



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12P 7/64</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 95/10626</b> (43) Date de publication internationale: 20 avril 1995 (20.04.95)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01192 (22) Date de dépôt international: 14 octobre 1994 (14.10.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/12209 14 octobre 1993 (14.10.93) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): CEN- TRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVEL- OPPEMENT [FR/FR]; 12, square Pétrarque, F-75116 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GRAILLE, Jean, Emile [FR/FR]; 4, rue la Capelette, F-34750 Villeneuve-les- Maguelonne (FR). MONTET, Didier, Jean-Luc [FR/FR]; 8, rue des Courlis, F-34000 Montpellier (FR). OZENNE, Catherine, Lucette [FR/FR]; 474, avenue de la Justice, F-34090 Montpellier (FR). LAMBERET, Gilles, François [FR/FR]; Appartement 140, 22, avenue de Choisy, F-75013 Paris (FR).</p>		<p>(74) Mandataires: HUBERT, Philippe etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). (81) Etats désignés: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: METHOD FOR THE ENZYMATIC TRANSFORMATION OF TRIGLYCERIDES IN A FAT, IN PARTICULAR DAIRY FAT</p>		
<p>(54) Titre: PROCEDE POUR LA TRANSFORMATION ENZYMATIQUE DES TRIGLYCERIDES D'UNE MATIERE GRASSE, EN PARTICULIER LA MATIERE GRASSE LAITIERE</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>A novel method for the enzymatic transformation of triglycerides in a main fat by acyl transfer, interesterification, transesterification or intrainteresterification, uses an enzymatic preparation in a reaction system containing said main fat alone or mixed with a co-substrate selected from fatty acids, fatty acid esters, from a secondary fat, or untreated secondary fat. The method is characterized specifically in that the enzymatic preparation comprises a plant latex, or a serum, or coagulum of the latter, in particular a latex of Euphorbiaceae or Caricaceae. Application particularly for enzymatic processing of dairy fat in the food industry.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>La présente invention a pour objet un nouveau procédé pour la transformation enzymatique des triglycérides d'une matière grasse principale par transfert d'acyle, interestérification, transesterification ou intrainteresterification, du type comprenant la mise en oeuvre d'une préparation enzymatique dans un système réactionnel comprenant ladite matière grasse principale seule ou en mélange avec un co-substrat choisi parmi les acides gras, les esters d'acides gras, issus d'une matière grasse secondaire, ou la matière grasse secondaire en l'état. Selon l'invention, ce procédé est essentiellement caractérisé par le fait que la préparation enzymatique comprend un latex végétal, ou un sérum, ou coagulum de celui-ci, en particulier un latex d'Euphorbiacées ou de Caricacées. L'invention trouve notamment application pour la transformation enzymatique de la matière grasse laitière dans l'industrie alimentaire.</p>		

### **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Procédé pour la transformation enzymatique des triglycérides d'une matière grasse, en particulier la matière grasse laitière.

La présente invention a pour objet un nouveau procédé pour la transformation enzymatique des triglycérides d'une matière grasse, en particulier la matière grasse laitière.

Ce procédé trouve notamment application pour la modification des propriétés rhéologiques de la matière grasse laitière ainsi que de ses fractions connues sous le nom d'oléine et de stéarine.

En particulier, ce procédé peut être utilisé pour former, à partir d'une oléine de matière grasse laitière, une matière grasse dont le comportement rhéologique est proche de celui d'une stéarine.

D'une façon plus générale, ce procédé peut être utilisé dans l'industrie alimentaire pour valoriser diverses matières grasses, en échangeant de manière sélective ou en remplaçant certains des acides gras constitutifs des triglycérides de ces matières grasses par des acides gras d'autre nature, de manière à modifier les propriétés rhéologiques et/ou nutritionnelles de la matière grasse traitée. Par exemple, dans le cas de la matière grasse laitière, ce procédé permet de remplacer une partie des acides gras à courte chaîne par des acides gras insaturés, dont la consommation est recommandée pour la santé.

La transformation des matières grasses par voie enzymatique, et notamment par transfert d'acyles, interestérisation, transestérisation ou intrainterestérisation a fait l'objet de nombreuses études. D'une façon générale, les procédés décrits dans l'état de la technique comprennent la mise en oeuvre de préparations enzymatiques diverses, dans un système réactionnel comprenant ladite matière grasse seule (transacylation ou intrainterestérisation) ou en mélange avec un co-substrat choisi parmi les acides gras (transestérisation), les esters d'acide gras ou une autre matière grasse (interestérisation).

Des procédés d'interestérisation sont par exemple décrits dans les documents GB-1577933 et EP-0035883, et un procédé de transestérisation est par exemple décrit dans le document GB-2 236 537.

Les préparations enzymatiques mises en oeuvre selon ces documents antérieurs, sont constituées de lipases, qui peuvent être régiosélectives (c'est-à-dire qui permettent de transférer des acides se trouvant dans une position spécifique, en particulier en position 1 et/ou en position 3, sur les triglycérides)

et/ou typosélectives (c'est-à-dire qui permettent de transférer préférentiellement certains acides, comme en particulier l'acide oléique, suivant leur nature).

