



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 895.430

Classif. Internat. :

C12 N/C12 P/C12 R

Mis en lecture le :

21 -06- 1983

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 21 décembre 1982 à 10 h. 40**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., boulevard de la Sauvenière, 85, Bte 042, 4000
Liège,

un brevet d'invention pour : Enzyme destinée à la décomposition d'un
hydrate de carbone à poids moléculaire élevé, hydrate de
carbone ainsi obtenu, procédé de sélection d'un micro-
organisme produisant ladite enzyme et procédé de production
d'une telle enzyme,
(Inv. : J.L. Adler-Nissen, G.W. Jensen, S. Riisgaard, H.
Gürtler, H.A.S. Olsen et M. Schüleïn)
qu'elle déclare avoir fait l'objet de demandes de brevet
déposées au Danemark le 22 décembre 1981, n° 5690/81 et le
6 mai 1982, n° 2025/82

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 21 juin 1983

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE :

Le Directeur

L. SALPETEUR

BREVET D'INVENTION

Au nom de : NOVO INDUSTRI A/S

Titre : Enzyme destinée à la décomposition d'un hydrate de carbone à poids moléculaire élevé, hydrate de carbone ainsi obtenu, procédé de sélection d'un microorganisme produisant ladite enzyme et procédé de production d'une telle enzyme.

Priorité : Demandes de brevets déposées au Danemark
le 22 décembre 1981 sous le n° 5690/81 et
le 6 mai 1982 sous le n° 2025/82.

Inventeurs : Jens Lorenz Adler-Nissen,
Georg Wilhelm Jensen,
Steen Riisgaard,
Henrik Gürtler,
Hans Aage Sejr Olsen,
Martin Schüleln.

Enzyme destinée à la décomposition d'un hydrate de carbone à poids moléculaire élevé, hydrate de carbone ainsi obtenu, procédé de sélection d'un microorganisme produisant ladite enzyme et procédé de production d'une telle enzyme.

5 La présente invention concerne une enzyme destinée à la décomposition d'un hydrate de carbone à poids moléculaire élevé, l'hydrate de carbone à poids moléculaire élevé isolé ainsi obtenu, un procédé de sélection d'un microorganisme produisant cette enzyme ainsi qu'un procédé
10 de production d'une telle enzyme.

Un procédé de préparation d'une protéine végétale purifiée (pvp) par élimination enzymatique de la rémanence, sans dissolution et reprécipitation de la protéine, est décrit dans le brevet belge n° 882.769. La pureté de la
15 pvp pouvant être obtenue par ce procédé connu n'est pas satisfaisante et demande donc à être améliorée. Dans les exemples, on a mis en évidence une pureté de la pvp d'environ 85 %. Même s'il est possible d'obtenir une pvp présentant une pureté d'environ 90 % suivant le procédé
20 connu, ceci n'est possible qu'en utilisant certaines substances de départ prétraitées, par exemple un concentré de protéines de soja. Il serait souhaitable d'obtenir une pureté de pvp supérieure ou proche de 90% avec une gamme de substances de départ beaucoup plus large, particulièrement de
25 la farine de soja décortiquée et dégraissée.

La présente invention repose sur la découverte surprenante qu'une certaine partie du produit de la décomposition de la rémanence, tel qu'il apparaît pendant le traitement enzymatique précité, à savoir un hydrate de
30 carbone à poids moléculaire élevé soluble dans l'eau, se fixe lui-même sur une partie de la protéine végétale comme il sera expliqué plus en détail ci-après. Il en résulte, bien entendu, une pureté moins bonne de la protéine. Il est également apparu que l'hydrate de carbone à poids
35 moléculaire élevé est capable de se fixer à des protéines

h

d'origine animale.

L'invention vise donc tout particulièrement à fournir une enzyme pour la décomposition des hydrates de carbone à poids moléculaire élevé précités et qui ouvrent
5 la possibilité de produire une pvp de pureté améliorée, ainsi qu'un procédé pour la production d'une telle enzyme.

Le principe de l'invention peut être décrit de la manière suivante en référence à la figure 1 qui n'indique que les substances existant en tant que solides
10 non dissous alors que tous les surnageants sont omis. Une charge de farine de soja a été divisée en deux parties égales, partie I et partie II (colonne a dans la figure 1). La partie I a été décomposée par voie protéolytique à un pH d'environ 8 au moyen d'ALCALASE[®] (une enzyme protéoly-
15 tique produite au moyen de B. licheniformis et vendue par NOVO INDUSTRI A/S, 2880 Bagsværd, Danemark) et a été ensuite lavée à pH d'environ 8 afin d'éliminer la quantité totale de protéine et la rémanence a été séparée du surnageant et a été lavée (voir partie I, colonne a et b,
20 figure 1). De cette manière, on a isolé une rémanence pure (désignée par rémanence I) (colonne b à la figure 1). La partie II de la farine de soja n'a pas été traitée ; pour plus de concision, la rémanence de la partie II a été dénommée rémanence II (colonne b à la figure 1). Ensuite,
25 la rémanence I et la partie II sont décomposées au moyen d'une pectinase commerciale, par exemple PECTINEX[®] (une enzyme pectolytique produite par Schweizerische Ferment A/G Bâle, Suisse) (voir colonnes b et c à la figure 1). On a découvert de manière inattendue que la partie non dissoute
30 de la rémanence I est beaucoup plus faible que la partie non dissoute de la rémanence II, sur base des bilans d'azote et de la masse de matières sèches (voir figure 1 dans laquelle les surfaces hachurées de la colonne c correspondent aux substances insolubles différentes des protéines
35 dans l'étape indiquée ci-dessus). En outre, si le

64

surnageant de la rémanence I traitée à la pectinase est est ajouté à la suspension de protéine de soja à pH 4,5, un polysaccharide du surnageant est lié à la protéine de soja. Ce polysaccharide du surnageant de la rémanence I, qui est
5 une partie du produit de décomposition de la rémanence et qui est nettement soluble dans l'eau en l'absence de protéine de soja mais qui est lié à la protéine de soja au point isoélectrique de la protéine de soja ou autour de ce point, si celle-ci est présente, est désigné par SPS (soluble,
10 polysaccharide); voir figure 1. Le SPS présente une distribution de poids moléculaire comprise entre 5×10^6 et $4,9 \times 10^4$. La préparation de SPS isolé apparaît dans le diagramme synoptique représenté à la figure 2 qui recouvre également certains des procédés indiqués à la figure 1. Le
15 problème consiste donc à trouver une enzyme qui est capable de décomposer la SPS de telle manière que les produits de décomposition de SPS ne lient pas la protéine de soja ou lient celle-ci dans une mesure beaucoup moindre que le SPS ne lie la protéine de soja.

20 Bien que la description concerne principalement la décomposition d'une protéine de soja, l'invention n'est pas limitée à une telle protéine mais concerne toutes les espèces de protéines végétales, notamment par exemple les protéines citées dans le brevet belge n° 992.769, page
25 1.

Suivant la présente invention, on a à présent trouvé qu'en examinant l'aptitude à décomposer du SPS de soja, il est possible de sélectionner des microorganismes qui sont aptes à produire un composé qui présente une acti-
30 vité enzymatique, en décomposant effectivement le SPS de soja, composé désigné ci-dessous, pour plus de concision, SPS-ase.

Par conséquent, sous un premier aspect, l'invention concerne une SPA-ase, une carbohydrase sous une forme
35 utilisable et capable de décomposer le SPS de soja dans des

h

conditions appropriées pour donner des produits de décomposition qui se fixent eux-mêmes sur une protéine en milieu aqueux, à un degré moindre que celui auquel le SPS de soja se serait fixé lui-même, avant décomposition, sur la même protéine dans des conditions correspondantes.

5 En outre, on a trouvé que cette SPS-ase permettant de dégrader le SPS de soja est capable de dégrader des polysaccharides similaires au SPS et provenant de légumes et de fruits, de manière plus complète que ne le font les pectinases commerciales et les cellulases commerciales.

10 L'expression "forme utilisable" indiquée ci-dessus, vise à exclure de l'invention par exemple une préparation contenant une SPS-ase qui contient des substances toxiques ou qui présente une activité de SPS-ase si basse qu'elle nécessite l'utilisation de plus de 10 % d'une préparation
15 contenant la SPS-ase, par rapport au poids du SPS dans le substrat dans une réaction effectuée pendant 24 heures, à 50°C et au pH optimal de la SPS-ase en question, pour obtenir la décomposition du SPS présentant une importance pratique.

20 La pureté de la protéine végétale finale est nécessairement améliorée par une élimination totale ou partielle du SPS de la protéine végétale finale par rapport à la pureté de la protéine végétale finale obtenue suivant le procédé du brevet belge n° 882.769 du fait que cette protéine
25 végétale connue était contaminée avec du SPS.

On ne sait pas à présent, si la SPS-ase particulière décrite ci-après développe son activité enzymatique à partir d'une seule enzyme ou à partir d'un complexe d'enzymes comprenant au moins deux enzymes. Certaines recherches semblent
30 indiquer qu'au moins deux enzymes sont responsables de l'effet de décomposition de la SPS-ase, une de ces enzymes étant capable de n'effectuer qu'une légère décomposition du SPS, après quoi une ou plusieurs enzymes sont capables d'effectuer une décomposition plus importante du SPS. Une
35 telle hypothèse ou des hypothèses semblables

4

ne doivent cependant pas limiter la portée de l'invention.

Suivant une forme d'exécution particulièrement préférée de l'invention, la SPS-ase est caractérisée en ce qu'elle est capable de décomposer du SPS de soja, en milieu aqueux, pour donner des produits de décomposition qui se fixent eux-mêmes sur une protéine végétale, en milieu aqueux, à un degré moindre que celui auquel le SPS de soja se serait fixé lui-même, avant décomposition, sur la même protéine végétale, en milieu aqueux.

10 Suivant une forme d'exécution préférée de la présente invention, la SPS-ase est caractérisée en ce qu'elle permet de décomposer du SPS de soja en milieu aqueux à un pH ne s'écartant pas de plus de 1,5 unités de la valeur 4,5, pour donner des produits de décomposition qui se
15 fixent eux-mêmes sur une protéine de soja, en milieu aqueux, à un degré moindre que celui auquel le SPS de soja se serait fixé lui-même, avant décomposition, sur la protéine de soja, en milieu aqueux.

Suivant une forme particulièrement préférée de la
20 présente invention la SPS-ase est caractérisée en ce que les produits de décomposition du SPS de soja, après dégradation complète, se fixent eux-mêmes sur la protéine végétale à un degré représentant une valeur inférieure à 50%, en particulier inférieure à 20%, que celui auquel le SPS
25 de soja se serait fixé lui-même, avant décomposition, sur la protéine végétale, en milieu aqueux.

Suivant une forme particulièrement préférée de la présente invention la SPS-ase est caractérisée en ce qu'elle réagit positivement au test de la SPS-ase, lorsqu'il est exécuté suivant le procédé de détermination
30 qualitative et quantitative de la SPS-ase décrite dans ce mémoire.

Suivant une forme d'exécution particulièrement préférée de la présente invention, la SPS-ase est produite au
35 moyen d'un microorganisme appartenant au genre d'*Aspergillus*, de préférence appartenant au groupe *Aspergillus niger*.

Suivant une autre forme d'exécution particulièrement préférée de la présente invention, la SPS-ase est

sh

dérivée des enzymes pouvant être obtenue au moyen de Asp.aculeatus CBS 101.43. La même SPS-ase peut être obtenue par Asp.japonicus IFO 4408. On a trouvé que Asp.aculeatus CBS 101.43 produit également des rémanases, des cellulases, des pectinases et des hémicellulases très efficaces. En outre, on a trouvé que toutes les souches appartenant aux souches Asp.aculeatus ou Asp.japonicus ne conviennent pas pour produire une SPS-ase nécessaire dans le cadre de l'invention. Ainsi, comme il apparaît dans un paragraphe ultérieur de la présente description (partie 5), on a prouvé que Asp.japonicus ATCC 20236 ne produit pas suffisamment de SPS-ase pour que celle-ci puisse être détectée par la détermination enzymatique de la SPS-ase décrite dans le présent mémoire descriptif.

Suivant une autre forme d'exécution particulièrement préférée de l'invention, la SPS-ase est identique au point de vue de l'immunoélectrophorèse à la SPS-ase produite au moyen de Asp.aculeatus CBS 101.43 et peut être identifiée au moyen de la technique de recouvrement électrophorétique (cfr. parties 6 et 7).

Lorsque la SPS-ase est produite par voie microbiologique, elle est obtenue en mélange avec différentes substances accompagnantes, particulièrement d'autres enzymes. Si on le désire, la SPS-ase en question peut être purifiée, par exemple au moyen des procédés de séparation chromatographique, comme on le verra plus tard dans ce mémoire (partie 8).

Dans Agr.Biol.Chem.40 (1), 87-92, 1976, on décrit qu'une souche de Asp.japonicus, ATCC 20236, produit un complexe d'enzymes qui est capable d'effectuer une décomposition partielle d'un polysaccharide acide dans une sauce de soja, nommée APS, dont une fraction est désignée par APS-1. Ce polysaccharide acide n'est pas identique au SPS, ce qui sera montré plus loin et plus en détail dans ce mémoire descriptif à la partie 3. Ainsi, les chromatogrammes HPLC de filtration sur gel du SPS et de l'APS sont

- nettement différents, et, en outre, les chromatogrammes de filtration sur gel de l'APS décomposée par la pectinase commerciale Pectolyase et d'un SPS traité avec la pectinase commerciale Pectolyase sont nettement différents. En outre,
- 5 il n'apparaît pas dans cet article que le polysaccharide acide est lié à la protéine de soja et que le polysaccharide acide décomposé n'est pas lié à la protéine de soja ou y est lié à un degré nettement inférieur à celui d'un polysaccharide acide non décomposé. On a également prouvé que
- 10 cette souche ne forme pas de SPS-ase en une quantité suffisante pour une détection au moyen d'une détermination enzymatique de la SPS-ase décrite dans ce mémoire. Ceci créait un préjugé à l'égard de toute souche de *Asp. Japonicus* en tant que producteur de SPS-ase; cependant, suivant
- 15 l'invention, on a trouvé de manière inattendue que certaines souches de *Asp. japonicus* sont des producteurs de SPS-ase.
- Suivant un deuxième aspect, la présente invention concerne le SPS isolé, produit à partir d'une protéine végétale brute servant de substance de départ.
- 20 Un mode d'exécution préféré du SPS isolé suivant la présente invention est caractérisé en ce que la protéine végétale brute consiste en une farine de soja dégraissée. La préparation de ce SPS isolé est décrite dans ce qui précède, en référence à la figure 2.
- 25 Suivant un troisième aspect, la présente invention concerne un procédé de sélection d'un microorganisme produisant une SPS-ase permettant de produire la SPS-ase suivant l'invention, dans lequel le microorganisme à tester est cultivé sur un milieu de fermentation
- 30 dont la source principale de carbone est le SPS, après quoi un échantillon du milieu de fermentation est analysé pour la détermination de la SPS-ase et le microorganisme en question est choisi en tant que microorganisme produisant une SPS-ase si l'analyse de détermination de la SPS-ase est
- 35 positive.
- 4

Suivant un quatrième aspect, la présente invention concerne un procédé de production de SPS-ase, suivant lequel une souche choisie suivant le procédé ci-dessus de sélection d'un microorganisme produisant une SPS-ase est
5 cultivée dans un milieu nutritif. La culture peut être effectuée en fermentation noyée (basse) ou en fermentation en surface (haute).

Un mode d'exécution préféré du procédé suivant l'invention est caractérisé en ce que la souche Asp.
10 aculeatus CBS 101.43 ou Asp. japonicus IFO 4408 est cultivé dans un milieu nutritif.

Suivant un mode d'exécution préféré de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que la culture est effectuée en culture noyée à un pH compris
15 dans l'intervalle de 3 à 7, de préférence de 4 à 6, à une température comprise dans l'intervalle de 20 à 40 °C, de préférence de 25 à 35 °C et en ce que le milieu nutritif contient des sources de carbone et d'azote et des sels inorganiques.

20 Suivant un autre mode d'exécution particulièrement préféré de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que le milieu nutritif contient de la farine de soja, de préférence grillée.

Suivant un autre mode d'exécution particulièrement préféré de la présente invention, le procédé est
25 caractérisé en ce que la farine de soja est traitée par une enzyme protéolytique avant d'être utilisée comme composant du substrat, l'enzyme protéolytique étant, de préférence, produite par voie microbiologique au moyen du
30 B. licheniformis.

Suivant un autre mode d'exécution préféré de l'invention, le procédé est caractérisé en ce qu'on ajoute une solution de pectine de manière aseptique au bouillon de fermentation pendant la culture.

35 On a trouvé que la souche Asp. aculeatus

h

- CBS 101.43 produit également des enzymes solubilisant la rémanence, des cellulases, des pectinases et des hémicellulases très efficaces en plus de la SPS-ase et que le complexe d'enzymes produit au moyen de la souche Asp. aculeatus
- 5 CBS 101.43 convient extrêmement bien en tant qu'agent destiné à la désintégration de parois cellulaires des substances végétales. Ainsi, le complexe d'enzymes produit par Asp. aculeatus 101.43 peut être utilisé dans l'industrie alimentaire avec d'excellents résultats, pour le traitement
- 10 de purées de fruits et de légumes et pour clarifier et réduire la viscosité lors de la production de jus et de vins; on peut également l'utiliser comme agent de déshydratation (à savoir un agent de décomposition de polysaccharides et par conséquent de libération de l'eau liée à
- 15 l'intérieur de la structure polymère des polysaccharides) dans le traitement de végétaux.

- Un cinquième aspect de la présente invention concerne l'utilisation d'une SPS-ase ou un procédé de décomposition de polysaccharides, de préférence des polysaccharides
- 20 de parois cellulaires de plantes, au moyen d'une carbohydrase, procédé dans lequel on met une préparation de SPS-ase suivant la présente invention en contact avec un substrat pour ladite préparation de SPS-ase, en un milieu aqueux, exception faite des décompositions déjà décrites
- 25 dans la demande de brevet danois n° 5691/81.

- Ainsi, on a trouvé, suivant la présente invention, que les préparations de SPS-ase sont des préparations d'enzymes efficaces pour la liquéfaction ou la décomposition partielle ou totale de différentes substances, de
- 30 préférence des substances végétales, par exemple des fruits et des déchets de plantes, contenant des protéines, de la cellulose, de l'hémicellulose, (par exemple des glucannes, du xylane, des galactanes et de l'arabane), des gommes, de la pectine, des lipides, de l'inuline, des polyphénols,
- 35 de l'amidon et des alginates; elles peuvent également être utilisées pour des applications qui y sont apparentées,
- 24

voir le tableau ci-dessous dans la description. A titre d'exemple pour de telles applications on peut citer toutes les applications pour lesquelles les pectinases et cellulases commerciales sont utilisées de nos jours. Différents
5 exemples seront donnés plus loin dans cette description.

En ce qui concerne le procédé d'extraction (d'isolation) décrit dans l'exemple 2, par exemple, il faut noter que la préparation de SPS-ase est essentiellement exempte de protéinase, étant donné que le produit final
10 désiré, à savoir la protéine, serait décomposé dans le cas contraire. De même, si l'on désire extraire (isoler), d'une substance biologique brute, des substances biologiques différentes de la protéine, la préparation de SPS-ase utilisée sera essentiellement exempte de toute enzyme
15 dégradant cette autre substance biologique. Une telle préparation de SPS-ase modifiée peut être produite par inactivation sélective de l'enzyme indésirée, par fractionnement ou par un autre procédé connu en soi.

Ainsi, un mode d'exécution préféré de la présente
20 invention est caractérisé en ce que la composition est accompagnée par l'isolation ou l'extraction d'une substance biologique différente d'une protéine de soja et de protéines végétales apparentées d'une substance biologique brute, la préparation de SPS-ase étant essentiellement exempte de
25 toute enzyme capable de décomposer ladite substance biologique.

Suivant la présente invention, on a donc trouvé que les préparations modifiées de SPS-ase (modifiées dans le sens qu'elles sont essentiellement exemptes d'enzymes
30 capables de décomposer la substance biologique à extraire ou à isoler) sont des préparations d'enzymes efficaces pour l'extraction (isolation) de substances biologiques spécifiques, par exemple l'amidon, les lipides, les arômes, les pigments et les essences de substances biologiques brutes.
35 Plusieurs exemples seront donnés plus tard dans cette description.

4

Suivant un mode particulièrement préféré de la présente invention, l'utilisation suivant l'invention est caractérisée en ce que l'un ou plusieurs des produits de réaction (sans distinguer s'ils sont des produits finals recherchés ou des déchets) sont traités ultérieurement en même temps que le traitement par enzyme ou après celui-ci. Ceci fournit une utilisation plus flexible et pouvant être mieux adaptée.

Suivant un autre mode d'exécution particulièrement préféré de la présente invention, l'utilisation est caractérisée en ce que le traitement ultérieur consiste en une fermentation alcoolique dans le cas où le produit de réaction est un sucre fermentable. Ainsi on fournit un procédé simple et bon marché pour la production d'alcool.

Afin de mieux expliciter la nature de la présente invention, on se référera à la description qui suit et qui est divisée en différentes parties numérotées de 1 à 10 décrivant chacune les détails spécifiques relatifs à la présente invention. Les différentes parties sont comme suit:

1. Préparation du SPS.
2. Caractérisation du SPS, en particulier la distribution du poids moléculaire de celui-ci.
3. Essais prouvant la différence entre SPS et APS.
4. Sélection de microorganismes produisant de la SPS-ase.
5. Caractérisation de certains microorganismes formant de la SPS-ase.
6. Description générale de la technique de recouvrement associée à des immunoélectrophorèses.
7. Caractérisation immunoélectrophorétique de la SPS-ase avec un anticorps polyspécifique et recouvrement.
8. Purification d'une préparation de SPS-ase.
9. Dépendance de l'activité à l'égard du pH et de la température et stabilité d'une SPS-ase.
10. Détermination de l'activité enzymatique.

4

PARTIE 1.

PREPARATION DU SPS.

Comme déjà mentionné précédemment, la substance de départ pour la préparation du SPS peut être la rémanence 5 de soja. C'est pourquoi, on décrira d'abord la préparation d'une rémanence de soja.

La rémanence de soja est une fraction d'hydrate de carbone exempte de protéines (qui, en pratique, peut contenir de faibles quantités de lignine et matières miné- 10 rales), contenue dans la farine de soja dégraissée et décortiquée, ladite fraction d'hydrate de carbone étant insoluble dans un milieu aqueux à pH 4,5 et pouvant être préparée de la manière suivante, en référence au tableau synoptique n° 1.

15 La farine de soja dégraissée (Sojamel 13 de Aarhus Oliefabrik A/S) est mise en suspension dans de l'eau désionisée à 50°C dans une proportion pondérale de farine de soja à l'eau de 1:5, dans un réservoir contenant un équipement de stabilisation de pH et de température. On règle 20 le pH à 8,0 au moyen de NaOH 4N (I). On effectue une hydrolyse à pH stationnaire au moyen d'ALCALASE 0,6 L (une enzyme protéolytique à base de *B. licheniformis* ayant une activité de 0,6 unités Anson par gramme, l'activité étant déterminée suivant la méthode Anson, comme décrit dans NOVO 25 ENZYME INFORMATION IB No. 058 e-GB). Le rapport enzyme/substrat correspond à 4 % de la quantité de protéines dans la farine de soja (II). Après une hydrolyse pendant une heure, la boue est séparée par centrifugation (III) et on lave (IV), cette opération étant effectuée deux fois (V, VI, 30 VII). La boue ainsi traitée est ensuite hydrolysée une fois de plus pendant une heure au moyen d'ALCALASE 0,6 L (VIII, IX), de manière similaire à ce qui a été dit ci-dessus. Ensuite la boue séparée par centrifugation (X) est lavée deux fois (XI, XII, XIII, XIV), la boue finalement lavée (6) 35 étant séchée par pulvérisation (XV). La poudre ainsi produite, séchée par pulvérisation est la rémanence de soja

h

servant de matériau brut pour la production de SPS.

Le SPS est la fraction soluble à l'eau de polysaccharide qui est obtenue par un traitement classique de la rémanence de soja susmentionnée avec de la pectinase.

5 Le SPS est préparé de la manière suivante au moyen des 14 étapes réactionnelles indiquées ci-dessous, en référence au tableau synoptique n° 2.

