

r1



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 882.769

Classif. Internat.: A23J

Mis en lecture le:

31-07-1980

Le Ministre des Affaires Économiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;

Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle;

Vu le procès-verbal dressé le 11 avril 1978 à 14 h. 08

au greffe du Gouvernement provincial de Liège;

ARRÊTE :

Article 1. — Il est délivré à la Sté dite : NOVO INDUSTRI A/S,
Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd, (Danemark),

repr. par Mr. M. Van Malderen, p/a Freylinger & Associés
S.P.R.L., 145 boulevard de la Sauvenière, Bte 031, 4000
Liège,

un brevet d'invention pour: Perfectionnements relatifs à un procédé
de production d'un produit protéique végétal purifié et
produits obtenus,
(Inv. : P. Barbesgaard, G.W. Jensen et H.A.S. Olsen)

qu'elle déclare avoir fait l'objet d'une demande de brevet
déposée au Danemark le 14 mars 1980, n° 1098/80

Article 2. — Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et
périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit
de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui
de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 30 avril 1980

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE:

Le Directeur

L. SALPETEUR

882789

Mémoire descriptif déposé à l'appui de la demande de brevet pour :
PERFECTIONNEMENTS RELATIFS A UN PROCEDE DE PRODUCTION D'UN PRODUIT
PROTEIQUE VEGETAL PURIFIE ET PRODUITS OBTENUS.

formée par

NOVO INDUSTRI A/S

à

DK-2880 Bagsvaerd, Danemark.

Faisant l'objet d'une demande de brevet déposée au Danemark le
14 mars 1980 sous le n° 1098/80 *ey*

Inventeur(s) : P. Barlesgaard, G. W. Jensen et
ey H. A. S. Olsen.

ls

Comme on peut le constater dans la littérature précitée, un concentrat de soya est un produit protéique purifié de soya contenant environ 70% de (N x 6,25) et un produit d'isolation de soya est un produit de soya davantage purifié contenant au moins environ 90% de (N x 6,25), ces pourcentages étant calculés sur la base d'une matière sèche. Pour des raisons de brièveté, (N x 6,25) sera désigné ci-après par l'expression "protéine". On obtient habituellement le produit d'isolation de soya par précipitation à l'acide comme représenté en figure 1 à laquelle on se référera également ci-après, tandis que le rendement en protéine est d'environ 60%, c'est-à-dire que 60% seulement de la protéine contenue dans les fèves de soya sont récupérés dans le produit d'isolation de soya. Des essais ont été entrepris en vue d'augmenter le rendement en produit d'isolation de soya par le procédé de précipitation à l'acide mais, jusqu'à présent, ces essais n'ont pas été couronnés de succès.

Dès lors, la production d'un produit protéique végétal purifié, en particulier, d'un produit d'isolation de soya, peut encore être améliorée en ce qui concerne le rendement, mais ce produit protéique végétal purifié, en particulier, le produit d'isolation de soya peut encore être amélioré en ce qui concerne la teneur en acides aminés sulfurés et, d'une manière générale, en ce qui concerne la teneur totale en acides aminés essentiels.

Dans le brevet belge n° 792.665 et dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.640.723, on décrit des traitements enzymatiques d'une matière à base de soya afin de provoquer la solubilisation des polysaccharides. Toutefois, aucun de ces procédés connus de solubilisation des polysaccharides dans une matière à base de soya ne donne des produits protéi-

ques finals ayant une teneur en protéine (basée sur la matière sèche) supérieure à celle du concentrat protéique de soya. Les produits obtenus par les procédés connus indiqués ci-dessus sont des protéines parfaitement appropriées pour les fourrages, mais ils n'ont aucune valeur en ce qui concerne l'application pour laquelle le produit d'isolation de soya est approprié. Aucun procédé connu pour l'élimination des polysaccharides des matières premières mentionnées ci-dessus ne comprend une décomposition enzymatique au moyen d'un produit enzymatique exempt de ou pauvre en protéinase.

La présente invention a pour objet de fournir un procédé économiquement intéressant pour la production d'un produit protéique végétal purifié ayant une haute teneur en protéine et une haute teneur totale en acides aminés essentiels, en particulier, en acides aminés sulfurés.

Suivant la présente invention, on prévoit un procédé de production d'un produit protéique végétal purifié par élimination de la rémanence (constituée principalement de polysaccharides) d'une protéine végétale dégraissée ou dégraissée et, en outre, partiellement purifiée en particules d'une granularité inférieure à environ 2,5 mm que l'on appellera ci-après "matière de départ", ce procédé consistant à traiter la matière de départ avec un produit enzymatique ayant une activité solubilisante de rémanence (ou rémanase), le rapport entre l'activité protéolytique en unités "SUN" (que l'on définira ci-après) et l'activité de rémanase mesurée en unités "SRU" (que l'on définira ci-après) étant inférieur à environ 4 dans un milieu aqueux à un pH ne s'écartant pas de plus de 1,5 unité du point isoélectrique de la partie principale de la fraction protéique de la matière de départ, ainsi qu'à une température se situant entre environ 20 et environ 60°C jusqu'à ce qu'au moins 25% de la rémanence aient été

solubilisés pour séparer ensuite, du produit surnageant, la phase solide contenant le produit protéique végétal purifié.

5 Ainsi qu'on l'exposera ci-après de manière plus détaillée, la rémanase est une enzyme qui solubilise la rémanence, laquelle est identique aux polysaccharides contenus dans le résidu mentionné à la page 38 de l'article précité de Waggle et Kolar. On se référera également à la figure 1 dans laquelle
10 la rémanence apparaît comme partie principale d'une des fractions résiduelles du procédé traditionnel de formation d'un produit d'isolation. On peut trouver une description d'une rémanase exempte de protéinase dans "Agric. Biol. Chem.", 43 (9), 1855 - 1862, 1979,
15 en se référant en particulier à la fraction D mentionnée à la page 1858. Etant donné que la rémanence est constituée de matières d'une nature chimique différente, il est préférable que le produit enzymatique mentionné ci-dessus et ayant une activité solubilisante de rémanence contienne plus d'une espèce enzymatique.
20

De façon étonnante, suivant l'invention, on peut obtenir ce produit protéique végétal purifié à l'échelle industrielle et de manière économiquement
25 intéressante au moyen d'un produit de rémanase exempt de ou pauvre en protéase. C'est ainsi que, dans le cas d'un procédé de préparation d'un produit protéique de soya purifié, suivant l'invention, on peut obtenir ce produit avec une teneur en protéine d'environ
30 90% (correspondant au produit d'isolation de soya) si bien que, en outre, le produit de soya purifié a une teneur plus élevée en acides aminés sulfurés que le produit d'isolation de soya traditionnel. Suivant l'invention, on peut obtenir un produit d'isolation
35 de soya avec un rendement de 85%.

dh

Selon l'invention, la protéine végétale dégraissée en particules d'une granularité inférieure à environ 2,5 mm comprend notamment de la farine de fèves de soya dégraissées, de la farine de semences de colza dégraissées, de la farine de semences de coton dégraissées, de la farine de semences de tournesol dégraissées et de la farine d'arachides dégraissées.

Selon l'invention, la protéine végétale dégraissée et, en outre, partiellement purifiée en particules d'une granularité inférieure à environ 2,5 mm comprend notamment les protéines végétales dégraissées mentionnées ci-dessus que l'on soumet à une purification complémentaire par extraction de composés à bas poids moléculaire afin que la protéine et les polysaccharides restent insolubles.