Dans un souci de généralisation, il est indiqué dans ces documents antérieurs que les lipases susceptibles d'être utilisées pour la transformation des triglycérides peuvent être d'origines variées, mais tous les exemples illustratifs  
5 mettent en oeuvre des lipases purifiées d'origine microbienne.

Il est en outre à noter que dans le document EP-0035883, la préparation enzymatique est préparée suivant un procédé spécifique comportant la dispersion, l'adsorption ou la liaison de l'enzyme dans ou sur un support, dans un milieu  
10 aqueux, puis séchage du mélange ainsi obtenu à une vitesse lente contrôlée.

Par ailleurs, dans le document US-3,190,753, il est préconisé d'utiliser un latex végétal, à savoir le latex de *Carica papaya* pour son activité hydrolasique.

Par ailleurs, dans le document US-3,190,753, il est préconisé d'utiliser un latex végétal, à savoir le latex de *Carica papaya* pour son activité hydrolasique.

15 Ce document antérieur qui décrit une réaction d'hydrolyse ne comporte aucune indication laissant supposer qu'un latex végétal pourrait être utilisé avec succès dans un procédé conduisant à un transfert d'acyles, tel qu'une interestérisation, une transestérisation ou une intrainterestérisation ; tel que celui faisant l'objet de la présente invention et où l'on cherche précisément à éviter,  
20 dans la mesure du possible, toute hydrolyse.

Il a été découvert, et ceci constitue le fondement de la présente invention que les latex végétaux, ainsi que leurs sérum et coagulum, c'est-à-dire en fait des préparations enzymatiques végétales non purifiées, peuvent être utilisées avec succès pour la transformation enzymatique des triglycérides de matières grasses  
25 variées, et en particulier de la matière grasse laitière.

Cette découverte est tout à fait inattendue, dans la mesure où :

- d'une part, il n'est pas possible de dire aujourd'hui si les réactions constatées sont catalysées par des lipases ou par des acyltransférases plus générales comme les protéases ; et
- 30 - d'autre part, on sait que les enzymes à forte activité lipase ou hydrolase n'ont pas forcément une activité acyltransférase en transestérisation (alcoololyse et acidolyse) ou en interestérisation, et inversement. (P.Galzy et al. Rev. fse Corps gras, (1986), 33, 307-310).

L'originalité de la présente invention réside donc dans le fait que rien ne laissait prévoir que des préparations enzymatiques à base de latex végétaux, connus pour leur activité protéolytique pourraient manifester une activité acyltransférase, notamment en présence d'une phase aqueuse limitée, semblable  
5 à celle des lipases, d'autant plus que jusqu'à présent personne n'a isolé de lipase de latex.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente demande vise à couvrir un procédé pour la transformation enzymatique des triglycérides d'une matière grasse principale par transfert d'acyles, interestérification, transestérification ou  
10 intrainterestérification, du type comprenant la mise en oeuvre d'une préparation enzymatique dans un système réactionnel comprenant ladite matière grasse principale seule ou en mélange avec un co-substrat choisi parmi les acides gras, les esters d'acides gras, ou une matière grasse secondaire, caractérisé en ce que ladite préparation enzymatique comprend un latex végétal, ou un sérum ou  
15 coagulum de celui-ci.

La matière grasse principale susceptible d'être traitée par le procédé conforme à l'invention peut être de nature et d'origine variées. Avantagement, la matière grasse principale sera choisie parmi la matière grasse laitière, son oléine ou sa stéarine.

20 De même, la nature et l'origine de la matière grasse secondaire éventuellement utilisée peuvent être variées. A titre d'exemple de matière grasse secondaire, on citera : les huiles de tournesol, de palme, de coco, de colza, de soja, etc...

De même encore, les acides gras ou esters d'acides gras, éventuellement  
25 utilisés comme co-substrat, peuvent être variés. A titre d'exemples gras, on citera les acides gras totaux de tout corps gras alimentaire ou officinal ou de synthèse comme l'acide undécylénique, pour des usages non alimentaires et à titre d'exemple d'esters d'acides gras, on citera les esters éthyliques, isopropyliques ou méthyliques de ces acides suivant que l'objectif est alimentaire ou non alimentaire.

30 Le latex végétal susceptible d'être utilisé dans le cadre de la présente invention peut provenir de plantes laticifères variées. De préférence, il s'agira d'un latex d'Euphorbiacées ou de Caricacées, et en particulier d'un latex d'Euphorbia characias ou de Carica papaya.

Il a également été observé que dans le cadre des réactions de transformation, objet de la présente invention, les latex végétaux et notamment le latex de *Carica papaya* présentent une forte régiospecificité pour la position 3 et/ou une très forte typoselectivité pour les chaînes courtes (de 4 à 10 atomes de carbone), ce qui est particulièrement intéressant dans le cas de la matière grasse laitière où l'on cherche à changer les acides gras à chaînes courtes occupant majoritairement la position 3.

