

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

①① N° de publication : **2 648 147**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **89 08153**

⑤① Int Cl^e : C 12 P 7/64.

①②

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ PROCÉDE POUR LA PREPARATION DE BETA-MONOGLYCERIDES ET PRODUITS OBTENUS

②② Date de dépôt : 13.06.89.

③③ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public
de la demande : 14.12.90 Bulletin 90/50.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 16.08.91 Bulletin 91/33.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport
de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : GATTEFOSSE SA., société
anonyme. -FR.

⑦② Inventeur(s) : BRUNO MAHLER - JEAN
GRAILLE - MICHEL PINA - DIDIER MONTET

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAURENT

FR 2 648 147 - B1



PROCEDE POUR LA PREPARATION DE BETA-MONOGLYCERIDES ET
PRODUITS OBTENUS.

L'invention concerne un nouveau procédé pour la
5 préparation de béta-monoglycérides par voie enzymati-
que ; elle se rapporte également aux produits ainsi ob-
tenus.

Comme on le sait, les compositions de béta-monogly-
10 cérides obtenus par hydrolyse enzymatique sont fonction
de la distribution et de la nature des acides gras pré-
sents sur les différentes positions des triglycérides
constitutifs des corps gras de départ.

15 Si le corps gras de départ renferme une quantité
importante d'un acide gras particulier, notamment un
acide gras essentiel ou présentant un intérêt quelcon-
que, par exemple l'acide gamma-linolénique (GLA), et que
cet acide gras particulier soit préférentiellement fixé
20 sur la position centrale des triglycérides, les béta-
monoglycérides obtenus sont encore plus concentrés dans
cet acide.

Le GLA est l'un des acides gras essentiel actuelle-
25 ment de plus en plus recherché pour ses applications dans
l'industrie des cosmétiques, notamment comme agent régén-
érateur. Pour l'essentiel, ce composé est actuellement
extrait d'huiles obtenues de graines de quelques plantes,
telles que de la bourrache, l'onagre ou du cassis ou
30 extrait des réserves lipidiques de certains microorga-
nismes. A ce jour, la préparation de GLA, ou de tout
autre acide gras suscitant un intérêt quelconque, sous
une forme pure ou concentrée fait en général appel à des
techniques coûteuses, encore peu compatibles avec une
35 exploitation industrielle.

Parmi les différentes sources possibles de GLA, on a retenu essentiellement l'huile de bourrache, car elle contient une forte proportion de GLA en position bêta (40 à 45 % par rapport aux acides gras estérifiant cette position, contre 20 à 25 % dans les acides gras totaux de l'huile). Les procédés chimiques actuellement connus pour préparer des bêta monoglycérides conduisent essentiellement à un mélange des formes alpha et bêta-monoglycérides à l'équilibre, très riche en forme alpha. De plus, comme il s'agit de réactions statistiques, la composition en acide gras des monoglycérides reste inchangée et est égale à celle des triglycérides de l'huile de départ.

L'industrie des cosmétiques emploie largement des molécules amphiphiles, tels que les monoglycérides, et recherche en même temps des moyens originaux de formulations à base d'acides gras particuliers tels que GLA. L'invention vise à obtenir des monoglycérides plus riches en GLA que l'huile native, notamment sous forme de bêta-monoglycérides.

L'invention consiste en un procédé de préparation par hydrolyse enzymatique régiosélective 1-3 d'un corps gras donné, seul ou en mélange dans leur forme native, randomisée, interestérifiée régiosélectivement, ou partiellement hydrolysée en diglycérides 1-2 ou 2-3, à l'aide de biocatalyseurs permettant d'obtenir économiquement et sélectivement des bêta-monoglycérides dans des conditions réactionnelles non isomérisantes. La méthode enzymatique mise au point permettant d'obtenir seulement les bêta-monoglycérides revient à produire un composé enrichi ou appauvri en un ou des acides gras donnés s'ils sont préférentiellement présents ou man- quants en position centrale par rapport à la structure

glycéridique globale de départ.