De préférence, la granularité des particules de la matière de départ est inférieure à 1 mm, plus avantageusement inférieure à 0,5 mm et, mieux encore, inférieure à 0,1 mm.

La rémanase utilisée dans le procédé suivant l'invention peut être obtenue au moyen de plusieurs micro-organismes produisant des enzymes pectolytiques, de préférence, les champignons, par exemple, Aspergillus niger (y compris les souches connues sous les noms A. awamori, A. foetidus, A. phoenicis, A. saitoi et A. usamii), Mucor racemosus, Rhizopus nigricans, Botrytis cinerea (Wolnak and Associates, "Present and Future Technological and Commercial Status of Enzymes", décembre 1972, "National Science Foundation", Ministère du Commerce des Etats-Unis d'Amérique) et Irpex lacteus ("Agric. Biol. Chem.", 43 (9), 1855 - 1962, 1979).

La protéinase peut être éliminée partiellement ou complètement de la rémanase utilisée suivant l'invention de diverses manières dont cer-

taines sont reprises ci-après. Un produit de rémanase déjà existant et ayant une teneur relativement élevée en protéase, par exemple, la pectinase commerciale préparée avec *Aspergillus niger*, par exemple, "PECTINEX" de "Novo Industri A/S", peut être soumis à un traitement physique ou chimique permettant d'éliminer ou d'inactiver sélectivement l'activité de protéase. Ce traitement peut être un traitement aux rayons γ comme décrit dans la publication de brevet japonais n° 1076-481, ou une séparation chromatographique. Un micro-organisme producteur de rémanase et ne formant aucune protéinase ou n'en formant que de très faibles quantités peut être utilisé pour obtenir le produit de rémanase exempt de ou pauvre en protéase. Ces souches pauvres en protéinase peuvent être obtenues par mutation d'un micro-organisme producteur de rémanase.

De préférence, le rapport entre les activités protéolytiques mesurées en unités "SUN" et en unités "SRU" est inférieur à 1, mieux encore, inférieur à 0,25.

On se référera utilement aux figures 1 à 3 annexées qui représentent :

figure 1, un tableau comparatif d'un procédé traditionnel avec produit d'isolation et d'un procédé à la rémanase;

figure 2, la courbe du pourcentage de polysaccharides solubilisés vis-à-vis du dosage de "rémanase" A/S,

figure 3, le pourcentage de polysaccharides, exprimé en fonction du temps en minutes.

Au cours du procédé suivant l'invention, le rapport entre l'activité de rémanase en unités "SRU" et la matière de départ (en grammes) doit se situer entre 15 et 500, de préférence, entre 100 et 300, mieux encore, entre 175 et 225. On se référera

à la figure 2 qui montre le pourcentage de polymaccharides solubilisés vis-à-vis du dosage de rémanase exprimé en unités "SRU"/g de flocons blancs broyés dans les conditions de réaction suivantes :

- 5 Substrat : S = 10% de flocons blancs broyés décortiqués
 pH = 4,5
 Température : 50°C
 Temps de réaction : 120 minutes
 Dosage de rémanase A/S : 0-240 unités "SRU"/g de
 10 flocons blancs.

Le rapport pondéral entre le liquide et le solide au cours du traitement enzymatique doit se situer entre 20:1 et 5:1 et il doit être, de préférence, d'environ 10:1.

- 15 Le pH régnant au cours de l'hydrolyse ne doit pas s'écarter de plus de 1,5 unité, de préférence, de plus de 1 unité et, mieux encore, de plus de 0,5 unité du point isoélectrique de la partie principale de la fraction protéique de la matière de départ. Dans la forme de réalisation de loin préférée,
 20 le pH régnant au cours de l'hydrolyse est égal ou presque égal au point isoélectrique de la partie principale de la fraction protéique de la matière de départ. A cet égard, on se référera au tableau ci-après
 25 faisant ressortir les points isoélectriques de la partie principale de la fraction protéique de certaines matières de départ que l'on peut traiter par le procédé de l'invention.

30	Soya	4,5	
	Colza	3,6	6,0
	Coton	pas de conservation : 5,5	
			conservation : 3,5
35	Tournesol	4,0	
	Arachide	4,5	

Si le pH optimum de la rémanase utilisée pour l'hydrolyse s'écarte trop (par exemple, de plus de 1,5 unité de pH) du point isoélectrique de la partie principale de la fraction protéique de la matière de départ à traiter, on peut avantageusement effectuer l'hydrolyse au pH optimum ou à peu près au pH optimum de la rémanase, après quoi on règle le pH au point isoélectrique ou à peu près au point isoélectrique de la partie principale de la fraction protéique de la matière de départ avant de séparer la phase solide du produit surnageant.

La température d'hydrolyse se situe dans l'intervalle allant de 20 à 60°C, de préférence, de 40 à 55°C et, mieux encore, cette température est d'environ 50°C.

Bien entendu, la durée de l'hydrolyse dépend de l'activité de rémanase par rapport à la quantité de rémanence. Afin d'éviter une croissance microbienne, il est souhaitable de raccourcir le plus possible le temps d'hydrolyse. Dans la pratique normale, le temps d'hydrolyse varie entre 2 et 4 heures. On se référera à la figure 3 qui indique le pourcentage de polysaccharides solubilisés en fonction du temps dans les conditions de réaction suivantes:

Substrat : 2% rémanence de soya isolée

pH = 4,5

Température : 50°C

Dosage de rémanase : 1.000 unités "SRU" par gramme de rémanence de soya isolée.

Afin d'obtenir un produit protéique végétal purifié acceptable, il convient de solubiliser au moins 25% de la rémanence. Une solubilisation à 25% de la rémanence correspond à une amélioration de la teneur en protéine (basée sur la matière sèche) allant de 68% (matière de départ) à 73% (produit protéique végétal purifié), pour autant qu'il n'y ait aucune

perte de protéine due à l'action protéolytique. On se référera au tableau ci-après qui indique des pourcentages autres que ceux indiqués ci-dessus pour le soya.

5

10

15

20

Teneur en protéine (basée sur la matière sèche) de la matière de départ (%)	Solubilisation de rémanence (%)	Teneur en protéine (basée sur la matière sèche) du produit protéique végétal purifié (%)
68	23	73
68	50	78
68	75	85
68	80	86
68	85	88
68	90	89
68	100	92

25

30

La séparation entre la phase solide contenant le produit protéique végétal purifié et le produit surnageant peut être effectuée par les procédés habituels de séparation entre les solides et les liquides, par exemple, la filtration, la centrifugation et la décantation. A des fins de production, la centrifugation est préférée et il est particulièrement préférable de procéder à plusieurs lavages et centrifugations combinés.

35

Normalement, la phase solide provenant du procédé de séparation précité est soumise à un traitement complémentaire afin d'améliorer la qualité du produit protéique végétal purifié. On se référera à la figure 1 qui indique les opérations préférées de

sh

finissage, notamment le réglage du pH, la pasteurisation et le séchage par pulvérisation.

5 On décrira ci-après le procédé de détermination de l'activité protéolytique à un pH de 4,5 et en unités "SUN" (unités d'azote protéique de soya).

Le substrat protéique de soya est la fraction de globuline isolée des fèves de soya et vendue dans le commerce sous la marque "Purina 500 E" par la firme "Ralston Purina".

