raison de leur pouvoir de rétention d'eau et leur effet conditionneur (JP-63253012). De tels peptides sont obtenus par hydrolyse enzymatique à l'aide d'Alcalase, de pepsine ou de la protéase acide d'Aspergillus niger.

Des esters de peptides ont été également proposés pour des applications cosmétiques (JP-60097043, JP-60097042, JP-60084209). Ces esters de peptides sont obtenus par la condensation d'un peptide avec un ester gras ou polyhydroxylé d'un acide aminé, catalysée par une protéase à cystéine (EC 3.4.22).

Bien que les procédés décrits jusqu'à ce jour pour la fabrication de dérivés de protéines soient relativement efficaces, ils présentent néanmoins certains inconvénients. Par exemple, la contamination microbienne du milieu réactionnel pose souvent un problème, les conditions opératoires favorisant la croissance de micro-organismes. En outre, lors d'une hydrolyse en milieu aqueux, la masse molaire du produit est difficile à contrôler et la réaction aboutit souvent à des produits de masse molaire inférieure à celle désirée.

Le procédé de l'invention a donc été élaboré dans le but de mettre au point un procédé économique permettant de valoriser des protéines d'origine

végétale et animale, même dans un état brut, pour la fabrication de peptides et d'esters de peptides, tout en minimisant le risque de contamination microbienne du milieu.

Les inventeurs ont mis au point un procédé de traitement de substrats protéiques qui se déroule dans un milieu alcoolique et qui est catalysé par une enzyme à la fois protéolytique et estérolytique.

L'activité estérase de certaines enzymes connues pour leur capacité à hydrolyser des liens peptidiques (peptides hydrolases, EC 3.4.) se caractérise par la possibilité de catalyser l'hydrolyse de liens esters alkyliques d'acides aminés ou de peptides de synthèse présents à faible concentration dans une solution aqueuse tamponnée.

Les inventeurs ont constaté que certaines enzymes qui présentent à la fois une activité de protéase et d'estérase, conduisent à la synthèse d'esters de peptides lorsque le substrat est un mélange de protéines ou de peptides présent en milieu alcoolique et dans certaines conditions de pH. L'enzyme utilise l'alcool à la place de l'eau pour couper le lien peptidique entre 2 acides aminés d'une protéine ou d'un peptide, ou est capable de catalyser la condensation d'un peptide par l'intermédiaire de son groupe carboxyle terminal avec l'alcool selon une réaction inverse à celle observée lors de l'hydrolyse d'esters alkyliques de peptides ou d'acides aminés.

La réaction enzymatique où le substrat est un mélange de protéines ou de peptides et le co-substrat est l'alcool est appelée réaction d'alcoololyse.

En milieu alcoolique et dans certaines conditions de pH, les inventeurs ont observé l'accumulation d'esters de peptides : l'équilibre entre la réaction de synthèse d'esters (réaction d'alcoololyse) et la

réaction d'hydrolyse desdits esters se trouve poussé vers la réaction de synthèse.

Dans ces conditions, l'alcool joue le rôle du substrat et du solvant. En d'autres termes, l'alcool est responsable de la formation d'esters et, en même temps, empêche leur dégradation.

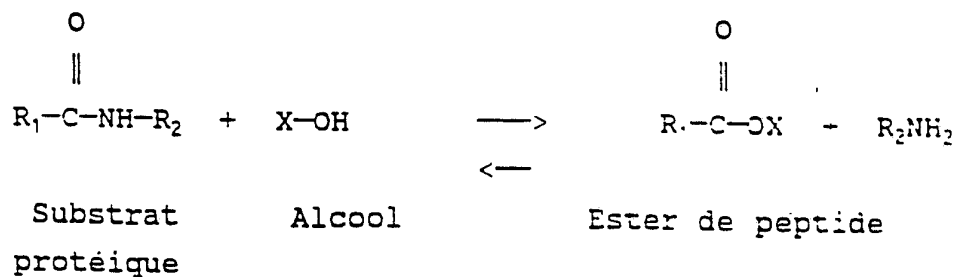
Un phénomène similaire a déjà été décrit par Vidaluc et al (Tetrahedron, vol. 39 n° 2, pp 269-274, 1983). Cet article rapporte la synthèse d'esters d'acides aminés à partir d'acides aminés en milieu alcoolique catalysée par l' α -chymotrypsine. Ceci étant, la synthèse d'esters de peptides à partir de substrats protéiques complexes n'a pas été décrite. En effet, il est tout à fait surprenant que la réaction de synthèse, catalysée par l'enzyme estérolytique et dont les substrats sont normalement des acides aminés ou des peptides de petite taille, peut être effectuée sur un substrat protéique composé de protéines et de polypeptides complexes.

Le produit obtenu par la réaction de l'invention est un mélange de peptides et d'esters de peptides provenant des réactions simultanées d'hydrolyse et d'alcoolyse. Le mélange présente des propriétés semblables à celles des peptides issus d'une hydrolyse classique, mais ont un caractère hydrophobe plus marqué, ce qui présente un avantage important pour beaucoup d'applications industrielles.