Le procédé selon l'invention pour la préparation de
bêta-monoglycérides par hydrolyse enzymatique régiosé-
5 lective 1-3 de triglycérides en présence d'eau se caracté-
rise en ce que la réaction est effectuée dans un mi-
lieu solvant homogène comprenant l'eau et un composé
chlorofluorocarboné. Il va de soi que la présence d'eau
dans le mélange solvant doit être en quantité suffisante
10 pour permettre d'une part l'activité de l'enzyme et
d'autre part la réaction d'hydrolyse.

En d'autres termes, l'invention consiste, pour la
préparation de bêta-monoglycérides par hydrolyse régio-
15 sélective 1-3, sans isomérisation de la forme bêta en
alpha, à faire appel d'une part à des corps gras riches
en acides gras particuliers, tels que des acides gras
polyinsaturés en position 2, tel que le GLA dans l'huile
de bourrache, et d'autre part à effectuer la réaction
20 d'hydrolyse en présence d'eau dans un milieu solvant
homogène composé pour partie essentielle d'un composé
chlorofluorocarboné.

Avantageusement, en pratique :

25 - le corps gras est une huile de bourrache raffinée
ou partiellement raffinée, (débarrassée de ses phos-
pholipides), ou obtenue par pression à froid ; ce peut
être également tous types de corps gras glycéridiques
seuls ou en mélange, sous la forme native, randomisée,
30 interestérifiée régiosélectivement ou partiellement hy-
drolysée en diglycérides 1-2 ou 2-3 ;

- le composé chlorofluorocarboné est le trichloro-
trifluoroéthane ($\text{CFCl}_2\text{-CF}_2\text{Cl}$), composé connu dans l'in-
dustrie sous la dénomination R113 ;

- le solvant homogène est l'azéotrope ternaire de ce trichlorotrifluoroéthane, de l'acétone et de l'eau ;

- le catalyseur enzymatique régiosélectif 1-3 est la lipase 1-3 régiosélective de *Mucor miehei*, telle que
5 celle commercialisée par NOVO INDUSTRIE sous la marque déposée LIPOZYME ;

- la réaction est effectuée à une température comprise entre 20 et 70°C, notamment au voisinage de 37°C, de préférence en continu au contact d'un lit catalytique
10 fixe ou fluidisé ;

- le rapport poids/volume (P/V) est de 1 % en poids de corps gras par rapport au volume de solvant ;

- le temps de séjour du mélange réactionnel sur le biocatalyseur est inférieur à cent cinquante secondes.

15

Dans les conditions de réaction, l'utilisation d'un biocatalyseur régiosélectif 1-3 permet d'obtenir des béta-monoglycérides d'une stabilité suffisante pour conserver la structure béta. Jusqu'alors on ne savait
20 pas le faire de manière industrielle.

En d'autres termes, l'invention pour la préparation de béta-monoglycérides par hydrolyse biologique régiosélective, réside essentiellement dans la triple sélection
25 à savoir d'un corps gras tel que l'huile de bourrache, puis d'un mélange solvant homogène particulier à base de composés chlorofluorocarboné, notamment sous forme d'azéotrope ternaire, et enfin d'un biocatalyseur régiosélectif 1-3. Cette triple sélection permet non seule-
30 ment d'obtenir économiquement le résultat recherché, mais également et surtout d'opérer dans des conditions réactionnelles non isomérisantes garantissant ainsi la pureté des produits béta-monoglycérides fabriqués de la sorte.

Si toutefois une isomérisation intervenait ultérieu-
35 rement à la fabrication, celle-ci n'aurait guère d'incidence sur la qualité et le contenu des composés obtenus.

Après cette étape de production effectuée dans des conditions non isomérisantes, même si les béta-monoglycérides obtenus venaient à s'isomériser en alpha-monoglycérides, la concentration en cet ou ces acides gras particuliers (le GLA dans l'exemple de l'huile de bourrache) resterait inchangée dans la formulation industrielle dans laquelle les béta-monoglycérides ont été introduits.