10 On incube un échantillon d'enzyme avec un substrat en suspension dans les conditions indiquées ci-dessous :

Substrat : 5,56% de protéine de "Purina 500 E", pH réglé à 4,5 en utilisant du HCl 6N. Température :
15 50°C.

On effectue le dosage d'enzyme de la manière suivante :

A 90 g de substrat (maintenu sous agitation dans un bain-marie à 50°C), on ajoute 10 g d'un
20 échantillon d'enzyme dilué de façon à obtenir une courbe réactionnelle linéaire dans le laps de temps de 0 à 20 minutes. On effectue des dosages à trois concentrations d'enzyme (E g/l) et on effectue un essai témoin avec 10 ml d'eau au lieu de 10 g de
25 l'échantillon d'enzyme. Du récipient réactionnel, on prélève des échantillons ayant chacun un volume d'environ 15 ml 5, 10 et 20 minutes après l'addition de l'enzyme. Immédiatement après le prélèvement, on filtre chaque échantillon au moyen d'un filtre en
30 fibres de verre d'une dimension calculée de telle sorte que la filtration ait lieu dans la minute. Ensuite, on mesure la quantité d'azote solubilisé contenu dans le filtrat en recourant à l'analyse de Kjeldahl. Une unité "SUN" est définie par l'activité
35 protéolytique qui, par le procédé ci-dessus, libère 1 μ mole d'azote par minute (mesure effectuée dans le

Température 50°C.

On effectue le dosage d'enzyme de la manière suivante :

5 A 5,5 ml d'un substrat maintenu dans un bain agité à 50°C, on ajoute 2 ml d'un échantillon d'enzyme (dilué de façon à obtenir une courbe réactionnelle linéaire dans le temps de réaction de 5 à 20 minutes). On effectue des dosages à trois concentrations d'enzyme E g/l. Pour chacune des trois valeurs de E, on effectue deux essais ; dans le premier
10 essai, on arrête la réaction après une durée de 5 minutes tandis que, dans le deuxième essai, on arrête la réaction après 20 minutes en ajoutant 3 ml d'un réactif constitué de 2 parties d'éthanol à 96% et de
15 1 partie de NaOH 0,5N.

Ensuite, on filtre les échantillons et on mesure la quantité d'équivalents de galactose en adoptant le procédé au tryptophane/acide sulfurique pour la détermination de la teneur totale en sucre
20 (Zacharias Dische, "Methods of Biochemical Analysis", volume 2, page 313). Une unité de rémanase de soya (SRU) est définie par l'activité de rémanase qui, par le procédé ci-dessus, libère 1 μ mole d'équivalent de galactose par minute (mesure effectuée dans le temps
25 de réaction de 5 à 20 minutes).

Il apparaît que la relation SRU-E n'est pas linéaire. Toutefois, un diagramme de $\frac{E}{SRU}$ vis-à-vis de E donne une fonction linéaire. Sur la base de cette fonction, on calcule la valeur E (E_2) correspondant à la valeur, en unités "SRU", de 2 μ moles de galactose/minute. L'activité de rémanase ainsi choisie est de $\frac{2 \times 1000}{E_2 \times 2}$ unités "SRU"/g d'enzyme, tandis que la valeur correspondante pour l'activité en unités "SRU" est la valeur à laquelle il est fait référence
35 dans la revendication ci-après.

On a trouvé qu'en plus de la lignine, la rémanence des semences riches en protéines était constituée principalement des polysaccharides suivants:

5 1) Polysaccharides pectiques constitués principalement d'acide D-galacturonique, de D-galactose, de L-arabinose, de D-xylose, de L-fructose et de L-rhamnose.

2) Héli-celluloses.

3) Cellulose.

10 4) Amidon.

Dès lors, chaque produit enzymatique de rémanase est caractérisé par les propriétés suivantes:

- 15 - activité protéolytique en unités "SUN"/g d'enzyme
- activité de rémanase en unités "SRU"/g d'enzyme
- rapport entre l'activité protéolytique et l'activité de rémanase en unités "SUN"/"SRU".

De même, il est à noter que le procédé suivant l'invention ne nécessite pas la dissolution et la reprecipitation de la protéine de soya que l'on effectue au cours du procédé classique a v e c un produit d'isolation de soya. Ceci apparaît également en figure 1 qui est un schéma reprenant les différentes étapes du procédé traditionnel a v e c un produit d'isolation, ainsi que les étapes du procédé de l'invention (appelé "procédé à la rémanase").

25 Au cours de l'extraction du procédé traditionnel a v e c un produit d'isolation, la protéine est transférée dans le produit surnageant tandis que, dans le procédé à la rémanase, la protéine reste dans la phase solide (à l'exception des "protéines de petit lait"). De même, en se référant à la figure 1, on peut noter que la rémanence est le composant polysaccharide de la fraction solide séparée par la centrifugation reprise dans la deuxième case du procédé traditionnel a v e c un produit d'isolation.

35

On peut également utiliser le produit enzymatique suivant l'invention pour la production d'un concentrat de soya. On obtient normalement un concentrat de soya en lavant de la farine de soya dégraissée à un pH de 4 à 4,5 lorsque la majeure partie des protéines restent insolubles avec les fibres et les polysaccharides insolubles. Si l'enzyme suivant l'invention est ajoutée au cours du procédé de lavage, on obtient une teneur en protéine (calculée sur la matière sèche) nettement supérieure à 70% et se situant habituellement dans l'intervalle de 75 à 85% contre une teneur en protéine (calculée sur la matière sèche) d'environ 70% dans le procédé traditionnel avec un concentrat de soya. De façon étonnante, on a trouvé que les propriétés fonctionnelles du concentrat de soya obtenu par le produit enzymatique suivant l'invention (en particulier, les propriétés de gélification, d'émulsification et de formation de mousse) étaient supérieures à celles du concentrat de soya classique.

Les essais 1 et 2 ci-après illustrent un procédé de production d'une rémanase que l'on peut utiliser dans le procédé de l'invention, tandis que les exemples 1 à 7 ci-après illustrent le procédé de l'invention.

Essai 1

On prépare la rémanase par fermentation submergée d'une souche appartenant au genre *Aspergillus niger*.

On cultive la souche pendant 6 jours à 26°C sur une culture inclinée d'agar-agar de Czapek-Dox.

On prépare un ballon de Fernbach avec un substrat d'agar-agar de la composition suivante :

02109

	Peptone "Difco"	6 g
	Aminoline "Ortana"	4 g
	Glucose	1 g
	Extrait de levure "Difco"	3 g
5	Extrait de viande "Difco"	1,5 g
	KH_2PO_4 "Merck"	20 g
	Extrait de malt "Evers"	20 g
	H_2O d'échange d'ions, pour compléter à 1.000 ml.	

10 On règle le pH à une valeur comprise entre 5,30 et 5,35. Ensuite, on ajoute 40 g d'agar-agar "Difco" et on effectue la stérilisation en autoclave. On transfère ensuite des spores de l'agar-agar de "Czapek-Dox" dans le ballon de Fernbach où l'on effectue l'incubation pendant 6 jours à 26°C.

15 On prépare une charge du substrat dans une cuve d'inoculation contenant 300 litres d'un substrat nutritif de la composition suivante :

	Liqueur de macération du maïs "Rofec"	24 g/l
	Glucose	24 g/l
20	CaCO_3	5 g/l
	Huile de soya	5 g/l.