Le milieu alcoolique permet de diminuer les risques de contamination microbienne et, de plus, de contrôler la masse molaire du produit. Le milieu alcoolique assure aussi une bonne stabilité chimique des substrats comme la glutamine, acide aminé majoritaire des protéines végétales. La réaction est catalysée par des enzymes peu coûteuses et facilement disponibles.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé de synthèse enzymatique d'esters alkyliques de peptides comprenant la mise en contact simultanée d'un substrat protéique d'origine animale ou végétale avec, d'une part, au moins une enzyme ayant à la fois une activité protéolytique et une activité estérolytique sur des protéines ou sur des peptides et, d'autre part, avec au moins un alcool, ledit alcool étant soit entièrement miscible à l'eau, soit au moins partiellement soluble dans l'eau, caractérisé en ce que la mise en contact simultanée du substrat protéique, de l'enzyme et de l'alcool s'effectue à un pH permettant la formation d'esters alkyliques de peptides.

La réaction d'alcoolyse se déroule selon le schéma suivant :



Dans le contexte de la présente invention, l'expression "un substrat protéique d'origine animale ou végétale" signifie toute source de protéines ou de polypeptides capable de jouer le rôle de substrat pour l'enzyme protéolytique/estérolytique. Comme substrat protéique d'origine animale, la gélatine ou toute matière contenant la gélatine est préférée.

Comme substrat protéique d'origine végétale, on peut citer des protéines provenant de céréales telles que le blé, le maïs, l'orge, l'avoine, le riz, le seigle, le sarrasin, le sorgho et le triticale,

éventuellement sous forme de grain entier, ou de fractions de grains ou de tout produit issu du broyage du grain, tel que la farine ou la semoule. Les produits issus du broyage du grain sont particulièrement préférés.

Le substrat protéique n'est pas nécessairement pur et peut être utilisé sous forme de mélange complexe associé à des matières non-protéiques. Ceci est le cas lorsque le substrat protéique est constitué de fractions ou de farine de grains. Il est également possible d'utiliser la fraction protéique de la céréale, séparée de la fraction non protéique. Le gluten de blé est un exemple de ce type de substrat. Il est particulièrement préféré, selon l'invention, d'utiliser comme substrat les protéines hydrophobes connues sous le nom de "prolamines", par exemple la gliadine, la zéine, l'hordéine et la kafirine. Ces protéines sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans l'alcool, et sont un constituant majoritaire des graines de céréales. Le gluten de blé contient par exemple environ 45 % de gliadine, et la fraction protéique du maïs contient environ 60 % de zéine.

Le substrat protéique de la réaction d'alcoololyse peut aussi être une matière peptidique ou polypeptidique.

Selon cette variante de l'invention, la matière peptidique peut provenir d'une préhydrolyse partielle d'une matière protéique. Dans ce cas, la réaction d'alcoololyse est précédée par une étape d'hydrolyse partielle. Les esters de peptides sont alors obtenus par condensation des peptides sur l'alcool. La préhydrolyse partielle peut être effectuée par voie enzymatique, chimique ou thermique. La voie enzymatique est préférée. Pour le procédé d'hydrolyse partielle, il est avantageux de mettre en oeuvre la

même enzyme protéolytique/estérolytique que celle utilisée ultérieurement dans la réaction d'alcoololyse. La réaction d'alcoololyse peut ainsi être initiée par la simple addition de l'alcool et l'ajustement du pH aux valeurs permettant la formation stable d'esters. Ceci permet un contrôle facile du degré d'hydrolyse et évite une hydrolyse totale du substrat protéique. Le substrat peptidique a normalement une masse molaire moyenne de 4 000 à 6 000 Daltons environ. Il s'agit donc de polypeptides de taille moyenne.

Dans tous les cas, le substrat du procédé a une masse molaire moyenne supérieure à 1 000 Daltons.

Le substrat protéique peut être soluble dans l'eau ou soluble dans l'alcool. La réaction d'alcoololyse étant effectuée dans un milieu alcoolique, l'utilisation d'une protéine non soluble dans l'alcool, telle que la gélatine, donne lieu à un milieu réactionnel hétérogène. Lorsque le substrat est un substrat complexe tel que le gluten, qui est composé de différentes protéines dont environ 50 % sont solubles dans l'alcool et 50 % solubles dans l'eau, le milieu réactionnel est multiphasique.

Selon le procédé de l'invention, le substrat protéique d'origine animale ou végétale est mis en contact avec au moins une enzyme ayant une activité protéolytique et estérolytique sur des protéines ou sur des peptides. L'enzyme est de préférence soit une protéase, soit une carboxypeptidase. Les protéases à sérine ou à cystéine respectivement exemplifiées par la subtilisine (provenant de Bacillus sp., de préférence Bacillus licheniformis), ou la papaine (provenant de latex de papayer) sont particulièrement préférées. L'activité double de protéase et d'estérase n'est pas une propriété possédée par toutes les protéases. Ceci étant, en appliquant le test décrit

ci-dessous pour détecter la formation d'esters, l'homme de l'art peut facilement identifier celles qui conviennent au procédé de l'invention. L'enzyme peut être sous forme de préparation enzymatique, par exemple sous forme de mélange grossier d'enzyme, tel qu'un surnageant de culture microbien, ou peut en revanche être sous forme purifiée dépourvue de tout autre type d'activité enzymatique et de tout autre contaminant. La préparation enzymatique peut aussi être un mélange de protéases d'origines différentes, à condition que ces différentes enzymes puissent fonctionner ensemble.

