

Brevet N° **83401**
 du **1er juin 1981**
 Titre délivré : **11 SEP. 1981**

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Intellectuelle
 LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite: CPC INTERNATIONAL INC., International Plaza, (1)
à ENGLEWOOD CLIFFS, New Jersey 07632, Etats-Unis d'Amérique,
 représentée par Monsieur Jacques de Muyser, agissant en (2)
qualité de mandataire

dépose(nt) ce premier juin 1980 quatre-vingt-un (3)
 à 15 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
"Procédé de production de polymères du fructose et sirops (4)
à forte teneur en fructose".

2. la délégation de pouvoir, datée de ENGLEWOOD CLIFFS le 21 janvier 1981

3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;

4. // planches de dessin, en deux exemplaires;

5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,

le 1er juin 1981

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :

Robert E. HEADY, 226 Tampa, à PARK FOREST, Illinois 60466, (5)
Etats-Unis d'Amérique

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
 (6) brevet déposée(s) en (7) aux Etats-Unis d'Amérique
 le 3 juin 1980 (No. 156,154) (8)

au nom de l'inventeur (9)
domicile

est(istent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg

35, bld. Royal (10)

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les
 annexes susmentionnées; — avec ajournement de cette délivrance à // mois. (11)

Le mandataire

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des
 Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

1er juin 1981

à 15 heures



Pr. le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes,
 p. [Signature]

REVENDICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / ~~du~~ / ~~procédé~~ / ~~d'invention~~ /

~~En~~/ Aux ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Du 3 juin 1980

Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

au nom de : CPC INTERNATIONAL INC.,

pour : "Procédé de production de polymères du fructose et sirops
à forte teneur en fructose".

La présente invention concerne un procédé de production de polymères de fructose à partir de saccharose. Les polymères de fructose ainsi produits peuvent être aisément convertis en sirops à forte teneur en fructose.

5 Les sirops du commerce contenant du fructose sont produits par l'isomérisation enzymatique du glucose obtenu à partir d'hydrolysats d'amidon dérivé du maïs. Cette opération est d'ordinaire effectuée dans un procédé continu qui implique la mise en contact de la solution contenant du
10 glucose avec une préparation enzymatique de glucose-isomérase qui a été immobilisée d'une certaine façon. De tels procédés donnent un sirop dans lequel le fructose est présent en proportion de moins de 50 % et, d'ordinaire, de 40 à 45 % des glucides totaux.

15 Du fait que le fructose est plus sucré que le glucose ou le saccharose, de nombreux efforts ont été consacrés à la mise au point de procédés de production de sirops dans lesquels plus de 50 % des glucides consistent en fructose. Normalement, ces procédés ont impliqué des
20 opérations chromatographiques de séparation du fructose des autres glucides contenus dans les sirops obtenus à partir de saccharose et/ou de maïs. On mentionne à titre d'exemples les brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 4 096 036, N° 4 022 637 et N° 3 483 031.

25 Un nouveau mode d'obtention d'un sirop de fructose contenant plus de 50 % de fructose a été décrit récemment dans le brevet britannique N° 2 000 144. Conformément à ce procédé, un substrat formé de saccharose est soumis à l'action d'un enzyme appelé fructosyl-transférase
30 pour convertir le saccharose en un sirop intermédiaire contenant principalement des polymères de fructose et du glucose. Ce sirop, dans lequel le fructose se trouve sous la forme polymérique, est utile comme glucide spécial ou bien il peut encore être traité pour produire des sirops de fructose
35 contenant plus de 50 % de fructose. La moitié environ du glucose contenu dans le sirop intermédiaire peut être isomérisée en fructose au moyen d'un enzyme appelé glucose-isomérase. Une hydrolyse subséquente de ce mélange

réactionnel clive les polymères de fructose en fructose, en produisant ainsi un sirop à forte teneur en fructose contenant une proportion dominante de fructose et de petites quantités de glucose. La présente invention apporte un perfectionnement à ce procédé.

La présente invention propose un procédé perfectionné de production de polymères de fructose à partir de saccharose. Ce procédé implique la mise en contact d'un substrat contenant du saccharose avec un mélange d'une préparation enzymatique de fructosyl-transférase et d'une préparation enzymatique de glucose-isomérase. Le produit réactionnel est un sirop qui contient des polymères de fructose, plus du glucose et du fructose. Ce sirop est utile comme glucide spécial pour des édulcorants et pour d'autres applications. Il peut aussi être hydrolysé en donnant un sirop dont le principal sucre est le fructose. La teneur en fructose des sucres contenus dans ces sirops est généralement supérieure à 60 % en poids et peut aller jusqu'à environ 75 % et au-delà, selon la composition du substrat de saccharose et les conditions réactionnelles utilisées.

Ce procédé simple surprend par son efficacité dans la production de sirops à forte teneur en fructose. L'action enzymatique simultanée de la fructosyl-transférase et de la glucose-isomérase sur le saccharose donne des polymères de fructose renfermant un pourcentage moyen de fructose sensiblement supérieur à celui que l'on obtient par les réactions successives des mêmes enzymes. L'hydrolyse des polymères de fructose donne un sirop à forte teneur en fructose qui contient jusqu'à 15 % de fructose de plus que les sirops obtenus par hydrolyse de polymères du fructose produits par les réactions enzymatiques successives de l'art antérieur.