25 On règle le pH à 5,5 avant l'addition de CaCO_3 . On effectue la stérilisation pendant 30 minutes à 121°C. Ensuite, on transfère tout le contenu du ballon de Fernbach dans la cuve d'incubation. Au cours de la culture effectuée dans la cuve d'inoculation à 26°C, le rapport d'aération est de 1 litre normal par litre de bouillon de culture et par minute, tandis que l'agitation est effectuée à une vitesse périphérique de 4 m/seconde. La pression est de 0,5 atmosphère.

30 On prépare deux charges de substrat dans deux cuves principales de fermentation avec un volume de départ de 300 litres de substrat nutritif, la composition du substrat étant la suivante :

35

50 g de farine de soya/1
25 g d'acide lactique/1.

On règle le pH à 6,5 avant la stérilisation que l'on effectue pendant 45 minutes à 121°C.

- 5 Après 28 heures de croissance dans la cuve d'inoculation, on transfère deux fois 30 litres du contenu de cette cuve dans les deux cuves principales de fermentation mentionnées ci-dessus. Au cours de la fermentation effectuée dans les deux cuves principales, le
- 10 rapport d'aération est de 1 litre normal par litre de bouillon de culture et par minute, tandis que l'agitation est effectuée à une vitesse périphérique de 5 m/seconde. La pression est de 0,5 atmosphère. Au cours
- 15 de la fermentation, on ajoute régulièrement une quantité de pectine correspondant à 1% du volume de fermentation (poids/volume).

- Après fermentation pendant 106 heures, on récupère les enzymes du bouillon de culture. Des deux
- 20 cuves principales de fermentation mentionnées ci-dessus, on obtient un total de 700 litres d'un bouillon de fermentation. On filtre ce bouillon de fermentation sur un filtre à tambour sous vide comportant un revêtement préalable de terre d'infusoires "Colite 512"). On effectue cette filtration à tambour avec
- 25 pulvérisation d'eau pour assurer le déplacement. On obtient ainsi 750 litres d'un filtrat clair. Par ultrafiltration dans un appareil prévu à cet effet et pourvu d'une membrane de type "DDS-600", on obtient
- 30 30 l de concentrat (produit de rétention). On soumet le concentrat à une filtration de germes sur un filtre-pressé "Seitz" pourvu de plaques "EKS" afin d'obtenir
- 20 litres d'un filtrat de germes. On soumet ce filtrat à une lyophilisation dans un appareil de "Stokes" à 20°C et l'on obtient ainsi une poudre brune d'une
- 35 activité de rémanase de 2.300 unités "SRU"/g et présentant un rapport d'unités "SUN"/"SRU" de 0,48.



Essai 2

On dissout 100 g du produit lyophilisé de l'essai 1 dans 1.000 ml d'un tampon d'acétate de sodium 0,05M (pH : 4,7). Ensuite, on agite cette solution pendant 1 heure avec 300 g d'un échangeur d'anions (diéthyl-cellulose). Ensuite, on effectue une élution discontinue en utilisant respectivement 700 ml de NaCl 0,15M dans le tampon d'acétate ci-dessus et 700 ml de NaCl 0,30M également dans le tampon d'acétate ci-dessus. On soumet ensuite les filtrats à une ultrafiltration, à une diafiltration et à une lyophilisation. On analyse ensuite les deux fractions de rémanase concernant leur activité en unités "SRU" par gramme et leur rapport d'unités "SUN"/"SRU". On obtient les résultats suivants :

Fraction correspondant au	Unités "SRU"/g	Rapport d'unités "SUN"/"SRU"
Filtrat de NaCl 0,15M (A)	1.631	0,25
Filtrat de NaCl 0,30M (B)	1.192	0,17

Exemple 1

Cet exemple décrit la production, en laboratoire, d'un produit protéique végétal purifié à partir de flocons blancs de soya décortiqués et dégraissés que l'on broie ensuite pour obtenir une farine de soya contenant 92,4% de matière sèche. La granularité moyenne des particules (base pondérale) de la farine de soya est de 45 μ m. On met 433 g de la farine de soya en suspension dans 3.367 g d'eau tout en maintenant une agitation à 50°C, puis on règle le pH à 4,5 au moyen de 34 ml de HCl 4N. On ajoute 200 g d'une solution contenant 35,3 g de rémanase provenant de l'essai 1. Le dosage de rémanase

est de 188 unités "SRU"/g de farine de soya. Ensuite, on agite le mélange pendant 240 minutes à 50°C. On soumet alors le mélange à une centrifugation dans une centrifugeuse de laboratoire (modèle "Beckman J-6B") pendant 15 minutes à 3.000 x g. On pèse le produit surnageant, on le soumet à une analyse de Kjeldahl pour en déterminer la teneur en azote, la teneur totale en carbohydrates (procédé mentionné ci-dessus à propos de la détermination de l'activité de rémanase) et de la teneur en matière sèche. Ensuite, on lave la phase solide avec un volume d'eau équivalent au volume du produit surnageant obtenu à la suite de la première centrifugation. On effectue deux fois cette opération. A la phase solide soumise trois fois à une extraction et à une centrifugation, on ajoute ensuite 1.500 g d'eau et, après remise en suspension, on ajoute 19 ml de NaOH 4N pour assurer la neutralisation. On soumet ensuite la bouillie neutralisée à une pasteurisation à 90°C avec un temps de séjour de 10 secondes, puis on la lyophilise. Les résultats obtenus sont repris dans le tableau 1.1 et, sur la base de ces résultats, on effectue les calculs suivants :

Rendement en protéine du produit protéique végétal purifié

Rendement en protéine basé sur le produit protéique végétal purifié final : 66,4%

Rendement en protéine du produit protéique végétal purifié, sur la base de la teneur en protéine des produits de centrifugation :

70,6%

Rendement moyen en protéine :

68,5%

Carbohydrates

Teneur totale en carbohydrates de la
farine de soya :

143,8 g

Quantité totale de carbohydrates contenus
dans les produits de centrifugation :

120,5 g

Pourcentage de carbohydrates solubilisés :

83,8%

Produit protéique végétal purifié (composition)

Pourcentage de matière sèche de la protéine :

83,2%

Tableau 1.1 - Résultats obtenus à l'exemple 1.

Fractions	Protéine (N x 6,25)		Quantité totale de carbohy- drates			Matière sèche	
	Identifi- cation	Masse (g)	%	Masse (g)	%	Masse (g)	%
Farine de soya	433	53,3	230,79	33,2*	143,8*	92,4	400,0
Enzyme	35,3	54,8	19,33	44,5	15,71	96,0	33,9
Produit de centrifuga- tion n° 1	3338	2,30	76,77	3,54	118,17	5,12	170,91
Produit de centrifuga- tion n° 2	3158	0,22	6,95	0,51	16,11	0,70	22,11
Produit de centrifuga- tion n° 3	3154	0,07	2,21	0,06	1,89	0,08	2,52
Produit pro- téique végé- tal purifié	192	79,82	153,25	-	-	96,0	184,32

* Chiffres basés sur l'hydrolyse complète.

