

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 09.12.92.

③0 Priorité : 12.12.91 JP 32878791.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 18.06.93 Bulletin 93/24.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Le rapport de recherche n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : TANISAKE Kabushiki-Kaisha — JP.

⑦2 Inventeur(s) : Sakai Mituru.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Morelle & Bardou.

⑤4 Complément nutritionnel.

⑤7 Complément nutritionnel préparé selon les étapes sui-
vantes: (a) préparation d'un substrat aqueux contenant des
protéines végétales et des lipides végétaux; (b) adjonction
à celui-ci de lipases et de protéinases et/ou d'amylase; et
(c) fermentation du substrat aqueux.

Du koji tel que du riz malté ou du malt peut remplacer
lesdites lipases et protéinases et/ou amylase.

Les produits fermentés accroissent l'immunité et peuvent
améliorer l'état de santé.

FR 2 684 847 - A1



COMPLEMENT NUTRITIONNEL

L'invention concerne les compléments nutritionnels. Plus spécifiquement, la présente invention concerne un complément nutritionnel contenant en abondance des ingrédients nutritifs tels que saccharides et vitamines ainsi que les sulfures d'acides aminés et d'acides gras insaturés qui peuvent assurer une excellente immunité.

05 Un certain nombre de compléments nutritionnels ont été introduits et commercialisés récemment avec pour objet le maintien et/ou l'amélioration du bon état de santé. Un grand nombre de ces compléments nutritionnels contiennent divers éléments nutritifs tels que acides aminés, acides gras, vitamines et minéraux, assurant à ceux qui les prennent des effets tels que contrôle de la pression sanguine assurée par les acides gras tels l'acide linoléique et vasodilatation assurée par les acides aminés.

10 Par une étude approfondie de la fermentation de substrats tels que son de riz, blé et soja contenant en abondance des protéines végétales et des lipides végétaux, l'inventeur a découvert que les sulfures des acides aminés et des acides gras insaturés dans un tel substrat pouvaient assurer une excellente immunité, tous les deux étant par conséquent très utiles pour le corps humain.

15 Selon la Revendication 1, l'invention est caractérisée en ce que le complément nutritionnel est préparé selon les étapes suivantes :

- a) préparation d'un substrat aqueux contenant des protéines végétales et des lipides végétaux ;
- 20 b) adjonction à celui-ci de lipases et de protéinases et/ou d'amylase ; et
- c) fermentation du substrat aqueux.

25 Selon un premier mode de réalisation, le complément nutritionnel est obtenu par la fermentation entre 30°C et 50°C pendant 8 à 15 heures d'un substrat aqueux contenant des protéines végétales et des lipides végétaux et 0,01 à 0,1 % en poids d'un mélange de lipases et de protéinases.

Selon un second mode de réalisation, le complément nutritionnel est obtenu par la fermentation entre 30°C et 55°C pendant 8 à 15 heures d'un substrat aqueux contenant des protéines végétales et des lipides végétaux et 0,01 à 0,1 % en poids d'un mélange de lipases, de protéinases et d'amylase.

30 Selon un troisième mode de réalisation, le complément nutritionnel est obtenu par la fermentation entre 40°C et 50°C pendant 12 à 15 heures d'un substrat aqueux contenant des protéines végétales et des lipides végétaux et de 1 à 3 % en poids de *koji* (une sorte de levure).

35 Les substrats utilisés dans la présente invention peuvent être tout ce qui renferme une protéine végétale et un lipide végétal, comme par exemple le son de riz, la lie de saké (alcool de riz), les germes de blé, le son de blé, le blé noir complet, le millet de sarrasin complet, le soja, la lie de fromage de soja, le lait de soja, les pois *adzuki*, la farine de soja, la mouture de café, les ignames, les taros (*Colocasia antiquorum*), la mouture de thé, le miel, le sésame, les cacahuètes, les graines de lotus, les feuilles d'*ashitaba*, les "langues de boeuf" (*Perilla frutescens crispa*), les algues *wakame* et les laminaires. Parmi ceux-ci, sont particulièrement préférés pour

servir de substrats dans la présente invention le son de riz, la lie de saké, le son de blé, la mouture de café, les germes de blé, le sésame, la lie de fromage de soja, le soja et les pois *adzuki* car ils contiennent des protéines végétales et des lipides végétaux en quantités bien équilibrées.