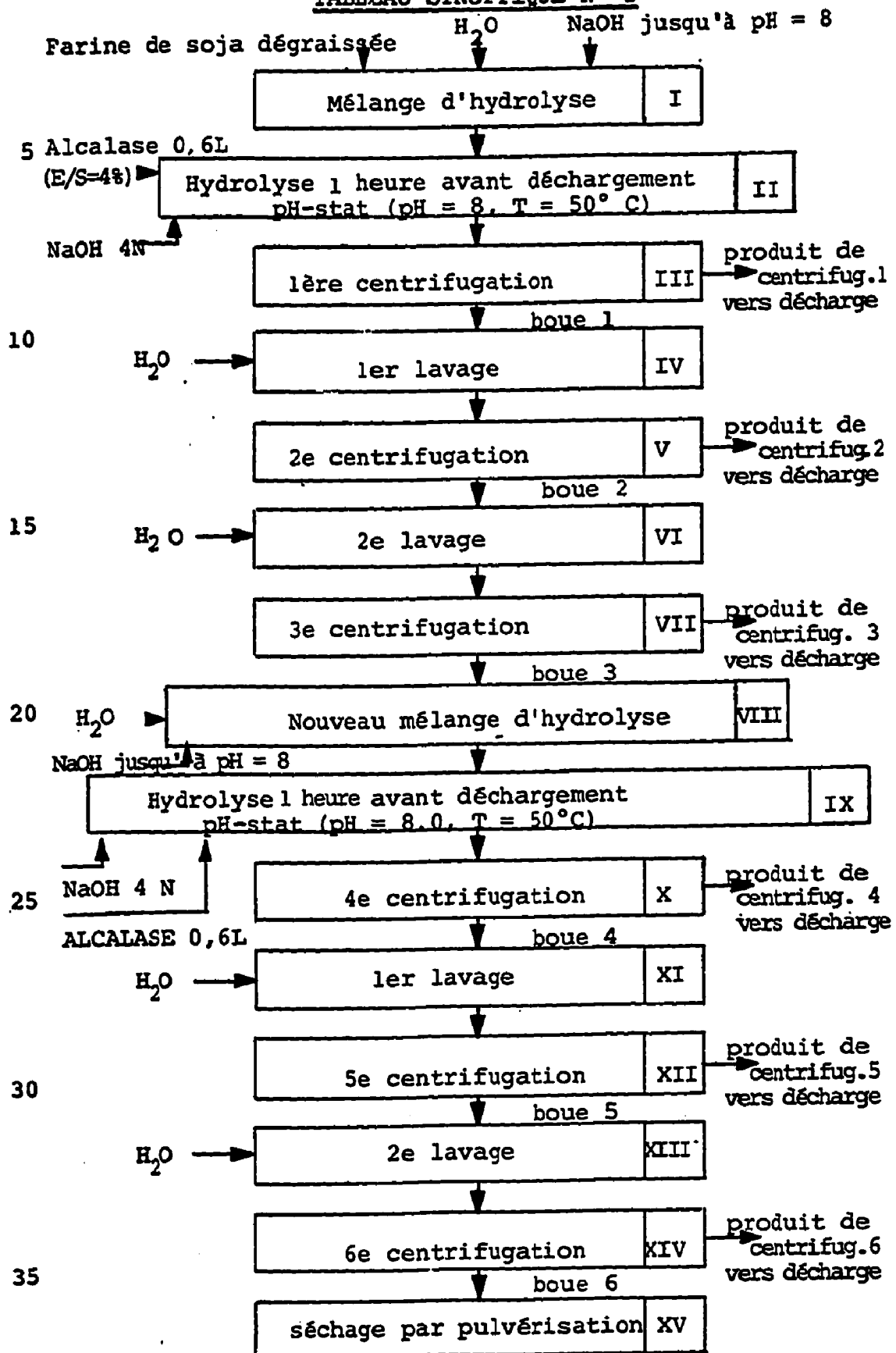
- 10 1. On détermine la teneur en matière sèche de la rémanence susmentionnée et on dilue la rémanence de soja dans de l'eau à raison de 2 % de matière sèche et ladite rémanence de soja est maintenue en suspension à 50°C dans un réservoir comportant un réglage de température.
2. On règle la valeur du pH à 4,50 au moyen de NaOH 6N.
- 15 3. On ajoute en une quantité de 200 g/kg de matière sèche du Pectinex Super concentré L (pectinase commerciale de la Schweizerische Ferment AG, Bâle, Suisse) présentant une activité en pectinase de 750.000 MOU, déterminée suivant le feuillet "Determination of the Pectinase units of Apple Juice (MOU)" du 12.6.1981, disponible à 20 la Schweizerische Ferment AG, Bâle, Suisse et on ajoute également en quantité de 20 g/kg de matière sèche du Celluclast 200L (cellulase commerciale décrite dans le feuillet NOVO enzymes, information sheet 25 B-153 e-GB 1000 juillet 1981, disponible chez NOVO INDUSTRIE A/S,
4. Le contenu du réservoir est maintenu à 50°C pendant 24 heures en agitant.
5. Les enzymes sont inactivées en augmentant le pH à 9,0 30 au moyen de NaOH 4N. Le mélange réactionnel est maintenu tel quel pendant 30 minutes et le pH est ensuite réglé à 4,5 au moyen de HCl 6N.
6. Le mélange réactionnel est centrifugé et on récupère le produit de centrifugation ainsi que la boue.
- 35 7. Le produit de centrifugation de l'étape 6 subit une filtration de contrôle sur un filtre presse (le filtre est lavé à l'eau avant la filtration de contrôle).
8. Le filtrat de contrôle est soumis à une ultrafiltration,

24

à une diafiltration et ensuite encore à une ultrafiltration sur une membrane présentant une valeur de coupure de 30.000. (DDS GR 60-P de De Danske Sukkerfabrikker), en ayant recours aux paramètres suivants :

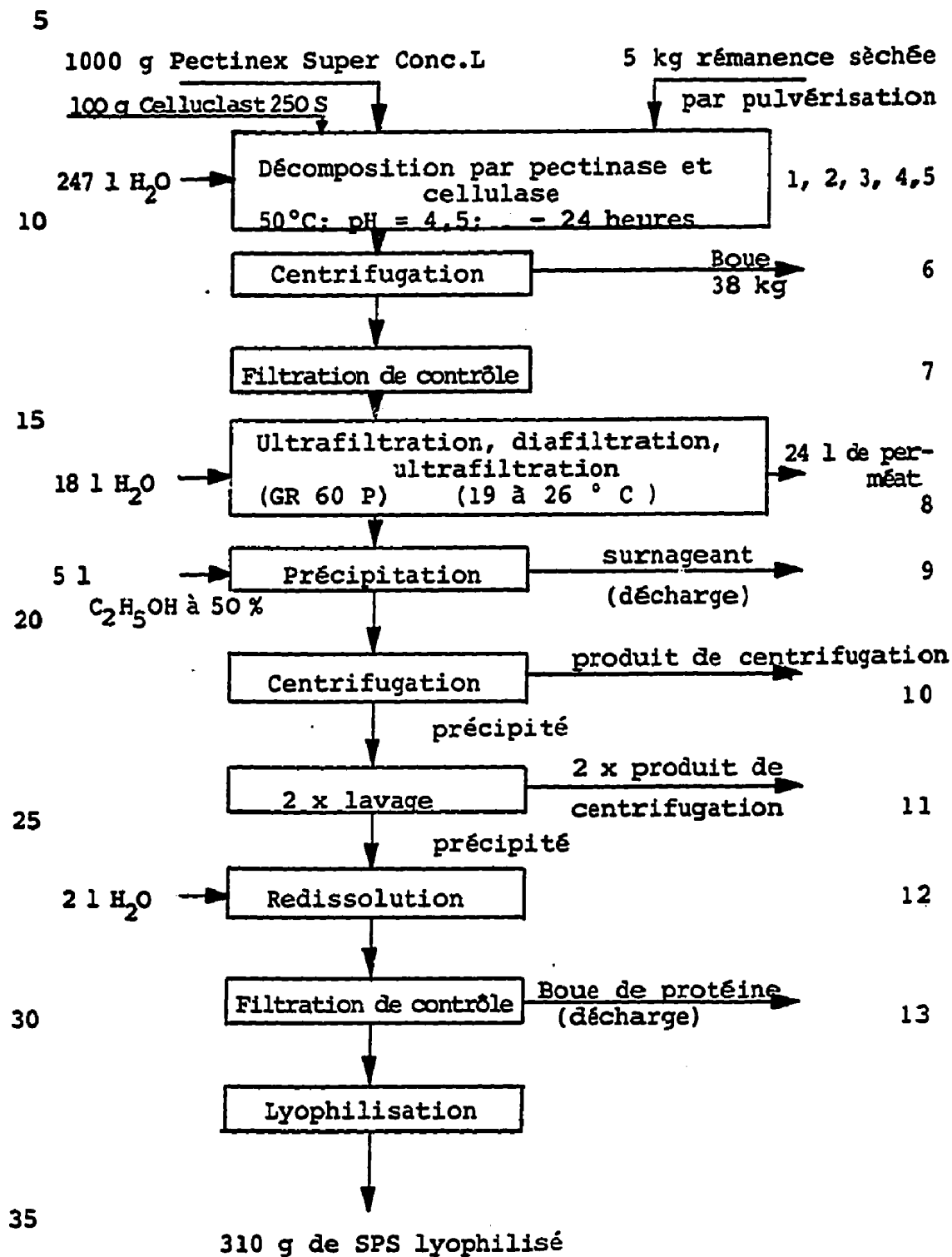
- 5 1. Ultrafiltration correspondant à une concentration de volume de 6.
2. Diafiltration jusqu'à ce que le pourcentage en matière sèche dans le perméat soit égal à 0 (~0° Brix),
3. Ultrafiltration jusqu'à environ 15 % de matière sèche
- 10 dans le concentrat.
- La température est de 50°C, le pH est de 4,5 et la pression moyenne de 3 bars.
9. Le concentrat soumis à l'ultrafiltration est refroidi jusqu'à 5°C et on ajoute un volume égal d'éthanol à 96 %.
- 15 10. On récupère le précipité au moyen d'une centrifugeuse.
11. Le précipité est lavé deux fois par de l'éthanol dans l'eau à 50 % v/v, correspondant au volume du produit de centrifugation de l'étape 10, c'est-à-dire qu'on effectue deux centrifugations.
- 20 12. Le précipité lavé est remis en solution dans l'eau en un volume qui correspond au volume de concentrat de l'étape 9 soumis à ultrafiltration.
13. Le liquide de l'étape 12 est soumis à une filtration de contrôle sur un filtre de verre.
- 25 14. Le filtrat clair contenant du SPS pur est lyophilisé.

TABLEAU SYNOPTIQUE N° 1



84

TABLEAU SYNOPTIQUE N° 2



PARTIE 2

CARACTERISATION DU SPS, EN PARTICULIER DISTRIBUTION DU POIDS MOLECULAIRE DE CELUI-CI.

On a déterminé (fig. 4), la distribution du poids
5 moléculaire du SPS dont la production est effectuée comme
indiqué dans ce mémoire, au moyen d'une chromatographie sur
gel dans un équipement HPLC (pompe Waters, modèle 6000,
module de données 730 de Waters et réfractomètre R 401 de
Waters). On a également déterminé (fig. 5) la distribution
10 du poids moléculaire des produits de décomposition du SPS
par la SPS-ase suivant le même procédé. En outre, on a montré
par la même méthode, l'effet de liaison entre la protéine de
soja et le SPS (fig. 6) et l'absence de l'effet de liaison
entre la protéine de soja et le SPS décomposé par l'agent
15 suivant l'invention (fig. 7).

La courbe de calibrage (le logarithme du poids moléculaire en
fonction de R_f , où la valeur R_f pour le glucose est arbitrairement
définie comme étant 1 et où la valeur R_f d'un dextrane spécifique est
définie en tant que temps de rétention de ce dextrane divisé par le temps
20 de rétention du glucose) a été établie au moyen de plusieurs dextrans
étalons ayant des poids moléculaires connus (T 4, T 10, T 40,
T 70, T 110, T 500) vendus par Pharmacia Fine Chemicals AB,
Boîte 175, S-75104, Uppsala, Suède. On a trouvé la valeur
 R_f pour le maximum de chaque pic de dextrane et le poids
25 moléculaire correspondant a été calculé en tant que $\sqrt{\bar{M}_w \cdot \bar{M}_n}$
où \bar{M}_w est la valeur moyenne pondérale du poids moléculaire
et \bar{M}_n est la valeur moyenne numérique du poids moléculaire.
On a utilisé du NaNO_3 0,1 M comme éluant pour ce
processus chromatographique. Les colonnes utilisées dans
30 ce processus chromatographique sont la colonne PW 5000 de
60 cm suivie par une colonne PW 3000 de 60 cm vendues par
Toyo Soda Manufacturing Co., Japon. On a établi la relation
entre le poids moléculaire et la valeur R_f pour les
dextrans indiqués ci-dessus de cette manière, cfr. fig. 3.

35 A partir de la fig. 4, on peut calculer que le
SPS présente une distribution de poids moléculaire qui est

du

caractérisée par une valeur \bar{M}_w d'environ $5,4 \times 10^5$ et par une valeur \bar{M}_n d'environ $4,2 \times 10^4$. Il apparaît également dans cette figure que le chromatogramme présente deux pics distincts à un temps de rétention de 34,5 minutes (6 %) correspondant à un poids moléculaire d'environ 5×10^6 et à un temps de rétention de 47,12 minutes (67 %) correspondant à un poids moléculaire d'environ $4,9 \times 10^4$. Il apparaît également de cette courbe qu'il existe un épaulement entre ces deux pics à un temps de rétention de 41,25 minutes (27 %) correspondant à un poids moléculaire de $2,8 \times 10^5$.

Après la décomposition du SPS par la SPS-ase, le mélange d'hydrolyse a été filtré sur membrane et le filtrat a été soumis à la chromatographie. On a trouvé qu'environ 55 % du SPS est décomposé en monosaccharide, disaccharide et trisaccharide et que le résidu de 45 % a été décomposé en un polymère présentant trois pics correspondant au poids moléculaires suivants : 5×10^4 , 10^4 et $4,4 \times 10^3$, cfr fig. 5.

Dans le but de démontrer l'effet de liaison entre la protéine de soja et le SPS et la réduction substantielle de l'effet de liaison entre la protéine de soja et le SPS décomposé au moyen de la SPS-ase, on a effectué les essais suivants.

3 % de SPS dans un tampon acétate 0,10 M à pH 4,5 est ajouté à une boue d'un isolat de soja (Purina E 500) afin de générer une suspension présentant le rapport isolat/SPS correspondant à 10:1. On fait incuber cette suspension pendant 18 heures dans un bain agité à 50 ° C. Après incubation, la suspension est centrifugée et le surnageant clair est analysé par HPLC comme décrit précédemment. En comparant la fig. 6 à la fig. 4, il apparaît que le SPS est complètement adsorbé sur l'isolat de soja.

Le même processus que celui mentionné dans le paragraphe précédent est mis en oeuvre avec une solution à 3 % de SPS hydrolysé avec une SPS-ase produite par CBS 101.43 (fig. 7). En comparant la fig. 7 et la fig. 5, on

sh

constate qu'aucun composé du SPS hydrolysé présentant un poids moléculaire inférieur à 10^4 n'est adsorbé sur l'isolat de soja. L'hydrolyse réduit la liaison quantitative jusqu'à environ 10 à 15 % par rapport à la liaison du SPS à la protéine de soja.

Une analyse RMN du SPS, dont la production est effectuée comme indiqué dans ce mémoire, révèle la composition approximative suivante du SPS :

- 1) acide α -galacturonique en une quantité d'environ 45 %,
10 approximativement 40 % de la quantité totale d'acide α -galacturonique étant présents en tant qu'ester méthylique.
- 2) rhamnopyranose en une quantité d'environ 20 %,
- 3) galactopyranose en une quantité d'environ 15 %, et
- 15 4) β -xylopyranose en une quantité d'environ 20 %.

Les constituants semblent être présents suivant une structure comprenant une chaîne principale rhamnogalacturonique et des chaînes latérales de xylose et de galactose.

L'hydrolyse acide complète du SPS (8 heures dans
20 H_2SO_4 1N) et l'analyse TLC ultérieure ont révélé qu'il y a également de faibles quantités de monosaccharides fucose et arabinose dans le SPS hydrolysé.

Une analyse HPLC du SPS décomposé par le complexe d'enzymes SPS-ase formé par CBS 101.43 montre une importante
25 réduction du poids moléculaire. De manière semblable, le spectre RMN du SPS décomposé comme indiqué ci-dessus montre qu'une majeure partie des groupes ester a disparu et que, également, la teneur en xylose et galactose dans la substance à poids moléculaire plus élevé a diminué. Le
30 spectre RMN de la partie du produit de décomposition de SPS qui précipite par addition d'un volume d'éthanol à un volume de produit de décomposition de SPS est semblable au spectre RMN du SPS qui a subi les modifications susmentionnées concernant les groupes ester et la teneur en xylose et galactose.

h

PARTIE 3

ESSAIS PROUVANT LA DIFFERENCE ENTRE SPS ET APS

On a préparé le APS comme mentionné dans Agr. Biol. Chem., Vol. 36, No. 4, p. 544 - 550 (1972).

5 On a ensuite hydrolysé ce polysaccharide et le SPS avec différentes enzymes , puis on a soumis le mélange de décomposition à une chromatographie sur gel par un équipement HPLC, comme mentionné dans la deuxième partie, "Caractérisation du SPS, en particulier la dis-
10 tribution du poids moléculaire de celle-ci".

Plus précisément, on a effectué l'hydrolyse par un traitement d'une solution de 25 ml de 2% de APS ou de 2 % de SPS dans un tampon acétate 0,1 M ayant un pH de 4,5 par 10 mg de KRF 68 ou 30 mg de Pectolyase KRF 68
15 est une préparation de SPS-ase dont la fabrication est décrite à l'exemple 1. Les résultats sont repris dans le tableau suivant :

20	Polysaccharide	Enzyme	Chromatogramme HPLC sur gel	Polysaccharide	
				Décomposé	Non décomposé
	APS	Pecto-lyase	fig. 8	x	
	APS	KRF 68	fig. 9	x	
	SPS	Pecto-lyase	fig. 10		x
25	SPS	KRF 68	fig. 5	x	

PARTIE 4.

SELECTION DE MICROORGANISMES PRODUISANT DE LA SPS-ASE.

30 Le microorganisme à tester est soumis à une incubation sur un substrat incliné d'agar présentant une composition qui permet la croissance du microorganisme. Après une croissance initiale sur le substrat incliné d'agar, le microorganisme est transféré dans un substrat
35 principal liquide dans lequel la source de carbone principale est le SPS (préparé comme indiqué), dans lequel la

2

source d'azote est du NO_3^- , NH_4^+ , de l'urée, des acides aminés libres, des protéines ou d'autres composés contenant de l'azote et qui contient en outre, un mélange de sels nécessaires et de vitamines, de préférence sous forme d'un extrait de levure. La composition du substrat principal dépend du genre du microorganisme, la considération principale consistant en ce que le substrat principal est capable de supporter la croissance et le métabolisme du microorganisme. Lorsque la croissance a eu lieu pendant une durée adéquate, de l'ordre de 1 à 7 jours, en fonction de la vitesse de croissance du microorganisme en question, on analyse un échantillon du bouillon de culture pour la détermination de la SPS-ase suivant la détermination enzymatique de la SPS-ase décrite dans cette description ou suivant toute autre détermination de SPS-ase adaptée à des utilisations spécifiques de la SPS-ase différentes de l'utilisation en tant que composant d'un agent de décomposition de la rémanence de soja.

Afin d'avoir une technique plus sensible pour la détermination de l'activité enzymatique, on peut abaisser la température à 40°C et on peut augmenter le temps d'incubation à 20 heures pendant la détermination de l'activité de SPS-ase, des antibiotiques pouvant être ajoutés au substrat dans le but d'éviter une infection.

Par cette technique, on peut trouver d'autres microorganismes produisant de la SPS-ase appartenant au genre *Aspergillus* ainsi qu'à d'autres genres.

PARTIE 5

CARACTERISATION DE CERTAINS MICROORGANISMES FORMANT DE LA SPS-ASE

Par la technique de sélection pour des microorganismes produisant de la SPS-ase indiquée dans ce mémoire descriptif, on a trouvé que les microorganismes cités dans la partie supérieure du tableau suivant sont des producteurs de SPS-ase. Le tableau contient également une souche appartenant à l'espèce *Asp. japonicus* qui n'est pas un producteur de SPS-ase

Producteur de SPS-ase		Espèces		Dénomination de la demanderesse	Dénomination officielle	Premier dépôt : année
Oui	Non	Asp. japo- nicusatus	Asp. aculé-			
x			x	A 805	CBS 101.43 ; DSM2344	1943
x		x		A 1443	IFO 4408 ; DSM2346	1950
	x	x		A 1384	ATCC 20236 ; DSM2345	1969

10

Une identification courte des souches indiquées ci-dessus peut être trouvée dans les catalogues de culture suivants :

List of Cultures 1978, Centraalbureau voor
15 Schimmelcultures, Baarn, Pays-Bas.

List of Cultures, 1972, 5è édition, de
1 "Institute for Fermentation" Osaka, 17-85, Juso-honmachi
2-Chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japon.

The American Type Culture Collection Catalogue of
20 Strains I, 14è édition 1980, 12301 Parklawn Drive,
Rockville, Maryland 20852, Etats-Unis d'Amérique.

Toutes les souches du tableau indiqué ci-dessus correspondent étroitement à la description taxonomique des espèces Asp. japonicus et Asp. aculéatus décrites dans
25 "The genus Aspergillus" de Raper and Fennell, 1965, voir
particulièrement les pages 327 à 330.

PARTIE 6

DESCRIPTION GENERALE DE LA TECHNIQUE DE RECOUVREMENT

30 ASSOCIEE A DESIMMUNOELECTROPHORESSES.

On a développé un procédé dénommé technique de recouvrement de top-agar pour identifier les composants individuels d'un complexe d'enzymes par immunoelectrophorèse croisée au moyen d'un anticorps polyspécifique pour tous les
35 composants d'enzyme du complexe d'enzymes. Le procédé est

sh

basé sur le fait que les enzymes sont encore actives après la liaison spécifique entre l'enzyme et l'anticorps ou, exprimé de manière différente, le procédé est basé sur le fait que le site enzymatique actif n'est pas identique
 5 au site de la liaison enzyme-anticorps. Les complexes enzyme-anticorps précipitent en tant qu' arcs distincts dans le gel pendant l'électrophorèse. La plaque de gel est recouverte avec du SPS soluble dans du top-agar. Après chauffage à 45°C pendant 20 heures dans une atmosphère
 10 ayant une humidité relative de 100 %, l'arc qui possède une activité de SPS-ase apparaît en tant que zone claire dans la couverture de SPS après précipitation par un mélange de parts égales en volume d'éthanol et d'acétone, lorsqu'on regarde du dessus contre un fond noir. Les arcs qui ne présen-
 15 tent pas d'activité SPS-ase restent invisibles.

PARTIE 7.

CARACTERISATION IMMUNOELECTROPHORETIQUE DE LA SPS-ASE AVEC UN ANTICORPS POLYSPECIFIQUE ET RECOUVREMENT.

20 On a immunisé des lapins par le complexe d'enzymes contenant la SPS-ase obtenu par fermentation de *Aspergillus aculeatus* CBS.101.43, comme indiqué dans l'exemple 1 (KRF 68) et on a récupéré l'anticorps polyspécifique d'une manière connue en soi. Au moyen de cet
 25 anticorps polyspécifique on a effectué une immunoélectrophorèse croisée du complexe d'enzymes obtenu par fermentation de l'*Aspergillus aculeatus* CBS 101.43, comme indiqué à l'exemple 1 (KRF 68), l'immunoélectrophorèse croisée ayant été décrite dans N.H. Axelsen et autre, "A
 30 Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis", 6ème édition 1977. On se réfère à la fig. 11 qui montre les arcs correspondant aux différentes protéines produites par le microorganisme. On a trouvé, au moyen de la technique de recouvrement de top-agar décrite précédemment, que la surface
 35 hachurée correspond à la SPS-ase.

Si l'hypothèse susmentionnée supposant que la SPS-ase consiste en au moins deux enzymes est correcte, la surface hachurée est la surface dans laquelle se trouvent toutes les enzymes responsables de l'activité de SPS-ase. Si, suivant d'autres modes d'exécution de la présente invention, on peut séparer des enzymes par immunoélectrophorèse de telle manière qu'elles ne couvrent aucune surface mutuelle, on peut encore identifier une partie de l'activité de SPS-ase au moyen d'immunoélectrophorèse avec un recouvrement avec à la fois le SPS et une pectinase commerciale.

PARTIE 8.

PURIFICATION D'UNE PREPARATION DE SPS-ASE.

On a effectué la purification de la préparation de SPS-ase KRF 92 (voir exemple 1) par échange d'ions. Le tampon est le Tris 50 mMolaire (tris-hydroxyméthylamino-méthane) qui est réglé à pH 7 au moyen de HCl. La colonne est une colonne K 5/30 vendue par Pharmacia, Suède. La substance d'échange d'ions est du DEAE-trisacryl vendu par LKB, Bromma, Suède (300 ml). La vitesse de passage est de 100 ml/heure.

On a dissous 15 g de la préparation de SPS-ase KRF 92 dans 450 ml de H₂O at 6°C et toutes les opérations indiquées ci-dessous ont été effectuées entre 6 et 10°C. On règle le pH à 7,0 au moyen de Tris 1 Molaire. La colonne a été équilibrée au moyen du tampon et on a ensuite introduit l'échantillon de SPS-ase dans la colonne. On a mesuré OD₂₈₀ et la conductivité de l'éluat; voir à la fig. 12. La fraction 1 correspond à l'éluat qui n'est pas lié à la substance d'échange d'ions. Ensuite la colonne a été lavée avec 2000 ml de tampon, ce qui donne la fraction 2. On a ensuite établi un gradient de NaCl 0-500 mMolaire ce qui donne les fractions 3 - 9. Les neuf fractions ont été concentrées à 200 ml et ont été dialysées

4

contre l'eau à une conductivité de 2mSi par dialyse (Hollow Fiber DP 2 de Amicon, Massachusetts, U.S.A.). Ensuite les neuf fractions ont été lyophilisées. Uniquement les fractions 1 et 2 présentaient une activité de SPS-ase.