Exemple 2

On met 86,6 g de farine de soya en suspension dans 663,4 g d'eau tout en agitant, puis on règle le pH à 4,5 au moyen de 9 g de HCl 6N. On maintient la température à 50°C en utilisant un bain-marie. On dissout 10,5 g du produit de rémanase A de l'essai 2 dans 39,5 g d'eau, puis on ajoute la solution ainsi obtenue à une suspension agitée de farine de soya, ce qui correspond à un dosage de rémanase de 198 unités "SRU"/g de farine de soya. On agite la suspension pendant 120 minutes. Ensuite, on soumet la suspension à une centrifugation dans une centrifugeuse de laboratoire (modèle "Beckman J-6B") pendant 15 minutes à 3.000 x g. On pèse le produit surnageant, on le soumet à une analyse de Kjeldahl pour en déterminer la teneur en azote et en matière sèche, puis on l'élimine. On lave la phase solide avec 660 ml d'eau, puis on traite et analyse le produit surnageant comme décrit ci-dessus. On répète une fois encore cette opération. Ensuite, on recueille la phase solide obtenue et on la soumet à une lyophilisation. On obtient 46 g d'un produit sec. On analyse ce produit pour en déterminer la teneur en protéine et la teneur en matière sèche ; on détermine la composition suivante :

83,7% de (N x 6,25) (85,3% sur base sèche)
98,1% de matière sèche.

Le tableau 2.1 ci-après donne le rendement en protéine.

Masse de protéine dans les produits

de centrifugation :

11,90 g

- masse de protéine provenant de l'enzyme :

5,22 g

5

Masse de protéine retirée de la farine de soya: 6,68 g

Pourcentage de protéine solubilisée

provenant de la farine de soya = $\frac{6,68 \times 100}{45,29} \% = 14,75\%$

10

Dès lors, le rendement en protéine est de $100 - 14,75 =$
85,25%

Afin de déterminer le pourcentage de polysaccharides solubilisés, on effectue un essai témoin sans addition d'enzyme, mais en procédant, pour le reste, exactement comme décrit ci-dessus.

15

Sur la base des teneurs en matières sèches des produits de centrifugation, des rapports des matières sèches de la protéine et de la teneur en sel du produit protéique végétal purifié, on peut évaluer la proportion de polysaccharides solubilisés par l'enzyme après correction pour la matière enzymatique, de même que la solubilité de la matière sèche de la matière première non traitée (pH = 4,5). Cette évaluation est indiquée dans le tableau 2.2.

20

25

Tableau 2.2

	Témoin	Traitement par une enzyme
5		
10	Suspension avant centrifugation à un pH de 4,5 * base sèche	10 g de farine de soya*/100 g de suspension + 1,30 g de réma- nase/100 g de suspension
15	Teneur en matière sèche du produit de centrifugation I	3,56% 6,03% (y compris 1,3% d'enzyme de ré- manase)
20	Matière sèche so- lubilisée prove- nant de la farine de soya	35,6% 47,3%
25	Matière sèche in- soluble (à un pH de 4,5)	64,4% 52,7%
30	Pourcentage de matière sèche du produit protéique végétal purifié Sels = 1,3 x cen- dres	70,8 3,9 85,3 3,6

Tableau 2.2. (suite)

	Témoin	Traitement par une enzyme
5 Polysaccharides avant centrifugation	$64,4(1 - \frac{70,8}{100}) - 3,9 = 14,90$	$52,7(1 - \frac{85,3}{100}) - 3,6 = 4,15$
10 Pourcentage de polysaccharides solubilisés	0	$\frac{(14,90 - 4,15) \times 100}{14,90} = 72,1\%$

15 Exemple 3

On effectue cet exemple afin de comparer les rendements en protéine et la qualité nutritive des produits protéiques de soya obtenus par les trois procédés suivants :

- 20 A : Précipitation isoélectrique traditionnelle.
 B : Lavage à l'acide pour la production d'un concentrat protéique de soya.
 C : Procédé à la rémanase pour la production d'un produit protéique végétal purifié.

25

A :

A un pH de 8, on extrait 108,2 g de farine de soya au moyen de 900 g d'eau. On agite la bouillie pendant 30 minutes à la température ambiante, puis on la soumet à une centrifugation à 3.000 x g pendant 30 minutes dans une centrifugeuse de laboratoire (modèle "Beckman J-6B"). On pèse le produit de centrifugation (I) et on le soumet à l'analyse de Kjeldahl pour en déterminer la teneur en azote et en matière sèche. Ensuite, par précipitation à l'acide, on sépare la protéine du produit de centrifugation I à un pH de 4,5 au moyen de 6,8 ml de HCl

35

6N. Après agitation pendant 15 minutes, on récupère la protéine par centrifugation à 3.000 x g pendant 30 minutes. On pèse le produit de centrifugation (II) et on le soumet à l'analyse de Kjeldahl pour en déterminer la teneur en azote et en matière sèche. On lave la phase solide avec de l'eau en une quantité correspondant à celle du produit de centrifugation II. Après avoir répété la centrifugation, on neutralise la phase solide et on la soumet à une lyophilisation. Le tableau 3.1 donne le bilan de masse obtenu.

B :

On extrait 108,2 g de farine de soya à un pH de 4,5 au moyen de 900 g d'eau. On agite la bouillie pendant 120 minutes à 50°C, puis on la soumet à une centrifugation à 3.000 x g pendant 15 minutes. On pèse le produit de centrifugation (I) et on le soumet à l'analyse de Kjeldahl pour en déterminer la teneur en azote et en matière sèche. On lave la phase solide (produit protéique végétal purifié) avec de l'eau en une quantité correspondant à celle du produit de centrifugation I. Ensuite, on neutralise le produit protéique végétal purifié lavé et on le soumet à une lyophilisation. Le tableau 3.1 donne le bilan de masse obtenu.

C :

On extrait 108,2 g de farine de soya à 50°C et à un pH de 4,5 au moyen de 850 g d'eau à laquelle on a ajouté 50 g de solution de rémanase contenant 9,8 g de rémanase A provenant de l'essai 2, ainsi que 3,4 g de rémanase B provenant également de cet essai 2. De la sorte, on utilise un dosage total de rémanase de 185 unités "SRU"/g de farine de soya. Après un temps de réaction de 120 minutes avec agitation à 50°C, on soumet le mélange à une centrifugation pendant 15 minutes à 3.000 x g. On pèse le produit de centrifugation (I) et on le soumet à l'analyse de

5. Kjeldahl pour en déterminer la teneur en azote et en matière sèche. On lave la phase solide (produit protéique végétal purifié) avec de l'eau en une quantité équivalant à celle du produit de centrifugation I. Ensuite, on neutralise le produit protéique végétal purifié lavé et on le soumet à une lyophilisation. Le tableau 3.1 donne le bilan de masse obtenu.

10 On détermine les compositions en acides aminés des trois produits protéiques (voir tableau 3.2). On calcule la teneur totale en acides aminés essentiels, de même que l'indice d'acides aminés essentiels. Cet indice d'acides aminés essentiels
15 dans "Protein and Amino Acid Nutrition", pages 281-295, Ed. A.A. Albanese, "Academic Press", New York, (1959).