Selon une caractéristique particulière, le latex précité se présente sous forme sèche, par exemple sous forme d'une poudre, de préférence obtenue par lyophilisation.

Par forme sèche, on entend désigner un latex dont le taux d'humidité résiduelle est inférieur ou égal à environ 15 %, et de préférence inférieur à 10 %.

Selon une autre caractéristique particulière, la préparation enzymatique contenant le latex végétal est issue d'une phase aqueuse dont le pH est compris entre 5,5 et 9, de façon à conférer un pH correspondant à la phase aqueuse du système réactionnel, même si celle-ci est quantitativement limitée.

Eventuellement, cette préparation enzymatique peut être rendue magnétique, de façon à faciliter son retrait du système réactionnel.

Les conditions générales de mise en oeuvre du procédé conforme à la présente invention pourront être déterminées relativement aisément par l'homme de métier à la lecture de la littérature existante.

Il est cependant à noter que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque l'activité de l'eau ( $a_w$ ) du système réactionnel est comprise entre 0,1 et 0,6 et de préférence voisine de 0,3, et lorsque la température du système réactionnel est comprise entre 10 et 90°C, de préférence entre 50 et 70°C.

D'une façon générale, ces plages ou valeurs d'activité de l'eau du système réactionnel correspondent à une teneur en eau de la matière grasse comprise entre 0,05 et 0,02 % et de préférence de l'ordre de 0,1 %.

Dans le cadre de la présente description et des revendications, l'activité de l'eau est définie comme le rapport de la pression de vapeur d'eau d'une solution ou d'une poudre sur la pression partielle de vapeur d'eau de l'eau pure à la même température. Les mesures sont effectuées à 40°C à l'aide d'un appareil de type Novasina RTD 33, TH2, après calibrage avec des sels étalons d'activité connue.

D'une façon générale, le rapport molaire entre le substrat, c'est-à-dire la matière grasse principale, et le co-substrat sera comprise entre 10:1 et 1:10 et la

quantité de préparation enzymatique utilisée sera de l'ordre de 0,5 à 10 % en poids rapportée au poids total du substrat et du co-substrat formant la phase grasse.

Le procédé conforme à la présente invention sera avantageusement mis en oeuvre en continu sur un lit fixe composé de la préparation enzymatique seule ou en mélange avec un support.

A titre d'exemple de support, on peut citer les celluloses, la célite, les silices, les alumines, les fibres creuses, etc...

Ce procédé peut également être mis en oeuvre dans un réacteur continu à lit fluidisé.

Selon un second aspect, la présente demande vise à couvrir l'utilisation des latex végétaux comme système enzymatique permettant la transformation des triglycérides d'une matière grasse par transfert d'acyles, interestérisation ou transestérisation ou intrainterestérisation.

L'invention sera mieux comprise à la lecture des exemples non limitatifs suivants :

Dans ces exemples, et sauf indication contraire, les pourcentages sont exprimés en pourcentages molaires pour les substrats et les co-substrats, et en pourcentage en poids pour la préparation enzymatique.

L'expression CX:Y, où X et Y sont des nombres entiers, désignera un acide gras comportant X atomes de carbone et Y doubles liaisons.

La précision  $\Delta Z$  où Z est un nombre entier, désignera la position de l'éventuelle double liaison.

Ainsi, l'expression C 11:1 $\Delta$ 10 désignera l'acide undécylénique dont la double liaison est portée par l'atome de carbone en position 10.

Par ailleurs, les abréviations suivantes seront utilisées :

TG. : triglycéride ;

MGL : matière grasse laitière ;

AG : acide gras libre ;

EM : ester méthylique.

### EXEMPLE 1

10 mM de triglycérides de matière grasse laitière anhydre sont mises en réaction avec 10 mM d'undécylénate de méthyle (C11:1 $\Delta$ 10) sous agitation en présence de 5 % en poids (par rapport au poids de la phase grasse) de latex de Carica papaya (commercialisé sous la dénomination SIGMA P3250) à une température de 37°C pendant une durée de 6 heures.

La fraction triglycéridique est séparée en fin de réaction par chromatographie sur couche mince.

L'analyse des acides gras de ces triglycérides peut être ensuite réalisée d'une façon connue en soi, par exemple par chromatographie en phase gazeuse :

– soit, dans le cas de triglycérides renfermant des chaînes courtes (c'est-à-dire comportant jusqu'à 10 atomes de carbone et moins) après transformation des triglycérides en dibutylalkylcarbinols selon la méthode décrite par PINA M. et al., Rev. fse Corps Gras (1991), 38, 213-218 ;

– soit, dans les autres cas, après transformation des triglycérides en esters méthyliques suivant la norme AFNOR n°NFT60234 (mai 1977)

Les résultats obtenus ont montré qu'environ 6 % (en mole) de C11:1 ont été incorporés dans la matière grasse laitière, principalement en substitution des chaînes courtes (de 4 à 10 atomes de carbone).

Cet exemple démontre donc l'activité acyltransférase du latex de Carica papaya.