Normalement, l'enzyme est utilisée sous forme libre, mais elle peut aussi être immobilisée sur un support solide tel que la silice, ou sur des billes ou sur des membranes connues dans l'art. L'immobilisation de l'enzyme permet d'effectuer le procédé de l'invention de manière continue.

Les conditions opératoires et notamment le pH sont critiques, selon le procédé de l'invention, pour l'efficacité de la réaction d'alcoololyse. Les réactions d'hydrolyse et d'alcoololyse se déroulent en parallèle, mais dans certaines conditions de pH, les esters ne s'accumulent pas dans le milieu réactionnel. Il existe cependant une gamme de pH à laquelle la formation d'esters est effective. Les inventeurs ont constaté que, pour une même enzyme, le pH optimum pour la réaction d'alcoololyse est sensiblement plus bas que le pH optimum pour la réaction d'hydrolyse telle qu'elle est pratiquée conventionnellement en milieu exclusivement aqueux. Par exemple, le pH optimum pour la réaction d'hydrolyse par la subtilisine est autour de pH 8 tandis que le pH optimum pour la réaction d'alcoololyse est autour de pH 5. La papaïne qui présente un pH optimum pour la réaction d'hydrolyse

d'environ 7 catalyse la réaction d'alcoolyse entre pH 5 et 7, particulièrement autour de pH 6. De manière générale, le pH doit être acide pour permettre la formation stable d'esters. La mise en contact du substrat protéique avec la subtilisine et l'alcool s'effectue à pH 3 à 8, de préférence à pH 4 à 6, par exemple pH 5 environ.

Selon la méthode de la présente invention, l'homme du métier peut sans difficulté déterminer le pH auquel la formation d'esters alkyliques de peptide est obtenue. Il suffit d'effectuer le test de détermination de la quantité d'alcool liée au produit par hydrolyse basique du groupe ester décrit dans l'exemple 1 ci-dessous. Cette détermination est effectuée pour une série de valeurs de pH différentes et les valeurs qui permettent la formation d'esters alkyliques sont ainsi déterminées. Dans le contexte de la présente invention, le taux d'estérification du produit considéré comme significatif est d'au moins 10 % environ. De préférence le taux d'estérification est d'au moins 25 % et avantageusement d'au moins 40 %.

Selon le procédé de l'invention, l'alcoolyse est effectuée en mettant en contact simultané le substrat protéique, l'enzyme et un alcool qui est soit entièrement miscible à l'eau, soit au moins partiellement soluble dans l'eau. Comme exemples de ce type d'alcools, on peut citer des alcanols aliphatiques possédant entre 1 et 5 atomes de carbone, par exemple le méthanol, l'éthanol, le propanol, le butanol et le pentanol. Le n-propanol, le n-butanol et le n-pentanol sont préférés. Les alcools qui sont totalement miscibles, en toutes proportions, à l'eau tels que le méthanol, l'éthanol et le n-propanol sont particulièrement avantageux. Néanmoins, lorsque l'alcool est partiellement miscible ou non miscible à

l'eau, l'efficacité de la réaction d'alcoolyse peut être augmentée par la présence d'un autre composé à la fois miscible à l'eau et miscible à l'alcool, par exemple le 2-propanol.

Le produit obtenu par le procédé de l'invention est un mélange de peptides et d'esters de peptides issus des réactions simultanées d'hydrolyse et d'alcoolyse. Le mélange est constitué d'une population hétérogène de peptides et d'esters de peptides de longueurs de chaînes variables, le groupement alkylique des esters provenant directement de l'alcool, et ayant donc entre 1 et 5 atomes de carbone. La nature précise du produit est influencée, d'une part, par la nature du substrat et, d'autre part, par la pureté de l'enzyme. Par exemple, un substrat protéique composé d'un mélange de protéines différentes donnera lieu à un mélange très complexe d'esters et de peptides. De même, une protéase ou une carboxypepsidase contaminée par d'autres enzymes présentant d'autres activités enzymatiques pourrait conduire à la présence d'autres substances chimiques dans le produit, surtout si le substrat est également impur. Les mélanges de peptides et d'esters de peptides peuvent être soumis à une étape de purification pour obtenir un mélange enrichi en esters.