Un tel substrat est mis à fermenter en utilisant des enzymes capables de décomposer à la fois les protéines végétales et les lipides végétaux dans le substrat et/ou en utilisant une levure. Ces enzymes peuvent comprendre lipase et protéinase, ou lipase, protéinase et amylase. La levure peut être du *koji* ou du riz malté, capable de produire dans l'organisme lipase, protéinase et/ou divers autres types d'enzymes.

Les protéinases préférées à utiliser sont les protéinases alcalines (pH 9 à 13) qui peuvent être obtenues à partir par exemple de *Bacillus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus mycoides*. Une solution tampon préférée est l'urée, de préférence à raison de 0,1 à 1,0 mol/l.

Lorsque cette protéinase alcaline doit être neutralisée ou acidifiée, de la papaïne peut par exemple être mélangée à la protéinase obtenue à partir de l'*Aspergillus*. On peut utiliser un groupe de protéinases faiblement alcalines ou neutres (meilleure fonctionnalité avec un pH entre 6 et 8) qui peuvent être raisonnablement stables à pH 9, comme par exemple la protéinase neutre obtenue à partir du *Streptomyces griseus*, en même temps qu'une protéinase alcaline. Cette protéinase alcaline peut être mélangée à une protéinase animale. On peut par exemple utiliser la protéinase pancréatique et une protéinase qui fonctionne à son maximum à un pH compris entre 8 et 9, ou inférieur, comme par exemple un composé de protéinase tiré de *Streptomyces griseus* et une enzyme tirée de *Bacillus natto*, *Bacillus cereus* ou de *Bacillus mycoides*, un enzyme tiré de *Asp. orizae*, *Rhiz. Chinensis* ou *Mucor. pusillus*, et une protéinase végétale comme par exemple papaïne, ficine et bromélinase. Il est nécessaire d'ajuster les valeurs du pH de ladite protéinase pour obtenir la meilleure fonctionnalité de l'enzyme utilisée. On peut ajouter de l'urée ou une solution tampon de bicarbonate de sodium ou de phosphate monopotassique par exemple pour ajuster le pH.

Lesdites lipases peuvent être diverses sortes de moisissures, levures, bacilles, liquides biologiques ou enzymes extraits d'organes internes, comme par exemple la lipase pancréatique, la lipase du foie, la bactérie de la tuberculose, la lipase FIB (fibrinolysine) et la lipase de *hima*. Les polysaccharides contenus dans les substrats, et tout spécialement les disaccharides et les trisaccharides, possèdent un excellent pouvoir immunitaire et l'amylase peut décomposer les saccharides.

Il est également nécessaire d'ajuster le pH en fonction de ces lipases et de l'amylase de manière à obtenir une bonne décomposition. Une solution tampon de bicarbonate de sodium et de carbonate de sodium, de borax et d'hydroxyde de sodium, de borax et de carbonate de sodium, ou de phosphate monosodique et d'hydroxyde de sodium, etc... peut être utilisée. Il est possible aussi d'utiliser plusieurs de ces solutions tampon.

La quantité d'enzymes nécessaire dépend du type d'enzymes et de leur activité. On préférera habituellement une plage de 0,01 à 1 % en poids. La quantité de lipases ou d'amylase est habituellement la moitié de la quantité de protéinase. La température de fermentation n'est pas ca-

pitale dans la présente invention. Elle dépend des propriétés de l'enzyme utilisée, comme la température la plus appropriée et la plage de stabilité. La température est habituellement comprise entre 30°C et 55°C. La durée de la fermentation est habituellement comprise entre 8 et 15 h. Il est préférable de stériliser le substrat dans un autoclave avant chaque fermentation.

