

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication: **0 256 899 B1**

(12)

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

(45) Date de publication de fascicule du brevet: **02.12.92** (51) Int. Cl.⁵: **C13K 1/00, C13K 11/00**

(21) Numéro de dépôt: **87401590.2**

(22) Date de dépôt: **07.07.87**

(54) **Procédé de liquéfaction de betteraves et de racines de chicorée par hydrolyse enzymatique et hydrolysats liquides obtenus.**

(30) Priorité: **07.07.86 FR 8609841**

(43) Date de publication de la demande:
24.02.88 Bulletin 88/08

(45) Mention de la délivrance du brevet:
02.12.92 Bulletin 92/49

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(56) Documents cités:
WO-A-82/00662

CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 26, 30 juin 1986, page 169, résumé no. 227697x, Columbus, Ohio, US; G. BELDMAN et al.: "Enzymic liquefaction and saccharification of agricultural biomass", & COMM. EUR. COMMUNITIES, (REP.) EUR 1985, EUR 9940, 41pp

RESEARCH DISCLOSURE, no. 217, mai 1982, pages 190-193, Havant, Hampshire, GB; H.S. OLSEN: "Method for decomposition of polysaccharides, preferably plant cell wall polysaccharides, by means of a carbohydrase"

(73) Titulaire: **Société Anonyme dite: AGRO INDUSTRIE RECHERCHES ET DEVELOPPEMENTS**
27-29 rue Chateaubriand
F-75383 Paris(FR)

Titulaire: **NOVO INDUSTRI A/S**
Novo Allé
DK-2880 Bagsvaerd(DK)

(72) Inventeur: **de Baynast de Septfontaines, Régis Jacques Marie P**
35, rue de l'Ermitage
F-78000 Versailles(FR)
Inventeur: **Brouard, François Emmanuel Marie Etienne**
721, rue de la Source
F-45000 Orléans(FR)
Inventeur: **Baret, Jean-Luc Alain Guy**
16, Résidence les Cottages
F-77250 Moret/Loing(FR)
Inventeur: **Gicquiaux, Yvon George Adrien Joseph Marie**
13, rue de la Butte aux Bergers
F-95470 Saint-Witz(FR)
Inventeur: **Olsen, Hans Sejr**
Højbjerg Vang 7
DK-2840 Holte(DK)

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition (art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

ENZYME MICROB. TECHNOL., vol. 6, novembre 1984, pages 503-507, Butterworth & Co. Ltd; G. BELDMAN et al.: "Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass"

⁽⁷⁴⁾ Mandataire: Colas, Jean-Pierre et al
Cabinet de Boisse 37, avenue Franklin D.
Roosevelt
F-75008 Paris(FR)

Description

L'invention concerne un procédé de liquéfaction de betteraves et de racines de chicorée par voie enzymatique et l'hydrolysate liquide obtenu.

5 Le mode habituel de traitement des betteraves à sucre consiste à les découper en fines lanières (cossettes et à extraire le saccharose de celles-ci par diffusion. On obtient ainsi un jus sucré qui peut servir à la production de sucre pour l'alimentation. On peut aussi faire subir à ce jus sucré une fermentation alcoolique pour produire de l'alcool éthylique. Après l'extraction par diffusion, il reste une pulpe qui peut servir, après séchage, à l'alimentation du bétail.

10 La présente invention a pour objet un nouveau procédé visant à convertir directement les betteraves par voie enzymatique en un hydrolysate liquide, sans avoir recours à une extraction par diffusion, et sans nécessité d'un ajout d'eau avant ou pendant le traitement.

Par ailleurs, il a été trouvé que le procédé de l'invention pouvait être appliqué également aux racines de chicorée.

15 Plus précisément, l'invention concerne un procédé de liquéfaction de betteraves ou de racines de chicorée comprenant les étapes suivantes :

- a) broyer grossièrement des betteraves ou des racines de chicorée préalablement lavées de façon à les réduire en petits morceaux ;
- 20 b) ajouter et mélanger aux betteraves ou aux racines de chicorée, pendant ou après leur broyage, une proportion efficace d'un mélange d'enzymes comprenant au moins une SPS-ase, une cellulase et une cellobiase, et un acide de façon à régler le pH du produit broyé dans la gamme de 3 à 5,5 environ ;
- c) laisser le mélange d'enzymes effectuer une préhydrolyse du produit broyé pendant 1 à 6 heures environ,
- d) pendant ou après l'étape c), broyer finement le produit à l'état de bouillie ;
- 25 e) poursuivre l'hydrolyse du produit broyé à l'état de bouillie par le mélange d'enzymes pendant 20 à 120 heures environ ; et
- f) récupérer le produit hydrolysé liquide résultant.