Les divers termes et expressions utilisés dans le présent mémoire ont les définitions ci-après :

1. Glucose et dextrose

Les termes "glucose" et "dextrose" sont utilisés de façon interchangeable dans le présent mémoire pour désigner ce monosaccharide sous une forme quelconque, en solution ou sous la forme sèche.

2. Fructose et lévulose

Les termes "fructose" et "lévulose" sont généralement utilisés de façon interchangeable dans la pratique pour désigner l'isomère du dextrose qui est plus sucré que le dextrose. Le fructose se trouve dans le miel et dans le sucre inverti, en même temps que le dextrose, et il est intéressant en raison de son pouvoir sucrant. Les termes lévulose et fructose seront utilisés de façon interchangeable dans le présent mémoire pour désigner ce monosaccharide sous toute forme, en solution ou sous la forme sèche.

3. Sirop à forte teneur en fructose

Cette expression utilisée dans le présent mémoire désigne tout sirop qui renferme plus de 50 % de fructose en poids sur base solide sèche. Il y a lieu de remarquer qu'un sirop du commerce contenant 42 % de fructose est généralement considéré comme un sirop à forte teneur en fructose dérivé du maïs, mais il n'est pas inclus dans la définition de l'expression utilisée dans le présent mémoire.

4. Saccharose

Le terme "saccharose" désigne ce disaccharide sous sa forme raffinée ou sous sa forme brute, en solution ou à sec, provenant de toute matière première apte à donner du saccharose, par exemple la canne à sucre ou les betteraves sucrières. Dans la pratique de la présente invention, le saccharose utilisé comme matière de départ est utilisé normalement en milieu aqueux.

5. Substrat contenant du saccharose

L'expression "substrat contenant du saccharose" est utilisée dans le présent mémoire pour désigner tout substrat dont la teneur en saccharose est au moins égale à 25 % en poids par rapport au poids des sucres présents. Cette expression couvre les mélasses, les égouts de turbinage, les jus denses, des mélanges de saccharose et de sucres invertis, des mélanges de saccharose et de sirop renfermant du fructose, de même que le saccharose purifié.

6. Polysaccharide

Le terme "polysaccharide" est utilisé dans le présent mémoire pour désigner tout saccharide formé d'au moins deux motifs de monosaccharide.

7. Polymère de fructose

L'expression "polymère de fructose" est utilisée dans le présent mémoire pour désigner tout polysaccharide dans lequel les motifs de monosaccharide qui prédominent sont les motifs de fructose.

8. Préparation enzymatique

L'expression "préparation enzymatique" est utilisée dans le présent mémoire pour désigner toute composition qui déploie l'activité enzymatique désirée. Cette expression est utilisée pour désigner, par exemple, des cellules entières vivantes, des cellules sèches, des extraits cellulaires, des préparations raffinées et concentrées dérivées des cellules et de liqueurs de culture. L'enzyme des polymères de fructose de l'invention produit alors un sirop de sucres contenant jusqu'à 15 % de fructose de plus que les sirops obtenus par hydrolyse de polymères de fructose résultants du procédé antérieur.

9. Transfructosylation

Ce terme est utilisé dans le présent mémoire pour désigner le transfert d'un groupe fructosyle d'un donneur, par exemple le saccharose, à un accepteur, par exemple un polysaccharide.

10. Fructosyl-transférase

Ce terme, tel qu'on l'utilise dans le présent mémoire, désigne tout enzyme qui catalyse la transfructosylation, et il couvre la préparation enzymatique obtenue à partir de Pullularia pullulans, ATCC N° 9348 (synonyme d'Aureobasidium pullulans). Dans ses formes de réalisation appréciées, la préparation enzymatique de fructosyl-transférase de l'invention contient l'enzyme appelé fructosyl-transférase sous une forme purifiée, c'est-à-dire sous une forme séparée du milieu de culture par fermentation dans lequel l'enzyme a été produit.

11. Unité de fructosyl-transférase

Au sens du présent mémoire, une unité de fructosyl-transférase est définie comme étant la quantité d'activité enzymatique nécessaire pour produire une micro-mole d'un sucre réducteur, exprimé en glucose, par minute

dans les conditions suivantes : (a) pH 5,5, (b) température de 55°C et (c) concentration dans le substrat de 60 g de saccharose de qualité alimentaire pour 100 ml de mélange réactionnel aqueux.

5 Le sucre réducteur (exprimé en glucose) est dosé au moyen de l'appareil appelé "Technicon Autoanalyzer II" (Technicon, Inc., Tarrytown, New York). L'analyse est effectuée selon une méthode classique au ferricyanure alcalin, Analytical biochemistry 45, N° 2, pages 517-524
10 (1972), adaptée en vue de pouvoir être utilisée dans l'appareil appelé "Autoanalyzer II". Sauf spécification contraire, les déterminations d'activité enzymatique sont effectuées par le contrôle continu d'un mélange réactionnel de composition suivante :

15 7,5 ml de solution aqueuse à 80 % (poids/volume) de saccharose de qualité alimentaire.
2,3 ml de tampon au citrate 0,1 M, pH 5,5.
0,2 ml d'un échantillon d'enzyme contenant la
20 quantité de fructosyl-transférase apte à produire 5 à 25 microgrammes de sucre réducteur (exprimé en glucose) par minute par ml de mélange réactionnel.