05 Du *koji* tel que riz malté ou malt, qui peut produire une enzyme telle que lipase, protéinase et amylase dans l'organisme, peut également être utilisé pour la fermentation. Les conditions préférées pour la fermentation dans le cas du *koji* sont de 1 à 3 % en poids, de 40°C à 50°C, et 12 à 15 h. Lorsqu'on utilise le *koji* pour la décomposition d'un substrat, il n'est pas nécessaire d'utiliser de solution tampon préparée spécialement.

10 Une unité induite de la méthode d'Anson est utilisée pour mesurer l'activité enzymatique. L'unité est appelée unité protéinase (hémoglobine) U. L'unité U correspond à la quantité d'enzyme entrant en contact avec 1 micromol/min (à 40°C, 280 nm) de tyrosine provenant de l'hémoglobine précipitée par l'acide trichloracétique.

15 Les produits fermentés sont obtenus par adjonction d'eau à un substrat suivie de l'adjonction d'enzymes (lipase, protéinase et/ou amylase) ou de *koji* (riz malté et/ou malt) dans le substrat aqueux, puis en faisant fermenter le liquide.

Le filtrat du produit fermenté préparé par adjonction d'enzymes ou de *koji* à un substrat aqueux contenant les protéines végétales ou les lipides végétaux a été analysé par HPLC (chromatographie liquide haute performance). L'analyse a été effectuée en utilisant un détecteur (LC-
20 9A, Shimadzu Seisakusho, Co., Ltd., Japon), un système de colonnes (3 m de long) et l'acétonitrile comme éluant, la température de la colonne étant de 30°C et le débit de liquide étant de 10 ml/min. Les résultats suivants ont été obtenus.

Il a été confirmé que ledit filtrat fermenté contenait des acides gras tels que acide myristique, acide palmitique, acide stéarique, acide arachique, acide béhénique, acide lignocérique, acide dodécénique, acide tétradécénique, acide tétradécadiénique, acide pentadécénique, acide hexadécénique, acide oléique, acide linoléique, acide linolénique, acide eicosaénique, acide eicosadiénique, acide arachidonique, acide eicosatriénique, acide érucique et acide docosahexa-
25 nique. Ledit filtrat contenait aussi des acides aminés tels que leucine, isoleucine, lysine, méthionine, cystéine, phénylalanine, tyrosine, thréonine, tryptophane, valine, histidine, arginine, acide aspartique, alanine, acide glutamique, glycine, proline et sérine. Des saccharides, de la
30 cendre, du calcium, du phosphore, de la carotène, de la vitamine B1, de la vitamine B2, de la vitamine B3, de l'acide pantothénique et des acides nucléiques étaient également contenus dans le filtrat.

Comme il apparaît clairement de l'analyse, le produit fermenté selon la présente invention
35 contient de nombreux acides aminés et acides gras différents. Les sulfures d'acides aminés et d'acides gras insaturés sont considérés comme vitaux pour le maintien et la stimulation de l'immunité. Dans le cas des produits fermentés préparés à partir d'un substrat aqueux auquel sont ajoutés protéinases, lipases et/ou amylase, ou du *koji* tel que riz malté ou malt, il se produit une décomposition des saccharides du substrat et des polysaccharides tels que disaccharides et tri-
40 saccharides sont formés, dont on pense qu'ils stimulent eux aussi l'immunité.

Un procédé de fabrication d'un complément nutritionnel selon la présente invention est décrit ci-dessous.

On prépare un substrat aqueux auquel sont ajoutés protéines végétales et lipides végétaux. On rajoute alors une enzyme à l'ensemble. Pour la décomposition du substrat, on utilise une
 05 protéinase, une lipase et/ou une amylase et/ou du *koji* qui peuvent produire diverses enzymes dans l'organisme. Ladite enzyme peut être ajoutée séparément ou en même temps. D'autres types d'enzyme peuvent également être utilisés. La température de fermentation préférée lorsqu'on utilise une enzyme est comprise entre 30°C et 55°C. La durée de fermentation préférée sous agitation du substrat varie entre 8 h et 15 h. Le pH doit être déterminé en fonction du type d'en-
 10 zyme utilisée. Lorsqu'on utilise le *koji*, la température de fermentation préférée est comprise entre 40°C et 50°C. La durée de fermentation préférée du substrat varie entre 12 h et 15 h sous agitation. Les produits fermentés ainsi préparés sont filtrés.