Le procédé de l'invention est applicable tant aux betteraves à sucre qu'aux betteraves fourragères et aux hydrides de ces types de betteraves.

30 Le broyage grossier a) des betteraves ou des racines de chicorée peut s'effectuer sans addition d'eau dans tout type de broyeur-malaxeur approprié, par exemple du type à hélice rotative. Dans cette étape les betteraves ou les racines de chicorée sont broyées en petits morceaux d'une grosseur de l'ordre de 1cm environ.

L'acide ajouté dans l'étape b) peut être un acide minéral ou organique. L'acide sulfurique convient particulièrement bien. On ajoute l'acide de façon que le pH soit dans la gamme de 3-5,5, de préférence 3,5-5. Le mélange d'enzymes utilisé tant pour effectuer la préhydrolyse c) que l'hydrolyse e) doit comprendre au moins une SPS-ase, une cellulase et une cellobiase.

Il est souvent nécessaire d'ajouter un agent bactériostatique n'affectant pas l'action des enzymes dans l'étape b). Un exemple d'agent bactériostatique utilisable est le formol à raison d'environ 0,5 à 2 litres par 40 tonne de betteraves ou de racines de chicorée (0,05 à 0,2%), de préférence à raison d'environ 1 litre par tonne (0,1%). Cet agent sert à éviter les proliférations microbiennes. Des agents bactériostatiques autres que le formol pourraient bien sûr être utilisés, mais le formol présente l'avantage d'être bon marché et facilement disponible.

La SPS-ase et sa préparation sont décrites en détail dans FR-A-2 518 570 au nom de NOVO INDUSTRI 45 A/S. Cette enzyme est ordinairement obtenue à partir de microorganismes du genre *Aspergillus*.

Une composition d'enzymes contenant de la SPS-ase, de la cellulase et de la cellobiase, est commercialisée par la Société danoise NOVO INDUSTRI A/S sous la désignation "SP 249" et présente les activités enzymatiques suivantes, décrites selon la nomenclature internationale.

50

55

Pectinases :	
Pectinestérase	- EC 3.1.1.11
Polygalacturonase	- EC 3.2.1.15
Exopolygalacturonase	- EC 3.2.1.67
Pectinelyase (transeliminase)	- EC 4.2.2.2.
Cellulases :	
Endo 1,4 bêta-glucanase	- EC 3.2.1.4
Hemicellulases :	
Alpha-glucosidase	- EC 3.2.1.20
Bêta-glucosidase	- EC 3.2.1.21
Alpha-galactosidase	- EC 3.2.1.22
Bêta-galactosidase	- EC 3.2.1.23
Bêta-mannosidase	- EC 3.2.1.25
Alpha-L arabinofuranosidase	- EC 3.2.1.55
Endo 1,4 bêta-mannanase	- EC 3.2.1.78

Le "SP 249" est un liquide brun dont les spécifications principales sont les suivantes :

polygalacturonase (EC 3.2.1.15)	9640 PGU/g
pectinase	2152 KPU/g
SPS-ase	29 SPSU/g
cellulase (EC 3.2.1.4.)	673 A-NCU/g
β -glucanase fongique (EC 3.2.1.4)	84 FBGU/g
hemicellulase (EC 3.2.1.78)	225 KVHCU/g

Comme les activités de cellulase et de cellobiase de la SP 249 sont assez faibles, on peut les renforcer par addition d'enzymes cellulase et cellobiase supplémentaires. Une telle addition est nécessaire dans le cas du traitement des betteraves et seulement optionnelle dans le cas du traitement de racines de chicorée.

Comme cellulase, on peut, par exemple, utiliser celle produite par fermentation submergée d'une souche de *Trichoderma reesei*. Un exemple de cellulase de ce type est le produit Celluclast ® vendu par la Société danoise NOVO INDUSTRI A/S. Le Celluclast ® présente une activité cellulase de 1500 ANCU/g et possède également des exo-activités cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) et exo-bêta-1,4D-glucosidase (EC 3.2.1.74) et l'endo-activité endo-bêta-1,4D-glucanase (EC 3.2.1.4). Une autre cellulase du commerce utile est la "SP-300" également de NOVO INDUSTRI A/S.