Ce protocole expérimental permet, d'une façon générale, de mesurer l'activité acyltransférase d'un latex donné en "opposant" les triglycérides d'une matière grasse donnée, suivant le cas à un acide gras libre, en particulier l'acide undécynélique, ou à son ester méthylique.

### EXEMPLE 2

On a étudié l'influence de la température et du rapport molaire substrat/co-substrat sur l'interestérisation d'une matière grasse laitière catalysée par le latex de Carica papaya de l'exemple 1.

Dans cet exemple, le co-substrat utilisé est l'undécylénate de méthyle.

Le rapport molaire substrat/co-substrat a été fixé à 1/1, puis 1/2, et on a fait varier la température de 25 à 70°C, la durée de la réaction étant fixée à 16 heures.

Les résultats obtenus ont été regroupés dans le tableau I ci-dessous.



On constate que l'on incorpore plus de C11:1 avec le rapport 1/2 et que la température optimale est de 60°C.

Près de 16 % de C11:1 ont été incorporés dans les conditions réactionnelles optimales, principalement en substitution des acides courts ayant de 4 à 10 atomes de carbone.

**TABLEAU I**

	TG/EM 1	TG/EM 1	TG/EM 1	TG/EM 1/2	TG/EM 1/2	TG/EM 1/2	MGL
a. gras	25°C	37°C	50°C	50°C	60°C	70°C	
C 4:0	13.9	13.3	11.9	11.1	9.4	11.6	16.5
C 6:0	6.6	6.3	5.4	5.3	4.5	5.2	6.3
C 8:0	2.7	2.9	2.5	2.2	1.8	1.8	2.7
C10:0	5.0	5.0	4.7	4.7	4.3	4.3	4.9
C12:0	4.8	4.7	4.5	4.3	4.3	4.3	4.5
C14:0	11.9	11.9	11.7	11.1	10.6	11.5	11.6
C16:0	23.7	23.4	23.4	22.1	22.0	23.0	23.5
C16:1	1.4	1.7	1.5	1.4	1.4	1.1	1.4
C18:0	9.4	9.4	9.1	8.6	8.2	8.4	9.4
C18:1	19.1	18.8	18.4	16.8	16.6	16.3	18.5
C18:2	0.8	0.6	0.8	0.7	0.8	0.6	0.7
C4à10	28.2	27.5	24.5	23.3	20.0	22.9	30.4

10

**EXEMPLE 3**

Le protocole expérimental de l'exemple 2 a été reproduit, en utilisant à titre de co-substrat l'acide undécylénique (C11:1 AG) dans un rapport molaire substrat/co-substrat égal à 1/2.

Les résultats obtenus qui sont reportés au tableau II montrent que la température réactionnelle optimale est également de 60°C et que dans ces conditions environ 20 % d'acide gras C11:1 sont incorporés aux triglycérides.

15

**TABLEAU II**

	TG/AG 1/2	TG/AG 1/2	TG/AG 1/2	TG/AG 1/2	MGL
A. gras	37°C	50°C	60°C	70°C	
C 4:0	12.8	13.8	8.9	10.9	16.5
C 6:0	6.0	6.0	4.2	5.3	6.3
C 8:0	2.5	2.5	1.7	2.1	2.7
C10:0	5.0	4.6	3.9	4.5	4.9
C11:1	6.3	10.8	19.2	10.8	0
C12:0	4.5	4.3	3.8	4.3	4.5
C14:0	11.5	10.7	10.4	11.3	11.6
C16:0	23.0	21.0	21.3	22.8	23.5
C16:1	1.2	1.2	1.3	1.2	1.4
C18:0	9.2	8.2	8.3	9.1	9.4
C18:1	17.6	16.2	16.2	16.8	18.5
C18:2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
C4à10	26.3	26.9	18.7	22.6	30.4

5

**EXEMPLE 4**

Les exemples 2 et 3 ont été reproduits en utilisant un latex de *Carica papaya* moins "brut", à savoir le latex commercialisé sous la dénomination SIGMA P3375.

10

Le taux d'incorporation de C11:1 est sensiblement plus faible que celui obtenu aux exemples 2 et 3.

On peut en déduire que le latex est d'autant plus actif qu'il est plus brut.

TABLEAU III

	TG/EM 1	TG/EM 1	TG/EM 1	TG/EM 1/2	TG/EM 1/2	TG/AG 1/2	TG/AG 1/2	MGL
a. gras	25°C	37°C	50°C	50°C	60°C	50°C	60°C	
C 4:0	11.0	13.3	9.7	8.5	8.4	10.5	6.9	12.5
C 6:0	5.8	6.6	5.3	4.8	4.6	5.8	3.7	5.4
C 8:0	2.6	3.1	2.7	2.1	2.0	2.6	1.7	2.6
C10:0	4.8	5.2	4.7	4.5	4.2	4.1	3.8	4.6
C11:1	1.0	2.0	4.0	10.1	9.5	6.9	16.7	0
C12:0	4.3	4.4	4.3	4.2	4.1	4.1	3.7	4.3
C14:0	12.5	11.7	12.0	11.9	11.6	11.6	10.7	12.1
C16:0	24.2	22.9	21.1	23.3	23.8	23.2	23.4	24.5
C16:1	1.5	1.3	1.4	1.5	1.3	1.5	1.2	1.5
C18:0	10.4	9.5	10.3	9.6	9.8	9.6	9.4	10.7
C18:1	12161	19.3	20.6	19.0	19.8	19.5	18.2	21.7
C18:2	0.8	0.8	0.8	0.3	0.8	0.7	0.7	0.8
C4à10	24.2	28.2	22.4	19.9	19.2	27.6	16.1	25.1