12. Glucose-isomérase

25 Toute préparation enzymatique qui isomérisé le dextrose en lévulose est appelée glucose-isomérase dans le présent mémoire. De tels enzymes sont bien connus dans la pratique et ont été appelés dextrose-isomérase, xylose-isomérase et glucose-isomérase. Ces enzymes peuvent être obtenus à partir de divers micro-organismes convenables. Des
30 sources de glucose-isomérases, leur purification, la définition des unités et des méthodes d'analyse de ces enzymes sont données dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 077 842, auquel on pourra se référer.

13. Analyse chromatographique en phase liquide sous haute pression

35 Cette expression, telle qu'on l'utilise dans le présent mémoire, définit une méthode par laquelle les sirops de l'invention sont analysés par chromatographie en phase liquide sous haute pression conformément à la technique

suivante : des composants sont chromatographiés par élution avec de l'eau sur une résine d'échange cationique sous la forme calcium. Les composants élués sont détectés au moyen d'un réfractomètre différentiel. Tous les glucides sont dosés quantitativement au moyen d'un intégrateur électronique. La méthode générale est celle qui est décrite dans "Analysis of Carbohydrate Mixtures by Liquid Chromatography", Am. Soc. Brew. Chem. Proc., 1973, pages 43-46. La résine utilisée est la résine "AMINEX 50W-X4" (20-30 μ m) sous la forme calcium, de la firme Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie.

Le substrat contenant du saccharose utilisé dans la présente invention peut être une solution de tout saccharose raffiné ou brut. Le substrat peut aussi consister en un mélange de saccharose et de quantités variables d'autres sucres dont la teneur en saccharose est d'au moins 25 % et de préférence d'au moins environ 50 % en poids des sucres présents. Des substrats appréciés sont des sources commerciales de saccharose telles que des mélasses ayant des degrés variables de pureté ou des mélanges de saccharose et de sucre inverti. D'autres substrats utiles comprennent des jus denses et égaouts des types "meladura" et "turbinado" et des mélanges de saccharose et de sirops de fructose. Le choix de la source de saccharose que l'on utilise est d'ordinaire une question d'ordre économique. Ce choix dépend de l'étape ou des étapes du procédé permettant d'effectuer la purification la plus économique.

Les préparations enzymatiques de fructosyl-transférase dont on apprécie l'utilisation dans la présente invention peuvent être toutes préparations enzymatiques capables de transférer le groupement fructose du saccharose à une autre molécule de saccharose ou à d'autres molécules de sucres de manière que les produits soient des polysaccharides comprenant 2 à environ 10 motifs fructosyle par molécule. On connaît de nombreuses préparations enzymatiques de ce genre. D'excellents résultats ont été obtenus en utilisant des préparations enzymatiques de fructosyl-transférase dérivées de souches de Pullularia pullulans telles que

NRRL N° 3937 ; ATCC N° 9348 ; ATCC N° 12 535 ;
 NRRL N° 1673 ; NRRL N° Y 2311 ; NRRL N° YB 3892 ; ATCC
 N° 15 223 ; et NRRL N° YB 3861. Un procédé de préparation de
 5 l'enzyme appelé fructosyl-transférase à partir de Pullularia
pullulans est décrit dans le brevet britannique N° 2 000 144
 précité, auquel on pourra se référer. Un autre procédé de
 préparation de cet enzyme est donné dans l'exemple 1.

Le substrat contenant du saccharose est traité en
 même temps avec une préparation enzymatique de fructosyl-
 10 transférase et une préparation enzymatique de glucose-
 isomérase pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention.
 La quantité de fructosyl-transférase que l'on utilise peut
 varier entre de larges limites. Des vitesses de réaction
 offrant un intérêt pratique s'observent lorsque 10 à
 15 30 motifs de fructosyl-transférase sont utilisés par gramme
 de saccharose dans le substrat. On peut obtenir des vitesses
 de réaction encore plus grandes en utilisant de plus grandes
 quantités de l'enzyme. La quantité de glucose-isomérase peut
 aussi varier entre de larges limites. Des vitesses de
 20 réaction offrant un intérêt pratique s'observent lorsque 10 à
 20 motifs de glucose-isomérase sont utilisés pour chaque
 gramme de saccharose dans le substrat.

Les procédés de l'invention sont mis en oeuvre au
 moyen de solutions aqueuses du substrat. On peut utiliser des
 25 concentrations dans la substrat s'abaissant à environ 10 %
 (en poids/volume). Toutefois, il est préférable d'utiliser
 des solutions aussi concentrées que possible, allant de
 préférence d'environ 50 % en poids/volume à la saturation, de
 manière qu'il y ait moins d'eau à évaporer du produit final.