Comme cellobiase, on peut, par exemple, utiliser celle produite par fermentation submergée d'une souche d'*Aspergillus niger*. Un exemple de cellobiase de ce type est le produit "Novozym 188" vendu par la Société danoise NOVA INDUSTRI A/S, qui présente une activité cellobiase de 250 CBU/g.

Ces enzymes peuvent être utilisées en proportions relatives variées. A titre indicatif, on peut utiliser 50-75% de SP 249, 5-50% de Celluclast et 5-50% de Novozym 188, ces proportions étant en poids par rapport au poids total d'enzymes. D'autres enzymes telles que des pectinases, des glucanases, des galactomannases, des protéases, etc... peuvent être présentes dans le mélange d'enzymes précité, si désiré.

La proportion d'enzymes par rapport aux betteraves ou aux racines de chicorée peut elle aussi varier largement. En termes d'unités d'activité par kg de matières sèches contenues dans les betteraves ou racines de chicorée, les enzymes pourront être utilisées dans les gammes suivantes :

<u>Unités/kg de matières sèches</u>		
<u>Enzyme</u>	<u>Gamme large</u>	<u>Gamme préférée</u>
SPS-ase	15 à 800	20 à 190
Cellulase	380-42000	700 à 7000
Cellobiase	10-4500	20 à 400

Les enzymes optionnelles pourront, de leur côté, être présentes dans les gammes d'activité suivantes :

<u>Unités/kg de matières sèches</u>		
<u>Enzyme</u>	<u>Gamme large</u>	<u>Gamme préférée</u>
Polygalacturonase	5000-250000	9000 à 60000
Pectinase	1000-55000	2000 à 14000
β -glucanase fongique	40-2500	80 à 550
Hemicellulase	120-6000	200 à 1500

Lorsqu'on utilise les mélanges des produits du commerce SP 249, Celluclast et Novozym 188, ces gammes correspondent sensiblement à 0,5 à 5 kg de mélange par tonne de betteraves ou racines de chicorée.

Il y a lieu de noter que les unités d'activité des enzymes indiquées correspondent aux unités déterminées par les méthodes mises au point par la Société NOVO INDUSTRI A/S, lesquelles sont disponibles auprès de cette Société sur demande.

Pour une activité optimale des enzymes, la température au cours des étapes de préhydrolyse et d'hydrolyse sera comprise entre 35 et 60 °C. De préférence, la température sera comprise entre 35 et 55 °C pendant la préhydrolyse c) et entre 45 et 55 °C pendant l'hydrolyse e).

La durée de l'étape de préhydrolyse c) peut aller de 1 à 6 heures, de préférence 1 à 3 heures, et celle de l'hydrolyse e) peut aller de 20 à 120 heures de préférence de 24 à 72 heures.

L'étape d) de broyage fin à l'état de bouillie, peut se mettre en oeuvre dans tous appareils exerçant un effet de cisaillement important. Un exemple d'appareil qui s'est révélé particulièrement bien convenir est un dépastilleur du genre de ceux utilisés par l'industrie de la pâte à papier. Dans cette étape les morceaux de betteraves sont réduits à une grosseur de l'ordre de 0,1 mm environ ou moins.

Le procédé qui vient d'être décrit constitue le procédé de base de l'invention.

Ce procédé peut être amélioré en le combinant avec un ou plusieurs des perfectionnements à caractère facultatif suivants :

Un premier perfectionnement consiste à effectuer avant ou pendant l'étape de broyage grossier (a), un traitement thermique des betteraves ou des racines de chicorée consistant à les chauffer à une température de 70 à 90 °C pendant quelques minutes à l'heure environ, par exemple à l'aide de vapeur d'eau. Ce traitement thermique a plusieurs effets avantageux :

- il facilite la mise en morceaux des betteraves ou des racines de chicorée dans l'étape (a), - il permet de réduire la quantité d'agent bactériostatique à utiliser, voire de le supprimer.
- il permet d'éliminer ou réduire fortement le moussage qui peut se produire dans l'étape (a),
- il permet de limiter considérablement le brunissement des morceaux de betteraves et d'obtenir des sirops d'hydrolysats de betteraves très peu colorés, alors que les produits obtenus sans traitement thermique sont brun foncé à noir,
- pour une dose d'enzymes donnée, il améliore les caractéristiques de l'hydrolysats (viscosité plus faible et taux de conversion plus élevé) ou bien permet d'employer une dose d'enzymes plus faible pour obtenir une viscosité et un taux de conversion donnés pour l'hydrolysats.