5

EXEMPLE 5

Les exemples 2 et 3 ont été reproduits, en remplaçant le latex de *Carica papaya* par un latex lyophilisé d'*Euphorbia characias* récolté dans la région de Montpellier.

Le rapport molaire substrat/co-substrat a été fixé dans cet exemple à 1/2.

10 Les résultats obtenus (tableau IV) montrent que ce latex est particulièrement intéressant pour la transformation des triglycérides par interestérisation.

15 Dans les conditions réactionnelles optimales, il est possible d'incorporer 20 % de C11:1, à 50°C par interestérisation, alors que dans les mêmes conditions on incorpore moins de 1 % de C11:1 par transacylation.

TABLEAU IV

	AG	AG	AG	EM	EM	EM	MGL
a.gras	37 °C	50 °C	60 °C	37 °C	50 °C	60 °C	
C 4:0	10.6	11.6	9.7	10.4	12.1	10.3	12.5
C 6:0	5.2	5.5	5.0	5.1	5.7	5.1	5.4
C 8:0	2.6	2.7	2.7	1.7	1.9	1.6	2.6
C10:0	4.6	4.7	4.4	3.8	3.9	3.8	4.6
C11:1	0.8	0.5	0.4	17.5	19.8	13.0	0
C12:0	4.3	4.3	4.2	3.6	3.6	3.0	4.3
C14:0	12.4	12.5	12.6	10.0	9.6	11.0	12.1
C16:0	24.9	24.6	25.4	21.1	19.1	22.2	24.5
C16:1	1.5	1.5	1.4	1.0	1.2	1.2	1.5
C18:0	10.6	10.3	11.0	8.1	7.7	8.9	10.8
C18:1	21.5	21.0	22.3	16.9	14.9	18.3	21.1
C18:2	0.9	0.9	0.9	0.7	0.5	0.8	0.8
C4à10	23.0	24.2	21.8	21.0	23.6	20.8	25.1

EXEMPLE 6

On a procédé à une étude cinétique de l'incorporation de C11:1, pour des rapports molaires substrat/co-substrat de 1/2, 1/1 et 2/1 (le co-substrat étant sous forme d'acide libre) à 60°C avec 5 % de latex de *Carica papaya* commercialisé sous la dénomination SIGMA P 3250; Le diagramme obtenu, reporté sur la figure unique annexée montre que le rapport substrat/co-substrat 1/1 est le plus adapté à la transformation enzymatique des triglycérides par transacylation.

En outre, il a été constaté que la préparation enzymatique peut être recyclée de nombreuses fois sans perte notable d'activité.

10

EXEMPLE 7

De l'oléine 19 de matière grasse laitière est opposée à des acides gras de palme, dans des rapports molaires 1/2, 1/1 et 2/1.

La réaction est réalisée à 60°C pendant une durée de 16 heures.

Les résultats obtenus, reportés au Tableau V ci-dessous, montrent une transformation de l'oléine; l'échange des acides gras se faisant principalement au dépend des acides gras courts (de C4 à C10).

Le point de goutte passe de 19 à 34°C environ, pour les triglycérides obtenues après neutralisation.

Cet exemple montre les nombreuses possibilités d'applications industrielles du procédé conforme à la présente invention, par exemple dans le domaine de la préparation de base pour margarine de table, pâtisseries ou autres produits alimentaires.

25

TABLEAU V

	Oléine	Palme	TG/AG 1/2	TG/AG 1/1	TG/AG 2/1
C4:0	18,7		11,1	10,5	12,6
C6:0	7,6		5,2	4,8	5,7
C8:0	3,1		2,4	2,6	2,8
C10:0	4,9		4,5	4,1	4,4
C12:0	4,7	1,5	4,4	4,3	4,5
C14:0	11,0	1,8	9,7	10,1	10,8
C16:0	22,2	46,0	29,1	28,8	27,2
C16:1	1,4	0,3	1,3	1,3	1,4
C18:0	7,3	5,2	6,7	6,9	6,9
C18:1	18,0	37,2	22,8	23,8	21,4
C18:2	1,2	8,0	2,7	2,8	2,3
C4 à C10	34,3		23,2	22,0	25,5
Insaturés	20,6	45,5	26,8	27,9	25,1
% poids TG AG	100		94 6	93 7	91 9
Point de goutte °C	19		34	34	33,5

EXEMPLE 8

Dans cet exemple, la préparation enzymatique utilisée comprend un latex de Carica papaya commercialisé sous la dénomination SIGMA P3250 fixé sur des fibres creuses commercialisées par la Société MERCK sous la dénomination DYNAGARD.