5 La fraction 1 a été purifiée ultérieurement par une filtration sur gel. On a dissous 1,5 g de la fraction 1 dans 10 ml d'acétate de sodium 50mMolaire ayant un pH de 4,5 (KCl 500 mM). La colonne est une colonne de 2,5 x 100 cm de LKB. La substance servant à la filtration sur
10 gel est le Sephacryl S-200 de Pharmacia, Suède. La vitesse de passage est de 30 ml/heure. Les fractions contenant des substances ayant un poids moléculaire compris entre 70.000 et 100.000, calibrées avec des protéines globulaires, contenaient un complexe d'enzymes désigné par facteur G qui
15 ne peut décomposer le SPS lorsque l'on pratique l'essai suivant le test qualitatif d'agar.; cependant, le SPS est décomposé suivant le test qualitatif d'agar lorsque l'on mélange le facteur G avec une pectinase. On a trouvé que le facteur G est capable de séparer le galactose, le
20 fucose et certains acides galacturoniques du SPS ; mais le produit de décomposition principal suivant l'analyse HPLC est un produit à poids moléculaire élevé ressemblant très fort au SPS.

25 PARTIE 9.

DEPENDANCE DE L'ACTIVITE A L'EGARD DU pH ET DE LA TEMPERATURE ET STABILITE D'UNE SPS-ASE

La fig. 13 montre l'activité en fonction du pH de la préparation de SPS-ase KRF 68. De pH 2,7 à 3,5 on
30 a utilisé un système de tampon à l'acide formique et de pH 3,7 à 5,5 on a utilisé un système de tampon à l'acétate.

La fig. 14 montre l'activité en fonction de la température de la préparation de SPS-ase KRF 68.

La fig. 15 montre la stabilité thermique de la
35 préparation de SPS-ase KRF 68.

sh

PARTIE 10

DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

Le tableau repris ci-dessous donne un aperçu des différentes déterminations de l'activité enzymatique 5 relevant de la présente invention.

Définition de l'unité d'activité et description de la détermination de l'activité enzymatique					
10	Enzyme	Genre d'activité, désignation abrégée	Publique-ment disponible	Décrit plus loin dans ce mémoire	Référence
15	SPS-ase	SPS-ase		x	
	Solubi - lisant la rémanence	SRU	x		1
		SRUM-120		x	
	Protéase	HUT		x	
20	Cellulase	C _x	x		2
	Pectinase	PU	x		3
		PGE	x		4
		UPTE	x		5
25		PEE	x		6
	Hemicellu- lase	VHCU	x		7

Les références indiquées dans la dernière 30 colonne du tableau susmentionné sont détaillées dans le tableau suivant.

sh

		Les références peuvent être obtenues		
		de NOVO INDUSTRI A/S NOVO Allé, 2880 Bagsværd, Danemark	de Schweizerische Ferment AG Bâle, Suisse	dans une bibliothèque
5	Réf. N°	Identification de la référence		
	1	Analyseforskrift AF 154/4 du 01-12-1981	x	
10	2	Analytical Biochemistry, 84, 522 à 532 (1978)		x
		Analytical method AF 149/6-GB du 25-05-1981	x	
15	3	Détermination of Pectinase Activity with Citrus Pectin (PU) du 23-03-1976	x	
	4	Viskosimetriscche Polygalacturonase-Bestimmung (PGE) du 10-11-1977	x	
20	5	Bestimmung der Pectintranseliminase (UPTE/g) du 24-09-1975	x	
	6	Determination of the Pectinesterase activity (non daté) portant les initiales WJA/GW	x	
25	7	Analytical method AF 156/1-GB	x	

En ce qui concerne la détermination de l'activité de cellulase, il est à noter que l'analyse a été effectuée comme indiqué dans AF 149/6-GB et que les principes de détermination sont expliqués dans Analytical Biochemistry.

ok

A. DETERMINATION ENZYMATIQUE DE SPS-ASE.

La détermination enzymatique de SPS-ase est effectuée en deux étapes, c'est-à-dire un essai qualitatif sur plaque d'agar et une détermination quantitative de l'activité SPS-ase, basée sur la mesure de la quantité totale de sucres libérée. Si l'essai qualitatif sur plaque d'agar est négatif, l'activité SPS-ase est nulle quelle que soit la valeur provenant de la détermination quantitative de l'activité en SPS-ase. Si l'essai qualitatif sur plaque d'agar est positif, l'activité en SPS-ase est égale à la valeur provenant de la détermination quantitative de l'activité en SPS-ase.

I. Essai qualitatif sur plaque d'agar.

On a préparé une plaque de SPS-agar de la manière suivante. On a préparé un tampon (B) en amenant de l'acide acétique 0,3 M à pH 4,5 au moyen de NaOH 1N. On dissout 1 g de SPS dans 20 ml de B. On mélange 1 g d'agarose (HSB Litex) avec 80 ml de B et on chauffe jusqu'au point d'ébullition en agitant. Lorsque l'agarose est dissoute, la solution de SPS est lentement ajoutée. La solution qui en résulte à 1 % SPS-agarose est disposée dans un bain d'eau à 60°C. Les plaques sont ensuite coulées en versant 15 ml de la solution à 1 % de SPS-agarose sur une plaque en verre horizontale ayant les dimensions de 10 cm x 10 cm. Ensuite on estampe 9 "puits" dans la couche solidifiée de SPS-agarose à une distance de 2,5 cm. Dans chaque puits on introduit 10 µl d'une solution à 1 % de la protéine d'enzyme à tester en ce qui concerne l'activité en SPS-ase. On fait incuber la plaque pendant 18 heures à 50°C et à une humidité relative de 100 %. Ensuite le SPS non encore décomposé est précipité par une solution à parts égales en volumes d'éthanol et d'acétone. L'essai de la SPS-ase sur plaque d'agar est positif pour un échantillon placé dans un puits spécifique si une zone

annulaire claire apparaît autour de ce puits.

II. DETERMINATION QUANTITATIVE DE L'ACTIVITE DE SPS-ase

Le but de cet essai est de déterminer les activités enzymatiques qui sont capables de décomposer le SPS d'une telle façon, que les produits de décomposition présentent une affinité à l'adsorption ou à la liaison de protéine de soja fortement réduite ou ne présentent pas d'affinité à l'adsorption ou à la liaison de protéine de soja. Des essais ont montré que la partie des produits de décomposition de SPS qui n'est pas précipitée par le mélange de parts égales en volumes d'eau et d'éthanol ne présente aucune affinité à l'adsorption ou à la liaison à la protéine de soja.

La détermination de la SPS-ase est basée sur une hydrolyse du SPS dans des conditions standard suivie par une précipitation de la partie de SPS qui n'a pas été hydrolysée par l'éthanol. Après la précipitation, la teneur en hydrate de carbone qui n'est pas précipitée est déterminée par une analyse quantitative pour le sucre total (suivant AF 169/1, disponible chez NOVO INDUSTRIE A/S, 2880 Bagsvaerd).

Les conditions standard sont :

Température : 50°C

pH : 4,5

Temps de réaction : contrôle pendant 210 minutes uniquement avec le substrat, suivi par 2 minutes l'enzyme étant additionnée.

Temps de réaction : valeur principale 212 minutes

L'équipement comprend :

Bain d'eau agité thermostatisé à 50°C.

Agitateur Whirlimixer

Centrifugeuse

Un bain d'eau glacé.

Les réactifs comprennent :

Tampon : acide acétique 0,6 M dans l'eau

sk

déminéralisée (a) et NaOH 1,0 M (b).

Substrat : la valeur pH de 50 ml de a est
 réglée à 4,5 au moyen de b, ensuite
 on ajoute 4,0 g de SPS et après dissolution de celui-ci, le pH est réglé
 une nouvelle fois à 4,5 et le volume
 est porté à 100 ml au moyen d'eau
 désionisée.

Réactif d'arrêt : Ethanol absolu.

Une unité d'activité SPS-ase (SAE ou SPSu) est
 définie comme l'activité SPS-ase qui libère
 une quantité d'hydrate de carbone soluble dans de
 l'éthanol à 50 % équivalente à 1 mole de galactose par
 minute, dans les conditions standard susmentionnées.

Même si la partie initiale de la courbe standard
 de l'enzyme est une ligne droite, il faut noter qu'elle
 n'intersecte pas le point (0,0).

B. DETERMINATION ENZYMATIQUE DE L'ACTIVITE SOLUBILISANT LA REMANENCE EXPRIMEE EN SRUM 120.

Principe.

Dans le procédé pour la détermination de l'activité d'hydrolyse, la partie insoluble de la farine de soja dégraissée, déprotéinisée et décortiquée est hydrolysée dans des conditions standard. La réaction de l'enzyme est arrêtée avec un réactif d'arrêt et la fraction insoluble est séparée par filtration. La quantité de polysaccharides dissous est déterminée par spectrophotométrie après une hydrolyse acide suivant AF 169/1, disponible chez Novo Industri A/S, 2880 Bagsværd.

Les carbohydrases présentant une activité endo ainsi que celles présentant une activité exo sont déterminées suivant le procédé.

Le substrat faisant partie de cette détermination enzymatique est identique au substrat de la rémanence décrit pour la méthode SRU. Le substrat est

14

dissous sous forme d'une solution à 3 % dans le tampon au citrate indiqué ci-dessous :

Tampon au citrate-phosphate 0,1 N de pH 4,5

5,24 g d'acide citrique-monohydraté (Merck Art 244)

- 5 8,12 g d'hydrogène-phosphate disodique bihydraté (Merck Art 6580)

Amené à 1 litre par de l'eau déminéralisée
pH 4,5 \pm 0,05

Stable pendant 14 jours.

- 10 Le réactif d'arrêt présente la composition suivante :

100 ml de NaOH 0,5 N

200 ml d'éthanol à 96 %

A garder dans un réfrigérateur jusqu'au moment de l'utilisation.

- 15 Conditions standard :

Temperature : 50 °C

pH : 4,5

Temps de réaction, échantillon : 120 minutes

" " , à blanc : 5 minutes

- 20 Définition de l'unité :

Une unité d'activité solubilisante la rémanence de soja (SRUM) 120 (M pour manuel) correspond à la quantité d'enzyme qui, dans les conditions de réaction données, libère, par minute, des polysaccharides solubilisés

- 25 équivalant à une micro-mole de galactose.

C. DETERMINATION ENZYMATIQUE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

MESURE HUT

Procédé pour la détermination de protéinase dans un milieu acide.

- 30 Le procédé est basé sur la digestion d'hémoglobine dénaturée par l'enzyme à 40°C, à pH 3,2, pendant 30 minutes. L'hémoglobine non digérée est précipitée au moyen d'acide trichloracétique à 14 % (poids/volume).

- 35 Tous les échantillons d'enzymes sont préparés en dissolvant celles-ci dans un tampon acétate 0,1M,

04

à pH 3,2.

Le substrat d'hémoglobine est préparé en utilisant 5,0 g de poudre d'hémoglobine bovine lyophilisée, conservée avec du Thiomersalate à 1 % et 100 ml d'eau
5 déminéralisée qui est agitée pendant 10 minutes, avant de régler le pH à 1,7 au moyen de HCl 0,33 N.

Après une agitation ultérieure de 10 minutes, on règle le pH à 3,2 au moyen de NaOH 1N. Le volume de cette solution est porté à 200 ml au moyen d'un tampon
10 acétate 0,2 M. Ce substrat d'hémoglobine doit être refroidi pour être gardé pendant 5 jours.

Le substrat d'hémoglobine est porté à température ambiante. Au temps zéro, 5 ml du substrat sont introduits dans une éprouvette contenant 1 ml d'enzyme. Après
15 agitation d'une seconde, l'éprouvette est mise dans un bain d'eau à 40°C pendant 30 minutes. Après exactement 30 minutes, on ajoute 5 ml d'acide trichloroacétique à 14 % dans l'éprouvette, qui est ensuite agitée et portée à température ambiante pendant 40 minutes.

Pour l'essai à blanc, le substrat d'hémoglobine est porté à température ambiante. Au temps zéro, on ajoute 5 ml du substrat dans l'éprouvette contenant 1 ml d'enzyme. Après une agitation d'une seconde,
20 l'éprouvette est mise dans un bain d'eau à 40°C pendant 5 minutes. Après exactement 5 minutes, on ajoute 5 ml d'acide trichloroacétique à 14 % dans l'éprouvette, qui est ensuite agitée et portée à température ambiante pendant 40 minutes.

Après 40 minutes, les essais à blanc et les
30 échantillons sont agités, filtrés une ou deux fois à travers un filtre Berzelius N° 0, et disposés dans un spectrophotomètre. L'échantillon est lu par rapport à l'essai à blanc à 275 nm en ajustant le spectrophotomètre par rapport à de l'eau.

35 Etant donné que l'absorbance de la tyrosine à

275 nm est un facteur connu, il n'est pas nécessaire d'établir une courbe standard de tyrosine à moins qu'il ne soit nécessaire de contrôler le spectrophotomètre de Beckman.

Calculs:

- 5 1 HUT est la quantité d'enzyme qui forme, en une minute, un hydrolisat équivalent en ce qui concerne l'absorbance à 275 nm à une solution de 1,10 microgramme/ml de tyrosine dans du HCl 0,006 N. Cette valeur de l'absorbance est de 0,0084. La réaction s'effectue à 40°C, à pH 3,2, et
10 pendant 30 minutes.

$$\text{HUT} = \frac{\text{Echantillon à blanc}}{0,0084} \times \frac{\text{Volume en ml}}{\text{temps de réaction en mn.}}$$

$$\text{HUT} = \frac{\text{Echantillon à blanc}}{0,0084} \times \frac{11}{30} = (E-B) \times 43,65$$

$$\text{HUT/g enzyme} = \frac{(E-B) \times 43,65}{\text{g enzyme dans 1 ml}}$$

- 15 Un essai pour déterminer la dépendance de la stabilité du pH de la protéase dans le KRF 68, effectué au moyen d'une analyse HUT avec des valeurs de pH de 2,0 à 8,0, a montré que la stabilité de la protéase à pH supérieur à 8,0 est très faible, cfr. fig. 16.

- 20 Dans le but de mieux illustrer la présente invention, on se réfèrera aux exemples 1 à 8 suivants, dans lesquels l'exemple 1 illustre la production d'une SPS-ase et dans lesquels les exemples 2 à 8 illustrent l'application de SPS-ase à une substance brute à base de soja afin de
25 produire une protéine végétale purifiée. D'autres applications de SPS-ase sont indiquées dans ladite partie entre l'exemple 8 et le tableau récapitulatif des figures.

- On a effectué, à l'échelle de laboratoire, différentes fermentations avec les souches de Asp. aculeatus et
30 Asp. japonicus, indiquées ci-dessus. Ainsi on a obtenu des préparations qui contenaient de la SPS-ase suivant l'essai de SPS-ase indiqué ici. Cependant, comme on doit disposer de quantités assez grandes en SPS-ase dans le but d'effectuer des essais d'application, on effectue des fermentations similaires à l'échelle
35 d'une installation pilote, cfr. exemple 1 suivant.

24

Exemple 1

Production d'une SPS-ase à l'échelle d'une installation pilote.

On a préparé une SPS-ase par fermentation
5 submergée d'Aspergillus aculeatus CBS 101.43.

On a préparé un substrat d'agar présentant la composition suivante dans un flacon Fernbach :

	Peptone Difco	6 g
	Aminoline Ortana	4 g
10	Glucose	1 g
	Extrait de levure Difco	1 g
	Extrait de viande Difco	1,5 g
	KH ₂ PO ₄ Merck	20 g
	Extrait de malt Evers	20 g
15	H ₂ O déminéralisée jusqu'à	1000 ml

On a réglé le pH à une valeur entre 5,30 et 5,35.

Ensuite on a ajouté 40 g d'agar Difco et on a maintenu le mélange dans un autoclave pendant 20 minutes à 120°C (le substrat est dénommé E-agar).

20 La souche CBS 101.43 a été cultivée sur un plan incliné de E-agar (37°C). Les spores du plan incliné ont été mis en suspension dans du lait écrémé stérilisé et la suspension a été lyophilisée dans des fioles. La teneur d'une fiole lyophilisée a été transvasée dans un flacon de
25 Fernbach. Le flacon a ensuite été soumis à une incubation pendant 13 jours à 30°C.

On a préparé un substrat ayant la composition suivante, dans un réservoir de fermentation de 500 litres :

	CaCO ₃	1,2 kg
30	Glucose	7,2 kg
	Rofec (matière sèche	
	d'une liqueur de maïs)	3,6 kg
	Huile de soja	1,2 kg

On a ajouté de l'eau de robinet jusqu'à un volume
35 total d'environ 240 litres. On a réglé le pH à environ 5,5 avant d'ajouter du CaCO₃. On a stérilisé le substrat dans

le fermentateur d'inoculation pendant une heure à 121°C.
Le volume final avant inoculation était d'environ 300 litres.

La suspension de spores dans le flacon de
5 Fernbach a été transférée dans le fermentateur d'inoculation. Les conditions de fermentation de l'inoculat étaient :

Type de fermentateur : Réservoir de fermentation classique aéré et agité présentant un rapport hauteur/diamètre d'environ 2,3.

- 10 Agitation : 300 tours/minute (2 hélices de turbine)
Aération : 300 litres N'd'air/minute
Température : 30 à 31 °C
Pression : 0,5 atmosphère relative
Temps ; Environ 28 heures.

15 Environ 28 heures après l'inoculation, on a transféré 150 litres du fermentateur d'inoculation vers le réservoir de fermentation principal.

On a préparé un substrat ayant la composition suivante dans un réservoir de fermentation principal de

20 2500 litres :

Farine de soja grillée : 90 kg
KH₂PO₄ : 20 kg
Pluronic ® : 150 ml.

On a ajouté de l'eau de robinet à un volume total
25 d'environ 900 l. La farine de soja grillée a été mise en suspension dans l'eau. On a réglé le pH à 8,0 au moyen de NaOH et on a augmenté la température à 50°C. Ensuite on a ajouté environ 925 unités Anson d'ALCALASE ® 0,6 L à la suspension. On a maintenu le mélange pendant 4 heures à
30 50 °C et à pH 8,0 (addition de Na₂CO₃) sans aération, sous une pression relative de zéro atmosphère relative et une agitation à raison de 100 tours/minute. Ensuite on a ajouté les composants restants de substrat et on a réglé le pH à environ 6 au moyen d'acide phosphorique. On a
35 stérilisé le substrat dans le réservoir de fermentation

principal pendant 1 1/2 heure à 123°C. Le volume final avant inoculation était d'environ 1080 litres.

Ensuite on a ajouté 150 litres de culture d'inoculation.

5 Les conditions de fermentation sont :

Type de fermentateur : Réservoir de fermentation classique aéré et agité présentant un rapport hauteur/diamètre d'environ 2,7.

Agitation : 250 tours/minute (2 hélices de turbine)

10 Aération : 1200 lN d'air/minute

Température : 30 °C

Pression : 0,5 atmosphère relative

Temps : environ 151 heures.

A partir de 24 heures de fermentation jusqu'à 15 environ 116 heures de fermentation on a ajouté une solution de pectine de manière aseptique au réservoir de fermentation principal à raison d'une vitesse constante d'environ 8 litres par heure. La solution de pectine ayant la composition suivante a été préparée dans un réservoir de 20 dosage de 500 litres.

Pectin genu * : 22 kg

Acide phosphorique concentré : 6 kg

Euronic ® : 50 ml

* Genu pectin (du genre citrus NF de "The Copenhagen 25 pectin factory Ltd").

On a ajouté de l'eau de robinet à un volume total d'environ 325 litres. Le substrat a été stérilisé dans un réservoir de dosage pendant 1 heure à 121°C. Le volume final avant le début du dosage était d'environ 360 litres. 30 Lorsque cette partie a été épuisée, on a préparé une autre partie similaire. Le volume total de la solution de pectine pour une fermentation était d'environ 725 litres.

Après environ 151 heures de fermentation on a arrêté le processus de fermentation. Le bouillon de 35 culture d'environ 1850 litres a été refroidi à environ 5°C

sh

et on a récupéré les enzymes selon la technique suivante.

Le bouillon de culture a été filtré sur un filtre tambour sous vide (Dorr Oliver), qui était enrobé d'une terre de diatomées Hy-flo-super-cel (adjuvant de
5 filtration). Le filtrat a été concentré par évaporation à environ 15 % du volume du bouillon de culture. Le concentré a été filtré sur une feuille de filtre Seitz (type supra 100) comportant 0,25 % de Hy-flo-super-cel à titre d'adjuvant de filtration (dénommé filtration I dans
10 le tableau suivant). Le filtrat a été précipité au moyen de 561 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /l à un pH de 5,5 et on a ajouté 4 % de terre de diatomée Hy-flo-super-cel à titre d'adjuvant de filtration. Le précipité et l'adjuvant de filtration sont séparés par filtration sur un filtre à cadre. Le
15 gâteau de filtre est dissous dans de l'eau et les fractions insolubles sont séparées par filtration sur un filtre à cadre. Le filtrat est soumis à un essai de filtration sur une feuille filtrante Seitz (de type supra 100) avec 0,25 % de Hy-flo-super-cel à titre d'adjuvant de filtra-
20 tion (dénommé filtration II dans le tableau suivant). Le filtrat a été soumis à une diafiltration dans un appareil d'ultrafiltration. Après diafiltration, le liquide est concentré jusqu'à une teneur en matière sèche de 12,7 % (dénommée, dans le tableau suivant, teneur en matière sèche
25 du concentré).

Un traitement de base facultatif pour éliminer partiellement l'activité de protéase peut être effectué à cette étape. Dans le cas d'un traitement de base, celui-ci est effectué à un pH de 9,2 pendant une heure, le pH étant
30 ensuite réglé à 5,0.

Ensuite le liquide est soumis à une filtration d'essai et filtré dans le but d'une réduction de germes et le filtrat est lyophilisé dans un équipement de lyophilisation de Stokes.

35 On a effectué quatre fermentations de la manière

sh

indiquée ci-dessous; la souche utilisée pour la fermentation, l'utilisation facultative d'un traitement de base et d'autres paramètres variant, comme indiqué dans le tableau suivant.

5

Microorganisme	Traitement de base		Code de Préparation	Concentration (%) de l'adjuvant de filtration pour :			Teneur en matière sèche du concentré	Remarques
	utilisé	non utilisé		filtration I	précipitation	filtration II		
10 CBS 101.43		x	KRF 68	0,5	5	0,2	28	
ATOC 20236		x	KRF 74	2,0	4	0,4	7,5	
IFO 4408		x	KRF 83	1,0	5	0,25	12,4	x
CBS 101.43	x		KRF 92	0,25	4	0,25	12,7	

- 15 x Après filtration de réduction des germes, le filtrat est concentré par évaporation en un rapport de 1:2,3. Une faible partie du filtrat concentré a été séchée par pulvérisation et la partie restante a été lyophilisée.

Afin de réduire encore plus l'activité de protéase, certaines préparations indiquées ci-dessus sont
20 traitées comme indiqué ci-dessous, en n'utilisant qu'une des trois possibilités A, B, ou C.

A. On dissout 100 g de préparation de SPS-ase dans un litre d'eau désionisée en agitant à $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$. On règle le pH à 9,1 au moyen de NaOH 4N. Ce traitement de
25 base est effectué pendant une heure. On règle ensuite le pH à 4,5 au moyen d'acide acétique glacial et on dialyse en opposition à l'eau désionisée glaciale à une conductivité de 3 mSi. Ensuite on effectue la congélation et la lyophilisation.

30 B. On dissout une préparation de 500 g de SPS-ase dans 4 litres d'eau désionisée en agitant à $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. On règle le pH à 9,1 au moyen de NaOH 4N. Ce traitement de base est effectué pendant une heure. On règle ensuite le pH à 5,0 au moyen d'acide acétique glacial. La
35 substance obtenue est lyophilisée.

sh

C. On dissout 50 g d'une préparation de SPS-ase dans 400 ml d'eau désionisée en agitant à $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. On règle le pH à 9,1 au moyen de NaOH 4 N. Ce traitement de base est effectué pendant une heure. Ensuite on règle le pH à 5,7 au moyen d'acide acétique glacial. La substance 5 obtenue est lyophilisée.