Un deuxième perfectionnement consiste à opérer après l'étape d'hydrolyse (e) une post-hydrolyse effectuée à une température égale plus élevée que l'étape d'hydrolyse proprement dite, de préférence dans la gamme de 55 et 75 °C. Cette post-hydrolyse sera également conduite habituellement à un pH plus bas que l'hydrolyse, dans le cas où on n'ajoute pas d'enzymes additionnels comme défini ci-après à propos du troisième perfectionnement, tout en ne descendant pas au dessous d'un pH de 3. Par exemple, si l'hydrolyse (e) est conduite à pH 4, la post-hydrolyse pourra être conduite à pH 3. Dans le cas où on ajoute des enzymes additionnels, le pH sera ajusté en fonction du pH optimal pour l'activité enzymatique. La durée de cette post-hydrolyse peut aller de quelques minutes à 10 heures environ.

L'utilisation d'une étape de post-hydrolyse permet d'améliorer la conversion en glucose et fructose au détriment des polyosides d'un degré de polymérisation de 2 (saccharose) et plus.

Un troisième perfectionnement consiste à utiliser, en plus du mélange d'enzymes défini, une invertase

ou une inulinase ou, de préférence, un mélange de ces deux enzymes. L'addition de l'enzyme ou mélange d'enzymes peut se faire à raison de 100 à 10000 INU/kg de matières sèches. Cette addition peut se faire simultanément à celle des autres enzymes ou postérieurement, par exemple pendant l'étape d'hydrolyse ou de post-hydrolyse. Un mélange d'enzymes invertase/inulinase fongique qui convient particulièrement bien est celui commercialisé sous la désignation commerciale "Novozym 230" par la Société NOVO INDUSTRI

A/S, ou une invertase de levure.

L'utilisation de cet ou ces enzymes additionnels permet, comme le deuxième perfectionnement ci-dessus, d'améliorer la conversion en glucose et fructose au détriment des polyosides d'un degré de polymérisation de 2 (saccharose) et plus.

L'invention concerne également, à titre de produit nouveau, un produit aqueux liquide obtenu directement par hydrolyse enzymatique de betteraves ou de racines de chicorée, caractérisé en ce qu'il contient, comme principaux ingrédients, du glucose, du fructose, des polyosides ayant des degrés de polymérisation de 2 et 3, et des composés azotés, ce produit ayant un pH acide, une viscosité non supérieure à 300 mPa.s, et une teneur en matières solides en suspension n'excédant pas 2% en poids.

Elle concerne, en particulier un tel produit aqueux liquide ayant un pH de 4 à 5 et une viscosité non supérieure à 150 mPa.s.

Elle concerne également les produits aqueux obtenus par concentration et éventuellement clarification dudit produit aqueux liquide.

Par exemple, en partant de betteraves sucrières ayant la composition typique suivante :

CONSTITUANTS	KG/T
SACCHAROSE	160
NON SUCRE SOLUBLES (1)	20

INSOLUBLES (2)	50
dont CELLULOSE	10
MATIERES MINERALES	8
EAU	770

(1) matière organique et minérale soluble autre que le saccharose

(2) matière organique et minérale insoluble

On peut obtenir un produit hydrolysé liquide ayant typiquement les caractéristiques suivantes :

	pH	4-4,5
	DENSITE	1,09
5	VISCOSITE (mPa.s)	50-150
	MATIERE EN SUSPENSION	0,8-1,5
	(% p/p)	
10	MATIERES SECHES	
	REFRACTOMETRIQUES	20-22g/100g de solution
	MATIERE SECHE TOTALE (%)	24-25
15	SUCRES TOTAUX (exprimés en équivalent glucose) :	160-200g/l
	NATURE BIOCHIMIQUE	Proportion, %
20	GLUCOSE	30-33
	FRUCTOSE	17-27
	DP2(3)	23-25
25	DP3(3)	21-14
	DP4(3) et plus	3-0,5
	PENTOSES	)
30	ACIDE GALACTURONIQUE	) 10-20
	(3) dpn : polyoside de degré de polymérisation n	
	AZOTE (X 6,25)	0,5-1,3
	(%)	