30 Les réactions sont conduites à des températures
 allant de la température ambiante à des températures juste
 inférieures à celles pour lesquelles une désactivation rapide
 des enzymes a lieu. Une plage appréciée de températures de
 réaction va de 50 à 60°C. On peut faire varier le pH du
 35 mélange réactionnel en fonction des optimums de pH des
 enzymes particuliers utilisés. Il convient d'utiliser une
 plage de pH d'environ 5,5 à environ 7,0, une plage appréciée
 allant d'environ 6,3 à environ 6,7 lorsque la fructosyl-

transférase est celle que l'on obtient à partir de Pullularia pullulans ATCC N° 9348 et lorsque la glucose-isomérase est celle qui est élaborée par Streptomyces olivochromogenes. Il est également apprécié de conduire les réactions en présence
5 d'ions Mg^{++} à la concentration de 0,005 M.

Lorsque le procédé de l'invention est mis en oeuvre à une température d'environ 55°C, il atteint un degré pratique d'achèvement en une période d'environ 24 heures. Les enzymes présents peuvent être désactivés par chauffage du
10 mélange réactionnel à environ 100°C pendant 10 à 15 minutes. Le cas échéant, les enzymes peuvent être enlevés du mélange réactionnel avant ou après la désactivation à la chaleur, par ultrafiltration sur un filtre dont les dimensions conviennent à l'enlèvement d'une telle matière.

Le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre en discontinu ou sur le mode continu. La réaction continue peut être conduite par circulation du mélange réactionnel dans un appareil d'ultrafiltration, ce qui a pour effet que le produit est continuellement entraîné dans l'ultrafiltrat
20 et que les enzymes sont retenus dans la fraction restant sur l'ultrafiltre. Du substrat et des enzymes frais nécessaires pour remplacer ceux qui ont été désactivés sont ajoutés au mélange réactionnel à la vitesse à laquelle l'ultrafiltrat est déchargé de l'ultrafiltre.

Si l'on désire obtenir comme produit un sirop à forte teneur en fructose, on peut hydrolyser les polymères de fructose de l'invention avant ou après leur séparation du glucose présent. La séparation du glucose peut être effectuée par des méthodes connues de séparation par chromatographie ou
30 sur membrane. Les agents hydrolysants et les conditions de l'hydrolyse des polymères du fructose doivent être choisis de manière que le fructose ne soit pas détruit. La réaction peut être catalysée par un acide ou par une résine acide. A titre de variante, l'hydrolyse peut être effectuée au moyen
35 d'enzymes tels que ceux qui sont contenus dans les préparations enzymatiques d'invertase disponibles dans le commerce.

D'autres détails des formes de réalisation de l'invention ressortent des exemples suivants. Toutes les parties sont exprimées en poids et tous les pourcentages sont exprimés en poids par volume, sauf spécification contraire.

5 EXEMPLE 1

Production de l'enzyme appelé fructosyl-transférase

A. Procédé de fermentation utilisé pour produire l'enzyme

10 Le milieu utilisé pour le développement de l'inoculum et pour la fermentation en vue de produire l'enzyme est le suivant :

- 0,5 % de dihydrogénophosphate de potassium
- 0,1 % de chlorure de sodium
- 0,02 % de sulfate de magnésium heptahydraté
- 0,06 % de sulfate d'ammonium
- 15 0,3 % d'extrait de levure (Difco Labs. Inc.,
Détroit, Michigan)
- 6,0 % de saccharose (de qualité alimentaire)
- pH du milieu ajusté à 6,8.

20 On prépare un inoculum de premier stade comme indiqué ci-après : les fioles d'ensemencement, qui sont des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu stérile, sont inoculées à partir d'une culture inclinée de levure noire Pullularia pullulans. La souche particulière de la levure que l'on utilise porte la référence ATCC N° 9348

25 dans le catalogue de l'American Type Culture Collection (Rockville, Maryland). Les fioles d'ensemencement, après développement sur une secoueuse mécanique pendant 48 heures à 31°C, sont utilisées pour préparer un inoculum de second stade. On procède à cette opération en plaçant des portions

30 de 0,25 ml de l'inoculum de premier stade dans 25 ml de milieu dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml. L'inoculum de second stade est développé sur une secoueuse mécanique pendant 24 heures à 31°C. Le contenu total d'une fiole est utilisé pour inoculer un appareil de fermentation de

35 7,5 litres contenant 5 litres du milieu. Le milieu est identique à celui qui a été utilisé pour les fioles d'ensemencement, à la différence que le saccharose s'y trouve à une concentration de 12 % au lieu d'une concentration de 6 %, et qu'il est additionné de 0,04 % de polypropylène-glycol de

poids moléculaire 2000, comme agent anti-mousse. Les fermentations sont conduites à 32°C, à une vitesse d'agitation de 500 tr/min et avec passage de 4 litres d'air par minute dans le mélange. La fermentation est conduite pendant une période totale de 65 heures.