10	Préparation de SPS-ase en tant que substance de départ pour le traitement de base	Traitement de base utilisé			Code de la préparation
		A	B	C	
	KRF 68	x			KRF 68 BII
	KRF 68		x		KRF 68 BIII
	KRF 92			x	KRF 92 BI

15 Les préparations indiquées ci-dessus sont caractérisées par leur activité des enzymes selon la présente invention dans le tableau suivant.

sk

000000

Activité enzymatique par g		KRF 68	KRF 68 BII	KRF 68 BIII	KRF 74	KRF 83	KRF 92	KRF 92BI
SAE	essai de plaque	+	+	+	-	+	+	+
	essai quantita- tif	350	301	349	0	168	476	430
SRU		737	507	481	142	683	626	757
SRUM ₁₂₀		2125	1560	1720	578	753	1640	1030
HUT ph 3,2		67000	105	339	1630	12800	5960	397
C _x		8000	8044	9396	1320	8040	5700	3092
PU		10300000	9000000	8800000	840000	7500000	8400000	7600000
PGE		119400	72000	77700	4100	64600	60000	68800
UPTE		78100	83700	76900	15130	327000	44000	62400
PEE		840	910	770	370	690	1000	790
VHCU		1600000	1100000	1000000	65000	2200000	1100000	742000

4

Exemple 2 (exemple d'application)

- Cet exemple décrit la fabrication de p.v.p. à partir de farine de soja dégraissée et décortiquée, "Sojamel 13" (disponible dans le commerce de Aarhus Oliefabrik A/S). La teneur en matière sèche de cette farine était de 94,0 % et la teneur en (N x 6,25) sur base des matières sèches était de 58,7 %. La farine de soja a été traitée avec les préparations de SPS-ase KRF 68 BII (exemple 1) de la manière suivante :
- 10 On a mis 85,29 g de la farine de soja en suspension et on a maintenu en agitation à 50°C dans 664,8 g d'eau et on a réglé le pH à 4,5 au moyen de 7,5 ml de HCl 6 N. On y a ajouté 50 g d'une solution contenant 4,00 g de ladite préparation de SPS-ase et on a ensuite agité le
- 15 mélange réactionnel pendant 240 minutes à 50°C. Le mélange a ensuite été centrifugé dans une centrifugeuse de laboratoire (modèle Beckman J-6B) pendant 15 minutes à 3000 x g. On a pesé le surnageant et on l'a analysé suivant la méthode de Kjeldahl afin de déterminer l'azote et les matières sèches.
- 20 La phase solide a ensuite été lavée avec un volume d'eau équivalent à la masse de surnageant obtenue lors de la première centrifugation. Cette opération a été effectuée deux fois. La phase solide a ensuite été lyophilisée, pesée et analysée suivant la méthode de Kjeldahl pour déter-
- 25 miner l'azote et les matières sèches chez Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, 8000 Aarhus C, Danemark. Ce laboratoire est agréé par l'Etat pour les analyses d'aliments pour bétail et des produits laitiers. Les résultats obtenus apparaissent dans le tableau 2.1 :

4

Tableau 2.1 Résultats obtenus

Composant	Masse g	N x 6,25 %	Matière sèche, %	Rendement en pro- téine, %	Rendement en matières sèches, %
5 Farine de soja	85,2	55,2	94,0	100 %	100 %
Préparation de SPS - ase	4,00	75,6	-	6,4%	-
1. Produit de centrigugation p.v.p.	66,6 44,5	1,50 87,5	5,04 95,7	21,2% 82,7%	42,0 % 53,2 %

10

On a donc obtenu une p.v.p. présentant une pureté de protéine, c'est-à-dire N x 6,25 sur base des matières sèches, de 91,4 % et avec un rendement total en protéine de 83 %.

15 Exemple 3 (exemple d'application)

Cet exemple a été effectué afin de comparer les rendements en protéine, la qualité nutritive et certaines propriétés fonctionnelles de produits à base de protéine de soja préparés suivant les trois techniques suivantes :

- 20 A: La précipitation isoélectrique classique pour la préparation d'un isolat de protéine de soja.
- B: Le lavage isoélectrique classique pour la préparation de concentré de protéine de soja.
- 25 C: Le lavage isoélectrique suivant l'invention comportant une enzyme solubilisant la rémanence, pour la préparation d'une p.v.p.

Afin de créer une comparaison valable du procédé de l'invention (C) avec les procédés classiques de prépara-
 30 tion de protéine de soja (A et B), on a utilisé la même substance brute dans les trois cas. De même, les essais ont été effectués de telle manière que les températures correspondantes et les durées de traitement soient les mêmes dans les trois cas. Uniquement les valeurs de pH
 35 étaient différentes étant donné les différences

21

fondamentales entre les trois essais.

A. La précipitation isoélectrique classique pour la
préparation d'un isolat de protéine de soja.

On a extrait 425,8 g de farine de soja (Sojamel
5 13 produit par Aarhus Oliefabrik A/S) dans 3574,2 g d'eau
de robinet à 50°C. On a réglé le pH à 8,0 avec 20,1 g de
NaOH 4 N. Après une agitation d'1 heure, on a centrifugé
la suspension à 3000 x g pendant 15 minutes en utilisant
quatre bechers d'1 litre dans une centrifugeuse de laboratoire
10 (modèle Beckman J-6B). Le produit de centrifugation I et
le précipité I ont été pesés. Le précipité I a été soumis
à une nouvelle extraction avec de l'eau jusqu'à atteindre
un poids total de 4000 g. On a maintenu la
température à 50°C, on a réglé le pH à 8 au moyen de NaOH
15 4 N et on a agité la suspension pendant 1 heure. On a
effectué la centrifugation et le pesage du produit de
centrifugation II et du précipité II comme décrit ci-dessus.
On a retiré des échantillons des produits de centrifugation
I et II et du précipité II pour les analyses suivant
20 Kjeldahl et pour la mesure des matières sèches. Ensuite,
les produits de centrifugation I et II ont été agités et
maintenus à 50°C. La protéine a ensuite été précipitée
isolélectriquement à pH 4,5 au moyen de 45 g de HCl 6 N.
Après une agitation d'1 heure à 50°C, on a récupéré la
25 protéine par centrifugation à 3000 x g pendant 15 minutes.
Le produit de centrifugation III a été pesé et analysé
pour les déterminations Kjeldahl-N et les mesures de
matière sèche. La phase solide III a été pesée et lavée
à l'eau en une quantité correspondant au poids du produit
30 de centrifugation I. Le lavage a été effectué en agitant
pendant 1 heure à 50°C. La protéine lavée a été récupérée
par centrifugation à 3000 x g pendant 15 minutes. Le
produit de centrifugation IV et la phase solide IV ont été
pesés. Le produit de centrifugation IV a été analysé pour
35 la détermination de Kjeldahl-N et pour la mesure des

matières sèches. La phase solide a été mise en suspension dans 1550 g d'eau à 50°C et on a réglé le pH à 6,5 au moyen de 17 g de NaOH 4 N. Le mélange a été maintenu en agitation pendant 1 heure et on a de nouveau réglé le pH à 6,5, si nécessaire. Finalement, le produit a été lyophilisé, pesé et analysé pour la détermination suivant Kjeldahl-N et pour la mesure des matières sèches. Les calculs de bilan massique sont représentés au tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Calculs du bilan massique de la précipitation isolélectrique classique pour la préparation d'un isolat de protéine de soja.

Opérations et fractions	Masse de fraction g	Protéine % (N x 6,25)	Matière sèche, %	Rendement en protéine, %	Rendement en matière sèche, %
Extraction: Farine de soja	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
Eau	3574,2	0	0	0	0
NaOH 4 N	20,1	0	16,0	0	0,8
1. Centrifugation: Σ	4020,1	5,9	10,0	100,9	100,4
Centrifugat I	3141,0	4,4	6,9	58,8	54,1
Précipité I	805,0	-	-	-	-
Réextraction:					
Précipité I	805,0	-	-	-	-
Eau	3195,0	0	0	0	0
2. Centrifugation:					
Centrifugat II	3104,0	0,5	0,9	6,6	7,0
Précipité II	820,0	9,1	17,2	31,7	35,2
Agitation et acidification					
Centrifugats I+II	6245,0	-	-	-	-
HCl 6 N	45,0	0	21,3	0	2,4
3. Centrifugation: Σ	6290,0				
Centrifugat III	5650,0	0,3	1,9	7,2	26,8
Précipité III	308,0	-	-	-	-
Lavage:					
Précipité III	308,0	-	-	-	-
Eau	3141,0	0	0	0	0
4. Centrifugation: Σ	3449,0				
Centrifugat IV	3113,0	0,04	0,15	0,5	1,2
Précipité IV	291,0	-	-	-	-
Neutralisation:					
Précipité IV	291,0	-	-	-	-
Eau	1550,0	0	0	0	0
NaOH 4 N	17,0	0	16,0	0	0,7
Séchage : poudre	128,0	93,8	96,3	51,1	30,8

B. Lavage isoélectrique pour la préparation d'un concentré de protéine de soja.

On a lavé 425,6 g de farine de soja (Sojamel 13 produit par Aarhus Oliefabrik A/S) dans 3574 g d'eau à 50° C. On a réglé le pH à 4,5 au moyen de 44,8 g de HCl 6 N. On a effectué le lavage pendant 4 heures en agitant. La suspension a ensuite été centrifugée à 3000 x g pendant 15 minutes dans une centrifugeuse de laboratoire (modèle Beckman J-6B) utilisant 4 bechers d'1 l. Le produit de centrifugation I a été pesé et analysé pour les déterminations suivant Kjeldahl-N et la mesure des matières sèches. La phase solide I a été pesée et lavée une nouvelle fois à l'eau jusqu'à un poids total de 4000 g. Le pH a de nouveau été réglé à 4,5 au moyen de 1,7 g de HCl 6N et on a maintenu la suspension sous agitation pendant 30 minutes à 50°C. On a effectué une centrifugation et une pesée du produit de centrifugation II et des solides II comme précédemment. La phase solide II a été remise en suspension dans 1575 g de H₂O à 50° C et on a réglé le pH à 6,5 au moyen de 34,5g de NaOH 4 N; On a maintenu le mélange sous agitation à 50° C pendant une heure et on a de nouveau réglé le pH à 6,5, si nécessaire. Finalement le produit de protéine a été lyophilisé, pesé et analysé suivant Kjeldahl-N et pour la mesure des matières sèches. Le bilan massique est représenté dans le tableau 3.2.

21

Tableau 3.2.: Calculs du bilan massique du lavage isoélectrique pour la préparation d'un concentré de protéine de soja.

	Opérations et fractions	Masse de la fraction, g	Protéine % (Nx6,25)	Matière sèche, %	Rendement en protéines	Rendement en mat. sèche, %
5	Lavage:					
	farine de soja	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
	eau	3574,0	0	0	0	0
	HCl 6N	44,8	0	21,3	0	2,4
10	1.Centrifugation: Σ	4044,6	-	-	-	-
	Centrifugat I	3150,0	0,6	3,2	8,0	25,2
	Solides I	846,0	-	-	-	-
	Nouveau lavage:					
	Solides I	846,0	-	-	-	-
	eau	3154,0	0	0	0	0
	HCl 6N	1,7	0	21,3	0	0,1
15	2.Centrifugation: Σ	4001,7	-	-	-	-
	Centrifugat II	3130,0	0,1	0,4	1,3	3,2
	Solides II	863,0	-	-	-	-
	Neutralisation:					
	Solides II	863,0	-	-	-	-
	eau	1575,0	0	0	0	0
	NaOH 4N	34,5	0	16,0	0	1,4
20	Séchage: poudre	281,0	72,5	98,4	86,7	69,1

C. Lavage isoélectrique comprenant une enzyme solubilisant la rémanence, pour la préparation d'une p.v.p.

On a lavé 425,8 g de farine de soja (Sojamel 13 produit par Aarhus Oliefabrik A/S) dans 3524,2 g d'eau à 25 50°C. On a réglé le pH à 4,5 en utilisant 43,7 g de HCl 6 N. On a dissous 24 g de la préparation SPS-ase, KRF 68 BIII (exemple 1) dans 26 g d'eau et on l'a ajoutée au mélange de lavage. On a ensuite effectué le lavage pendant 4 heures sous agitation. On a ensuite effectué la purification comme décrit dans l'essai B, les quantités de HCl 6N, de NaOH 4 N et d'eau pour la nouvelle suspension étant les seuls paramètres présentant des valeurs différentes. Le bilan massique est représenté dans le tableau 3.3.

4

Tableau 3.3.: Calcul du bilan massique du lavage isoélectrique comportant une enzyme solubilisant la rémanence pour la préparation d'une p.v.p.

	Opérations et fractions	Masse de fraction g	Protéine % (N x 6,25)	Matière sèche, %	Rendement en protéine %	Rendement en matière sèche, %
5	Lavage					
	farine de soja	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
	eau	3540,2	0	0	0	0
	HCl 6N	43,7	0	21,3	0	2,3
	SPS-ase: KRF 68 BIII	24,0	75,3	96,0	7,7	5,8
10	1. Centrifugation: Σ	4043,7	-	-	-	-
	Centrifugat I	3420,0	1,7	5,2	24,7	44,4
	Solides I	620,0	-	-	-	-
	Nouveau lavage:					
	Solides I	620,0	-	-	-	-
	eau	3380,0	0	0	0	0
	HCl 6N	1,3	0	21,3	0	0,1
15	2. Centrifugation: Σ	4001,3				
	Centrifugat II	3400,0	0,2	0,6	2,9	5,1
	Solides II	577,0	-	-	-	-
	Neutralisation:					
	Solides II	577,0	-	-	-	-
	eau	1700,0	0	0	0	0
	NaOH 4N	25,3	0	16,0	0	1,0
20	séchage: poudre	211,0	87,3 ¹⁾ 86,9 ²⁾	98,7 ¹⁾ 97,0 ²⁾	78,2	51,1

1) Analysé par Biotechnisk Institut, Holbersvej 10, DK-6000 Kolding, Danemark

25 2) Analysé par Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, DK-8000, Aarhus C, Danemark

Propriétés nutritives

Les compositions en acides aminés des trois produits de protéine ont été déterminées, voir tableau 3.4. La teneur totale en acides aminés essentiels, la teneur chimique et l'indice d'acides aminés essentiels (EAAI) sont calculés en utilisant le document de référence FAO de 1957.

La teneur en inhibiteur de trypsine des trois produits a été déterminée au moyen de la méthode décrite dans A.O.C.S. Tentative Method Ba 12-75 (A.O.C.S. est une

54.

abréviation pour American Oil Chemists' Society). Les résultats sont représentés dans le tableau 3.5 qui comporte également les rendements et le rapport protéine/matière sèche des trois produits.

5 **Tableau 3.4.:** Composition d'acides aminés et évaluation nutritive des trois produits de protéine A, B, et C

Acide aminé	A. Isolat de protéine de soja		B. Concentré de protéine de soja		C. Isolat de protéine de soja (p.v.p.)	
	g/16g N	aas ¹⁾	g/16 g N	aas ¹⁾	g/16 g N	aas ¹⁾
10 Non-essentiels:						
Acide aspartique	12,4	-	11,3	-	11,9	-
Sérine	4,62	-	4,69	-	4,81	-
Acide glutamique	21,3	-	18,2	-	17,7	-
Proline	6,07	-	5,19	-	4,76	-
Glycine	4,13	-	4,26	-	4,33	-
15 Alanine	3,54	-	4,27	-	4,55	-
Histidine	2,83	-	2,78	-	2,50	-
Arginine	8,09	-	7,57	-	7,04	-
Essentiels :						
Isoleucine	4,87	> 100	4,97	> 100	5,19	> 100
Leucine	7,80	> 100	7,98	> 100	8,09	> 100
Lysine	6,24	> 100	6,09	> 100	5,57	> 100
20 Phénylalanine	5,47	> 100	5,35	> 100	5,17	> 100
Tyrosine	3,38	> 100	3,88	> 100	4,44	> 100
Cystine	1,29	64,5	1,32	66,0	1,44	72,0
Méthionine	1,08	49,1	1,21	55,0	1,31	59,5
Thréonine	3,10	> 100	3,60	> 100	3,97	> 100
Tryptophane	1,06	75,7	1,37	97,9	1,32	94,3
Valine	4,90	> 100	5,23	> 100	5,57	> 100
25 Teneur totale en acides aminés essentiels %	38,36		41,31		42,21	
Teneur chimique	56,4 %		60,2 %		65,5 %	
EAAI	86,7 %		90,2 %		91,3 %	

30 ¹⁾ aas = teneur en acides aminés (amino acid score) basée sur le document de référence FAO de 1957.

24

Tableau 3.5.: Caractéristiques du processus et teneur en inhibiteur de trypsine des trois produits de protéine A, B et C

5			A. Isolat de protéine de soja	B. Concentré de protéine de soja	C. Isolat de protéine de soja (p.v.p)
	Caractéristiques du processus	Protéine dans matière sèche	97,4 %	73,7 %	90,0 %
10		Rendement en Protéine	51,1 %	86,7 %	78,2 %
	Inhibiteurs de trypsine TUI/g		34.000	21.000	19.000
15	Protéine TUI/g		36.250	28.970	21.810

Propriétés fonctionnelles

L'indice de solubilité de l'azote (NSI:

20 Nitrogen solubility index) a été déterminé respectivement, dans une dispersion de protéine à 1 % à pH 7,0 dans NaCl 0,2M et dans l'eau distillée. Après avoir agité pendant 45 minutes au moyen d'un agitateur magnétique, on a centrifugé la suspension à 4000 x g pendant 30 minutes et on a analysé

25 le surnageant pour déterminer l'azote. La solubilité de l'azote a été calculée comme le rapport : % N soluble / % N total. Les résultats de cette détermination effectuée sur les trois produits sont représentés dans le tableau 3.6

La capacité d'émulsification a été déterminée

30 trois fois sur chaque produit par un titrage de Swift légèrement modifié. 4,0 g de (N x 6,25) du produit ont été mélangés dans 250 ml de NaCl 0,5 M au moyen d'un agitateur Sorval Omnimixer à vitesse lente. On a transféré 50 ml de la suspension dans un récipient mélangeur en verre et on y

35 a ajouté 50 ml d'huile de soja. Le mélange total a ensuite été pesé. Le mélange huile-eau a ensuite été homogénéisé

sh

à 10.000 tours/minute, le récipient étant disposé dans un bain de glace. On a ajouté une quantité supplémentaire d'huile de soja à une vitesse de 0,3 ml par seconde jusqu'à ce que l'émulsion s'effondre. La quantité totale d'huile ajoutée avant le "point final" a été déterminée par pesage.

La capacité d'émulsification est calculée comme le nombre de ml d'huile par gramme de protéine ($N \times 6,25$). La densité de l'huile a été supposée égale à 0,9 g/ml.

Les résultats moyens de la détermination de la capacité d'émulsification des trois produits sont représentés au tableau 3.6.

L'expansion au fouettement a été déterminée dans une solution de protéine à 3 %, à pH 6,5. On a fouetté 250 ml d'une dispersion aqueuse des échantillons de protéine à la vitesse III pendant 4 minutes dans un agitateur Hobart (modèle N-50) comportant un fouet en forme de fil. L'expansion au fouettement a été calculée selon la formule

Expansion au fouettement = $\frac{V-250}{250} \times 100 \%$
dans laquelle V représente le volume de fouettement final en ml.

La valeur V est mesurée en remplissant le récipient mélangeur avec de l'eau. On a doublé les essais de chacun des trois échantillons. Les résultats moyens sont représentés au tableau 3.6.

La stabilité de la mousse est déterminée en tant que rapport entre la quantité de mousse abandonnée après égouttage pendant 30 minutes et la quantité de mousse à l'origine. Un gramme de mousse produite par le procédé précédent a été introduit dans un cylindre en plastique (diamètre 7 cm, hauteur 9 cm) comportant un filet à mailles de 1 mm x 1mm. Le cylindre a été disposé au-dessus d'un entonnoir monté sur un cylindre en verre et le poids (B)

24

du liquide égoutté dans le cylindre en verre est mesuré. La stabilité de la mousse FS (foam stability) est déterminée par l'équation

$$FS = \frac{A - B}{A} \times 100 \%$$

- 5 Les résultats de la mesure sont représentés au tableau 3.6.

La résistance du gel est définie dans cette description en tant que la viscosité de Brookfield mesurée au moyen de mandrins T sur un statif de Brookfield.

- 10 Helipath. Les gels sont produits par traitement thermique de suspensions de protéine à 12 % dans du NaCl 0,5 M. Le traitement thermique a été effectué dans des bidons fermés ayant un diamètre de 7,3 cm et une hauteur de 5,0 cm, plongés dans un bain d'eau, pendant 30 minutes, maintenus à 15 80 et 100°C. Les bidons ont été refroidis et thermostatés à 20°C avant de les ouvrir et avant d'effectuer les mesures. Les résultats de ces mesures sont représentés dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6.: Propriété fonctionnelles des trois substances de protéine A, B, et C

20

Propriétés fonctionnelles	A. Isolat de protéine de soja	B. Concentré de protéine de soja	C. Isolat de protéine de soja (pvp)
25 % NSI dans NaCl 0,2M	39,5	20,3	25,6
% NSI dans l'eau	53,9	25,1	28,6
Capacité d'émulsification: ml huile/g (N x 6,25)	218	182	354
30 Expansion au fouettage %	120	120	340
Stabilité de la mousse %	50	50	20
35 Résistance du gel 80°C (NaCl 0,5M) 100°C (NaCl 0,5M) en poises	$1,7 \times 10^3$ $2,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$ $4,0 \times 10^4$	$3,3 \times 10^2$ $1,3 \times 10^4$

Exemple 4 (exemple d'application)

On a produit une p.v.p. suivant le processus décrit à l'exemple 3 C sauf que l'activité de cellulase était partiellement dérivée du Trichoderma reseei. La
5 préparation de cette cellulase commerciale CELLUCLAST, produite par Novo Industri A/S, a été traitée au moyen d'une base à faible température de la manière suivante. Le pH d'une solution à 10 % de CELLUCLAST dans l'eau a été réglé à 9,2 au moyen de NaOH, et la solution résultante a été
10 refroidie à 5°C. Après séjour d'une heure à ce pH et à cette température, on a réglé le pH à 4,7 au moyen d'acide acétique à 20 %. Cette solution a été maintenue à 5 °C pendant la nuit et ensuite été filtrée de manière stérile. Le produit de filtration a été lyophilisé. On a ajouté 4g
15 du produit lyophilisé à la préparation de SPS-ase, KRF 68 BIII (exemple 1). Les deux enzymes ont été dissoutes dans 172 g d'eau avant d'être ajoutées au mélange de lavage. Les déterminations du bilan massique de cet exemple sont représentées dans le tableau 4.1.

20 L'essai prouve que cette préparation particulière de SPS-ase contient déjà une cellulase efficace étant donné qu'une addition de CELLUCLAST ne semble pas affecter le rapport protéine/matière sèche. Cependant, d'autres préparations de SPS-ase peuvent contenir moins de
25 cellulase, par exemple KRF 92, voir le tableau précédant immédiatement l'exemple 2.




Tableau 4.1: Calculs du bilan massique du lavage isoélectrique comportant une préparation de SPS-ase et du CELLUCLAST[®] pour la production du p.v.p.

5	Opérations et fractions	Masse des fractions gramme	Protéine % (Nx6,25)	Matière sèche %	Rendement en protéine %	Rendement en matière sèche %
10	Lavage :					
	Farine de soja	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
	Eau	3546,2	0	0	0	0
	HCl 6 N	43,1	0	21,3	0	2,3
	SPS-ase :KRF68-BIII	24,0	75,3	96	7,7	5,8
	CELLUCLAST	4,0	43,6	96	0,7	1,0
15	Centrifugation: Σ	4043,1	-	-	-	-
	Centrifugat I	3382,0	1,9	5,5	27,3	46,5
	Solides I	661,0	-	-	-	-
20	Nouveau lavage :					
	Solides I	661,0	-	-	-	-
	Eau	3339,0	0	0	0	0
	HCl 6 N	0	0	0	0	0
25	2e Centrifugation: Σ	4000,0				
	Centrifugat II	3414,0	0,2	0,7	2,9	6,0
	Solides II	582,0	-	-	-	-
30	Neutralisation:					
	Solides II	582,0	-	-	-	-
	Eau	1691,0	0	0	0	0
	NaOH 4N	25,3	0	16,0	0	1,0
	Séchage :					
	Poudre	206,0	88,8	98,9	77,8	50,9

Exemple 5 (exemple d'application)

35 On a produit une p.v.p. suivant le procédé décrit dans l'exemple 3 C sauf que toutes les masses sont divisées par un facteur de 5 et que le mélange réactionnel est

sh

refroidi à environ 5°C avant la centrifugation. Sur base des résultats analytiques en rapport avec les produits de centrifugation, on obtient un rendement théorique en protéine précipitée, comme montré dans le tableau 5.1.

5 **Tableau 5.1.:** Rendements théoriques en protéine obtenus lors de la production d'une p.v.p.

Fractions	Masse g	Protéine (Nx6,25) %	Rendement en protéine %	Exemple 3	
				Protéine (Nx6,25) %	Rendement en protéine %
10 Farine de soja	85,2	55,2	100	55,2	100
SPS-ase KRF-68 BIII	4,8	75,3	7,7	75,3	7,7
1ère centrifugation	639	0,99	13,5	1,7	24,7
2è centrifugation	595	0,13	1,6	0,2	2,9
15 p.v.p.	-	87,2 ^a	92,6 ^b	87,1	80,1 ^b

^a Moyenne de 87,5 (Bioteknisk Institut) et 86,9 (Qvist's Laboratorium) ; la teneur en matière sèche est respectivement 97,6 et 98,0 %.

20 ^b Calculé en tant que masse totale de protéine - la perte en protéine dans les produits de centrifugations.

Exemple 6 : (exemple d'application)

Démonstration de la liaison protéique du SPS.

25 On a dissous 40 g de (Nx6,25) d'un isolat d'une protéine de soja commerciale (Purina 500E de Ralston Purina) dans 680 g d'eau. On a chauffé le mélange dans un bain d'eau à 50 °C et on a réglé le pH à 4,50 au moyen de HCl 6 N. On a transféré 90 g de ce mélange dans 5 flacons d'Erlenmeyers de 250 ml et on y a ajouté 10 g de chaque

30 solution aqueuse contenant respectivement 0 g, 0,2 g, 0,4g, 0,8 g et 1,6 g du SPS préparé comme décrit précédemment dans ce mémoire. Les flacons ont ensuite été maintenus sous agitation au moyen d'un aimant dans un bain d'eau à 50°C pendant 240 minutes.

35 On a ensuite centrifugé les suspensions à 3000 x g

pendant 15 minutes et les produits de centrifugation I ont été analysés suivant Kjeldahl-N et pour la détermination des matières sèches. Les phases solides ont été lavées à l'eau à température ambiante et centrifugées une nouvelle 5 fois. Cette étape a été répétée. Ensuite on a dispersé les solides dans 50 ml d'eau et on a réglé le pH à 6,50 par une addition goutte à goutte de NaOH 6 N. Les produits neutralisés ont été lyophilisés et analysés suivant Kjeldahl-N et pour déterminer les matières sèches(MS). En se 10 basant sur les analyses représentées au tableau 6.1, on a calculé le pourcentage de protéine récupérée et le pourcentage de SPS qui a été lié à la protéine au moyen des formules représentées en relation au tableau 6.2.