Le complément nutritionnel préparé par filtration des produits fermentés peut être ajouté à du jus, des sucreries, de la sauce de soja, etc...

15 *Modes de Réalisation Préférés*

* Mode de réalisation 1

Du son de riz a été traité thermiquement pendant 30 minutes par vapeur chaude (150°C à 180°C) dans un autoclave. Le son de riz traité thermiquement a alors été comprimé dans une presse jusqu'à obtention d'une teneur en eau de 40 % en poids. De l'*Aspergillus orizae* et
 20 *Hanzenula anorama* ont entre temps été cultivés séparément sur milieu de culture MY (mélange de polypeptone, extrait de levure, extrait de malt, glucose et eau). Du *Bacillus subtilis* a également été cultivé sur bouillon de culture. Le son de riz comprimé (10 kg) a été stérilisé et les trois substances cultivées susmentionnées mélangées à lui. Le mélange a été agité à 30°C. Après 8 heure environ, la température a été portée à 45°C et l'agitation a été reprise pour 5 h. Le produit
 25 alors fermenté a été filtré et 300 g de filtrat ont été obtenus. Le filtrat a été analysé. Les résultats de l'analyse sont les suivants.

	Composants	% (en poids)
	eau	8,5
	acides aminés	55,8
30	acides gras	20,1
	saccharides	2,5
	cendres	8,3
	calcium	2,3
	phosphore	2,2
35	carotine	0,09
	vitamine B1	0,15
	vitamine B2	0,0005
	vitamine B3	0,0025
	acide panthothénique	0,0058
40	acides nucléiques	0,1160

* Mode de réalisation 2

On ajoute de l'eau à des germes de blé (40 % en poids) et l'on traite alors thermiquement le substrat aqueux dans un autoclave pendant 25 min. De l'*Aspergillus soya* a séparément été cultivé sur milieu de culture MY. Du *Saccharomyces subtilis* a également été cultivé sur bouillon de culture. On ajoute au mélange des deux dites substances cultivée de la papaine, du riz malté, de la lipase rénale et hydrocarbonate de sodium, et le mélange résultant est ajouté et mélangé au substrat aqueux (10 kg). L'ensemble du mélange est agité pendant 10 h à 45°C. Le produit fermenté est filtré et un filtrat est obtenu (310 g). Le filtrat a été analysé et les résultats suivants ont été obtenus.

10

Composants	% (en poids)
saccharides	2,0
acides aminés	65,5
acides gras	25,5
15 cendres	12,3
carotène	0,009
vitamine B1	0,110
vitamine B2	0,0005
vitamine B3	0,0015
20 acide panthothénique	0,0038
acides nucléiques	0,150

* Test d'immunité

Les filtrats obtenus dans les Modes de réalisation 1 et 2 ont été testés sur 20 souris dont 10 étaient en bonne santé et les 10 autres souffraient de rhume. Elles ont été séparées en deux groupes de 10 dont cinq étaient en bonne santé dans chaque groupe. Deux des souris en bonne santé et deux des souris malades de chaque groupe n'ont reçu qu'une solution de sérum physiologique (2 ml deux fois par jour). On a administré aux trois autres souris en bonne santé et aux trois autres souris malades de chaque groupe lesdits filtrats des Modes de réalisation 1 et 2 (2 ml deux fois par jour), respectivement. Les résultats suivants ont été obtenus sur une durée d'observation de 30 jours.

- Souris en bonne santé : aucune anomalie n'a été détectée sur les quatre souris des deux groupes qui n'ont reçu que la solution de sérum physiologique ; aucune anomalie n'a été détectée sur les six souris des deux groupes qui ont reçu l'un ou l'autre des filtrats.
- 35 - Souris malades : les quatre souris des deux groupes qui n'ont reçu que le sérum physiologique sont mortes dans les cinq jours ; les six souris des deux groupes auxquelles on a administré l'un ou l'autre filtrat ont survécu au-delà des 30 jours de test.