La réaction est effectuée en batch ; la quantité de préparation enzymatique (latex fixé) étant choisie de façon à être suffisante pour mettre en oeuvre 3 % en poids de latex par rapport à la phase grasse.

Dans cet exemple, les triglycérides de la matière grasse laitière ont été opposés à l'acide undécylénique.

Le tableau VI ci-dessous montre que d'excellents résultats, comparables à ceux obtenus avec du latex libre, peuvent être obtenus avec une préparation enzymatique comprenant du latex fixé sur des fibres creuses.

15

TABLEAU VI

	MGL	Enzyme libre	Enzyme fixée
C4:0	12,5	7,0	9,0
C6:0	5,4	3,7	4,3
C8:0	2,6	1,6	2,0
C10:0	4,6	3,8	4,0
C11:1	—	16,0	12,6
C12:0	4,3	4,0	3,9
C14:0	12,1	11,8	11,8
C16:0	24,5	23,7	22,6
C16:1	1,5	1,2	1,1
C18:0	10,7	8,8	9,3
C18:1	21,1	17,0	18,6
C18:2	0,8	0,4	0,8

20

%  
m  
o  
l  
a  
i  
r  
e

EXEMPLE 9

Dans cet exemple, de l'oléine 22 de matière grasse laitière a été opposée à de l'oléine de palme ou de la stéarine de palme.

La réaction a été réalisée en présence de latex de *Carica papaya* commercialisé sous la dénomination SIGMA P3250 à 60°C, pendant une durée de 6 heures 30.

Les résultats obtenus, qui sont reportés dans le tableau VII ci-après, sont tout à fait satisfaisants.

10

TABLEAU VII

	Oléine de MGLA	Produit obtenu avec		
		AG de palme	"Oléine" de palme	"Stéarine" de palme
% C4:0	15,3	8,0	8,5	9,4
C6:0	6,2	3,9	4,6	4,7
C8:0	2,5	1,8	2,2	2,1
m C10:0	4,0	3,2	3,2	3,5
o C12:0	3,5	3,4	3,0	3,2
l C14:0	10,6	8,9	9,3	9,9
a C16:0	22,8	28,3	29,7	31,0
i C16:1	1,7	1,3	1,9	1,7
r C18:0	9,1	10,8	10,5	9,6
e C18:1	23,3	27,7	25,3	23,5
C18:2	1,0	2,7	1,8	1,3
C4 à 10	28,0	16,9	18,5	19,7
Saturés	74,0	68,3	71,0	73,5
Insaturés	26,0	31,7	29,0	26,5
% poids DG	-	8	7,9	7,5
TG	100	92	92,1	92,5
Pt de goutte (°C)	22,5	32	32	33



## 15

EXEMPLE 10

Des acides gras d'oléine 22 de matière grasse laitière ont été préparés.

Au cours de cette préparation, les acides gras courts sont perdus en partie,

5 notamment l'acide en C4.

2 lots ont été constitués :

- l'un par les acides gras ainsi obtenus,

- l'autre, après ajout d'acide butyrique pour obtenir la concentration initiale.

Les deux lots d'acides gras ainsi préparés ont été opposés à l'oléine 22 elle-

10 même, dans un rapport molaire MGL/AG égal à 1/1.

On a en outre réalisé une intrainterestérisation sur l'oléine 22 utilisée.

Les trois réactions donnent des résultats voisins, comme le montre le tableau VIII ci-dessous.

15 On constate également que le point de goutte passe de 22 à 30, 29,5 et 28°C, respectivement.

TABLEAU VIII

		Oléine	+AG Oléine avec C4	Oléine +AG oléine sans C4	Intra Interestérisée	
%	m o l a i r e	C4:0	15,3	14,9	10,4	15,2
		C6:0	6,3	6,0	5,5	6,6
		C8:0	2,5	2,6	2,7	2,9
		C10:0	4,0	4,5	4,4	4,5
		C12:0	3,5	4,1	4,2	4,0
		C14:0	10,6	12,0	12,5	11,3
		C16:0	22,8	24,4	25,8	22,4
		C16:1	1,7	1,7	1,7	1,7
		C18:0	9,1	9,1	9,9	9,3
		C18:1	23,3	20,2	22,4	21,2
	C18:2	1,0	0,5	0,4	0,9	
	Pt goutte °C	22	30	29,5	28	

## 16

EXEMPLE 11

Un essai en continu sur pilote (capacité 10 kg) a confirmé les résultats obtenus à l'échelle du laboratoire.