B. Séparation de l'enzyme des cellules

Le pH du bouillon de fermentation est ajusté à 5,5 par addition d'une solution de NaOH 4 N avant le passage du bouillon dans une centrifugeuse continue "Sharples" pour séparer les cellules et les débris cellulaires de la liqueur surnageante. Les cellules humides sont placées dans une fiole d'Erlenmeyer de 1 litre de capacité contenant deux volumes d'eau. Après l'addition de 1 % de toluène et d'une petite quantité de "Triton X-100" (détergent non ionique du type d'un alkylphénoxy polyéthoxyéthanol, produit de la firme Rohm & Haas Corp., Philadelphie, Pa.), la fiole est agitée par secousses pendant 1 heure sur une secoueuse mécanique pour mettre les cellules en suspension. La fiole est ensuite maintenue à la température ambiante pendant 3 jours, et elle est agitée à la main de temps en temps. Le mélange est filtré sur un filtre préalablement revêtu de terre de diatomées et le gâteau cellulaire est lavé à l'eau. Le filtrat est ensuite concentré par ultrafiltration sur un dispositif appelé "Pellican Cassette System", produit de la firme Millipore Corp., Bedford, Mass., équipé d'une cassette qui retient la matière de poids moléculaire supérieur à 10 000. Au cours de la concentration, la partie retenue est amenée à traverser une mousse réticulée avant d'être ramenée à l'appareil d'ultrafiltration. La partie retenue est lyophilisée dans un appareil de lyophilisation, broyée dans un mortier à l'aide d'un pilon, lavée à l'éthanol et de nouveau lyophilisée. La matière obtenue dans six essais similaires pèse au total 39,9 g et présente une activité enzymatique de 18 976 unités de fructosyl-transférase par gramme.

EXEMPLE 2

Préparation de glucose et d'un sirop de polymère de fructose par l'action simultanée de glucose-isomérase et de fructosyl-transférase sur le saccharose

5 On dissout 250 g de saccharose de qualité alimentaire dans 250 ml d'eau et on ajoute du chlorure de magnésium à une concentration de 0,005 M. On ajuste le pH à 6,5 et on le maintient à cette valeur par l'addition éventuelle d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N. On
10 ajoute à la solution de saccharose 7500 unités de préparation enzymatique de fructosyl-transférase, obtenue comme dans l'exemple 1, et 5000 unités de préparation enzymatique de glucose-isomérase obtenue comme décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 077 842 précité. Après que le
15 mélange a été agité à 55°C pendant 24 heures, on interrompt la réaction enzymatique en maintenant la matière au bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Le sirop résultant est ensuite analysé par chromatographie en phase liquide sous haute pression. Les résultats de deux essais différents
20 effectués en utilisant des lots différents d'enzymes sont reproduits sur le tableau I.

Une portion du sirop est diluée avec de l'eau pour former une solution à 10 % en poids/volume. On l'hydrolyse ensuite avec une invertase (Pfanstiehl
25 Laboratories, Waukegan, Illinois) en utilisant 0,1 ml d'invertase par 10 ml de solution. On recouvre la solution de quelques gouttes de toluène pour inhiber un développement microbien et on la fait incuber à 32°C pendant 48 heures. La teneur en glucides du sirop résultant déterminée par chroma-
30 tographie en phase liquide sous haute pression, est également indiquée sur le tableau I.

L'identité des fractions de glucides séparées quantitativement par l'analyse chromatographique en phase liquide sous haute pression a été déterminée de la manière
35 suivante. Les temps d'élution du fructose, du glucose et du saccharose ont été déterminés d'après les temps d'élution établis au moyen d'échantillons connus de sucres cristallins purs. L'inulobiose, l'inulotriose, le 1-kestose et le nystose ont tous été séparés des mélanges des sirops de polymères de

fructose par chromatographie préparative en phase liquide sous haute pression. Les structures des sucres ainsi isolés ont été déterminées par spectroscopie de résonance magnétique des noyaux de ^{13}C . Les temps d'élution de ces sucres ont été
 5 utilisés comme références pour leur dosage quantitatif dans des mélanges. Les positions des pics quantitatifs d'élution des représentants supérieurs de la série de l'inulobiose et du 1-kestose ont été déterminées par une technique graphique d'extrapolation.

10 ESSAI COMPARATIF 1

(Procédé de l'art antérieur)

Préparation de sirops d'un polymère du fructose et de glucose par l'action successive de la fructosyl-transférase et de la glucose-isomérase sur le saccharose

15 On prépare comme dans l'exemple 2 une solution de saccharose contenant du chlorure de magnésium 0,005 M. On ajuste le pH et on le maintient à 5,5 par l'addition éventuelle de solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N. On ajoute de la fructosyl-transférase préparée comme dans l'exemple 1 à
 20 la dose de 30 unités par gramme de saccharose et on maintient le mélange à 55°C pendant 24 heures sous agitation. La fructosyl-transférase est désactivée par chauffage du mélange au bain-marie bouillant pendant 15 minutes, puis le sirop est refroidi à 55°C et le pH est ajusté à 7,0. On ajoute
 25 ensuite à cette solution 20 unités de glucose-isomérase par gramme de saccharose et on maintient le pH à 7,0 par l'addition éventuelle d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N. Au bout de 24 heures à 55°C, on chauffe à nouveau le produit pour désactiver la glucose-isomérase et on analyse le
 30 sirop par chromatographie en phase liquide sous haute pression. L'analyse du produit est indiquée sur le tableau I. Un échantillon du sirop est traité avec la préparation enzymatique d'invertase comme indiqué dans l'exemple 2 et le sirop à forte teneur en fructose obtenu est analysé par
 35 chromatographie en phase liquide sous haute pression. Les résultats obtenus sont également reproduits sur le tableau I.