La solubilité du produit dans l'eau ou dans l'alcool varie selon les réactifs et n'est pas toujours la même que celle du substrat. Par exemple, l'utilisation de la gliadine de blé comme substrat donne lieu à des esters qui sont solubles dans l'eau, tandis que l'utilisation de la zéine de maïs conduit à la formation d'esters solubles dans l'alcool. Pourtant, la gliadine et la zéine sont toutes deux solubles dans l'alcool. Lorsque le substrat protéique

est un mélange complexe de protéines présentant des solubilités différentes, il est probable que le produit de la réaction d'alcoolyse sera constitué d'esters et de peptides possédant des solubilités différentes. Dans ce cas, la fraction soluble dans l'eau ou soluble dans l'alcool peut être récupérée selon l'utilisation ultérieure du produit. Par exemple, en cosmétique, des produits solubles dans l'eau sont préférés.

La durée de la réaction d'alcoolyse varie entre 2 à 30 heures selon la nature du substrat protéique et de l'alcool. Par exemple, l'alcoolyse d'un substrat protéique complexe tel que le gluten se déroule de préférence pendant environ 24 heures. En revanche, un substrat protéique pur tel que les gliadines de blé donne lieu, dans un milieu alcoolique miscible à l'eau, à des taux d'estérification important après seulement 2 à 6 heures. La réaction est arrêtée par dénaturation de l'enzyme par ajustement du pH à une valeur fortement acide, éventuellement accompagné par un chauffage à 50° environ pendant 30 à 50 minutes.

La réaction d'alcoolyse se déroule normalement à une température comprise entre 20 et 45°C, par exemple autour de 25°.

La concentration de l'alcool est d'au moins 30 % v/v et de préférence, d'au moins 70 % v/v. Lorsque l'alcool est l'éthanol, la concentration peut être de 90 % v/v. Si la concentration de l'alcool est trop basse, la réaction d'alcoolyse ne peut avoir lieu et la réaction d'hydrolyse domine.

La masse molaire moyenne du produit peut être déterminée par chromatographie par perméation de gel (FPLC) et reflète la taille des peptides et des esters de peptides obtenus. La masse molaire moyenne du produit varie selon la nature du substrat protéique,

c'est-à-dire protéique ou peptidique, et selon la durée de la réaction et la concentration de l'enzyme. En général, la masse molaire moyenne du produit issu de l'alcoolyse de protéines est inférieure à 10 000, par exemple entre 6 000 et 10 000, et celle du produit issu de l'alcoolyse de peptides est inférieure à 5 000, par exemple entre 3 000 et 5 000. Dans tous les cas, la masse molaire moyenne du produit est supérieure à 1 000 Daltons. La réaction de l'invention aboutit donc à des produits ayant une masse molaire moyenne plus élevée que la masse molaire moyenne obtenue après une réaction d'hydrolyse en milieu aqueux. En effet, en milieu alcoolique (n-propanol, 70 % v/v), la masse molaire moyenne du produit de la réaction d'alcoolyse de gluten, soluble dans l'eau est de 6 200 (exemple 1), alors que le produit de la réaction d'hydrolyse de gluten, soluble dans l'eau est de 4 200 (exemple 2). La condensation de peptides de maïs sur le n-propanol conduit à la formation d'une population de peptides estérifiés de masse molaire moyenne 4 200.

Selon une variante de l'invention, le procédé peut comporter une étape supplémentaire permettant de récupérer le produit de l'invention, sous forme de microparticules. Selon cette variante, le produit doit être soluble en milieu alcoolique. Normalement, cette étape comprend la précipitation du produit (soluble en milieu alcoolique) dans une phase aqueuse. La phase aqueuse contient avantageusement au moins un agent antiagrégant facilitant la formation de particules de petite taille. Comme agents antiagrégants, on peut citer des agents tensio-actifs et des gommes telles que la gomme arabique et la carboxyméthylcellulose. L'agent antiagrégant est présent dans la phase aqueuse à une concentration comprise entre 0,2 % et 1,0 %

(p/v). Par microparticules, il faut comprendre dans le contexte de la présente invention, des particules ayant une taille de 0,2 à 10 μ , de préférence autour de 1 μ , par exemple 0,8 à 1,2 μ . L'introduction de la solution alcoolique dans la solution aqueuse est accompagnée d'une agitation vigoureuse. Bien entendu, il est important de veiller à ce que le produit ne soit pas dénaturé.

Le produit obtenu par ce mode de réalisation de l'invention, est une dispersion aqueuse stable de microparticules de peptides et d'esters de peptides. Ils peuvent être utilisés pour des applications agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. L'utilisation des microparticules de l'invention dans l'industrie agroalimentaire comme substituts de graisse s'est avérée particulièrement avantageuse.

Les propriétés du produit sont en partie dépendantes de la masse molaire moyenne. Les conditions opératoires et les matières de départ peuvent donc être choisies en fonction de l'utilisation ultérieure du produit.

Par exemple, pour un produit destiné à être utilisé comme substitut de graisse, il est avantageux d'effectuer la réaction d'alcoolyse directement sur le substrat protéique sans effectuer de préhydrolyse partielle préalable.