- 10 La manière dont l'invention peut être réalisée et les avantages qui en découlent ressortiront mieux des exemples de réalisation qui suivent.

Exemple 1 :

- 15 A 37°C plus ou moins 1°C, on mélange sous agitation un gramme d'huile de colza dans cent millilitres de l'azéotrope ternaire acétone/eau/trichlorotrifluoroéthane. La dissolution est quasiment instantanée.

- 20 On ajoute à ce mélange cinq grammes de lipase régiosélective 1-3 de Mucor miehei commercialisé par NOVO Industrie sous la marque déposée "LIPOZYME". La réaction sous agitation magnétique dure environ une heure.

- 25 On obtient environ 100 % du rendement théorique en béta-monoglycérides.

De manière connue, on élimine les acides gras par dialyse et on récupère les béta-monoglycérides produits.

30

Exemple 2 :

- On répète l'exemple 1 en remplaçant le LIPOZYME par la lipase régiosélective 1-3 de Rhizopus arrhizus fixée sur celite. En deux heures, on obtient environ 90 % du
35 rendement théorique en béta-monoglycérides.

Exemple 3 :

On répète l'exemple 1 en faisant cette fois circuler le mélange réactionnel dans un réacteur à lit fixe contenant 7,5 grammes de LIPOZYME. La durée de contact 5 entre la solution et le biocatalyseur est d'environ cent cinquante secondes.

En sortie de réacteur, on obtient un miscella contenant un mélange de béta-monoglycérides et d'acides 10 gras. De manière connue, on élimine les acides gras par dialyse. On récupère ainsi les béta-monoglycérides dont la position est représentative de la position centrale des triglycérides de l'huile de colza et ce, avec un rendement d'environ 92 % du rendement théorique.

15

Exemple 4 :

On répète l'exemple 3 en remplaçant l'huile de colza par de l'huile de bourrache. On obtient un rendement d'environ 92 % du rendement théorique en béta-mono- 20 glycérides dont la composition en acides gras fait apparaître un enrichissement en acide gamma linoléinique (GLA) de 95 % environ par rapport à l'huile de départ, c'est-à-dire 41 % environ de GLA dans les béta-monoglycérides contre 21 % dans les triglycérides de départ.

25

Exemple 5 :

On répète l'exemple 3 en remplaçant le LIPOZYME par la lipase régiosélective 1-3 de Rhizopus arrhizus fixée sur célite. On obtient un rendement d'environ 80 % du 30 rendement théorique en béta-monoglycérides et un enrichissement en GLA de l'ordre de 75 à 80 % par rapport au corps gras de départ.

35

Le procédé selon l'invention présente de nombreux avantages. On peut citer :

- sa sélectivité,
 - sa simplicité,
- 5 - l'enrichissement ou l'appauvrissement en acides gras particuliers,
- l'obtention de monoglycérides uniquement béta,
 - la possibilité d'être industrialisé,
 - la stabilité des composés béta-monoglycérides.
- 10 De la sorte, les béta-monoglycérides ainsi préparés et même leurs éventuelles formes isomères générées ultérieurement peuvent être utilisées avec succès dans l'industrie des cosmétiques et de la diététique.

REVENDEICATIONS

1/ Procédé pour la préparation de béta-monoglycérides par hydrolyse enzymatique régio-sélective 1-3 de 5 triglycérides en présence d'eau, caractérisé en ce que la réaction est effectuée dans un milieu solvant homogène comprenant l'eau et un composé chlorofluorocarboné.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en 10 ce que le composé chlorofluorocarboné est le trichlorotrifluoroéthane.

3/ Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le solvant apolaire homogène est l'azéotrope 15 ternaire du trichlorotrifluoroéthane, de l'acétone et de l'eau.

4/ Procédé selon revendication 1, caractérisé en ce que le triglycéride est une huile de bourrache.

20

5/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le triglycéride est une huile végétale riche en acides gras polyinsaturés en position 2.