L'action synergique surprenante obtenue lorsque les deux enzymes sont utilisés ensemble ressort de ces résultats. Les sirops de polymères de fructose qui sont

produits contiennent de bien plus grandes quantités d'inulobiose (F_2), d'inulotriose (F_3) et de représentants supérieurs de la série de l'inulobiose que les sirops obtenus par les réactions enzymatiques séquentielles de l'art
5 antérieur. De plus, l'hydrolyse de ces polymères de fructose donne un sirop à forte teneur en fructose contenant un bien plus fort pourcentage en fructose que celui que l'on obtient par le premier procédé (essai comparatif 1). De plus, ces résultats sont obtenus en deux fois moins de temps que par le
10 procédé antérieur sans l'utilisation d'aucun enzyme additionnel et sans qu'il soit nécessaire d'ajuster le pH au bout de 24 heures, comme cela était nécessaire lorsqu'on utilisait des réactions enzymatiques séquentielles.

TABLEAU I

Composition de sirops préparés par réactions simultanées
et successives de fructosyl-transférase et
de glucose-isomérase avec le saccharose

5	Glucide ^{a)}	Composition, % en poids		
		Exemple 2 ^{b)}		
		Essai 1	Essai 2	Essai comparatif 1 ^{c)}
10	k ₆	2,5	3,2	4,6
	k ₅	11,9	12,9	15,1
	K ₄	18,8	19,7	20,5
	K ₃	9,7	9,7	12,6
	F ₆	1,8	1,5	0,4
15	F ₅	0,5	0,2	0,2
	S	3,0	5,8 ^{d)}	8,9 ^{d)}
	F ₄	3,0	-	-
	F ₃	4,8	3,6	0,6
	G	17,2	17,3	17,4
20	F ₂	9,3	7,6	1,1
	F	17,1	18,2	18,3
<u>Composition après hydrolyse sous l'action de l'invertase</u>				
	F	72,1	69,8	65,0
25	G	27,9	30,1	34,8

a) Les glucides sont énumérés dans leur ordre d'élution.

F = fructose ; F₂, F₃, etc. = inulobiose, inulotriose et les homologues supérieurs de la série de l'inulobiose ;

30 S = saccharose ; G = glucose ; K₃ = 1-kestose ; K₄ = nystose ; K₅, etc. = homologues supérieurs de la série du 1-kestone.

b) Utilisation simultanée de la fructosyl-transférase et de la glucose-isomérase.

35 c) Utilisation successive de la fructosyl-transférase et de la glucose-isomérase.

d) Ces valeurs englobent le saccharose et F₄.

EXEMPLE 3

Préparation de sirops de polymères de fructose par l'action simultanée de fructosyl-transférase et de quantités variables de glucose-isomérase sur le saccharose

5 On suit le mode opératoire général de l'exemple 2, en utilisant 30 unités de fructosyl-transférase par gramme de saccharose. On effectue cinq essais en utilisant, respectivement, 5, 10, 15, 20 et 30 unités de glucose-isomérase par gramme de saccharose. Des analyses des
10 sirops obtenus avant et après leur hydrolyse sous l'action de l'invertase sont reproduites sur le tableau II.

 Les résultats du tableau II montrent que le pourcentage de fructose dans le sirop à forte teneur en fructose obtenu par l'action de la fructosyl-transférase et
15 de la glucose-isomérase sur le saccharose croît avec la quantité utilisée de glucose-isomérase. Toutefois, on n'obtient que de faibles accroissements du pourcentage de fructose lorsqu'on utilise plus de 15 à 20 motifs de glucose-isomérase par gramme de saccharose. Ces essais montrent en
20 outre la facilité avec laquelle on prépare un sirop renfermant un pourcentage relativement élevé de fructose par le procédé de l'invention.

TABLEAU II

Composition de sirops préparés par la réaction simultanée
de fructosyl-transférase et de diverses quantités
de glucose-isomérase avec le saccharose

5	Glucide ^{a)}	Composition, % en poids				
		N° de l'essai ^{b)}				
		1 (5)	2 (10)	3 (15)	4 (20)	5 (30)
10	K ₆	2,9	2,7	2,6	2,5	2,8
	K ₅	12,3	12,4	12,1	11,9	12,2
	K ₄	20,2	19,6	18,7	18,8	18,7
	K ₃	11,3	9,6	9,7	9,7	9,5
	F ₆	--	1,4	1,6	1,8	1,7
	F ₅	--	0,3	0,4	0,5	0,4
15	S	6,3	3,0	2,9	3,0	2,7
	F ₄	--	2,7	3,0	3,0	3,2
	F ₃	--	4,4	4,7	4,8	5,2
	G	23,7	18,7	17,7	17,2	16,5
	F ₂	7,5	9,0	9,5	9,3	9,9
	F	14,9	15,8	16,5	17,1	16,7

Composition après hydrolyse sous l'action de l'invertase

F	67,6	70,3	71,7	72,1	73,2
G	32,3	29,7	28,3	27,9	26,7

25

a) Les symboles des glucides ont les mêmes définitions que dans l'exemple 1.

b) Les nombres placés entre parenthèses après le numéro de l'essai désignent les unités de glucose-isomérase par gramme de saccharose. Dans tous les essais, on a utilisé 30 unités de fructosyl-transférase par gramme de saccharose.