Cet exemple démontre que le SPS est lié intime- 15 ment à la protéine de telle sorte que le rapport protéine/matière sèche diminue pour une teneur croissante en SPS. Le rapport protéine/SPS présent dans la farine de soja correspond à une teneur en SPS comparable à environ 0,4 g dans 10 g d'eau, ajouté à 5 g d'isolat de protéine.

20 Le pourcentage de liaison du SPS est une valeur calculée. Le pourcentage de liaison du SPS diminue à cause de la saturation de la protéine en SPS aux faibles rapports protéines/SPS.

Tableau 6.1.: Mesures suivant l'exemple 6

Rapport Protéine/SPS	Produit de centrifugation I		Précipité séché			
	% N	% MS	% N	% N x 6,25	% MS	% $\frac{N \times 6,25}{MS}$
∞	0,068	10,62	13,2	82,5	93,1	88,6
25	0,045	0,49	13,4	83,8	97,3	86,1
12,5	0,038	0,45	13,0	81,3	97,9	83,0
6,25	0,031	0,45	12,6	78,8	98,1	80,3
3,125	0,026	0,61	11,8	73,8	97,9	75,3

4

Tableau 6.2.: Récupération de protéine et pourcentage de liaison du SPS

	Rapport Protéine/ SPS	Pourcentage de récupé- pération de protéine ¹⁾	% de liaison du SPS ²⁾
5	∞	91,5	0
	25	94,4	77
	12,5	95,3	90
10	6,25	96,1	70
	3,125	96,8	60

1) pourcentage de récupération de protéine =

$$\left[1 - \frac{NC\ 1 \times 6,25}{5} \right] \times 100, \text{ où}$$

15 NC 1 = pourcentage d'azote dans le produit de centrifugation I.

2) pourcentage de liaison du SPS =

$$\left[\frac{5 \times (\% \text{ récupération protéine})}{(\% P/H)} - \frac{5 \times (\% \text{ récupération protéine})}{(\% P/H)} \right] \times 100$$

20 5/ rapport de SPS

où, (% P/H) est le rapport protéine/matière sèche dans le précipité séché, et

(% P/H)_∞ se rapporte au précipité sans addition de SPS.

Exemple 7 (exemple d'application)

25 Cet exemple décrit la préparation d'une p.v.p. en utilisant la préparation de SPS-ase KRF 92 B-I comportant 5 % de matière sèche. Le procédé de préparation est le même que celui de l'exemple 3 C, sauf que toutes les masses sont divisées par un facteur 5. La p.v.p. a été

30 analysée comme décrit à l'exemple 2. Les résultats obtenus dans l'essai apparaissent dans le tableau 7.1.

Tableau 7.1.: Résultats obtenus à l'exemple 7

Composants	Masse g	(Nx6,25) %	Matière sèche %	Rendement en protéine %	Rendement en mat. sèche %
5 Farine de soja	85,2	55,2	94,0	100	100
Préparation d'enzyme	4,0	71,2	-	6,1	-
1er produit de cen- trifugation	632	1,88	5,44	25,3	43,0
10 2è produit de cen- trifugation	673	0,30	0,80	4,3	6,7
p.v.p:	39,8	85,6 ^a 84,4 ^b	98,1 ^a 98,1 ^b	71,9	48,8

^aAnalysé par Biotechnisk Institut, Holbergsvej 10, DK-6000
15 Kolding.

^bAnalysé par Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169,
DK-8000 Aarhus C.

Exemple 8 (exemple d'application) :

Cet exemple montre l'effet d'un pré-traitement de
20 la farine de soja par une cuisson au jet de vapeur avant la
préparation de la p.v.p.

Pré-traitement :

Une suspension de farine de soja dans l'eau con-
sistant en 10 kg de farine de soja (Sojamel 13 produit par
25 Aarhus Oliefabrik A/S) par 100 kg a été pompée à travers un
éjecteur de vapeur (type Hydroheater B-300) et mélangée
avec de la vapeur à 8 Bar en une telle quantité et à une
telle vitesse qu'on a pu maintenir une température finale
de 150°C pendant 25 sec, dans un réacteur tubulaire
30 pressurisé. Ensuite la pression a été réduite dans une
chambre de détente (un cyclone) d'où la suspension a été
envoyée dans un échangeur de chaleur à plaque dans lequel
elle a été refroidie à environ 50°C. La boue refroi-
die a pu être utilisée telle quelle pour la préparation de
35 p.v.p. suivant l'invention, mais, dans ce cas, la suspension.

4

a été séchée par pulvérisation à une température d'entrée de 200°C et à une température de sortie de 90°C. Le produit pré-traité indique une teneur en matière sèche de 96,5 % et une teneur en protéine de 36,9 % (N x 6,25).

5

Préparation de la p.v.p.

Cette préparation a été effectuée de la manière suivante :

On a mis 70 g de matière sèche de farine de soja cuite au jet de vapeur et séchée en suspension et on a maintenu sous agitation à 50°C dans 560 g d'eau et on a réglé le pH à 4,50 au moyen de 6,5 ml d'HCl 6N. On a transféré 6 x 90 g de cette suspension dans 6 Erlenmeyers de 250 ml et on a maintenu sous agitation à 50°C dans un bain d'eau au moyen d'agitateurs magnétiques. A chaque flacon d'Erlenmeyer on a ajouté 10 g d'une solution contenant respectivement 0 g, 0,025 g, 0,050 g, 0,10 g, 0,20 g et 0,40 g de la préparation de SPS-ase KRF-68-B-III. Les mélanges réactionnels sont ensuite agités pendant 240 minutes à 50°C. On a ensuite effectué une centrifugation pendant 15 minutes à 3000 x g.

Le surnageant a ensuite été analysé suivant la méthode de Kjeldahl-N et la phase solide a été lavée à l'eau à volumes égaux et a été centrifugée. Cette opération a été effectuée deux fois. La phase solide a ensuite été lyophilisée et analysée pour la détermination de Kjeldahl-N et des matières sèches.

Un essai semblable a été effectué avec une farine de soja non traitée (Sojamel 13 de Aarhus Oliefabrik A/S) utilisée en tant que substance de départ. Dans ce cas, les rapports de l'enzyme au substrat étaient de 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % et 8 %.

En se basant sur la teneur en protéine des surnageants, on a pu calculer le pourcentage de protéine récupérée. Le rendement en protéine est basé sur

h

l'hypothèse que la substance d'enzyme est solubilisée à 100 % après la réaction. Le tableau ci-dessous indique les résultats obtenus par les deux essais.

Tableau 8.1.: Rendements en protéine et rapport protéine/matière sèche pour une p.v.p. préparée à partir de farine de soja cuite ou brute.

	E/S %	Farine de soja cuite		Farine de soja non-traitée	
		Rendement en protéine %	Protéine des mat.sèches %	Rendement en protéine %	Protéine des mat.sèches %
10	0	92,9	76,5	90,7	73,9
	0,25	90,1	86,6	-	-
	0,50	89,3	88,7	-	-
15	1,0	88,1	89,7	87,1	86,2
	2,0	86,6	91,7	85,7	88,1
	3,0	-	-	84,3	89,5
	4,0	84,7	92,2	82,6	90,9
20	8,0	-	-	76,2	91,1

En ce qui concerne les processus d'extraction (isolation) appliqués à des substances différentes des protéines ou les processus de liquéfaction et les techniques qui y sont apparentées, on se référera au schéma général de procédés pour des applications, comme représenté au tableau synoptique n°3.

Le substrat peut consister en un ou plusieurs hydrates de carbone présents dans la substance brute ou bien il peut consister en la totalité de la substance brute.

Ce substrat peut être soumis à un prétraitement de nature chimique ou physique, comme expliqué plus loin à titre d'exemple, constitué par un traitement acide ou alcalin, un trempage ou un mouillage et/ou une cuisson avec ou sans vapeur.

La substance brute peut être macérée, coupée, moulue à l'état humide et/ou homogénéisée (tous ces traitements étant qualifiés d'homogénéisation au tableau synoptique n°3),

avec ou sans addition d'eau, d'autres additifs pouvant être ajoutés pendant cette étape. L'homogénéisation peut être effectuée avec différents degrés d'efficacité, différentes pressions n'étant, par exemple, qu'une fraction de
5 la pression maximum donnée pour l'équipement d'homogénéisation spécifique utilisée. On peut ajouter différents additifs avant ou pendant l'homogénéisation, comme représenté par $b_1, b_2 \dots b_n$ dans le tableau synoptique n°3.

Le processus réactionnel y compris la préparation
10 de la SPS-ase est effectué dans des conditions spécifiques, par exemple de température, de pression, de durée, de pH et de dosage d'enzyme; de même, des recommandations concernant le réacteur utilisé (par exemple discontinu, écoulement tamponné) et l'agitation, si nécessaire, sont importantes. On peut
15 utiliser une série d'additifs pour différentes substances brutes, représentés par $c_1 c_2 \dots c_n$ dans le tableau synoptique n°3.

De même, les opérations de séparation peuvent être effectuées avec différents degrés d'efficacité. Dans de
20 nombreux cas, la séparation est omise ou facilitée, par exemple lorsque la substance brute est complètement liquéfiée. On peut utiliser différents dispositifs de séparation (par exemple des centrifugeuses, des filtres, des dispositifs d'ultrafiltration, des hydrocyclones, des épaisseurs,
25 seurs, des tamis ou cribles ou des simples décanteurs).

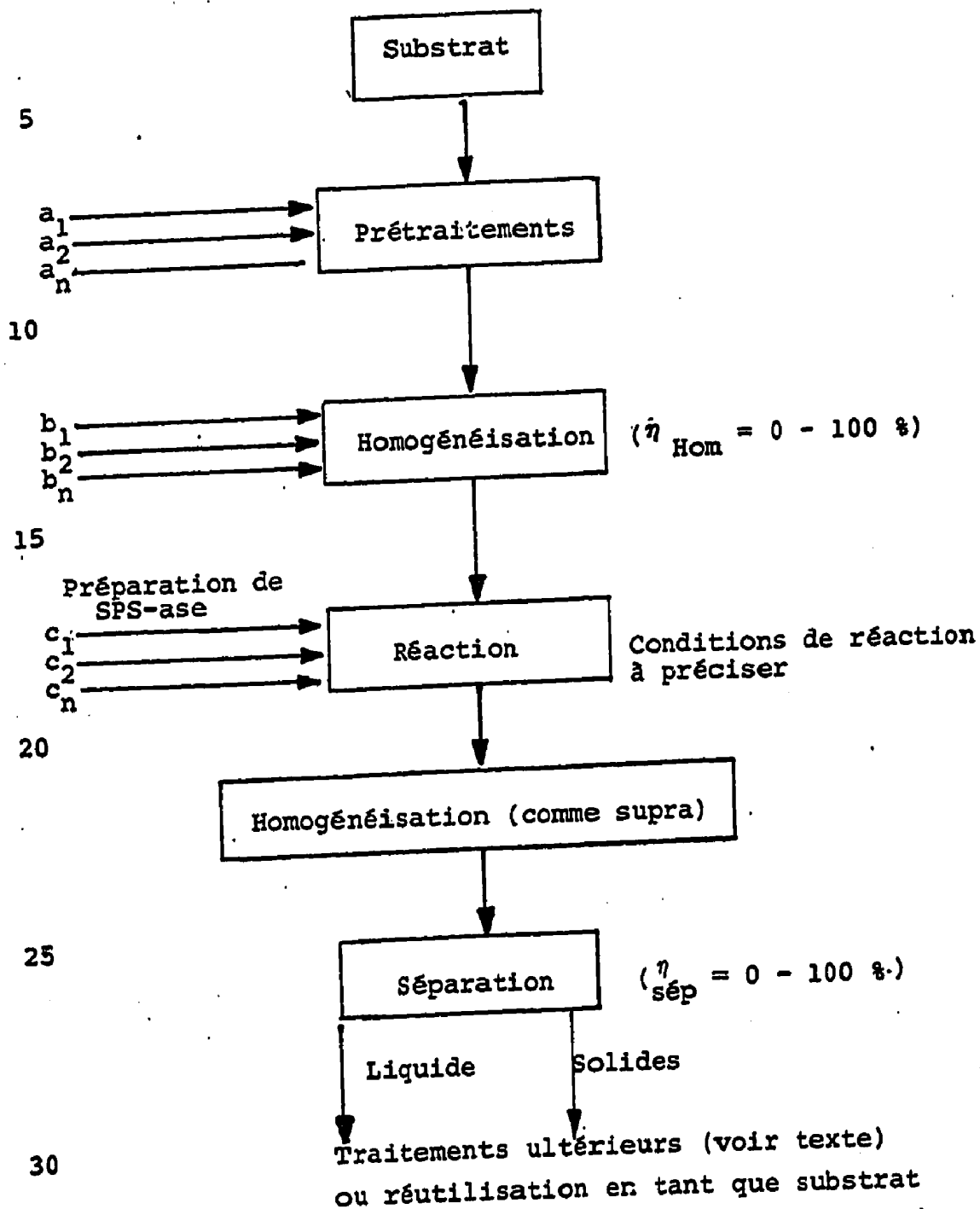
L'efficacité de la séparation est définie comme la proportion entre la teneur absolue en boues dans la phase des solides et la teneur absolue en boues du mélange réactionnel.

30 Les phases liquides ou solides obtenues peuvent être traitées ultérieurement, par exemple concentrées, séchées ou être extraites par solvant, afin d'éliminer certaines composants comme la graisse ou l'huile; elles peuvent également fermenter pour produire une biomasse, de l'alcool ou d'autres
35 produits (des enzymes, des antibiotiques ou d'autres composants utilisables).

De même, les produits obtenus peuvent être recyclés dans le processus de manière à répéter le traitement.

h

Tableau synoptique n° 3



Les exemples qui suivent montrent des applications des préparations de SPS-ase et la liste suivante donne un résumé de ces applications.

De même, le tableau 1 annexé indique certaines caractéristiques concernant le tableau synoptique n° 3.

84

Liste d'applications de préparations de SPS-ase, à titre d'exemples.

Type de préparations de SPS-ase		Référence N°	
5	Préparation de SPS-ase substantiellement exempte d'une ou plusieurs activités enzymatiques non désirées	A 1	Extraction d'amidon de maïs, de blé et de pommes de terre
		A 2	Extraction de lipides de substances végétales
		A 3	Extraction d'huiles étheriques de substances végétales
		A 4	Extraction de colorants naturels de substances végétales
		A 5	Extraction de caoutchouc du buisson guayul
10			
15	Préparation de liquéfaction complète ou traitement semblable	Ba 1	Production d'un substitut de lait pour animaux domestiques
		Ba 2	Production de substances brutes contenant de l'amidon saccharifié
		Ba 3	Liquéfaction complète de poires ou d'autres fruits
		Ba 4	Production de jus par traitement de fruits et de végétaux
		Ba 5	Traitement concernant l'extraction ou le pressage de la canne à sucre ou de la betterave à sucre
		Ba 6	Production de lait de soja
		Ba 7	Traitement destiné à accroître la quantité récupérable de matières solubles de café
20			
25	Additifs de processus	Bb 1	Prévention et/ou décomposition du louche de pomme
		Bb 2	Utilisation en tant que agent clarifiant de vin blanc
		Bb 3	Production de ISSPH ou d'autres hydrolisats de protéine végétale
		Bb 4	Enzyme de brassage pour l'industrie de la bière
		Bb 5	Additif enzymatique pouvant être utilisé pendant la fermentation et/ou le stockage de la bière
		Bb 6	Agent destiné à enlever la peau de l'amande
30			
35	Autres applications	Bc 1	Décomposition de différents déchets
		Bc 2	Saccharification et fermentation simultanée
		Bc 3	Décomposition de cellulose
		Bc 4	Application en tant que additif de cuisson
		Bc 5	Amélioration du rendement en alcool et en biomasse pendant la fermentation de la liqueur de sulfite dans la production du papier
		Bc 6	Assèchement de produits de boue biologique
		Bc 7	Additif pour aliment de bétail ensilé.

35 30 25 20 15 10 5

Réf.	Substrat	Additifs			1 ^è homo-généisa-tion η Hom %	2 ^è homo-généisa-tion η Hom %	Sépara-tion η Sép. %	Phase liquide	Traitements ultérieurs	
		a ₁	b ₁	c ₁					Phase solide	Phase combinée (sans séparation)
A 1	Maïs	Eau	Eau	NaOH ou HCl	20 - 50	10 - 30	30 - 50	(Contient des germes) lavage, récupération de l'huile	Opérations de lavage	-
A 2	Gemme de maïs	-	-	NaOH ou HCl	0	0	100	(Huile + eau) Purification	Déchets	-
Ba 1	Farine de soja (dégraissée)	Eau	-	HCl	0	0	0	-	-	Pasteurisation, concentration, séchage par pulvérisation
Ba 2	Patate douce	Eau	Terma-myl	NaOH ou HCl	-	-	0	-	-	Levure pour la fermentation de l'alcool distillation
Ba 5	Betterave à sucre	Eau	-	NaOH ou HCl	10 %	-	100	Cristallisation	(Déchet)	-
Bc 1	Residu de torréfaction de lait de soja	Eau	-	HCl	10 %	-	0	-	-	Levure pour la fermentation de l'alcool, distillation

04

A 1. Extraction d'amidon de maïs, de blé et de pommes de terre.

L'extraction d'amidon de maïs, de blé, de pommes de terre et d'autres plantes contenant de l'amidon est effectuée par l'une ou plusieurs des étapes suivantes : macération, broyage à l'eau et séparation. L'utilisation d'une préparation de SPS-ase ne comportant essentiellement aucune activité amylolytique fournit les avantages suivants, le maïs étant utilisé à titre d'exemple :

- 10 1. La libération d'amidon est facilitée pour une période de macération plus courte,
2. La consommation d'eau peut être réduite,
3. La libération du germe de maïs est facilitée sans libération de l'huile du germe de maïs,
- 15 4. On peut obtenir la protéine en une pureté plus élevée,
5. La récupération de l'eau de macération de maïs est facilitée.

A 2. Extraction de lipides de substances végétales.

20 Etant donné que les lipides d'une substance végétale sont enfermés à l'intérieur de cellules et généralement liés aux protéines, on peut extraire les lipides en phase aqueuse en les traitant avec une préparation de SPS-ase qui est essentiellement exempte de lipases. Ainsi, l'huile de 25 germe de maïs est normalement isolée par extraction à l'hexane des germes séchés de maïs. Cependant, l'opération de séchage est superflue si les germes de maïs humides sont traités avec une préparation de SPS-ase du genre susmentionné. De manière analogue, l'extraction de l'huile 30 d'olive en phase aqueuse peut être améliorée, si l'enzyme utilisée pour le traitement enzymatique est une préparation de SPS-ase du genre susmentionné, voir, par exemple, Food, Pharmaceutical and Bioengineering, No. 172, volume 74, pages 93 à 94. De même, l'extraction aqueuse, par exemple, 35 de l'huile de soja, l'huile de colza et l'huile de tourne-

h

sol peut être améliorée de manière analogue.

A 3. Extraction d'huiles éthériques de substances végétales

Si des substances végétales contenant des huiles éthériques sont extraites au moyen d'une solution aqueuse 5 d'une préparation de SPS-ase qui est essentiellement exempte d'activité enzymatique capable de décomposer ou de modifier d'une autre manière les huiles éthériques, celles-ci sont récupérées en des rendements élevés, à des frais très bas.

10 A.4. Extraction de colorants naturels de substances végétales.

Si l'on traite des substances végétales contenant des colorants, par exemple des racines de betteraves contenant le colorant rouge bétanine ou le colorant conte- 15 nu dans les airelles, avec une préparation de SPS-ase qui est essentiellement exempte d'activités enzymatiques capables de décomposer ou de modifier d'une autre manière les colorants, ceux-ci sont récupérés en de hauts rendements, à des frais très bas.

20 A 5. Extraction de caoutchouc du buisson guayul.

Un autre exemple de substrat pour une préparation de SPS-ase qui est essentiellement exempte d'une activité enzymatique capable de décomposer le caoutchouc naturel est la substance de parois cellulaires dans les 25 racines et branches du buisson guayul.

Ba 1. Production d'un substitut de lait pour animaux domestiques, de préférence un substitut de lait pour veau.

On peut produire un substitut de lait pour veau qui est soluble dans l'eau froide à un pH d'environ 4,5 par 30 une liquéfaction complète en milieu aqueux de fèves de soja, de graines de tournesol, de graines de coton, de fèves faba ou de pois des champs. En utilisant une substance brute contenant de l'amidon comme des fèves faba ou pois des champs, on peut accomplir la liquéfaction de 35 l'amidon au moyen d'une alpha-amylase avant, après ou

oh

pendant le traitement avec la SPS-ase qui solubilise finalement les polysaccharides qui ne sont pas de l'amidon et qui sont présents en tant que substance formant la structure des parois cellulaires. On montre un exemple détaillé 5 ci-dessous, en utilisant des fèves faba, qui sont comparées au soja, en se référant au tableau I. Le prétraitement des fèves de soja peut, de préférence, consister en une cuisson par jet de vapeur, ce qui améliore la solubilisation de la rémanence.

10. Exemple Ba 1.1

On met 15 kg de farine de fève faba (Farine de Fèves des GRANDES MINOTERIES A FEVES DE FRANCE, Paris) en suspension dans 35 litres d'eau. On ajoute 75 g de Termamyl® 60 L et 18 g de CaCl_2 . On a chauffé la suspension à 95° C 15 en utilisant un récipient à chemise de vapeur et en agitant. La suspension a ensuite été traitée à cette température pendant 60 minutes. Ensuite on a réglé le pH à 4,5 et le produit a été refroidi à 50° C. On a dissous 300 g de la préparation de SPS-ase KRF 68 dans 1 litre d'eau et on 20 l'a ajouté à la suspension. La réaction a été effectuée pendant 440 minutes. Lorsqu'on a introduit 10 g de Fungamyl 800 L la fraction d'amidon a été transformée principalement en disaccharide (maltose). Ensuite, le mélange de réaction a été pasteurisé à 90° C, pendant 2 mn. Une partie 25 aliquote du produit est ensuite lyophilisée et utilisée pour des essais de stabilité. L'échantillon a ensuite été solubilisé à 10 % de matière sèche et la solution du produit a pu être maintenue stable sans sédimentation pendant plusieurs jours.

30 De la graisse ou de l'huile fondue peut être facilement émulsifiée dans le produit en obtenant une composition finale très semblable au lait de vache. Une émulsion contenant 3,5 % d'huile (huile de soja) a également pu être maintenue stable sans sédimentation pendant 35 plusieurs jours.

h

Exemple Ba 1.2

On a fait cuire au jet de vapeur à 150°C pendant 25 secondes, comme décrit à l'exemple 8, de la farine de soja (Sojamel 13). La farine de soja cuite au jet de vapeur a été séchée par pulvérisation et utilisée pour des recherches ultérieures décrites ci-après.

A:

On a mélangé 50 g de farine de soja cuite au jet de vapeur avec 450 g d'eau et on a réglé le pH à 4,5 au moyen de 4,1 ml de HCl 6 N. Le mélange a ensuite été chauffé à 45°C dans un bain d'eau et on a ajouté 0,250 g de la préparation de SPS-ase KRF-68 au mélange chauffé que l'on a fait réagir pendant 5 heures sous agitation.

Ensuite, on a chauffé le mélange à 80°C pendant 2 minutes afin d'inactiver l'enzyme. On a centrifugé un échantillon de 100 ml à température ambiante pendant 15 minutes à 3000 x g (g = gravité). Le surnageant a été soumis à un échange ionique et a été analysé par HPLC pour déterminer la composition de l'hydrate de carbone. Le surnageant a également été analysé pour la détermination de l'azote par la méthode de Kjeldahl, des matières sèches et du degré de solubilité de l'azote (nitrogen solubility index NSI); on a également calculé le degré de solubilité des matières sèches (dry matter solubility index DSI); voir les résultats du tableau Ba I. On a introduit 100 ml du mélange réactionnel refroidi à 20°C dans un récipient de 100 ml gradué et on l'a maintenu à 4°C pendant 2 jours. La stabilité à la dispersion (%) a été mesurée en lisant le volume des dispersions obtenues (tableau Ba II) après 1 et 2 jours.

On a ajouté 8 g d'huile de soja à 200 ml du mélange réactionnel (à 20°C). On a préparé une émulsion en mélangeant pendant 2 minutes dans un mélangeur de Waring. La stabilité de l'émulsion (%) a été mesurée comme ci-dessus après 1 et 2 jours.

24

B:

On a effectué une réaction comme ci-dessus, dans ce cas, cependant, on a utilisé 1,00 g de la préparation de SPS-ase. On a effectué les mêmes genres d'analyse et de 5 mesures de stabilité que ceux décrit à la partie A. Les résultats sont représentés dans les tableaux Ba I et Ba II.

Des analyses chimiques des surnageants, il apparaît que les valeurs de NSI (%) et de DSI (%) obtenues dans l'essai B sont plus élevées que celles obtenues pour 10 l'essai A. Cependant, les essais de stabilité effectués sur les mélanges réactionnels donnent une meilleure valeur pour les échantillons A. Ceci est probablement dû à la plus grande longueur de la chaîne de peptides des protéines du mélange réactionnel résultant du dosage plus 15 faible en enzymes.

De la composition de l'hydrate de carbone déterminée par HPLC, il apparaît que l'on produit principalement des monosaccharides et des disaccharides. De ce fait, des oligosaccharides dont il est connu qu'ils provoquent la 20 diarrhée et la flatulance lorsqu'on les donne aux veaux en de quantités trop importantes, ne sont présentes qu'en de faibles quantités.