5

EXEMPLE 12

La forte régio-spécificité pour la position 3 des latex végétaux et en particulier du latex de *Carica papaya* (sn3-spécificité) a été mise en évidence par une réaction d'interestérisation entre un triglycéride chiral ; à savoir le 1-buturoyl-2-stéaroyl-3-palmitoyl glycérol (BSP) et la trimyristine (MMM) en solution dans un solvant tel que l'hexane selon le protocole suivant :

10

- On dissout 0,02 mmoles de chaque triglycéride dans 0,5 ml d'hexane.
- On ajoute 5 mg de latex de *Carica papaya* et on règle la température à 60°C.
- Le mélange ainsi obtenu est agité.

15

La cinétique de la réaction est étudiée en prélevant régulièrement des échantillons de 1 $\mu$ l pour analyse directe par chromatographie en phase gazeuse. On constate que l'interestérisation a bien lieu car les concentrations en BSP et MMM diminuent au cours du temps à des vitesses similaires et que conjointement, les triglycérides néoformés apparaissent (BSM et MMP).

20

Les résultats obtenus montrent qu'au delà d'un certain temps relativement court (de l'ordre de 10 minutes) l'échange d'acyles se fait préférentiellement sur la position sn3.

## REVENDICATIONS

1. Procédé pour la transformation enzymatique des triglycérides d'une  
5 matière grasse principale par transfert d'acyles, interestérisation,  
transestérisation ou intrainterestérisation, du type comprenant la mise en oeuvre  
d'une préparation enzymatique dans un système réactionnel comprenant ladite  
matière grasse principale seule ou en mélange avec un co-substrat choisi parmi les  
10 acides gras, les esters d'acide gras, ou une matière grasse secondaire, caractérisé en  
ce que ladite préparation enzymatique comprend un latex végétal, ou un sérum ou  
coagulum de celui-ci.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la matière grasse  
principale précitée est choisie parmi la matière grasse laitière, son oléine ou sa  
stéarine.
- 15 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le latex  
végétal précité est un latex d'Euphorbiacées ou de Caricacées.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le latex précité est  
un latex d'Euphorbia characias ou de Carica papaya.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la  
20 l'activité de l'eau ( $a_w$ ) du système réactionnel précité est comprise entre 0,1 et 0,6,  
et est de préférence égale à 0,3.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le  
latex précité se présente sous forme d'une poudre, de préférence obtenue par  
lyophilisation.
- 25 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la  
préparation enzymatique précitée est issue d'une phase aqueuse dont le pH est  
compris entre 5,5 et 9, de façon à conférer un pH correspondant à la phase aqueuse  
résiduelle du système réactionnel précité.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la  
30 préparation enzymatique précitée est rendue magnétique, de façon à faciliter son  
retrait du système réactionnel précité.
9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la  
température du système réactionnel est comprise entre 10 et 90°C, de préférence  
entre 50 et 70°C.

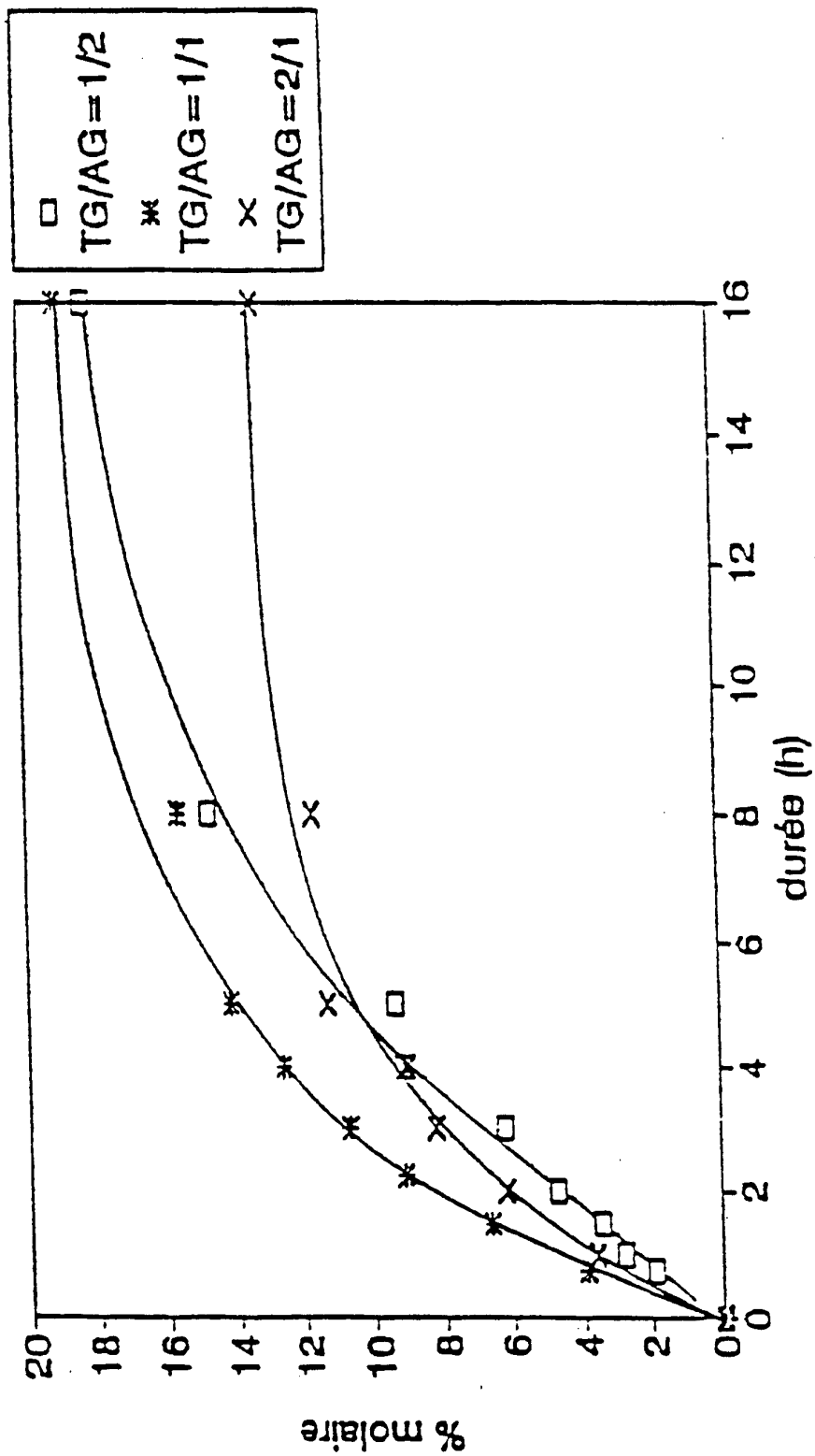
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il est réalisé en continu sur un lit fixe composé de la préparation enzymatique seule ou en mélange avec un support.