30

EXEMPLE 4

Préparation de sirops de polymères de fructose
par l'action simultanée de quantités variables de
fructosyl-transférase et de glucose-isomérase
sur le saccharose

5

On suit le mode opératoire général de l'exemple 2
en utilisant 20 unités de glucose-isomérase par gramme de
saccharose et des quantités variables de fructosyl-
transférase dans trois essais différents (respectivement 30,
10 60 et 90 unités par gramme de saccharose). Des analyses des
sirops résultants avant et après l'hydrolyse avec l'invertase
sont reproduites sur le tableau III.

Les résultats indiqués sur le tableau III
montrent qu'en faisant croître la quantité de fructosyl-
15 transférase utilisée dans le procédé de la présente
invention, on élève le pourcentage de fructose dans les
sirops à forte teneur en fructose qui sont formés. Des sirops
à forte teneur en fructose contenant plus de 75 % de ce sucre
sont faciles à obtenir par ce procédé.

TABLEAU III

Composition de sirops préparés par réaction simultanée
de quantités variables de fructosyl-transférase
et de glucose-isomérase avec le saccharose

5	Glucide ^{a)}	Composition, % en poids		
		N° de l'essai ^{b)}		
		1 (30)	2 (60)	3 (90)
10	K ₆	2,6	4,2	4,6
	K ₅	11,7	10,5	8,5
	K ₄	18,5	11,4	7,5
	K ₃	10,2	8,3	7,6
	F ₆	1,9	2,8	2,6
	F ₅	0,6	1,0	0,9
15	S	3,2	1,9	1,4
	F ₄	2,9	4,0	5,0
	F ₃	4,9	6,8	6,8
	G	14,6	16,0	17,2
	F ₂	9,3	11,2	12,2
	F	19,1	20,2	23,1
<u>Composition après l'hydrolyse sous l'effet de l'invertase</u>				
	F	73,9	77,1	78,0
	G	26,0	22,7	21,7

25 a) Les symboles des glucides ont les mêmes définitions que sur le tableau I.

b) Les nombres placés entre parenthèses après le numéro de l'essai indiquent les unités de fructosyl-transférase par gramme de saccharose. Dans tous les essais, on a utilisé
30 20 unités de glucose-isomérase par gramme de saccharose.

EXEMPLE 5

Préparation de sirops à forte teneur en fructose
par l'action simultanée de fructosyl-transférase et
de glucose-isomérase sur des mélanges de saccharose et
5 d'un sirop du commerce contenant du fructose

Une solution de 120 g de saccharose et de 60 g,
sur base sèche, d'un sirop de fructose du commerce contenant
41,2 % de fructose, 52,5 % de glucose et 6,3 % de poly-
saccharides ne renfermant pas de fructose dans 120 ml d'eau
10 est additionnée de chlorure de magnésium à une concentration
de 0,005 M. On ajuste le pH à 6,5 et on le maintient à cette
valeur par l'addition éventuelle d'une solution d'hydroxyde
de sodium 0,5 N. On ajoute ensuite à la solution ci-dessus
5400 unités de préparation enzymatique de fructosyl-
15 transférase obtenue comme dans l'exemple 1 et 3600 unités de
préparation enzymatique de glucose-isomérase obtenue comme
décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 077 842
précité. Après agitation du mélange à 55°C pendant 24 heures,
on arrête la réaction enzymatique en maintenant le mélange au
20 bain-marie bouillant pendant 10 minutes. On analyse ensuite
le sirop résultant par chromatographie en phase liquide sous
haute pression.

On répète trois fois le mode opératoire de cet
exemple en utilisant des quantités relatives différentes de
25 saccharose et de sirop contenant du fructose. Les rapports du
sirop de fructose au saccharose, sur base sèche, sont,
respectivement, égaux à 1:1, 2:1 et 3:1, dans les trois
essais suivants. Les résultats des analyses des produits sont
indiqués sur le tableau IV.

30 Les résultats indiqués sur le tableau IV
montrent que le procédé de l'invention constitue un moyen
commode de convertir un sirop de fructose du commerce en un
sirop à teneur élevée en fructose dans lequel 57 à 67 % de la
substance sèche consistent en fructose. Ces essais démontrent
35 également que la quantité de fructose contenue dans le sirop
à forte teneur en fructose préparé par ce procédé croît à
mesure que la proportion de saccharose dans le mélange
s'élève.