Tableau Ba I. Propriétés chimiques du surnageant.

25	Essais	Dosage des enzymes par rapport au substrat % en poids	NSI, % * (à pH = 4,5)	DSI, % ** (à pH = 4,5)	Résultats H.P.L.C. (composition de sucres neutres)
30	A	E/S = 0,5%	39,9	62,4	DP ₁ + DP ₂ : 79,7 % DP ₃ : 7,4 % DP ₄ : 12,2 % DP ₄₊ : 8,1 %
	B	E/S = 2,0%	57,0	67,1	DP ₁ + DP ₂ : 84,4 % DP ₃ : 6,1 % DP ₄ : 3,7 % DP ₄₊ : 5,7 %

35 * NSI = Degré de solubilité de l'azote

** DSI = Degré de solubilité des matières sèches

64

Tableau Ba II. Essais de stabilité des mélanges réactionnels

5	Essais	Dosage des enzymes par rapport au substrat % en poids	Essai de stabilité			
			Sans huile		Avec huile	
			Dispersion 1er jour	Dispersion 2è jour	Emulsion 1er jour	Emulsion 2è jour
	A	E/S = 0,5%	80 %	63 %	100 %	87 %
	B	E/S = 2,0 %	66 %	35 %	85 %	71 %

10 Ba 2. Production de substances brutes contenant de l'amidon saccharifié.

En ce qui concerne la saccharification du manioc et de patates douces et d'autres substances végétales contenant de l'amidon, l'addition d'une préparation de SPS-ase peut résoudre des problèmes de viscosité. En utilisant une préparation de SPS-ase, il est possible de produire des suspensions d'amidon présentant une teneur en matières sèches de 25 à 30 %, et après saccharification, la pâte peut fermenter pour obtenir un éthanol bon marché.

Exemple Ba 2.1

On prépare une purée présentant une teneur en matières sèches de 24 % à partir de patates douces (Japon) fraîches et rapées. La teneur en amidon des patates douces se situe aux environs de 70 % de la teneur en matières sèches de celles-ci. Une première liquéfaction au moyen de l'amylase bactérielle Termamyl[®] 60 L en une quantité de 0,5 kg/t. d'amidon a été effectuée en chauffant la purée à 90° C. Ensuite elle a été maintenue à 90 °C pendant 30 minutes. On a ensuite mesuré la viscosité η_1 du mélange réactionnel au moyen d'un fuseau HAAKE à 90° C.

On a ensuite fait refroidir le mélange réactionnel à 55°C, et on a réglé le pH à 5,0 au moyen de H₂SO₄ 2 N. On a ensuite initié une saccharification par addition de la gluco-amylase SAN 150 (marque déposée par NOVO INDUSTRIA/S) en un dosage de 1,75 litre/tonne d'amidon. Le mélange de

04

saccharification a ensuite été divisé en trois parties, A, B et C qui ont été traitées pendant 15 minutes par des enzymes comme représenté ci-dessous avant qu'on ne mesure la viscosité :

- 5 A: Cette partie est l'essai à blanc. La viscosité η_2 a été mesurée, voir tableau Ba III.
- 10 B: On a ajouté la cellulase Tricoderma viride de Celluclast[®] 200 N en une quantité de 1 kg par tonne de matières sèches de patates douces. La viscosité η_3 a été mesurée, voir tableau Ba III.
- 15 C: On a ajouté la préparation de SPS-ase KRF-68 en une quantité de 0,25 kg/tonne de matières sèches de patates douces. On a mesuré la viscosité η_4 , voir tableau Ba III.

Tableau Ba III : Viscosités

	Mélange réactionnel	Viscosité	
		à 90°C	à 55°C
20	Patates douces	$\eta_1 = 770$ cp	$\eta_2 = 2190$ cp
	A	-	$\eta_2 = 2190$ cp
	B	-	$\eta_3 = 1970$ cp
	C	-	$\eta_4 = 950$ cp

- 25 Ainsi, on peut donc constater que la viscosité du mélange réactionnel peut effectivement être réduite au moyen de la SPS-ase à dosage faible par rapport au CELLUCLAST^R et au SAN 150.
- 30 Ba 3. Liquéfaction complète de poires ou d'autres fruits. Si l'on traite ultérieurement avec une préparation de SPS-ase des poires entières qui ont été écrasées mécaniquement, on effectue une liquéfaction complète et on produit un jus de poires clair après avoir éliminé de faibles quantités de matières solides. Un procédé analogue
- 35 peut être utilisé pour d'autres fruits semblables, par

4.

exemple les pommes.

Exemple Ba 3.1.

Des pommes fraîches sont grossièrement broyées au moyen d'un broyeur central Bucher. La purée de pommes
5 est ensuite pasteurisée dans un réservoir chauffé à 90°C, pendant 5 minutes, et elle est ensuite refroidie à température ambiante. Les pommes pré-broyées sont ensuite écrasées une deuxième fois dans un broyeur Fryma comportant un appareillage à pierre de corindon, jusqu'à ce que la purée soit
10 lisse au toucher. La pâte a ensuite été pasteurisée une seconde fois à 80°C pendant 10 minutes et refroidie à 50°C.

Les réactions enzymatiques ont ensuite été effectuées à 50°C pendant 30 minutes au moyen du dispositif Contraves Rheomat 15 en agitant et en effectuant simultanément la mesure de viscosité (par rapport à un pourcentage
15 lu sur le Rhéomètre à vitesse 13). Après la fin de la réaction enzymatique on a retiré un échantillon de 100 g et on l'a centrifugé dans un tube gradué à 3000 x g pendant 15 minutes. A ce stade, on a mesuré le pourcentage de jus
20 et le pourcentage de dépôt. On a également mesuré le pH et le pourcentage en matières sèches au réfractomètre, en ° Brix. Le tableau Ba IV montre une comparaison entre l'effet de la SPS-ase, la combinaison de Celluclast et de SPS-ase et la combinaison de Celluclast et de Pectinex. On
25 a utilisé la préparation de SPS-ase KRF-68.

Tableau Ba IV: Résultats des essais de liquéfaction totale
avec une purée de pommes à 50°C pendant 30
minutes

5	SPS-ase g/hl de purée	Celluclast [®] 200 l g/hl de purée	Pectinex [®] 3x g/hl de purée	Viscosité finale %	Centrifugation		Jus	
					% jus	% dépôt	pH	°Brix
10	0	0	0	100	59	49	3,8	9,7
	25	0	0	19	81	19	3,5	10,5
	50	0	0	15	79	21	3,5	10,7
	50	50	0	4,8	83	17	3,5	10,8
				3,8	83	17	3,1	12,5
	0	50	200	9,5	83	17	3,2	12,9
	0	50	2000	4,0	82	18	3,1	13,2

15. Ba 4. Production de jus par traitement de fruits et de
végétaux.

On a trouvé que des préparations de SPS-ase
conviennent bien pour la production de jus par traitements
de différents fruits, baies et de végétaux, par exemple la
20 carotte, les pois, les tomates, les pommes, les poires, le
cassis, les fèves et le chou. Dans ce cas, on obtient des
rendements améliorés en jus et une meilleure extraction des
pigments et arômes par rapport aux préparations commerciales
de pectinase et de cellulase.

25. Exemple Ba 4.1.

On se réfère à l'exemple Ba 3.1 dans lequel on a
comparé la préparation de SPS-ase aux produits commerciaux
de cellulase et de pectinase Celluclast[®] 200 L et Pectinex[®]
3x. Il apparaît du tableau que le rendement en jus peut
30 être légèrement amélioré avec seulement 50 g/hl de SPS-ase
par rapport à 2000 g/hl de Pectinex[®], les deux étant en
combinaison avec 50 g/hl de Celluclast[®]. La viscosité
était également légèrement plus basse. De ce fait, il
semble que la SPS-ase est environ 40 fois plus efficace que

64

le Pectinex.

Ba 5. Traitement concernant l'extraction ou le pressage de la canne à sucre ou de la betterave à sucre.

On a trouvé qu'il est possible d'améliorer le rendement de processus de simple extraction, si l'on utilise la préparation de SPS-ase pour le traitement de la canne à sucre ou de la betterave à sucre avant et/ou pendant l'extraction ou le pressage de celles-ci. De même, la rémanence (la bagasse) peut être traitée avec la préparation de SPS-ase, ladite rémanence étant partiellement convertie en sucres fermentables qui peuvent être utilisés en tant que substance brute pour une fermentation d'éthanol.

Exemple Ba 5.1

On a broyé 2 fois, dans un broyeur Fryma (type MZ-110), 10 kg de rémanence de betterave sucrière (pulpe) obtenue par une extraction continue à contre-courant dans un diffuseur-DDS chez Nakskov Sugar Factory. On a ajouté de l'eau de traitement pendant l'opération de broyage.

On a traité par enzyme des fractions de 300 g de pulpe à 45°C pendant 18 heures au moyen des dosages d'enzymes représentés au tableau Ba V. On a ajouté le produit enzymatique sec (KRF-68) à la pulpe qui a été agitée par une tige pendant la première heure. Ensuite, la pulpe a été liquéfiée de manière à pouvoir effectuer une agitation par agitateur magnétique pendant le temps restant. A la fin de la réaction on a mesuré le pH (on n'a pas effectué de correction de pH pendant le début de la réaction) et on a centrifugé le mélange réactionnel jusqu'à ce que l'on obtienne un surnageant clair. On a effectué des déterminations de matières sèches du mélange réactionnel et des surnageants. Les pourcentages de matières sèches solubilisées ont été calculés sur base de ces résultats. Les corrections ont été faites pour les matières sèches solubles du produit enzymatique dans tous les calculs.

Les surnageants N°s 2, 3 et 4 ont été soumis à un échange ionique et ont été analysés par HPLC pour déterminer la composition des hydrates de carbone.

ok

Tableau Ba V. Résultats obtenus par une liquéfaction enzymatique d'une pulpe de betterave

Essais No.	Dosage des enzymes par rapport aux matières sèches E/S %	Mesures finales			
		Mélange réactionnel		Surnageants	
		pH (final)	matières sèches %	matières sèches %	matières sèches solubilisées %
1	0	5,5	4,18	0,0	0,0
2	0,35	3,6	3,85	2,85	66,9
3	0,56	3,5	3,81	2,56	66,2
4	1,02	3,5	3,86	2,73	70,4
5	1,58	3,3	3,17	2,34	73,4
6	3,10	3,4	3,23	2,49	76,4
7	7,52	3,4	2,66	2,18	80,5

Conditions de réaction : M = 300 g

S = 4,18 % de matières sèches

E/S comme montré ci-dessus

pH non réglé

T = 45°C

t = 18 heures

Tableau Ba VI : Données HPLC

Genre de sucre (neutre)	Essais n°		
	2	3	4
	% de sucres neutres		
Poids moléculaire élevé (DP4+)	43,6	31,9	25,3
Disaccharides	4,6	4,8	-
Glucose	20,4	23,7	27,8
Galactose	5,0	5,9	7,3
Fructose/Arabinose	26,4	32,2	33,2
Acide Galacturonique	pas mesuré		

Tous les sucres formés suivant le tableau Ba VI ci-dessus peuvent fermenter en alcool ou être utilisés dans

oh

d'autres buts.

Ba 6. Production de lait de soja

On peut facilement produire du lait de soja par une liquéfaction totale de soja broyé et par une homogénéisation ultérieure du mélange obtenu. Le lait de soja est souvent produit en trempant les fèves de soja dans de l'eau bouillante, en broyant les fèves imprégnées en extrayant l'eau et en séparant ensuite les résidus insolubles, par exemple les protéines et les polysaccharides. Afin d'améliorer le rendement en lait de soja, ces résidus insolubles peuvent être liquéfiés par réaction avec la SPS-ase

Exemple Ba 6.1

Le procédé de production de lait de soja est expliqué plus en détail par les séries de réaction enzymatique suivantes, les calculs du degré de solubilité de protéine (PSI, %, protein solubility index) et du degré de solubilité de matières sèches (DSI, %, dry matter solubility index) représentent les rendements obtenus après séparation à pH 7 (voir tableau Ba VII). Les réactions enzymatiques ont été effectuées dans les conditions suivantes :

Substrat : farine de soja non dégraissée (Dansk Sojakagefabrik A/S)

	Masse du mélange réactionnel :	220 g
	Masse du substrat :	20 g
25	Température :	50 °C
	pH :	4,5 (HCl 6 N)
	Temps de réaction :	Séries A: 1 heure
	Temps de réaction :	Séries B: 0,5 à 6 heures
	Enzyme :	SPS-ase (KRF-68)
30	Quantité d'enzyme :	Séries A: rapport E/S (poids/poids) 0 à 8,0 % Séries B: rapport E/S (poids/poids) : 1,0 %

Après la réaction, on a réglé le pH à 7 au moyen de NaOH 4 N et on a effectué une séparation par centrifugation à 3000x g, pendant 15 minutes.

04

00530

Tableau Ba VII : Calculs du bilan en masse du procédé enzymatique
de production de lait de soja

Séries	Temps de réaction heures	Quantité d'enzymes E/S %	Mélange réactionnel		Surageant		Indices de solubilité	
			% protéine	% mat. sèches	% protéine	% mat. sèches	% PSI	% DSI
A	1,0	0	3,65	8,70	1,87	5,72	49,6	63,7
	1,0	0,5	3,68	8,74	2,41	6,28	63,7	70,0
	1,0	1,0	3,71	8,78	2,48	6,43	65,1	71,4
	1,0	2,0	3,78	8,86	2,98	7,18	77,5	79,5
	1,0	4,0	3,92	9,03	3,36	7,69	84,6	83,9
	1,0	8,0	4,19	9,37	3,76	8,08	88,5	85,0
B	0,5	1,0	3,64	8,78	2,39	6,41	64,0	71,1
	1,0	1,0	3,64	8,78	2,56	6,60	68,7	73,4
	2,0	1,0	3,63	8,78	2,79	6,91	75,2	77,1
	4,0	1,0	3,63	8,78	3,10	7,29	84,0	81,7
	6,0	1,0	3,63	8,78	3,39	7,69	92,3	86,5

2

Ba 7. Traitement destiné à accroître la quantité récupérable de matières solubles de café.

On a trouvé que le traitement de graines de café à différentes étapes, pendant la production de café instantané, résulte en une augmentation du rendement de matières solubles de café. Ainsi, par exemple, le marc de café épuisé ou des graines vertes peuvent être traitées par des enzymes avec des résultats avantageux.

Bb 1. Prévention et/ou décomposition du louche de pomme

Après la production d'un jus de pomme ou de poire ou d'autres jus de fruits, qui doivent être clairs et qui ont antérieurement été traités avec des préparations de pectinase et cellulase classiques afin d'éviter la formation de turbidité, il peut apparaître un louche de pomme ou des louches de fruits analogues. On a trouvé que des préparations de SPS-ase conviennent bien pour la décomposition de tels louches qui consistent principalement en arabanne liée aux protéines.

Exemple Bb 1

On a constaté que le concentrat de jus de poire produit par liquéfaction enzymatique de déchets de conserves de poires en utilisant du Celluclast[®] et du Pectinex[®] se trouble au repos. Le louche a été isolé et hydrolysé au moyen de H₂SO₄ 0,01 N pendant 24 heures et a été analysé par HPLC. Le chromatogramme montre de l'arabinose et de faibles quantités d'oligosaccharides.

En faisant incuber 0,5 % poids/volume de cet hydrate de carbone dans 1 mM de tampon acétate à pH 4,5, pendant 3 heures, à 40°C, avec la SPS-ase (KRF-68 + KRF 92, 1:1) présentant une concentration en enzyme de 0,05 % poids/volume, on a trouvé que 84 % de l'hydrate de carbone du louche initial (matière sèche) ont été transformés en arabinose.

On a également traité un concentré de poire dilué (20°Brix) pendant 2 heures à 40 ° C avec une quantité

h.

d'enzyme SPS-ase susmentionnée de 0,15 % poids/volume ou avec un produit commercial dénommé Clarex[®] en une quantité de 1 % poids/volume. On a trouvé que la SPS-ase était capable de réduire de 86 % la surface relative du pic HPLC du louche semblable à l'arabanne, alors que la réduction correspondante au moyen de Clarex[®] (utilisé en une quantité nettement supérieure à la préparation de SPS-ase) n'était que de 78 %.

10 Bb 2. Utilisation en tant que agent clarifiant de vin blanc.

On a trouvé que les vins blancs présentant une turbidité très indésirable peuvent être clarifiés efficacement au moyen d'une SPS-ase. On a montré que la substance trouble consiste principalement en arabinogalactanes qui 15 sont liés à des résidus d'hydroxyproline dans une protéine structurelle de parois cellulaires.

Bb 3. Production de ISSPH ou d'autres hydrolisats de protéine végétale.

Avant la séparation du ISSPH (isoelectric soluble 20 soy protein hydrolyzate - hydrolisat de protéine de soja, isoélectriquement soluble) ou d'autres hydrolysats de protéine végétale de la boue, comme décrit dans le brevet des Etats-Unis N° 4.100.024 ou dans Process Biochemistry, vol. 14, No 7 (1979), pages 6 à 8 et 10 - 11, on peut traiter 25 le mélange réactionnel avec une préparation de SPS-ase. Ceci permet d'obtenir une séparation plus facile.

Bb 4. Enzyme de brassage pour l'industrie de la bière.

Dans la production d'hydrates de carbone de bière à partir de substances brutes, par exemple les beta-glucannes 30 de malt et d'orge, on observe une influence sur la viscosité et la filtrabilité du moût. L'addition d'une SPS-ase pendant le brassage réduit la viscosité du moût et améliore sa filtrabilité ainsi que le rendement à l'extraction. En outre, l'addition d'une SPS-ase pendant le brassage augmente 35 la fermentabilité du moût ainsi que la teneur en azote

h

dans le moût.

Exemple Bb 4.1

Au laboratoire, on a brassé ensemble 50 g de gruau d'avoine moulu consistant en 50 % de malt et 50 %
5 d'orge avec 275 gr d'eau (15 % de matières sèches) selon le schéma de brassage suivant : 52 ° C (60 minutes)/ 63°C (60 minutes)/76°C (30 minutes).

Afin de prouver l'effet de la SPS-ase on a effectué quatre essais, voir le tableau donné ci-dessous, dans
10 lesquels les enzymes ont été ajoutés pendant le brassage (pH du brassin. 5,5 - 6,0).

	Enzyme	Néant	Cerefl.	SPS-ase (KRF-68)	
15	Activité de bêta-glucanase/g	0	200 BGU	1630 FBG	1630 FBG
	Dosage d'enzyme par kg de gruau	0	1,5 g	0,05 g	0,18 g
20	Quantité totale d'unités d'activité d'enzyme par kg de gruau	0	300 BGU	80 FBG	300 FBG
25	Vitesse de filtration du moût après 10 mn	120 ml	135 ml	160 ml	170 ml
	Viscosité du moût 10° Balling (25°C)	1,52 cP	1,36 cP	1,36 cP	1,30 cP

30 BGU représente des unités de bêta-glucanase déterminées selon le procédé analytique AF 70/4-GB, disponible chez NOVO Industri A/S.

FBG représente des unités de bêta-glucanase fongiques déterminées selon le procédé analytique AF 70.1/
35 2-GB disponible chez NOVO Industri A/S.

La seule différence entre BGU et FBG est le pH auquel on effectue la détermination de l'enzyme : pH 7,5 pour BGU et pH 5,0 pour FBG.

Cereflo est une préparation de bêta-glucanase 5 bactérielle décrite dans le document d'information B 214b-GB 1500, Juillet 1981, disponible chez NOVO Industri A/S.

Exemple Bb 4.2

Au laboratoire, on a brassé ensemble 50 g de gruau d'avoine moulu consistant en 40 % de malt et 60 % 10 d'orge avec 150 g d'eau (25 % de matières sèches) selon le schéma de brassage suivant : 45°C (60 minutes)/63°C (90 minutes)/75°C (15 minutes).

Afin de prouver l'effet de la SPS-ase on a effectué trois essais, cfr. le tableau ci-dessous, dans 15 lesquels on a ajouté les enzymes pendant le brassage (pH de la boue 5,5 - 6,0).

	Enzyme	Néant	Ceremix	SPS-ase (KRF-68)+Ceremix ajouté comme dans les essais précédents
20	Activité de bêta-glucanase/ g	-	200 BGU	1630 BGU
	Dosage d'enzyme par kg de gruau	-	1,65 g	0,033 g
25	Quantité totale d'unités d'acti- vité d'enzyme par kg de gruau	0	330 BGU	50 FBG
30	Vitesse de fil- tration du moût après 15 min.	48ml	98 ml	111 ml
	Extrait, °Balling	18,6	19,0	19,5
	Viscosité du moût 10°Balling (25°C)	1,72 cP	1,37 cP	1,27 cP

La définition de BGU et FBG est la même que celle donnée à l'exemple Bb 4.1 La dernière colonne du tableau ci-dessus ne donne que l'activité et la quantité provenant de la SPS-ase comme indiqué.

- 5 Ceremix est une préparation de bêta-glucanase bactérielle décrite dans le document d'information B 216 b-GB 1000, Février 1982, disponible chez NOVO Industri A/S. Bb 5. Additif enzymatique pouvant être utilisé pendant

la fermentation et/ou le stockage de la bière.

- 10 On peut ajouter de la SPS-ase pendant la fermentation du moût ou pendant le stockage de la bière afin de réduire la teneur en bêta-glucanes et pour améliorer la filtration de la bière et la stabilité de celle-ci par rapport au louche. La SPS-ase exerce également un effet sur les 15 protéines responsables d'un louche se formant à froid.

Bb 6. Agent destiné à enlever la peau de l'amande.

- Pendant l'étape mécanique qui consiste à enlever la peau des amandes, qui suit l'étape d'émondage des amandes, un certain pourcentage de peau d'amandes n'est 20 pas éliminé. On a trouvé qu'un traitement enzymatique des amandes provoque une diminution du pourcentage indiqué ci-dessus.

Bc 1. Décomposition de différents déchets.

- Dans certains procédés de fabrication, on produit 25 de grandes quantités de carbohydrates contenus dans des déchets,. Ceci est le cas, par exemple, lors de la production d'un isolat de soja par extraction à l'eau et précipitation au moyen de l'acide, de lait de soja et de tofu (un type particulier de fromage japonais). A cet égard, on 30 peut également citer la pulpe résiduelle des pommes, des poires ou des agrumes. On a trouvé qu'une préparation de SPS-ase est capable de liquéfier complètement ces déchets contenant des hydrates de carbone et de produire des sucres fermentables qui peuvent être utilisés en tant que 35 substance de départ pour une fermentation d'éthanol.

Exemple Bc 1.1

Lors de la production classique de lait de soja ou de tofu, on plonge souvent les fèves de soja dans l'eau bouillante, mélange et extrait avec de l'eau chaude, après
 5 quoi on effectue une séparation. Le résidu de cette séparation est la substance utilisée dans cet essai. La phase liquide est constituée par le lait de soja qui peut être traité ultérieurement pour produire du tofu.

On a broyé 10 kg de fèves de soja entières ob-
 10 tenues chez Aarhus Oliefabrik A/S simultanément avec 70 litres d'eau bouillante dans un broyeur Fryma du type MZ 110. La boue de broyage a été maintenue au-dessus de 85°C pendant 15 minutes afin d'inactiver les enzymes de graines naturelles qui développent l'odeur désagréable connue du soja.
 15 Ensuite, on a centrifugé 5 litres de cette boue de soja dans le laboratoire pendant 15 minutes à 3000 x g (g = gravité). On a trouvé, par analyse, que la rémanence contenait 20,45 % et 20,06% de matières sèches (mesures faites en double, moyenne calculée : 20,26%). On a ajouté lentement du HCl
 20 6 N qui a été trituré dans la rémanence au moyen d'une spatule jusqu'à ce qu'un pH-mètre indique 4,50, lorsque l'électrode est introduite directement dans la masse.

On a effectué, à 50°C, dans un becher de 500 ml
 des réactions d'enzyme avec 2 x 200 g de la masse avec
 25 les deux dosages de SPS-ase (KRF-68), E/S = 0,5 % par rapport aux matières sèches et E/S = 3,0 % par rapport aux matières sèches. L'enzyme sèche a été ajoutée à la masse. Pendant les 1 à 2 premières heures, on a effectué l'agitation au moyen d'une spatule et ensuite la masse a été
 30 liquéfiée à une telle mesure que l'on puisse efficacement effectuer l'agitation au moyen d'un agitateur magnétique. Le temps de réaction total était de 21 heures. On a mesuré l'osmolalité au moyen d'un osmomètre, pendant la durée de la réaction (Advanced Digimatic 3DII disponible
 35 chez Advanced Instruments Inc.). Les résultats du tableau

Bc I montrent l'évolution de la réaction. A la fin de l'essai, les mélanges ont été centrifugés à 3000 x g pendant 15 minutes. Une couche d'huile est apparue à la surface du surnageant et le volume de celle-ci a été déterminé. Une couche de boue non tassée est apparue comme couche de fond. Le surnageant contenant l'huile a été retiré au moyen d'une pipette. L'huile a été combinée avec la phase d'eau claire par homogénéisation et on a retiré un échantillon pour la détermination des matières sèches. Les résultats donnés au tableau Bc I montrent clairement que ce déchet peut être liquéfié par une réaction enzymatique et que l'on peut produire de l'huile brute comme mentionné à la partie A 4. Après avoir récupéré l'huile, on peut utiliser de différentes manières la rémanence solubilisée, par exemple pour une fermentation en composés utilisables ou par une utilisation en tant que aliment pour bétail ou produit alimentaire après concentration et séchage ou pour des produits utiles après une purification ultérieure.