64

0203

Tableau 3.1 - Mesures du bilan de masse au cours des procédés A, B et C

Pro- cédé	Fractions	Masse de frac- tion (g)	Protéine (N x 6,25)		Matière sèche		Rendement en protéine (%)
			%	Masse (g)	%	Masse (g)	
A	Farine de soya	108	53,3	57,56	92,4	100,00	100
	Produit de centrifuga- tion I	770	3,98	30,65	6,46	49,74	53,3
	Produit de centrifuga- tion II	710	0,58	4,12	3,35	23,79	7,16
	Produit de centrifuga- tion III	710	0,05	0,36	0,13	0,92	0,63
	Produit d'i- solation de soya	27	95,97	25,91	99,18	26,78	45,0
B	Farine de soya	108	53,3	57,56	92,4	100,00	100
	Produit de centrifuga- tion I	701	0,77	5,42	3,56	24,96	9,4
	Produit de centrifuga- tion II	710	0,08	0,57	0,40	2,84	1,0
	Concentrat de soya	75	68,44	51,33	96,65	72,49	89,2

TABLEAU 3.1 (suite)

Pro-cédé	Fractions	Masse de frac-tion (g)	Protéine (N x 6,25)		Matière sèche		Rendement en protéine (%)
			%	Masse (g)	%	Masse (g)	
C	Farine de soya	108	53,3	57,56	92,4	100,00	100
	Produit de centrifuga-tion I	765	1,39	10,67	5,52	42,23	12,01 *
	Produit de centrifuga-tion II	720	0,15	1,08	0,60	4,32	
	Produit de centrifuga-tion III	720	0,02	0,14	0,07	0,50	
	Produit pro-téique végé-tal purifié	60	82,69	49,61	96,86	58,12	86,2

* Soustraction de la protéine provenant de l'enzyme.

03709

TABLEAU 3.2 - Composition en acides aminés des procédés A, B et C.

5	Acides aminés	A. Produit d'isolation protéique de soya		B. Concentrat protéique de soya		C. Produit protéique végétal purifié	
		g/16 g N	aas ¹⁾	g/16 g N	aas ¹⁾	g/16 g N	aas ¹⁾
10	Non essentiels						
	Acide aspartique	12,3	-	11,9	-	12,3	-
	Sérine	4,91	-	4,81	-	5,04	-
	Acide glutamique	24,1	-	21,2	-	20,8	-
15	Proline	6,59	-	6,03	-	5,97	-
	Glycine	3,90	-	4,12	-	4,31	-
	Alanine	3,89	-	4,31	-	4,49	-
	Histidine	2,46	-	2,86	-	2,60	-
	Arginine	7,99	-	7,83	-	7,62	-
20	Essentiels						
	Isoleucine	4,93	>100	4,95	>100	5,09	>100
	Leucine	7,71	>100	6,30	>100	8,25	>100
	Lysine	5,21	>100	6,30	>100	6,10	>100
	Phénylalanine	5,23	>100	5,22	>100	5,36	>100
25	Tyrosine	3,28		3,52		3,95	
	Cystine	1,08		1,12		1,14	
			50,0		56,2		57,6
	Méthionine	1,02		1,24		1,28	
30	Thréonine	3,05	>100	3,43	>100	3,65	>100
	Tryptophane	1,0	72,0	1,3	92,9	1,3	92,9
	Valine	4,52	>100	5,10	>100	5,35	>100
35	Teneur totale en acides aminés essentiels (%)	37,0		40,3		41,5	
	Indice d'acides aminés essentiels	88,0		92,2		92,5	

- 1) sas = résultat en acides aminés basé sur le modèle de référence de la "Food and Agricultural Organisation".

Exemple 4

5 Le concentrat de protéine de soya ("Procon 2000" de "Staley Ltd.") est un produit protéique végétal soumis à une purification partielle complémentaire. A 60,6 g de ce produit, on ajoute 689 g d'eau et on règle le pH à 4,5 au moyen de HCl 6N. On porte la température à 50°C et on agite le mélange au moyen d'un agitateur à palette en U tournant à une vitesse de 200 tours/minute. On ajoute 0,8 g de la rémanase de l'essai 1, solubilisée dans 50 g d'eau, soit un dosage de rémanase de 30 unités "SRU"/g de concentrat de protéine de soya, puis on effectue le traitement enzymatique pendant 4 heures. On soumet ensuite le mélange à une centrifugation pendant 15 minutes à 3.000 x g. On lave une fois le produit de centrifugation, on le neutralise et on le soumet à une lyophilisation. Le tableau 4.1 donne la composition du concentrat initial de protéine de soya, ainsi que celle du produit protéique végétal purifié obtenu par ce procédé. On constate que la quantité de polysaccharides solubilisés par suite du traitement enzymatique est de 37% lorsqu'on effectue le calcul par le procédé décrit à l'exemple 2.

TABLEAU 4.1 - Composition du concentrat de protéine de soya et du concentrat de protéine de soya traité à la rémanase.

Composant	Concentrat de protéine de soya	Traitement à la rémanase (produit protéique végétal purifié)
Matière sèche (%)	92,43	90,75
Protéine (N x 6,25) %	63,87	72,25

Exemple 6

5 A 91,8 g de semences de coton dégrais-
sées, on ajoute 658 g d'eau et on règle le pH à 4,5
avec 5,5 ml de HCl 6N. On règle la température du
mélange à 50° C au moyen d'un thermostat. On solu-
bilise 0,8 g de la préparation de rémanase prove-
nant de l'essai n° 1 dans 50 g d'eau et on ajoute
la solution ainsi obtenue au mélange dont la tempé-
rature est réglée par un thermostat, pour obtenir
10 un dosage de rémanase de 20 unités "SRU"/g de semen-
ces de coton dégraissées. Après 4 heures, on soumet
le mélange à une centrifugation pendant 15 minutes
à 3.000 x g. On soumet le produit surnageant à l'ana-
lyse de Kjeldahl pour en déterminer la teneur en
15 azote et la teneur totale en carbohydrates.

On effectue un essai analogue à celui
décrit ci-dessus sans la rémanase.

Les résultats obtenus sont repris dans
le tableau 6.1.

20 **TABEAU 6.1**

25		Semences de coton; pas de traitement par une enzyme	Semences de coton ; trai- tement par une enzyme
	Azote solubilisé (%)	7	13
30	Carbohydrates so- lubilisés (%)	44,3	68

Exemple 7

35 On met 86,3 g de semences de colza par-
tiellement décortiquées, broyées et dégraissées en
suspension dans 664 g d'eau. On règle le pH et la

température respectivement à 3,6 et 50°C, puis on agite vigoureusement la suspension. On solubilise 0,8 g de la rémanase provenant de l'essai n° 1 dans 50 g d'eau et on ajoute la solution ainsi obtenue à la solution agitée, pour obtenir un dosage de rémanase de 21 unités "SRU"/g de semences de colza partiellement décortiquées, broyées et dégraissées. Après un temps de réaction de 4 heures, on soumet le mélange à une centrifugation pendant 15 minutes à 3.000 x g. On soumet le produit surnageant à l'analyse de Kjeldahl pour en déterminer la teneur en azote et la teneur totale en carbohydrates en adoptant le procédé décrit à l'exemple 1.

On effectue un essai analogue à celui décrit ci-dessus mais sans addition d'enzyme.

D'après les résultats obtenus, on calcule la quantité d'azote solubilisé, ainsi que la quantité de carbohydrates solubilisés. Les résultats obtenus sont repris dans le tableau 7.1.

On lave deux fois les produits finals et on les soumet à une lyophilisation. Le tableau 7.2 donne une comparaison des produits. Les faibles rendements en protéine obtenus dans l'essai témoin et dans le produit protéique végétal purifié traité par une enzyme sont dus au fait que la protéine de semences de colza a deux points isoélectriques, tandis que la séparation n'est effectuée qu'au bas point isoélectrique (pH : 3,5), mais également à la très faible teneur en composés azotés à bas poids moléculaire qui sont solubles aux points isoélectriques.

TABEAU 7.1 - Résultats basés sur les produits de centrifugation.