Les produits de l'invention ont des propriétés émulsifiantes, adoucissantes et un pouvoir de rétention d'eau. Ces propriétés physiques et chimiques sont avantageusement exploitées dans des produits cosmétiques comme agents émulsifiants, comme agents filmogènes par exemple comme conditionneurs dans les shampooings, comme adoucissants, comme agents épaississants, comme agents hydratants, comme base

lavante et moussante, ou comme tout autre additif ou ingrédient.

Les produits de l'invention peuvent également être utilisés dans l'industrie agroalimentaire ou pharmaceutique comme additifs ou ingrédients texturants, comme substituts de matière grasse, comme agents moussants ou comme agents émulsifiants. Il est en outre possible d'utiliser les produits de l'invention dans des produits chimiques, comme agents mouillants par exemple pour des produits de lessive, comme agents émulsifiants, comme agents adoucissants, comme agents filmogènes et comme agents de filage.

Différents modes de réalisation de l'invention seront illustrés par les exemples suivants.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : ALCOOLYSE DES PROTEINES DU GLUTEN DE BLE :

Le gluten de blé vital utilisé est commercialisé par la société Roquette (Lestrem, France).

300 g de gluten sont dispersés dans 1,2 l de n-propanol à 70 % v/v. Le pH de la suspension est ajusté à 5,2 à l'aide de 17 mmoles de HCl. La subtilisine de qualité alimentaire (Alcalase^R 2,4 L : subtilisine Carlsberg) est commercialisée par NOVO NORDISK^R (Fontenay sous bois, France). 24 ml de préparation de subtilisine sont ajoutés à la suspension. Le mélange est incubé 24 heures sous agitation douce à 25°C.

La subtilisine est ensuite dénaturée par ajustement du pH du mélange à 3,5 avec 115 mmoles de HCl et chauffage à 50°C pendant 40 minutes.

Le n-propanol est éliminé par évaporation à 55°C, et le produit mis en suspension dans de l'eau (volume de la suspension aqueuse : 3,3 l, pH = 3,1).

Le pH de la suspension aqueuse est ajusté à 6,0 à l'aide de 113 mmoles de NaOH. Les produits solubles sont collectés par centrifugation (5000 g, 15 min), microfiltrés sur filtre 0,2 micron et lyophilisés. Les insolubles sont éliminés.

Après lyophilisation, la quantité collectée de produit soluble est de 110 g.

Détermination de la masse molaire moyenne du produit :

La masse molaire moyenne du produit est déterminée par chromatographie par perméation de gel à l'aide d'une colonne Superose 12 R HR 10/30 Pharmacia^R (F.P.L.C.). L'éluant est du tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0 contenant 150 mM de NaCl. Le débit d'élution est 0,5 ml/min. Les produits d'élution sont détectés à l'aide d'un spectrophotomètre dont la longueur d'onde d'absorption est fixée à 280 nm. La calibration de la colonne (correspondance masse molaire/temps d'élution) et la détermination du volume total sont effectués comme indiqué dans la documentation technique Pharmacia.

La droite de calibration du système analytique est obtenue en exprimant le logarithme décimal de la masse molaire de protéines de calibration en fonction du temps ou du volume d'élution. La masse molaire moyenne du produit de gluten soluble dans l'eau après réaction d'alcoololyse est calculée d'après le chromatogramme d'élution à l'aide de la formule :

$$\frac{\sum \log M_i}{\sum \log M_i}$$

$$\sum \log M_i$$

avec, pour un temps ou un volume d'élution i ;

16

- M_i , la masse molaire du produit élué au temps ou au volume d'élution i sur la droite de calibration,

- h_i , la hauteur sous le pic pour un temps ou un volume d'élution i .

L'échantillon est préparé à une concentration de 5 g/l dans le tampon d'élution et centrifugé si nécessaire.

Détermination de la quantité d'alcool liée au produit par hydrolyse basique du groupe ester :

L'alcool total contenu dans l'échantillon correspond à l'alcool lié au produit et éventuellement à l'alcool libre résiduel, non éliminé par évaporation et lyophilisation.

L'alcool lié au produit correspond donc à l'alcool total par gramme de produit moins l'alcool libre par gramme de produit.

Alcool total :

67 mg de produit sont introduits dans un tube Eppendorf. 0,3 ml d'eau, puis 0,3 ml de NaOH 2N sont ajoutés et le tube est bouché. Le mélange est agité et incubé à température ambiante pendant 2 heures. Le mélange est ensuite acidifié à l'aide de 0,3 ml de H_2SO_4 2,1N. Le mélange est centrifugé et la quantité d'alcool total par gramme de produit est déterminée par analyse HPLC du surnageant de centrifugation.

Alcool libre :

67 mg de produit sont introduits dans un tube Eppendorf. 0,3 ml d'eau, puis 0,6 ml de H_2SO_4 10mN sont ajoutés et le tube est bouché. Le mélange est agité, incubé à température ambiante pendant 2 heures,

centrifugé et la quantité d'alcool libre par gramme de produit est déterminée comme précédemment.