Un effet d'immunité des filtrats a ainsi été confirmé.

Des modes de préparation montrant des usages pratiques de ce filtrat de produits fermentés

selon l'invention sont donnés ci-dessous.

*** Mode de préparation 3**

Des tomates bien mures (1 kg) ont été concassées avec un mixeur. La pâte concassée a été
05 envoyée dans un réfrigérant de Liebig dans lequel coulait de l'eau à 90°C et l'enzyme oxydante
de la pâte a été détruite. La pâte a alors été placée dans un broyeur. Du sel (7 g) et le filtrat obtenu
selon le Mode de réalisation 1 (20 g) lui ont été ajoutés. Le mélange a été broyé pendant 5
secondes. La pâte broyée a été traitée au vide et stérilisée à 120°C pendant 2 secondes. Elle a
alors été refroidie, donnant du jus de tomates.

10

*** Mode de préparation 4**

Du sucre en poudre (1 kg) et du sirop de malt épais (500 g) ont été mélangés au filtrat du
produit fermenté du Mode de réalisation 1 (10 g). Le mélange a été chauffé à 120°C dans une
casserole en aluminium. Le sirop épaissi a été versé petit à petit dans de l'alcool qui se trouvait à
15 une température inférieure à 0°C, formant ainsi des pastilles.

*** Mode de préparation 5**

Une base de gomme naturelle (20 g) a été mise à fondre à la chaleur et le filtrat du Mode de
réalisation 1 (2 g), du carbonate de calcium (2 g), du sucre en poudre (40 g), du sucre de raisin
20 (glucose) (20 g), du sirop de malt (15 g) et des excipients aromatiques (1 g) lui ont été ajoutés.
L'ensemble a été soigneusement pétri et pressé à plat. On a ainsi obtenu du chewing gum.

*** Mode de préparation 6**

De la poudre de riz (100 g) et du sucre (100 g) ont été placés dans un récipient. De l'eau
25 (80 ml) a été ajoutée petit à petit dans le récipient. L'ensemble a été mélangé soigneusement et le
filtrat du Mode de réalisation 1 (10 g) a été ajouté. Le mélange résultant a été soigneusement
pétri. Le mélange pétri a été passé à la vapeur dans un cuiseur à vapeur pendant 25 min. Le mé-
lange passé à la vapeur a alors été placé dans un bol et un peu de sel lui a été mélangé. Le mé-
lange a été divisé en petites portions, chacune pesant environ 5 g, devenant des boulettes (que-
30 nelles).

Les dits modes de préparation ne représentent que quelques unes des nombreuses possibi-
lités d'utilisation des produits fermentés préparés selon la présente invention. En consommant
ce type d'aliments, un bon état de santé sera entretenu et/ou amélioré.

REVENDICATIONS

1 . Complément nutritionnel préparé selon les étapes suivantes :

a) préparation d'un substrat aqueux contenant des protéines végétales et des lipides végétaux ;

b) adjonction à celui-ci d'un mélange d'enzymes, choisies parmi les lipases, protéinases, amylases ; et

c) fermentation du substrat aqueux.

2 . Complément nutritionnel préparé selon la Revendication 1, *caractérisé en ce que* l'on ajoute 0,01 à 0,1 % en poids de lipases et de protéinases et que la fermentation du substrat aqueux est opérée entre 30°C et 50°C pendant 8 à 15 heures.

3 . Complément nutritionnel préparé selon la Revendication 1, *caractérisé en ce que* l'on ajoute 0,01 à 0,1 % en poids de lipases, de protéinases et d'amylase et que la fermentation du substrat aqueux est opérée entre 30°C et 55°C pendant 8 à 15 heures.

4 . Complément nutritionnel préparé selon la Revendication 1, *caractérisé en ce que* l'on ajoute 1 à 3 % en poids de *koji* et que la fermentation du substrat aqueux est opérée entre 40°C et 50°C pendant 12 à 15 heures.