Tableau Bc I. Résultats obtenus lors de la liquéfaction de lait de soja et de boue de tofu.

5	Conditions de réaction et résultats	Essai A			Essai B		
10	Masse de résidus	200 g			200 g		
	Masse de SPS-ase (KRF-68)	0,20 g			1,20 g		
	Température	50° C			50 °C		
	pH	4,50			4,50		
	Temps de réaction	21 heures			21 heures		
15	Résultats mesurés sur un osmomètre pendant l'évolution de la réaction	t mn	osmo-lalité mOsm	Δ os-mo-mali-té mOsm	t mn	osmo-mali-té mOsm	Δ osmo-mali-té mOsm
		0	287	0	0	282	0
		10	313	26	10	386	86
		-	-	-	25	497	215
		40	391	104	45	601	319
		95	501	214	95	718	436
		250	634	347	250	875	593
20	Δ Osmolalité est la valeur corrigée de l'osmolalité du mélange à t = 0	1260	907	620	1260	1145	863
25	Mélange réactionnel :						
	Matière sèche	20,3 %			20,7 %		
	Surnageant :						
	Matière sèche	18,0 %			19,4 %		
	Surnageant :						
30	Teneur en huile	8 à 10 %			8 à 10 %		
	Calculs du % des matières sèches solubilisées	88,6 %			93,5 %		

Bc 2. Saccharification et fermentation simultanées.

Les substances végétales contenant des hydrates de carbone, par exemple les tubercules comme les topinambours, les pommes de terre, les patates douces, le manioc ou la pulpe de tels tubercules, à savoir la substance

restant après avoir éliminé les composants extraits, peuvent être saccharifiés par un traitement avec une préparation de SPS-ase et, simultanément, les saccharides fermentables obtenus peuvent être fermentés en éthanol.

5 Exemple Bc 2.1

La production d'éthanol par fermentation des topinambours décomposés contenant de l'inuline a été expérimentée à l'échelle de laboratoire par une saccharification simultanée avec une SPS-ase et une inulinase et par quatre prétraitements différents des topinambours.

SPS-ase : On a utilisé la préparation de SPS-ase KRF-68.

Inulinase : L'inulinase a été produite par fermentation de *Asp. ficuum* (CBS 55 565). L'activité d'inulinase est déterminée comme décrit dans Research Disclosure No. 21234 (Décembre 1981) p. 456 à 458.

Fermentation au laboratoire : On a fait fermenter des fractions de 150 gr de purée prétraitée (décrite plus loin) après avoir ajouté 4,5 g de levure de boulangerie et 1 ml d'une solution de Pluronic à 4 % en tant qu'agent anti-moussant. Les flacons de fermentation sont munis de pièges de CO_2 contenant de l'acide sulfurique à 98 % et la fermentation est suivie par une mesure de la perte en poids due à la libération de CO_2 . Le contenu du flacon est agité pendant la fermentation qui est effectuée à 30°C. On a utilisé trois flacons pour chaque paramètre étudié.

Dans le tableau Bc II, la perte en poids due à la libération de CO_2 est convertie en éthanol, en supposant qu'1 mole de CO_2 libérée équivaut à 1 mole de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, à savoir $1 \text{ g } \text{CO}_2 \sim \frac{46}{44} \text{ g } \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.

30 Prétraitements des topinambours :

Traitement A : On a effectué une cuisson suivant le procédé de Henze de 14,1 kg de topinambours à 140°C et à 4 à 5 atm pendant 20 minutes. Le poids après cuisson était de 19,0 kg (16,9 % de matière sèche). Les ferment-

14

tations: ont été effectuées directement sur la purée.

5 **Traitement B :** Des topinambours lavés et coupés en tranches ont été mélangés avec de l'eau (1:1) et ont été mêlés dans un mélangeur Waring. La purée a ensuite été soumise à un traitement thermique pendant une heure, à 85°C et à pH=4,5.

Traitement C : Comme le traitement B, mais le pH n'a pas été réglé.

10 **Traitement D :** Comme le traitement B, mais on n'a pas effectué de traitement thermique et on n'a pas réglé le pH.

15 **Résultats :** Les résultats du tableau Bc II montrent l'effet de l'addition d'une SPS-ase à la purée prétraitée sur le rendement en éthanol. On a obtenu une amélioration nette du rendement en éthanol sur toutes les purées prétraitées lorsqu'on a ajouté une SPS-ase.

Tableau Bc II. Résultats de fermentation lors d'une fermentation simultanée et d'une saccharification enzymatique de topinambours.

Prétraitement	Unité d'inulnase ajoutée à 1 g de matière sèche	SPS-ase E/S %	Perte en CO ₂ (g) après 42 à 44 hres de fermentation	% éthanol produit par rapport aux matières sèches
A	1,5	0	7,65 ± 0,05	31,5
	1,5	0,27	8,07 ± 0,08	33,2
B	1,5	0	4,85 ± 0,03	29,7
	1,5	0,40	5,41 ± 0,03	33,1
C	1,5	0	5,70 ± 0,05	34,8
	1,5	0,10	5,97 ± 0,01	36,5
	1,5	0,20	6,13 ± 0,06	37,5
	1,5	0,30	6,13 ± 0,00	37,5
	1,5	0,40	6,18 ± 0,05	37,8
D	1,5	0	5,77 ± 0,02	35,3
	1,5	0,10	5,89 ± 0,00	36,0
	1,5	0,20	6,04 ± 0,11	36,9
	1,5	0,30	6,01 ± 0,01	36,7
	1,5	0,40	6,02 ± 0,03	36,8
	0	0,40	5,48 ± 0,02	33,5

Bc 3. Décomposition de cellulose

On a trouvé que des substances contenant de la cellulose comme de la paille, par exemple la paille de blé, la sciure, du papier et de la lignocellulose, peuvent être hydrolysées en une mesure plus grande au moyen d'une préparation de SPS-ase qu'avec des cellulases classiques. Ceci est montré par l'exemple suivant dans lequel une substance de cellulose cristalline (AVICEL) est traitée au moyen d'une cellulase classique Celluclast[®] 200 produite par la souche *Trichoderma reesei* et au moyen de la préparation de SPS-ase KRF-68.

Exemple Bc 3.1

On a mis l' Avicel en suspension dans l'eau (20% de matière sèche) ; on a réglé le pH à 5 et on a maintenu la température à 50°C. Après un temps de réaction de 24 heures, on a filtré la boue et on a mesuré la teneur en sucre réducteur (mg de glucose/g AVICEL). En utilisant des quantités d'enzyme de 5 et 20 % de la teneur en cellulose, on a obtenu les valeurs suivantes.

20 Tableau Bc III.

Enzyme	E/S %	mg glucose/g AVICEL
Celluclast	5	80
SPS-ase	5	200
Celluclast	20	100
SPS-ase	20	340

Bc 4. Application en tant que additif de cuisson.

On a également constaté que les préparations de SPS-ase conviennent particulièrement comme additifs (adjuvants) de cuisson de boulangerie. Ainsi, lorsqu'on ajoute une préparation de SPS-ase à une farine sèche, avant production de la pâte, il est possible d'obtenir un pain présentant une qualité supérieure en ce qui concerne le volume, la mie et le goût. De ce fait, il est possible d'obtenir un pain de haute qualité avec une farine de blé

64

de moins bonne qualité si on utilise la préparation de SPS-ase en tant que additif.

Bc 5. Amélioration du rendement en alcool et en biomasse pendant la fermentation de la liqueur de sulfite dans la production du papier.

5 On a également trouvé que le rendement en éthanol peut être amélioré si l'on traite la liqueur de sulfite du papier avec une préparation de SPS-ase avant qu'elle ne soit utilisée à titre de source d'hydrate de
10 carbone pour la fermentation en éthanol. La liqueur de sulfite du papier peut également être utilisée pour la production de biomasse, par exemple une protéine unicellulaire, par fermentation ; même dans ce cas, le rendement en biomasse a été amélioré lorsqu'on a traité préalablement
15 la liqueur de sulfite avec une préparation de SPS-ase. De même, la décomposition due à la présence de la préparation de SPS-ase et la fermentation peuvent être effectuées simultanément.

Bc 6. Assèchement de produits de boue biologique.

20 Lors d'extraction classique à l'eau de nombreuses substances biologiques provenant de substances végétales brutes, on obtient de grands volumes de résidus insolubles consistant en grande partie de polysaccharides gonflés. Ce cas se présente, par exemple lorsqu'on produit du lait
25 de soja, du tofu ou un isolat de soja par extraction à l'eau de fèves de soja, de farine de soja dégraissée ou de flocons blancs. La substance de polysaccharides gonflés structurée peut ensuite être traitée en une petite mesure avec une SPS-ase, ce qui ouvre la structure en réseau de la
30 substance et, de ce fait, il n'y a que de faibles quantités d'hydrates de carbone qui sont solubilisés. Ainsi, la substance est déshumidifiée et on obtient, par conséquent, une teneur en matière sèche plus élevée dans la boue par rapport au produit obtenu sans traitement enzymatique. De
35 ce fait, le procédé enzymatique présente l'avantage qui

4

consiste en une consommation en énergie considérablement plus faible pour éliminer l'eau par séchage et ledit traitement permet également de produire un aliment pour bétail sec meilleur marché ou un agent de masse pour des applications alimentaires.

Bc 7. Additif pour aliment de bétail ensilé.

Il est connu d'ajouter des additifs enzymatiques au fourrage ensilé afin d'accroître la vitesse du processus d'ensilage et la digestibilité du fourrage ensilé. On a trouvé qu'une préparation de SPS-ase est supérieure comparé aux additifs enzymatiques connus pour le fourrage ensilé.

Afin d'être plus clair, on donne ci-dessous un aperçu des figures auxquelles on a déjà fait référence.

La fig. N°	Concerne	Décrit
1	La partie générale de la description	L'effet de liaison entre le SPS et la protéine de soja
2	La partie générale de la description	Tableau synoptique décrivant la préparation du SPS
3	2ème partie	Courbe de calibrage pour la chromatographie HPLC à filtration sur gel
4	2ème partie	Chromatogramme HPLC à filtration sur gel du SPS
5	2ème partie	Chromatogramme HPLC à filtration sur gel du SPS décomposé par la SPS-ase
6	2ème et 3ème parties	Chromatogramme HPLC à filtration sur gel du surnageant de SPS, soumis à incubation avec une protéine de soja
7	2ème partie	Chromatogramme HPLC à filtration sur gel du surnageant de SPS décomposé, soumis à incubation avec une protéine de soja

	La fig.	N°	Concerne	Décrit
		8	3ème partie	Chromatogramme HPLC à filtration sur gel de APS décomposé par Pectolyase
5		9	3ème partie	Chromatogramme HPLC à filtration sur gel de APS décomposé par la SPS-ase
		10	3ème partie	Chromatogramme HPLC à filtration sur gel du SPS traité avec la Pectolyase
10		11	7ème partie	Pics immunoélectrophorétiques comportant un pic de SPS-ase identifié par la technique de recouvrement
		12	8ème partie	Chromatogramme à échange ionique d'une SPS-ase
15		13	9ème partie	Dépendance de l'activité du pH d'une SPS-ase
		14	9ème partie	Dépendance de l'activité de la température d'une SPS-ase
20		15	9ème partie	Stabilité à la température d'une SPS-ase
		16	10ème partie	Stabilité du pH d'une protéase dans une préparation de SPS-ase
25				

h

REVENDICATIONS

1. A titre de produit industriel nouveau, la SPS-ase, à savoir une carbohydrase sous une forme utilisable et capable de décomposer le SPS de soja dans des conditions appropriées pour donner des produits de décomposition qui se fixent eux-mêmes sur une protéine, en milieu aqueux, à un degré moindre que celui auquel le SPS de soja se serait fixé lui-même, avant décomposition, sur la même protéine dans des conditions correspondantes.
2. SPS-ase suivant la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle est capable de décomposer le SPS de soja, en milieu aqueux, pour donner des produits de décomposition qui se fixent eux-mêmes sur une protéine végétale, en milieu aqueux, à un degré moindre que celui auquel le SPS de soja se serait fixé lui-même, avant décomposition, sur la même protéine végétale, en milieu aqueux.
3. SPS-ase suivant l'une des revendications 1 ou 2 caractérisée en ce qu'elle est capable de décomposer le SPS de soja, en milieu aqueux, à un pH ne s'écartant pas plus de 1,5 unités de la valeur 4,5, pour donner des produits de décomposition qui se fixent eux-mêmes sur une protéine de soja, en milieu aqueux, à un degré moindre que celui auquel le SPS de soja se serait fixé lui-même, avant décomposition, sur la protéine de soja, en milieu aqueux.
4. SPS-ase suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que les produits de décomposition du SPS de soja se fixent eux-mêmes, après dégradation complète, sur la protéine de soja à un degré, représentant une valeur inférieure à 50 %, en particulier inférieure à 20 %, que celui auquel le SPS de soja se serait fixé lui-même, avant décomposition, sur la protéine végétale, en milieu aqueux.
5. SPS-ase suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisée en ce qu'elle réagit positivement

au test de la SPS-ase lorsqu'il est exécuté suivant le procédé de détermination qualitative et quantitative de la SPS-ase.

6. SPS-ase suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que la SPS-ase est produite au moyen d'un microorganisme appartenant au genre *Aspergillus*, de préférence appartenant au groupe *Aspergillus niger*.
- 7 SPS-ase suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'elle est dérivée des enzymes qui peuvent être produites par *Asp. aculeatus* CBS 101.43.
8. SPS-ase suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisée en ce qu'elle est identique au point de vue de l'immunoélectrophorèse à la SPS-ase produite au moyen de *Asp. aculéatus* CBS 101.43 et qu'elle peut être identifiée au moyen de la technique de recouvrement immunoélectrophorétique.
9. SPS isolé caractérisé en ce qu'il est produit à partir d'une protéine végétale brute servant de substance de départ.
10. SPS isolé suivant la revendication 9 et caractérisée en ce que la protéine végétale brute est une farine de soja dégraissée.
11. Procédé de sélection d'un microorganisme produisant une SPS-ase permettant de produire la SPS-ase suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en que le microorganisme à tester est cultivé sur un milieu de fermentation dont la source principale de carbone est du SPS suivant la revendication 9 ou 10, après quoi un échantillon du milieu de fermentation est analysé pour déterminer la SPS-ase et le microorganisme en question est choisi en tant que microorganisme produisant une SPS-ase, si l'analyse de la SPS-ase est positive.
12. Procédé de production de SPS-ase suivant l'une

24

- quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'une souche choisie suivant le procédé de sélection de la revendication 11 est cultivée dans un milieu nutritif.
13. Procédé suivant la revendication 12 caractérisé en ce que la souche Asp. aculeatus CBS 101.43 ou Asp. japonicus IFO 4408 est cultivée dans un milieu nutritif.
14. Procédé suivant la revendication 12 ou 13 caractérisé en ce que la culture est effectuée en culture noyée à un pH compris dans l'intervalle de 3 à 7, de préférence de 4 à 6, à une température dans l'intervalle de 20 à 40°C, de préférence de 25 à 35°C, et en ce que le milieu nutritif contient des sources de carbone et d'azote et des sels inorganiques.
15. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 12 à 14 caractérisé en ce que le milieu nutritif contient de la farine de soja.
16. Procédé suivant la revendication 15 caractérisé en ce que la farine de soja est traitée par une enzyme protéolytique avant d'être utilisée comme composant du substrat, l'enzyme protéolytique étant, de préférence, produite par voie microbienne au moyen de *Bacillus licheniformis*.
17. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 12 à 16 caractérisé en ce qu'une solution stérile de pectine est ajoutée de manière aseptique au bouillon de fermentation pendant la culture.
18. Procédé de décomposition de polysaccharides, de préférence des polysaccharides de parois cellulaires de plantes, au moyen d'une carbohydrase, caractérisé en ce qu'on met une préparation de SPS-ase suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8 en contact avec un substrat pour ladite préparation de SPS-ase, exception faite des décompositions déjà décrites dans la demande de brevet danois n° 5691/81.
19. Procédé de décomposition de polysaccharides,

suivant la revendication 18, caractérisé en ce que la décomposition est accompagnée par l'isolement ou l'extraction d'une substance biologique différente de la protéine de soja et des protéines végétales apparentées provenant d'une substance biologique brute, la préparation de SPS-5 ase étant essentiellement exempte de toute enzyme capable de décomposer ladite substance biologique.

20. Procédé de décomposition de polysaccharides suivant la revendication 18 ou 19 caractérisé en ce que un ou plusieurs des produits de réaction, sans distinguer s'ils sont des produits finals recherchés ou des déchets, sont traités ultérieurement en même temps que le traitement enzymatique ou après celui-ci.

21. Procédé de décomposition de polysaccharides suivant la revendication 20 caractérisé en ce que le traitement ultérieur est une fermentation alcoolique dans le cas où l'un des produits de la réaction est un sucre fermentable.

Liège, le 21 décembre 1982
Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S

Michel VAN MALDEREN
(FREYLINGER & ASSOCIES)
Ppon



805430

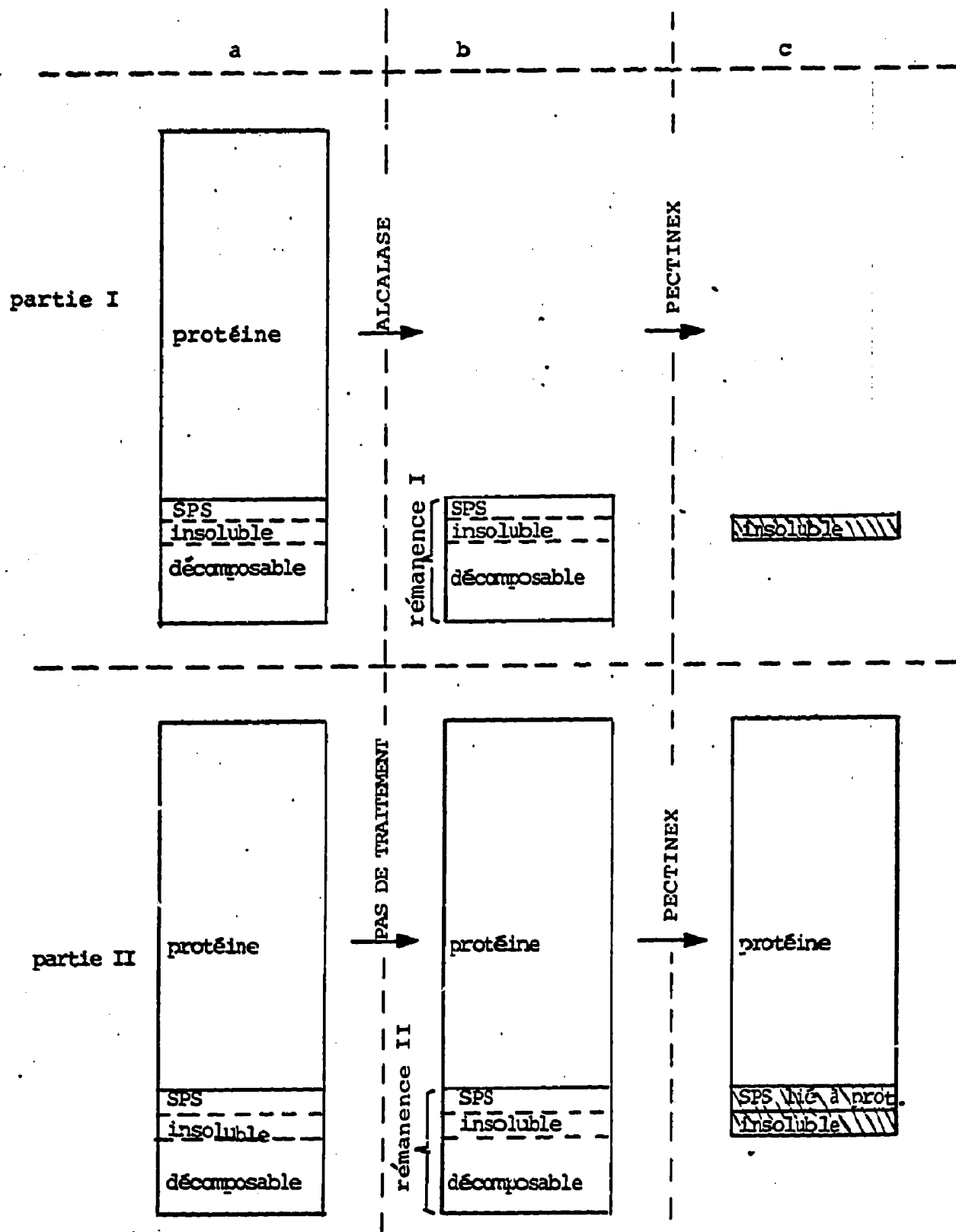


FIG. 1

Liège, le 21 décembre 1982
Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S

Michel VAN MALDEREN
(FREVING & ASSOCIES)
Pron

gok

005430

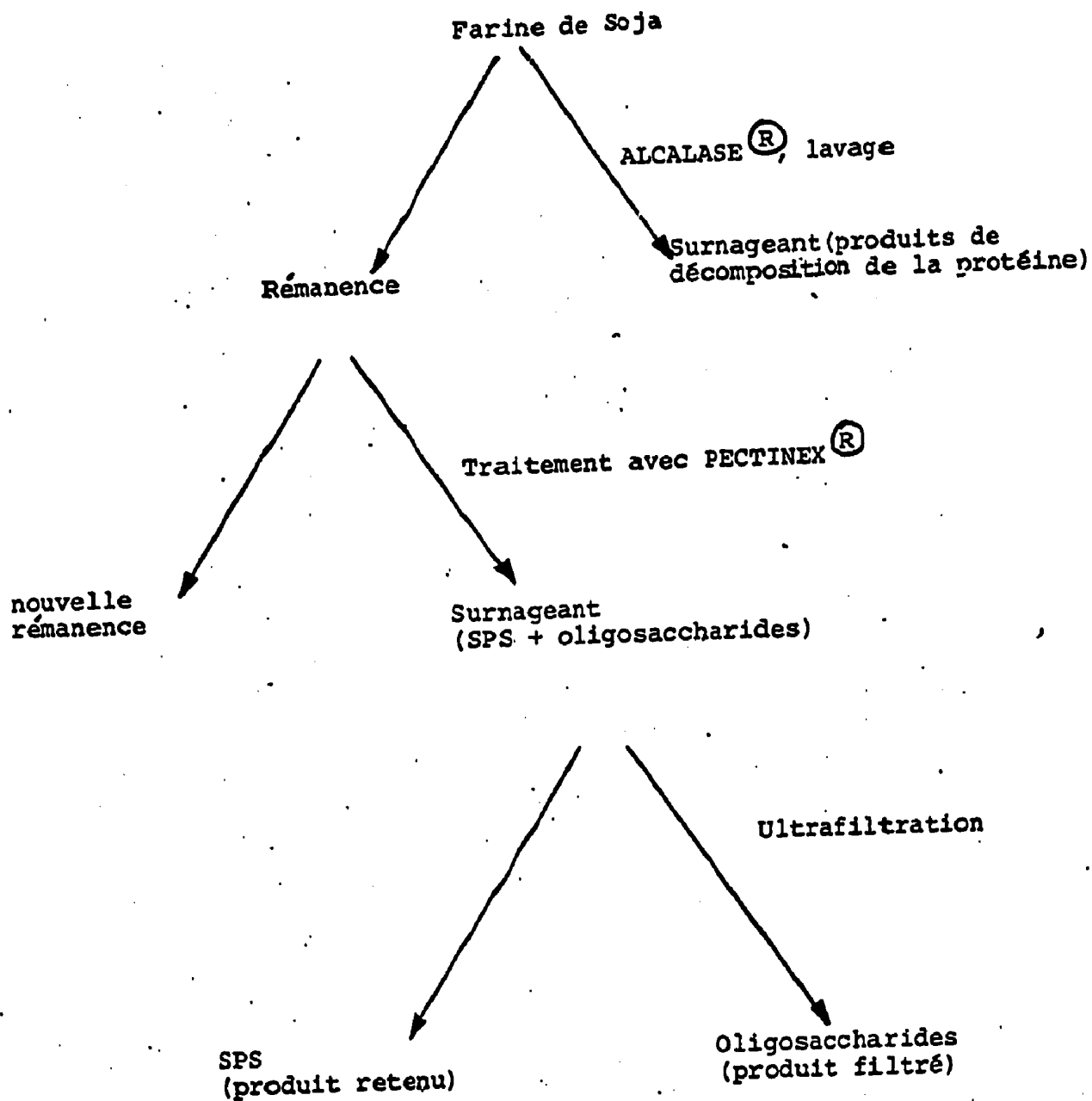


FIG. 2

Liège, le 21 décembre 1982
Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S

Michel VAN MALDEREN
(FREYLINGER & ASSOCIES)
Ppon

g. o. k.