L'alcool est analysé par HPLC à l'aide d'une colonne Polypore H (Brownlee Labs, 250 x 7,0 mm, 10 microns). L'éluant est une solution aqueuse de H₂SO₄, 10mN à un débit compris entre 0,35 et 0,70 ml/min. Le volume injecté est de 20 µl. Le détecteur est un réfractomètre.

Taux d'estérification :

Le taux d'estérification correspond au nombre de micromoles d'alcool lié par gramme de produit divisé par le nombre de micromoles de peptides et d'esters de peptides par gramme de produit.

Caractérisation du produit obtenu par alcoololyse du gluten par la subtilisine en présence de n-propanol 70 % v/v :

- teneur en peptides	:	71 %
(méthode de Kjeldahl)		
- masse molaire moyenne	:	6200
- n-propanol lié	:	2,7 mg/g peptides
- taux d'estérification	:	28 %

EXEMPLE 2 : ALCOOLYSE DE PEPTIDES DE GLUTEN DE BLE :

Les peptides de gluten de blé ont été préparés par hydrolyse du gluten par la subtilisine (Alcalase) à pH = 8 : la masse molaire moyenne des peptides solubles dans l'eau déterminée selon les conditions décrites dans l'Exemple 1 est de 4 200.

75 g d'hydrolysats de gluten sont dispersés dans 0,75 l de n-propanol à 70 % v/v. Le pH du milieu réactionnel est ajusté à 5,1 à l'aide de 120 mmoles de HCl. 15 ml de subtilisine (Alcase^R 2,4L) sont ajoutés

à la suspension. Le mélange est incubé 20 heures sous agitation douce à 25°C.

La subtilisine est ensuite dénaturée par ajustement du pH du mélange à 3,5 avec 80 mmoles de HCl et chauffage à 50°C pendant 40 minutes. Le n-propanol est éliminé par évaporation à 55°C et le produit mis en suspension dans de l'eau (volume de la suspension aqueuse : 0,75 l, pH = 2,9).

Le pH de la suspension aqueuse est ajusté à 6,0 à l'aide de 85 mmoles de NaOH. Les produits solubles sont collectés par centrifugation, microfiltrés sur filtre 0,2 micron et lyophilisés. Les insolubles sont éliminés. Après lyophilisation, la quantité collectée de produit soluble est de 61 g.

Caractérisation du produit obtenu par alcoololyse de peptides de gluten par la subtilisine en présence de n-propanol 70 % v/v :

- teneur en peptides : 62 %
(méthode de Kjeldahl)
- masse molaire moyenne : 3900
- n-propanol lié : 8,2 mg/g
- taux d'estérification : 53 %

EXEMPLE 3 : ALCOOLYSE DES GLIADINES EN PRESENCE D'ALCOOLS MISCIBLES ET NON MISCIBLES A L'EAU

Des milieux réactionnels contenant :

- gliadines (Sigma G-3375) : 30 g/l
- subtilisine (Alcalase 2,4L) : 2 % v/v
- alcool : 70 %

ont été préparés à pH = 5 (ajusté avec HCl) et incubés à 25°C sous agitation douce. Après incubation, la subtilisine est dénaturée par ajustement du pH à 2

avec HCl, l'alcool évaporé, le produit mis en suspension dans l'eau. Les mélanges sont ensuite lyophilisés et les produits de réaction caractérisés.

Tableau 1 : Alcoolyse des gliadines en présence d'alcools miscibles et non miscibles à l'eau :

Alcool, 70 % v/v	Durée d'incuba- tion h	Masse mol. (produits solubles à pH = 7,0	Taux d'estéri- fication % (a),
Ethanol	2	9 900	79
n-propanol	6	8 400	50
n-butanol	15	8 100	15
n-butanol:45% 2-propanol:25%	15	8 200	32
n-pentanol	15	4 800	4
n-pentanol 2-propanol	15	8 300	9

(a) Le taux d'estérification est donné pour l'alcool primaire.

L'efficacité de la réaction d'alcoolyse diminue lorsque la longueur de la chaîne aliphatique augmente (éthanol, propanol).

Lorsque l'alcool est partiellement miscible (n-butanol) ou immiscible à l'eau (n-pentanol), l'efficacité de la réaction d'alcoolyse est augmentée par la présence d'un tiers composé à la fois miscible à l'eau et miscible à l'alcool (par exemple, le 2-propanol).

EXEMPLE 4 : INFLUENCE DU pH SUR L'EFFICACITE DE LA REACTION D'ALCOOLYSE :

Des milieux réactionnels ont été préparés comme détaillé dans l'Exemple 3 avec seulement l'éthanol et le n-propanol comme alcools utilisés et les pH des milieux réactionnels ajustés à 5,0 ou à 7,0 avec HCl. Les produits de la réaction après 6 heures d'incubation ont été obtenus comme indiqué dans l'Exemple 3 et caractérisés (Tableau 2).

L'hydrolyse de protéines par la Subtilisine est efficace à pH basique, 7 à 10. Néanmoins, il a été observé que l'efficacité de la réaction d'alcoolyse est significativement augmentée lorsque le pH du milieu réactionnel est acide, le pH étant ajusté à 5,0 notamment.