5 11. Utilisation des latex végétaux comme système enzymatique permettant la transformation des triglycérides d'une matière grasse par transfert d'acyle, interestérisation, transestérisation ou intrainterestérisation.

10

15

20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati	Application No
PCT/FR 94/01192	

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 6 C12P C12N C11B A23B A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A,3 190 753 (W.S.CLAUS) 22 June 1965 cited in the application see column 1, line 57 - column 2, line 17; claims	1-4
A	---	
A	CA,A,1 136 920 (BRITISH COLUMBIA RESEARCH COUNCIL) 7 December 1982 see claims	1
A	---	
A	FR,A,2 301 267 (LEK TOVARNA FARMACEVTSKIH) 17 September 1976 see claims	1
	---	
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

24 January 1995

6.02.95

Name and mailing address of the ISA  
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer  
  
 Delanghe, L

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati	Application No
PCT/FR 94/01192	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 117, no. 5, 3 August 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 43208a, MOULIN, ANDRE ET AL. 'Purification of a lipase from the latex of Euphorbia characias using an apolar solvent extraction method.' page 388 ; see abstract &amp; C.R. ACAD. SCI., SER III, vol.314, no.8, 1992 pages 337 - 342</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, no. 17, 25 April 1983, Columbus, Ohio, US; abstract no. 143683j, page 605 ; see abstract &amp; JP,A,57 156 482 (OGAWA, YOSHIKAZU) 27 September 1982</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internati

Application No

PCT/FR 94/01192

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-3190753	22-06-65	NONE	
CA-A-1136920	07-12-82	JP-A- 56085239	11-07-81
FR-A-2301267	17-09-76	BE-A- 838750 DE-A,B,C 2605576 GB-A- 1512491	16-06-76 09-09-76 01-06-78
JP-A-57156482	27-09-82	NONE	



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 94/01192

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12P7/64

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12P C12N C11B A23B A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US,A,3 190 753 (W.S.CLAUS) 22 Juin 1965 cité dans la demande voir colonne 1, ligne 57 - colonne 2, ligne 17; revendications ---	1-4
A	CA,A,1 136 920 (BRITISH COLUMBIA RESEARCH COUNCIL) 7 Décembre 1982 voir revendications ---	1
A	FR,A,2 301 267 (LEK TOVARNA FARMACEVTSKIH) 17 Septembre 1976 voir revendications ---	1
	-/--	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 Janvier 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06 -02- 1995

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Delanghe, L

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 94/01192

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 117, no. 5, 3 Août 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 43208a, MOULIN, ANDRE ET AL. 'Purification of a lipase from the latex of Euphorbia characias using an apolar solvent extraction method.' page 388 ; voir abrégé &amp; C.R. ACAD. SCI., SER III, vol.314, no.8, 1992 pages 337 - 342</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, no. 17, 25 Avril 1983, Columbus, Ohio, US; abstract no. 143683j, page 605 ; voir abrégé &amp; JP,A,57 156 482 (OGAWA, YOSHIKAZU) 27 Septembre 1982</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 94/01192

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US-A-3190753	22-06-65	AUCUN	
CA-A-1136920	07-12-82	JP-A- 56085239	11-07-81
FR-A-2301267	17-09-76	BE-A- 838750	16-06-76
		DE-A, B, C 2605576	09-09-76
		GB-A- 1512491	01-06-78
JP-A-57156482	27-09-82	AUCUN	