5		Farine de se- mences de colza non traitée par une enzyme, mais extraite à un pH de 3,6	Farine de se- mences de colza traitée par une enzyme et ex- traite à un pH de 3,6
10	Azote solu- bilisé (%)	47,5	74,5
15	Carbohydrates solubilisés (%)	57,0	93,3

**TABEAU 7.2 - Composition de la matière première et des produits protéiques végétaux pu-
rifiés.**

20		Farine de semences de colza dé- graissées	Produit protéique végétal purifié témoin (traite- ment à un pH de 3,6)	Produit protéique végétal purifié traité par une enzyme (traitement à un pH de 3,6)
25				
30	% de (N x 6,25)	48,3	49,0	55,8
	Carbohy- drates (%)	30,0	28,0	19,0
	Matière sèche (%)	92,7	99,8	95,8

REVENDECATIONS

1, Procédé de production d'un produit protéique végétal purifié par élimination de la rémanence (constituée principalement de polysaccharides) d'une protéine végétale dégraissée ou dégraissée et soumise à une purification partielle complémentaire en particules d'une granularité inférieure à environ 2,5 mm (appelée ci-après : "matière de départ"), caractérisé en ce qu'il consiste à traiter la matière de départ avec un produit enzymatique ayant une activité solubilisante de rémanence (ou rémanase), le rapport entre l'activité protéolytique en unités "SUN" (unités d'azote protéique de soya) et l'activité de rémanase mesurée en unités "SRU" (unités de rémanase de soya) étant inférieur à environ 4, dans un milieu aqueux, à un pH ne s'écartant pas de plus de 1,5 unité du point isoélectrique de la partie principale de la fraction protéique de la matière de départ, ainsi qu'à une température comprise entre environ 20 et environ 60°C jusqu'à ce qu'au moins 25% de la rémanence aient été solubilisés, pour séparer ensuite, du produit surnageant, la phase solide contenant le produit protéique végétal purifié.

2, Produits obtenus par le procédé de la revendication 1.

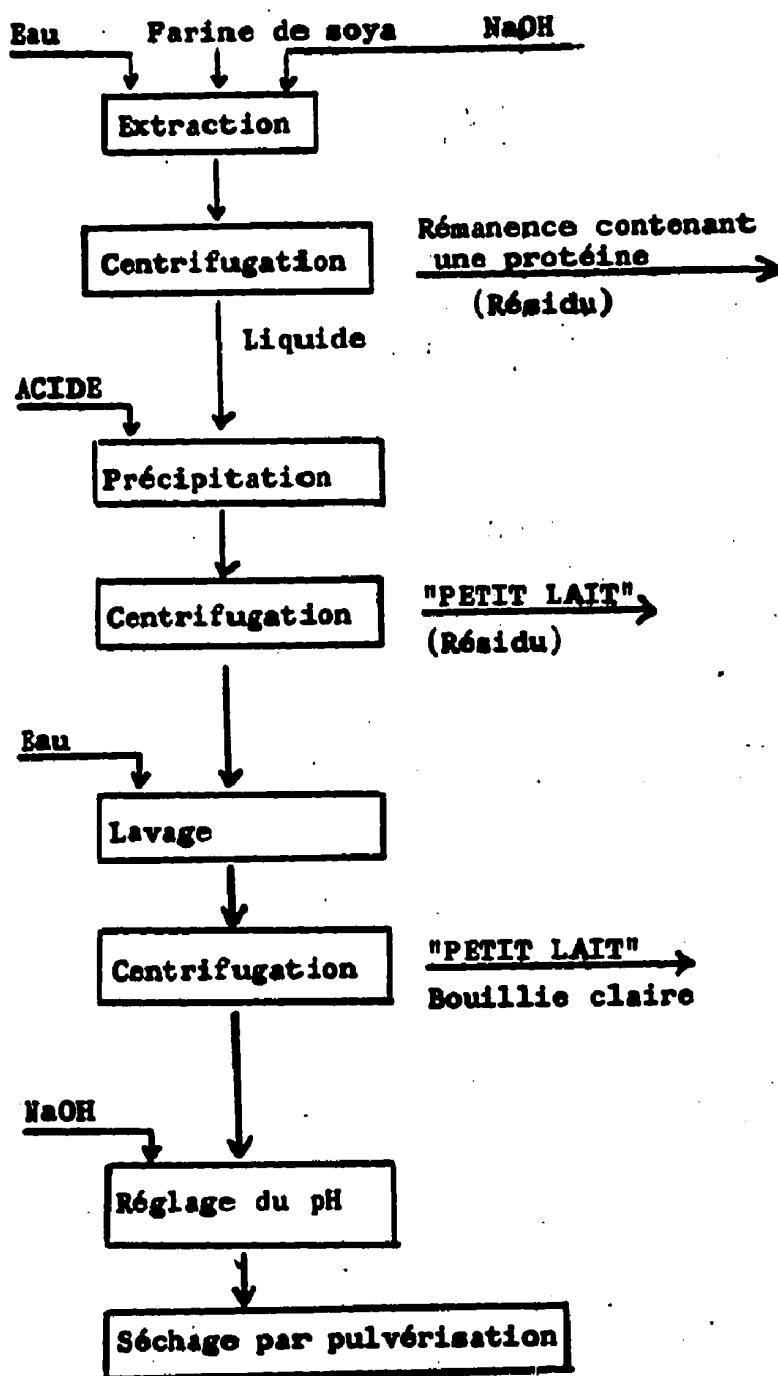
Liège, le 11 avril 1980

Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S

Michel VAN MALDEREN
GRETLINGER & ASSOCIES
Poon



**PROCEDE TRADITIONNEL
AVEC PRODUIT D'ISOLATION**



PROCEDE A LA REMANENCE

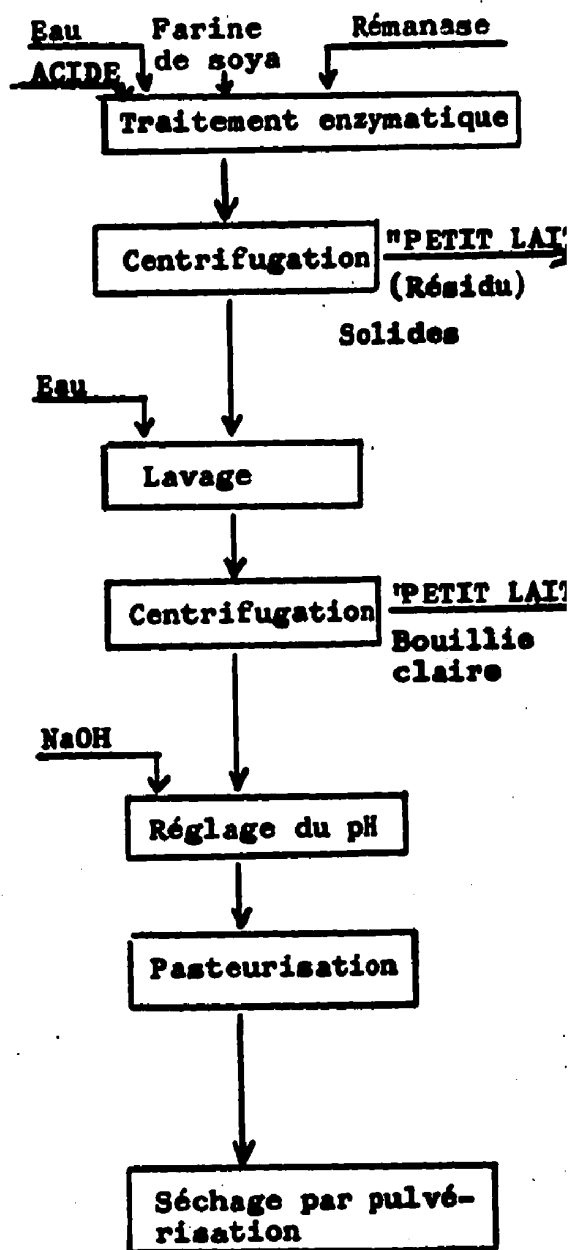


Figure 1

Liège, le 11 avril 1980

Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S

Michel VAN MALDEREN
(FREVINGER & ASSOCIES)
Ppen

J. de

882789

POLYSACCHARIDES SOLUBILISES (%)