Tableau 2 : Influence du pH sur l'efficacité de la réaction d'alcoolyse des gliadines par la subtilisine :

Alcool	pH Milieu de synthèse	Mw	Taux d'estérisation %
Ethanol	7,0	6 700	14
Ethanol	5,0	9 400	49
N-propanol	7,0	8 300	39
N-propanol	5,0	8 400	50

EXEMPLE 5 : ALCOOLYSE DES PROTEINES DU GLUTEN DE BLE PAR LA PAPAINE :

250 g de gluten de blé vital sont dispersés dans 1,0 l de n-propanol à 70 % v/v. Le pH de la suspension est ajusté à 6,0 à l'aide de HCl. 100 g de papaine (6500 NF Gist Brocades, Seclin, France), et de la cystéine (concentration finale : 10 mM) sont ajoutés à

la suspension. Le mélange est incubé 24 heures sous agitation douce à 25°C. Le produit de la réaction est récupéré comme indiqué dans l'Exemple 1. La masse molaire moyenne des peptides solubles à pH 6,0 est 5 700 et le taux d'estérification est égal à 9 %.

EXEMPLE 6 : ALCOOLYSE DE LA GELATINE PAR LA SUBTILISINE :

25 g de gélatine alimentaire (140-160 bloom) sont dispersés dans 250 ml de n-propanol à 70 % v/v. Le pH est ajusté à 5,0 avec HCl (0,3 mmole). La subtilisine (2,5 ml d'Alcalase 2,4L) est ajoutée et le mélange est incubé pendant 22 heures sous agitation douce à 25°C. 12,5 ml de préparation de Subtilisine sont alors ajoutés et le mélange incubé pendant 4 heures. La Subtilisine est enfin dénaturée par ajout de 11 mmoles de HCl (pH = 3,5) et le mélange chauffé à 50°C pendant 30 minutes. L'alcool est évaporé et le produit dilué dans l'eau est lyophilisé. La masse molaire moyenne des produits solubles dans l'eau à pH = 7 est 12 000 et le taux d'estérification est égal à 29 %.

EXEMPLE 7 : PREPARATION DE MICROPARTICULES A PARTIR DU PRODUIT D'ALCOOLYSE DE ZEINE DE MAIS PAR LA SUBTILISINE EN PRESENCE D'ETHANOL :

10 g de zéine (matière azotée totale : 80,7 % Sigma Z-3625) sont solubilisés dans 100 ml d'éthanol à 90 % v/v ou 70 % v/v. Les mélanges sont ajustés à pH 5 avec HCl. La subtilisine (2 ml d'Alcalase 2,4L) est ajoutée et les mélanges sont incubés 48 heures à 25°C. Les solutions sont ensuite filtrées sur papier et les microparticules sont préparées selon le protocole suivant :

- la solution alcoolique (100 ml) maintenue à 40°C est pompée à un débit de 4 ml/min dans 0,8 l d'une solution aqueuse de gomme arabique à 10 g/l maintenue à 70°C et agitée fortement. La solution alcoolique entre en contact avec la solution aqueuse à travers une aiguille de diamètre 0,8 mm plongeant dans la solution aqueuse,

- la suspension de microparticules est incubée au moins 4 heures à 4°C et filtrée sur papier,

- l'alcool contenu dans le filtrat est évaporé,

- les microparticules sont obtenues en suspension dans l'eau et séchées par lyophilisation.

Les caractéristiques des produits obtenus sont indiquées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Préparation de microparticules à partir du produit d'alcoolyse de la zéine de maïs par la subtilisine en présence d'éthanol :

Ethanol dans la réaction d'alcoolyse, % v/v	70	90
M.A.T. dans produit sec, %	55	54
Rendement de microparticulation de la M.A.T., %	100	94
Ethanol lié aux peptides mg/g peptides	0,98	1,14

EXEMPLE 8 : ALCOOLYSE DE PEPTIDES DE MAIS EN PRESENCE DE N-PROPANOL :

Les peptides de maïs ont été préparés selon la méthode de l'exemple 2 et soumis ensuite à une réaction d'alcoolyse. Le milieu et les conditions réactionnels étaient les suivants :

23

- peptides de maïs : 100 g/l
(masse molaire : 5 700)
- n-propanol : 70 % v/v
- Alcalase : 2 % v/v
- pH : 5,0
- température : 25°C
- durée : 20 h

Le produit de la réaction de condensation avait les caractéristiques suivantes :

- masse molaire : 4 100
- taux d'estérification : 55 %

REVENDICATIONS

1. Procédé de synthèse enzymatique d'esters alkyliques de peptides comprenant la mise en contact simultanée d'un substrat protéique d'origine animale ou végétale avec, d'une part, au moins une enzyme ayant à la fois une activité protéolytique et une activité estérolytique sur des protéines ou sur des peptides et, d'autre part, avec au moins un alcool, ledit alcool étant soit entièrement miscible à l'eau, soit au moins partiellement soluble dans l'eau, caractérisé en ce que la mise en contact simultanée du substrat protéique, de l'enzyme et de l'alcool s'effectue à un pH permettant la formation d'esters alkyliques de peptides.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le substrat protéique est une protéine végétale provenant d'une céréale telle que le blé, le maïs, l'orge, l'avoine, le riz, le seigle, le sarrasin, le sorgho et le triticales, éventuellement sous forme de grain entier, ou de fractions de grains ou de tout produit issu du broyage du grain, tel que la farine ou la semoule.