TABLEAU IV

Composition de sirops préparés par réaction simultanée
de fructosyl-transférase et de glucose-isomérase
avec des mélanges de saccharose et d'un sirop du commerce
contenant du fructose

5	Glucide ^{a)}	Composition, % en poids			
		N° de l'essai ^{b)}			
		1 (1:2)	2 (1:1)	3 (2:1)	4 (3:1)
10	K ₅	3,5	1,4	0,3	0,2
	K ₄	10,4	5,9	2,4	1,2
	K ₃	7,2	5,2	2,8	2,0
	F ₆	1,7	1,3	0,9	0,6
	F ₅	0,6	0,5	0,3	0,2
15	S	3,9	4,1	3,5	3,6
	F ₄	4,2	4,4	4,0	3,7
	F ₃	4,8	3,7	2,0	1,4
	G	25,4	30,4	35,5	39,7
	F ₂	11,7	12,6	11,2	9,2
20	F	26,3	30,2	36,7	38,0
<u>Composition après hydrolyse par l'invertase</u>					
	F	67,2	63,5	59,2	57,0
	G	30,8	33,7	37,2	39,2

25 a) Les symboles des glucides ont les mêmes définitions que sur le tableau I.

b) Les nombres placés entre parenthèses après le numéro de l'essai représentent les rapports du sirop de fructose au saccharose sur base sèche. Le sirop de fructose du commerce contient 41,2 % de fructose et 52,5 % de glucose, sur base sèche.

30

EXEMPLE 6

Production semi-continue de sirops de polymères de fructose

On équipe un réacteur de 3,6 litres de tubes d'arrivée et de départ de manière que le mélange réactionnel puisse être pompé continuellement dans le réacteur par l'intermédiaire d'un appareil d'ultrafiltration, le produit retenu dans l'appareil d'ultrafiltration étant recyclé au réacteur. L'appareil d'ultrafiltration utilisé est l'appareil "Pellican Cassette System" fabriqué par la firme Millipore Corp., Bedford, Mass., équipé d'une cassette qui retient la matière de poids moléculaire supérieur à 10 000. On prépare une solution de saccharose en dissolvant du saccharose dans un poids égal d'eau. On charge le réacteur avec 1 litre de la solution de saccharose, 64 800 unités de fructosyl-transférase préparée dans l'exemple 1 et 32 400 unités de glucose-isomérase. On ajuste le pH de la solution à 6,5 et on le maintient à cette valeur pendant toute la durée de la réaction par l'addition éventuelle de solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N. On agite le mélange à 55°C et on le fait circuler dans l'appareil d'ultrafiltration. On ne décharge pas de filtrat de l'appareil d'ultrafiltration pendant les quatre premières heures de réaction. On fait croître le volume du mélange réactionnel par l'addition de 250 ml de solution de saccharose toutes les 15 minutes jusqu'à ce qu'un total de 2 litres de sirop aient été ajoutés. On ajoute ensuite 600 ml de sirop de saccharose contenant encore 43 200 unités de fructosyl-transférase. Après 4 heures de réaction, le produit du réacteur est envoyé à l'appareil d'ultrafiltration. On recueille un total de 1200 ml de filtrat et on ajoute au réacteur un volume correspondant de 1200 ml de solution de saccharose. La solution de saccharose neuve contient 1 unité de glucose-isomérase et 5 unités de fructosyl-transférase par gramme de saccharose. On poursuit la réaction pendant 170 heures en déchargeant 1200 ml de filtrat toutes les 4 heures et en ajoutant de façon correspondante toutes les 4 heures 1200 ml de solution de saccharose. Après 44 heures de réaction, la quantité de glucose-isomérase neuve ajoutée au réacteur est

portée à 5 unités par gramme de solution neuve de saccharose ajoutée. Toutefois, cela ne modifie pas la composition du produit obtenu. Des échantillons de l'ultrafiltrat ont été hydrolysés par l'invertase suivant le procédé décrit dans l'exemple 2 et les sirops à forte teneur en fructose ainsi obtenus ont été analysés par chromatographie en phase liquide sous haute pression en donnant les résultats suivants :

Composition de sirop de fructose, % en poids			
	Temps (heures)	Fructose	Glucose
10	4	56,0	44,0
	8	60,9	39,1
15	12	63,6	36,4
	20	63,9	36,1
	40	64,7	35,3
	60	65,3	34,7
20	80	66,9	32,6
	100	65,8	34,2
	120	65,3	34,7
	140	65,5	34,5
	160	64,0	36,0

25

Ces résultats montrent que le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre dans une réaction semi-continue pour produire un sirop à forte teneur en fructose contenant plus de 60 % de fructose, sur base sèche.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production de polymères du fructose, de glucose et de fructose, caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre un substrat contenant du saccharose à l'action simultanée de quantités efficaces de préparations enzymatiques de fructosyl-transférase et de glucose-isomérase.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la réaction est conduite suivant un mode continu.

3. Procédé de production d'un sirop à forte teneur en fructose, caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre un substrat contenant du saccharose à l'action simultanée de quantités efficaces de préparations enzymatiques de fructosyl-transférase et de glucose-isomérase pour former des polymères de fructose, du glucose et du fructose, et à hydrolyser lesdits polymères de fructose.

4. Procédé suivant l'une des revendications 1 et 3, caractérisé en ce que la préparation enzymatique de fructosyl-transférase est dérivée de Pullularia pullulans ATCC N° 9348.

5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que la réaction est conduite à une température d'environ 50 à environ 60°C et à un pH d'environ 6,3 à environ 6,7.

6. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que le substrat contenant du saccharose est formé de saccharose et d'un sirop contenant du fructose.

7. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que sa première étape est mise en oeuvre de manière continue.

8. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que les polymères de fructose sont séparés du glucose avant leur hydrolyse.

9. Le produit obtenu par le procédé suivant la revendication 1.