25 6/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le corps gras peut être seul ou en mélange sous forme native, randomisée, interestérifiée, régiosélectivement ou hydrolysée partiellement en diglycéride 1-2 ou 2-3.

30

7/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le biocatalyseur enzymatique est la lipase 1-3 sélective de Mucor miehei, telle que celle commercialisée par NOVO INDUSTRIE sous la marque déposée 35 LIPOZYME.

8/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la réaction est effectuée en continu en lit catalytique fixe ou fluidisé à une température comprise entre 20 et 70°C, de préférence au voisinage de 37°C.

9/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le mélange réactionnel comprend 0,1 à 30 % en poids d'huile végétale pour cent millilitres de solvant homogène.

10/ Béta-monoglycérides obtenus par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

AVIS DOCUMENTAIRE

(art. 19 de la loi n°68-1 modifiée du 2 janvier 1968 ; art. 40 à 53 du décret n°79-822 du 19 septembre 1979)

N°

Etabli par :

L'Institut national de la propriété industrielle

OBJET DE L'AVIS DOCUMENTAIRE

■ Conférant à son titulaire le droit exclusif d'exploiter l'invention, le brevet constitue pour les tiers, une **importante exception à la liberté d'entreprendre**.

C'est la raison pour laquelle la loi prévoit qu'un brevet n'est valable que si, entre autres conditions, l'invention :

- est "nouvelle", c'est-à-dire n'a pas été rendue publique en quelque lieu que ce soit, avant sa date de dépôt,
- implique une "activité inventive", c'est-à-dire dépasse le cadre de ce qui aurait été évident pour un homme du métier.

■ L'Institut n'est pas habilité, sauf absence manifeste de nouveauté, à refuser un brevet pour une invention ne répondant pas aux conditions ci-dessus.

C'est aux tribunaux qu'il appartient d'en prononcer la nullité à la demande de toute personne intéressée, par exemple à l'occasion d'une action en contrefaçon.

L'Institut est toutefois chargé d'annexer à chaque brevet un "AVIS DOCUMENTAIRE" **destiné à éclairer le public et les tribunaux** sur les antériorités susceptibles de s'opposer à la validité du brevet.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT AVIS

■ Il a été établi sur la base des "revendications" dont la fonction est de définir les points sur lesquels l'inventeur estime avoir fait œuvre inventive et entend en conséquence être protégé.

■ Il a été établi à l'issue d'une **procédure contradictoire** (1) au cours de laquelle :

- le résultat d'une recherche d'antériorités effectuée parmi les brevets et autres publications a été notifié au demandeur et rendu public.
- les tiers ont présenté des observations visant à compléter le résultat de la recherche
- le demandeur a modifié les revendications pour tenir compte du résultat de cette recherche
- le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- le demandeur a présenté des observations pour justifier sa position.

EXAMEN DES ANTERIORITES

- Cet examen n'a pas été nécessaire, car aucun brevet ou autre publication n'a été relevé en cours de procédure.
- Les brevets et autres publications (1), ci-après, cités en cours de procédure, **n'ont pas été examinés** car pour être efficace, cet examen suppose au préalable une vérification des priorités (2) :
- Les brevets et autres publications (1) ci-après, cités en cours de procédure, **n'ont pas été retenus** comme antériorités :

FR-A-2 601 384 EP-A-0 239 470 FR-A-2 617 501
 REVUE FRANCAISE DES CORPS GRAS, vol. 23, n° 11, nov. 1986, P. 423-430.
 PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 13, n° 199 (C-594)(3 547), 11 mai 1989 ; &
 JP-A- 119 042.
 PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 12, n° 96 (C-484)(2 943), 29 mars 1988 ; &
 JP-A-62 228 289.

CONCLUSION : EN L'ETAT, AUCUNE ANTERIORITE N'A ETE RETENUE

(1) - Les pièces du dossier, ainsi que les brevets et autres publications cités, peuvent être consultés à l'INPI ou délivrés en copie.
 (2) - Tout renseignement peut être obtenu de l'INPI : demander l'aide-mémoire "Intercalaires et interférences".