3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le substrat protéique est d'origine animale et comprend la gélatine.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'alcool est un alcanol aliphatique possédant entre 1 et 5 atomes de carbone, de préférence le méthanol, l'éthanol, ou le n-propanol.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que l'enzyme ayant une activité d'estérase sur des protéines ou sur des peptides est une protéase ou une carboxypeptidase.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'enzyme est une protéase à sérine ou une protéase à cystéine, par exemple la subtilisine ou la papaine.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéase est la subtilisine.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la mise en contact du substrat protéique avec la subtilisine et l'alcool s'effectue à pH 3 à 8, de préférence à pH 4 à 6, par exemple pH 5 environ.

9. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que la protéase est la papaine.

10. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que la mise en contact s'effectue entre pH 5 et 7 environ.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 caractérisé en ce que la concentration de l'alcool est au moins de 30 % v/v, et de préférence, au moins de 70 % v/v, par exemple entre 70 % et 90 %.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la réaction d'alcoolyse est précédée par une étape d'hydrolyse partielle du substrat protéique, de préférence par contact du substrat avec une protéase, notamment, la même que celle mise en oeuvre dans l'étape d'alcoolyse.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 ou 4 à 12 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape permettant la formation de microparticules, par exemple la précipitation du produit soluble en milieu alcoolique dans une phase aqueuse.

14. Mélange de peptides et d'esters alkyliques de peptides tel qu'obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

15. Mélange selon la revendication 13 ayant un taux d'estérification d'au moins 25 %, et de préférence d'au moins 40 %.

16. Microparticules telles qu'obtenues par le procédé selon la revendication 13.

17. Microparticules selon la revendication 16 ayant une dimension d'entre 0,2 et 10 μ .

18. Utilisation des mélanges selon l'une quelconque des revendications 14 à 15 comme agents émulsifiants, comme agents filmogènes, par exemple comme conditionneurs pour les shampooings, comme adoucissants, comme agents épaississants, comme agents hydratants, comme base lavante et moussante, ou comme tout autre additif ou ingrédient dans les produits cosmétologiques.

19. Utilisation des mélanges selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15 dans l'industrie agroalimentaire ou pharmaceutique comme additifs ou ingrédients texturants, comme agents moussants, comme substitut de graisse, ou comme agents émulsifiants.

20. Utilisation des mélanges selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15 dans l'industrie chimique comme agents mouillants, par exemple pour des produits de lessive, comme agents émulsifiants, comme agents adoucissants, comme agents filmogènes et comme agents de filage.

21. Utilisation des microparticules, selon la revendication 16, comme substituts de graisse.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00213

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. 5: C12P21/06; A23J3/34; A61K7/00; A61K47/42 A23L1/052; According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC A61K7/075		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl. 5: C12P; A23J; C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,9 003 123 (ENZYTECH) 5 April 1990 cited in the application see the whole document * en particular page 21, line 16 - page 22, line 12 *	1-17,19,21
X	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 52, No. 3, 1988, TOKYO JP pages 855 - 856 H. SAITO ET AL 'Papain-catalyzed hydrolysis in an aqueous organic system' see the whole document	1,2,4-6, 9-11,14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 June 1993 (01.06.93)		Date of mailing of the international search report 8 June 1993 (08.06.93)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300213
SA 71069

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 01/06/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9003123	05-04-90	AU-A- 4339489	18-04-90
		EP-A- 0434760	03-07-91
		JP-T- 4502102	16-04-92
		US-A- 5021248	04-06-91
		US-A- 5145702	08-09-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00213

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5	C12P21/06; A23L1/052;	A23J3/34; A61K7/075
		A61K7/00;
		A61K47/42
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12P ; A23J ; C07K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	WO,A,9 003 123 (ENZYTECH) 5 Avril 1990 cité dans la demande voir le document en entier * en particulier page 21, ligne 16 - page 22, ligne 12 *	1-17, 19, 21
X	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 52, no. 3, 1988, TOKYO JP pages 855 - 856 H. SAITO ET AL 'Papain-catalyzed hydrolysis in an aqueous organic system' voir le document en entier	1,2,4-6, 9-11,14
<p>⁹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
01 JUIN 1993	08. 06. 93	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	VAN DER SCHAAL C.A.	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300213
SA 71069

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale 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.

01/06/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9003123	05-04-90	AU-A- 4339489	18-04-90
		EP-A- 0434760	03-07-91
		JP-T- 4502102	16-04-92
		US-A- 5021248	04-06-91
		US-A- 5145702	08-09-92

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82