885430

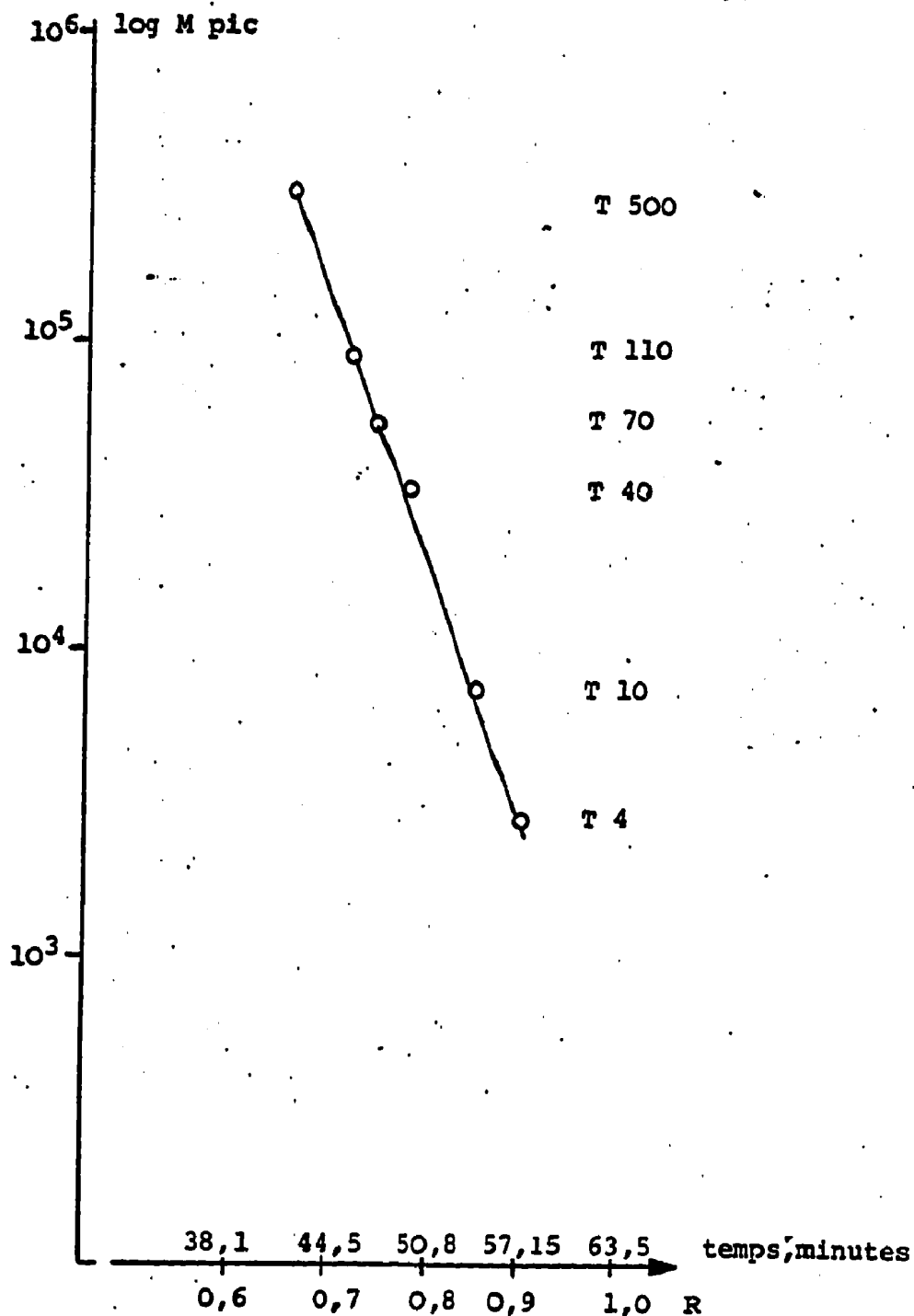


FIG. 3

Liège, le 21 décembre 1982
Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S

Michel VAN MALDEREN
(FREYLINGER & ASSOCIES)
Ppon

[Handwritten signature]

095430



FIG. 4

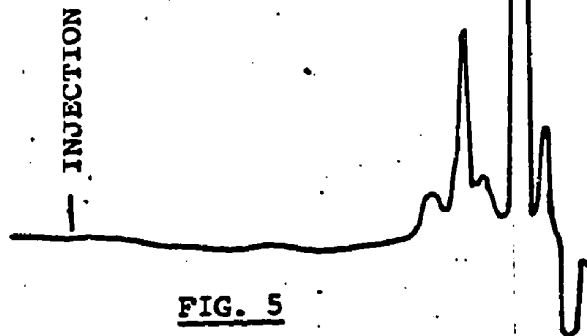


FIG. 5



FIG. 6

Liège, le 21 décembre 1982
Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S

Michel VAN MALDEREN
(FREYLINGER & ASSOCIATES)

Ppon

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "c. J. G. L.", written over the printed name.

895430

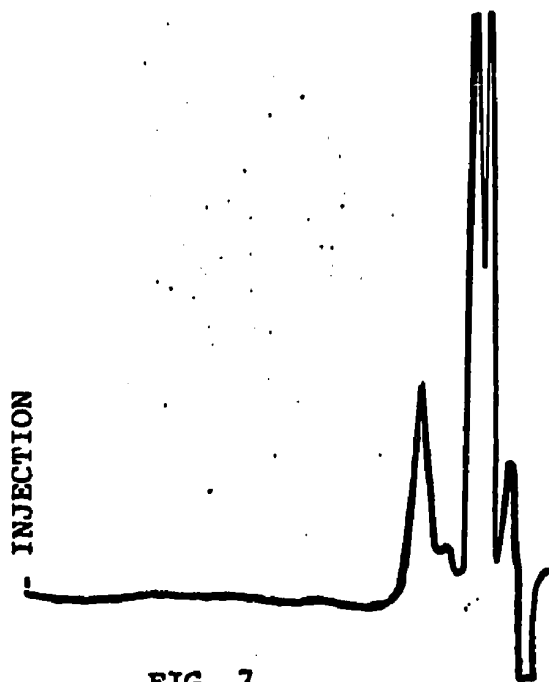


FIG. 7

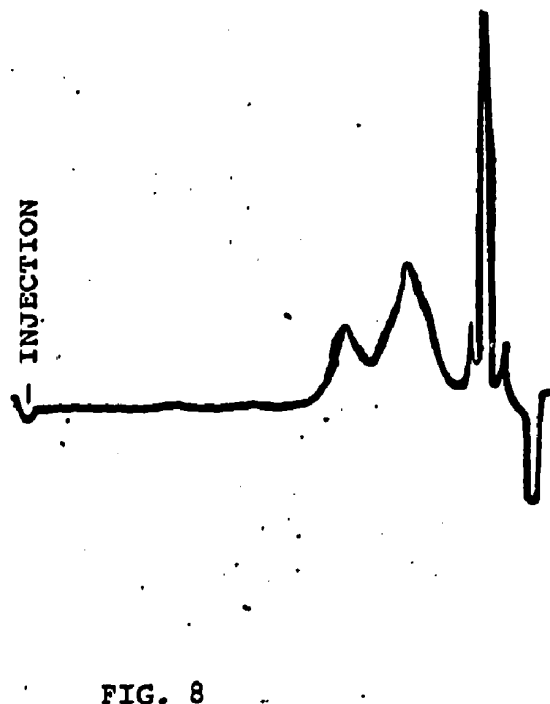


FIG. 8

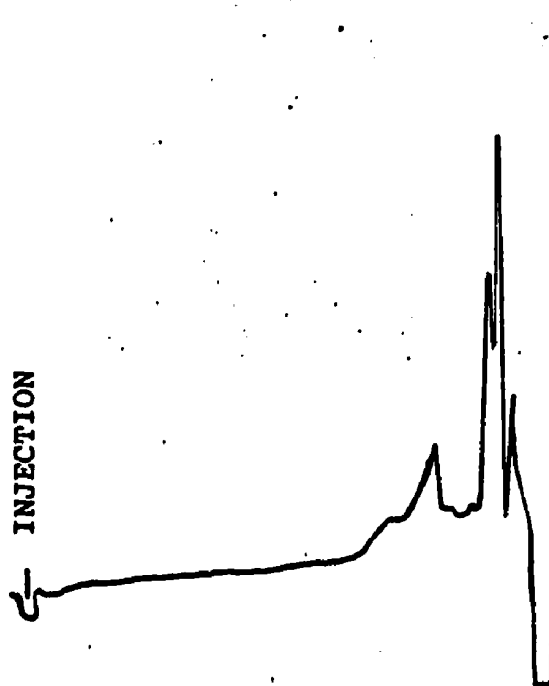


FIG. 9

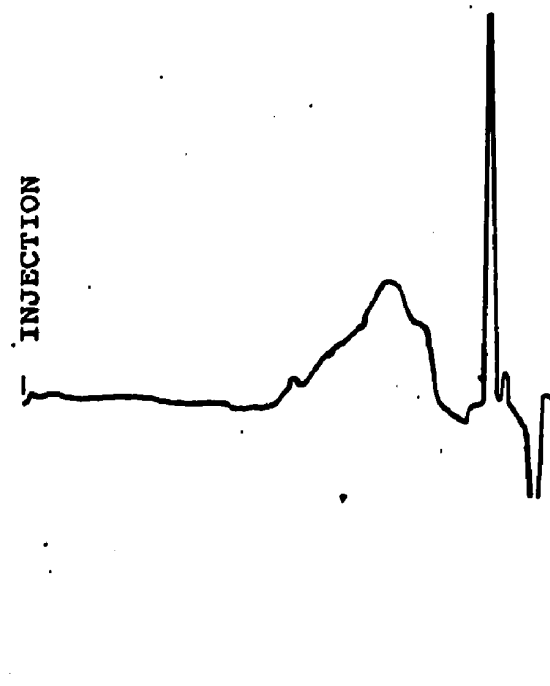


FIG. 10

Liège, le 21 décembre 1982
Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S
Michel VAN MÄLDEREN
(FREYLINGER & ASSOCIÉS)
Ppon

gob

025430

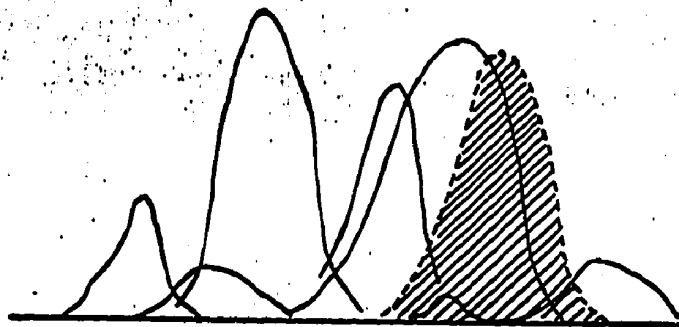


FIG. 11

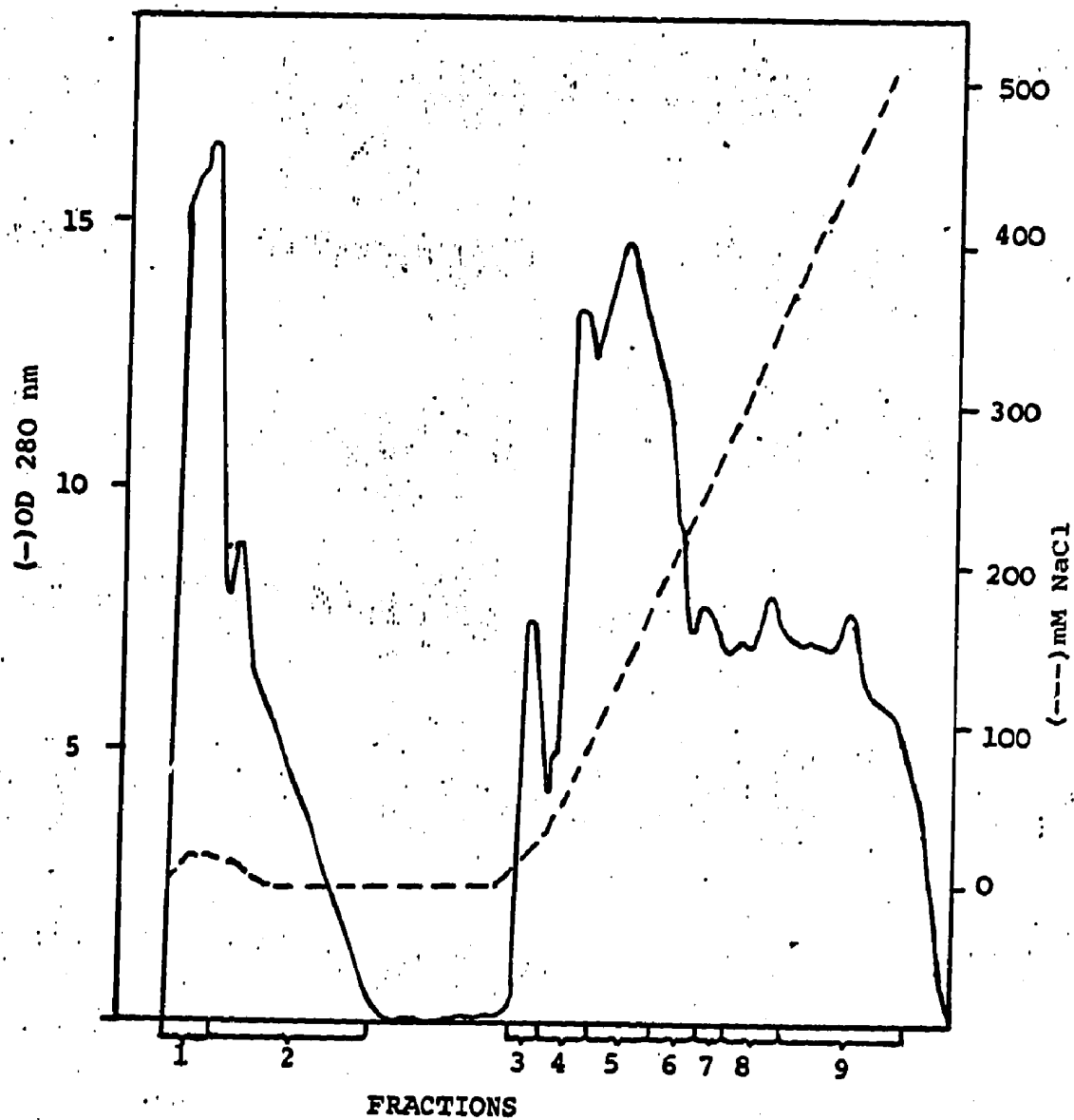


FIG. 12

Liège, 1e 21 décembre 1982
Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S

Michel VAN MALDEREN
(FREYLINGER & ASSOCIÉS)
Ppon

[Handwritten signature]

095430

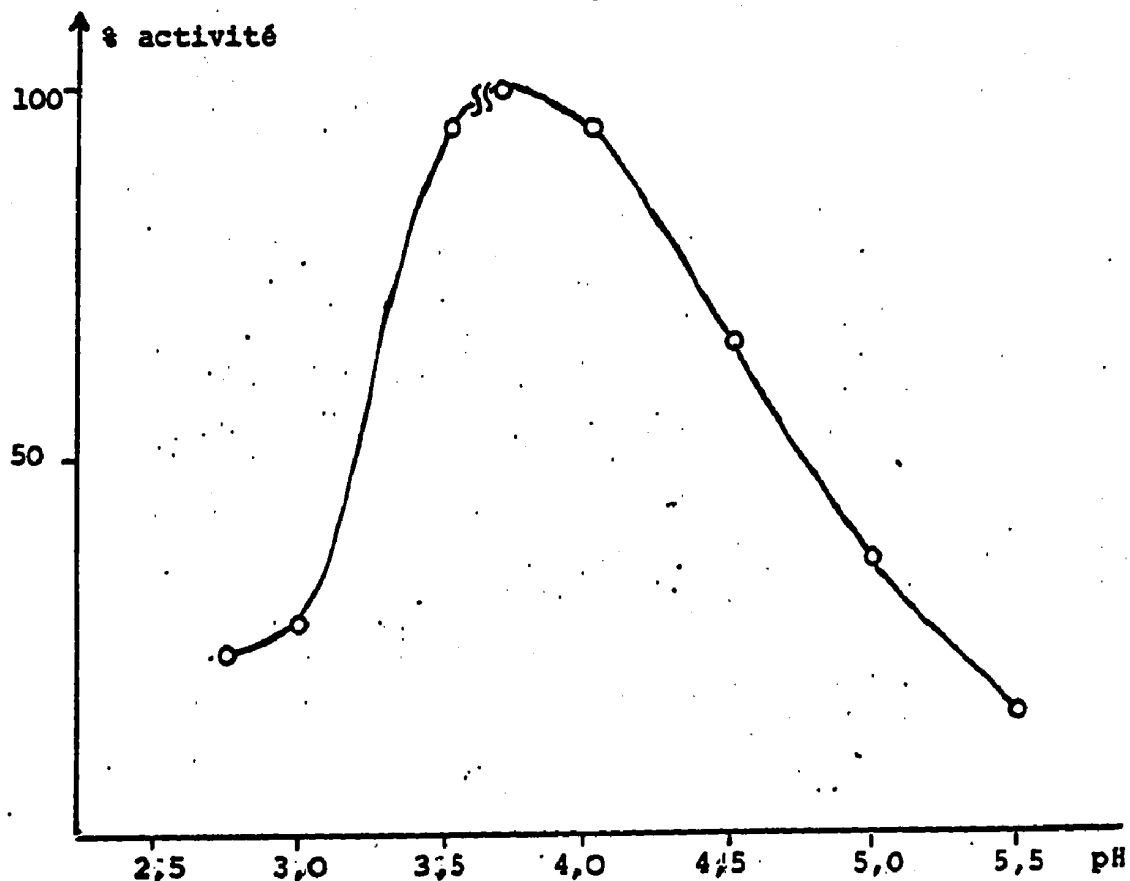


FIG. 13

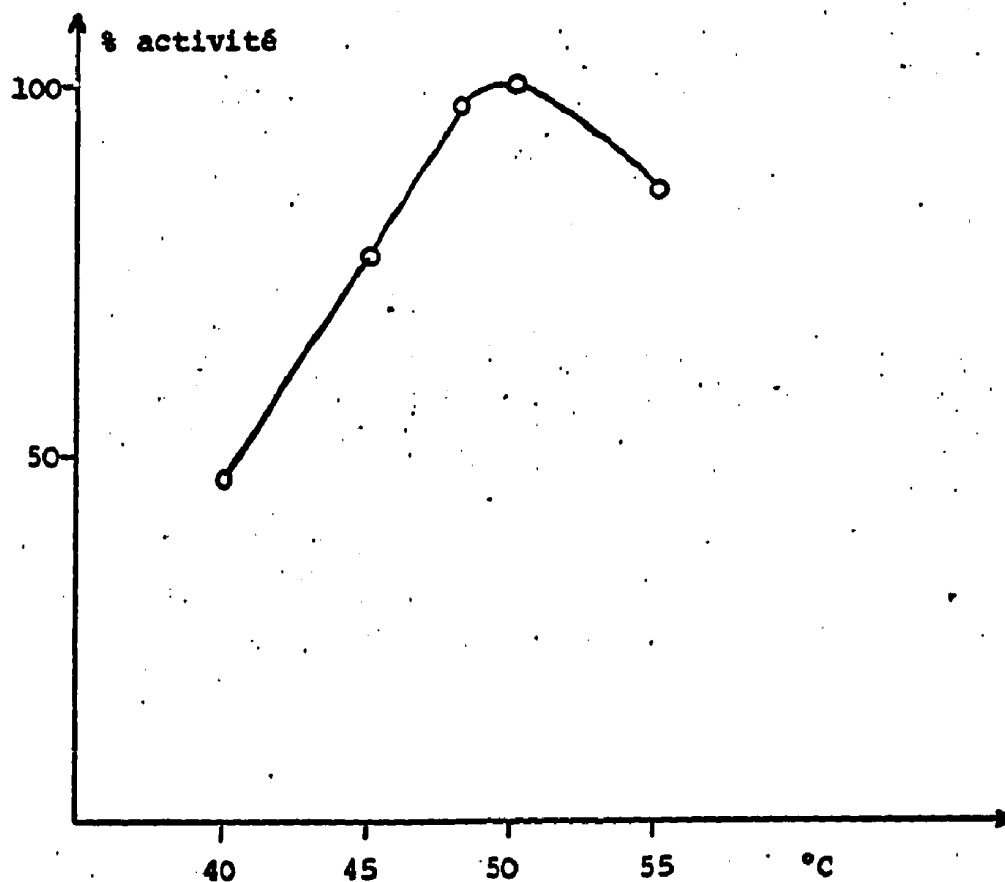


FIG. 14

Michel VAN MALDEREN
(FREYLINGER & ASSOCIES)
Ppon

Liège, le 21 décembre 1982
Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S

[Signature]

89530

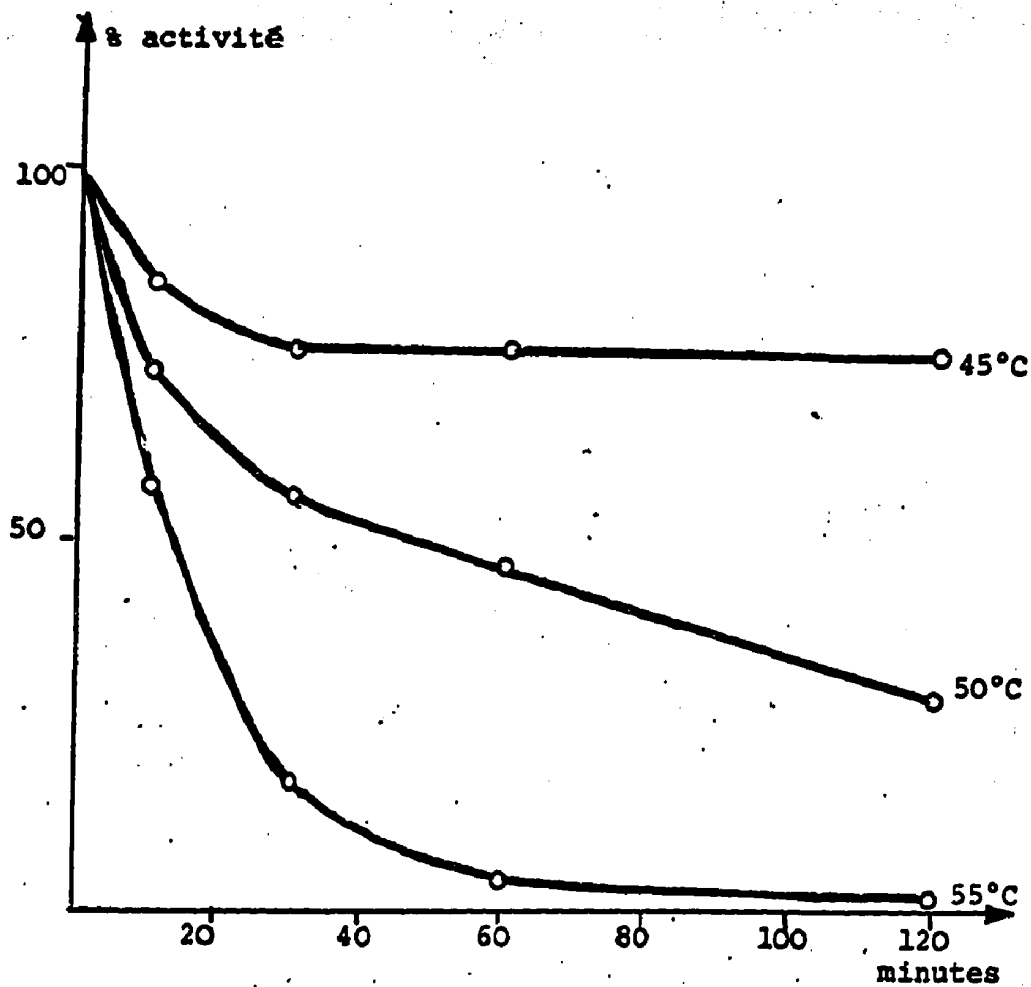


FIG. 15

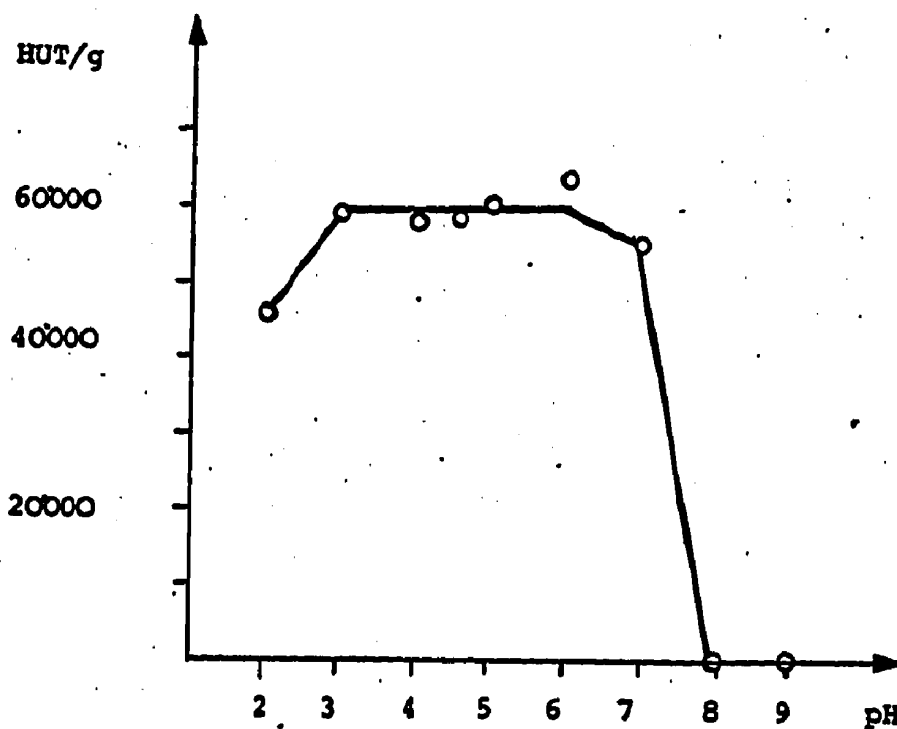


FIG. 16

Michel VAN MALDEREN
(FREYLINGER & ASSOCIATES)
Ppon

Liège, le 21 décembre 1982
Par Pr.: NOVO INDUSTRI A/S