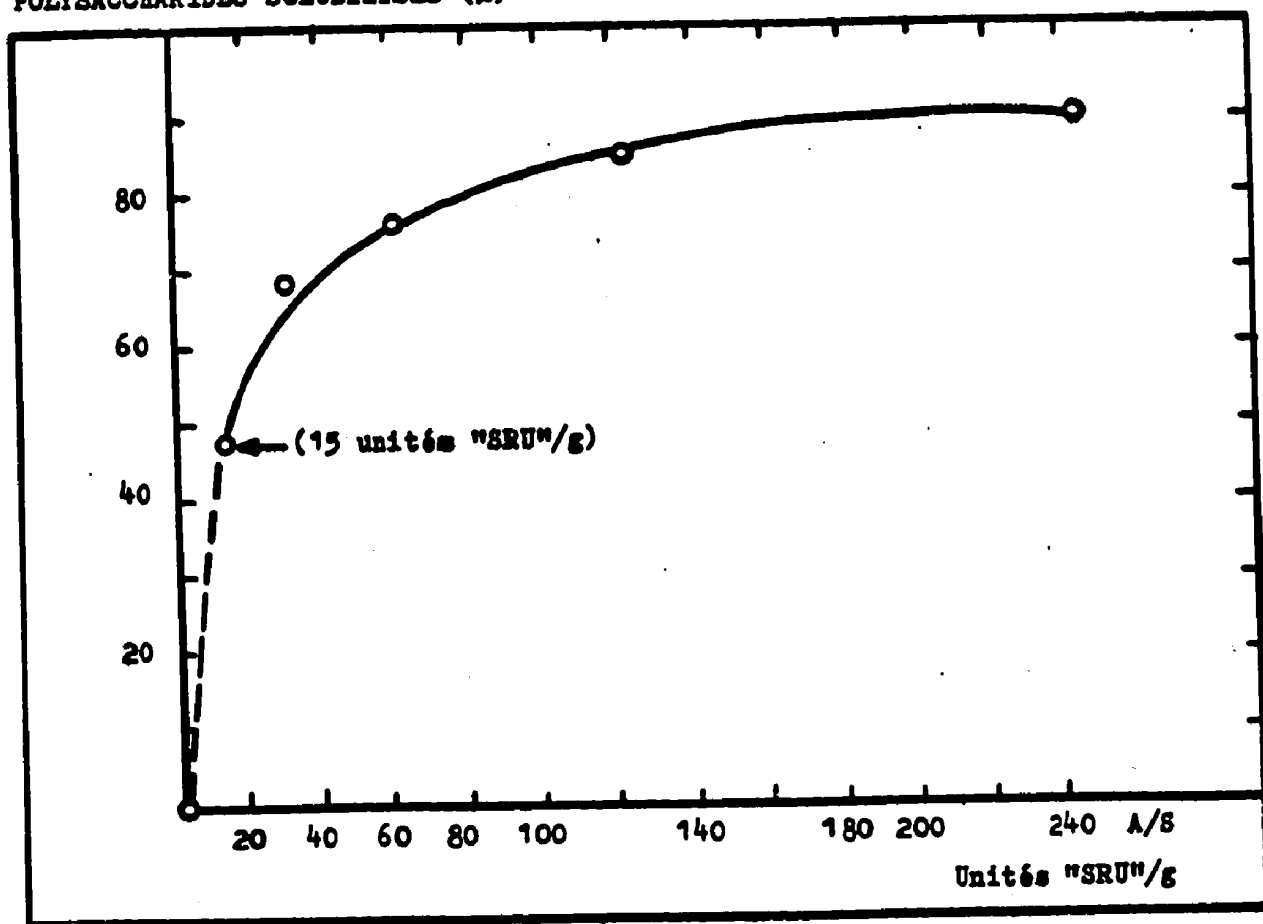


Figure 2

Liège, le 11 avril 1980

Par Pr.: NOVO INDUSTRIE A/S

Michel VAN MALDEREN
(FREYLINGER & ASSOCIÉS)
Pdon

[Signature]

82789

Polysaccharides solubilisés (%)

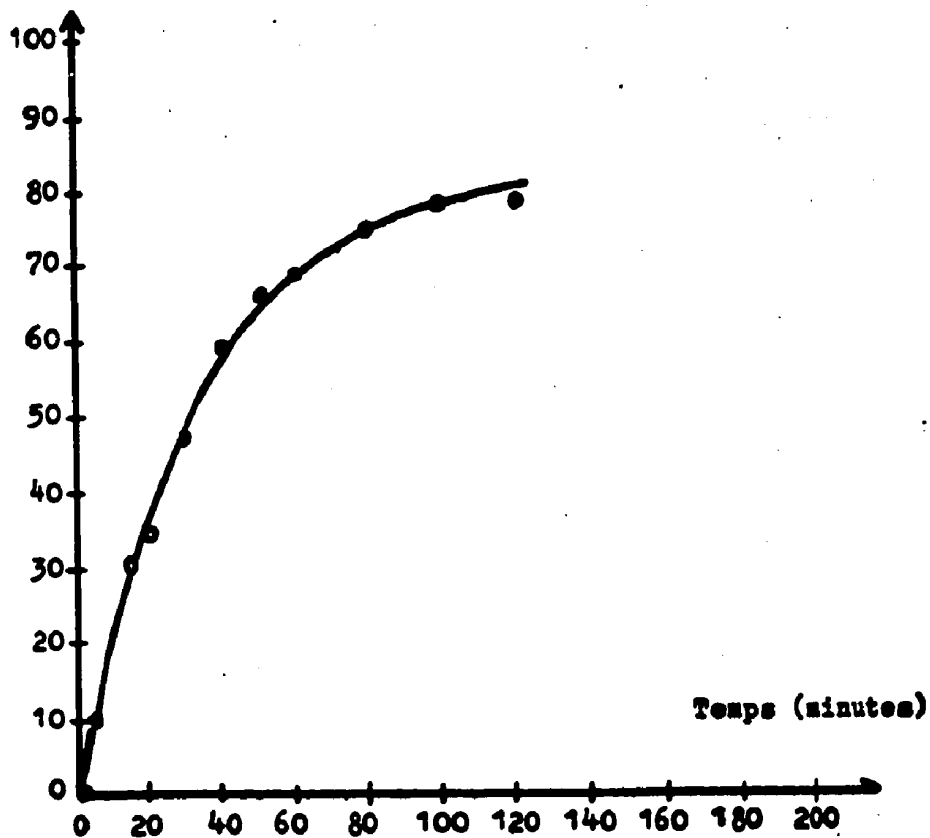


Figure 3

Liège, le 11 avril 1980

Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S

Michel VAN MALDEREN
(PRETLINGER & ASSOCIES)
Ppon

[Signature]