Ce produit peut être clarifié pour éliminer les matières insolubles en suspension, par exemple par filtration ou même par centrifugation, et/ou concentré, par exemple à l'aide d'un évaporateur rotatif. On donne ci-après, à titre indicatif, les caractéristiques d'hydrolysats clarifiés, clarifiés concentrés, et concentrés, obtenus à partir de l'hydrolysate de betteraves sucrières ci-dessus.

★ HYDROLYSAT CLARIFIE

DENSITE 1,09

VISCOSITE (mPa.s) 5-10

MATIERES SECHES

REFRACTOMETRIQUES 20-22g/100g de solution

COMPOSITION EN SUCRES IDENTIQUE A CELLE DE L'HYDROLYSAT
BRUT

★ HYDROLYSAT CLARIFIE CONCENTRE

DENSITE 1,3

VISCOSITE (mPa.s à 20°C) 90

MATIERES SECHES

REFRACTOMETRIQUES 63-67g/100g de solution

COMPOSITION RELATIVE EN SUCRES IDENTIQUE A CELLE DE
L'HYDROLYSAT CLARIFIE

★HYDROLYSAT BRUT CONCENTRE

DENSITE 1,35

VISCOSITE (Pa.s à 20°C) 18-20

MATIERES SECHES

REFRACTOMETRIQUES 50-60g/100g de solution

ACTIVITE DE L'EAU 0,78-0,82

COMPOSITION EN SUCRES IDENTIQUE A CELLE DE L'HYDROLYSAT
BRUT

Les hydrolysats de l'invention qu'ils soient bruts et/ou clarifiés et/ou concentrés, sont des produits utiles, notamment pour la production d'alcool éthylique par fermentation alcoolique classique à l'aide de levures. On peut obtenir de l'alcool avec des rendements améliorés (3 à 12 points de pourcentage en plus) par rapport à la technique classique. Il faut veiller, toutefois, à ce que l'activité rémanente de l'agent bactériostatique ne gêne pas le développement des levures ou leur activité fermentaire.

Les exemples non limitatifs suivants sont donnés afin d'illustrer l'invention.

Exemples 1 à 8

Ces exemples ont été conduits en utilisant l'appareillage-pilote représenté schématiquement sur la figure unique.

Cet appareillage comprend un broyeur-malaxeur 1 du type à hélice rotative ouvert à sa partie supérieure pour l'introduction des betteraves et des divers ingrédients à incorporer (acide, bactériostatique, enzymes), et relié à sa partie inférieure, par un conduit 2 muni d'une vanne 3, à une pompe 4. Cette pompe 4 est elle-même reliée à un dépastilleur 5 par un conduit 6 muni d'une vanne 7. Le conduit 6 est connecté à sa partie médiane à un conduit 8 retournant au sommet du broyeur 1. A la sortie du dépastilleur 5 est prévu un conduit 9 raccordé au conduit 8. Entre le point de raccordement des conduits 8 et 9 et le conduit 6 est prévue, sur le conduit 8, une vanne 10, tandis qu'une vanne 11 est disposée sur le conduit 8 juste avant le sommet du broyeur 1. En amont de la vanne 11, le conduit 8 se raccorde à un conduit 12 aboutissant au réacteur 13 à pales agitatrices 14, une vanne 15 étant prévue sur le conduit 12. Une conduite de sortie 16 est prévue à la base du réacteur 13 et commandée par une vanne 17. Une chemise 18 à circulation d'eau est prévue autour du réacteur pour régler la température du réacteur, de l'eau froide ou de l'eau chaude pouvant y être admise, selon que l'on désire refroidir ou réchauffer le réacteur.

Le fonctionnement de cet appareillage est le suivant :

Le broyeur 1 étant en marche, on y introduit les betteraves, l'acide, l'agent bactériostatique et le mélange d'enzymes.

Lorsque la réduction de la grosseur des morceaux de betteraves et le degré d'avancement de la préhydrolyse sont suffisamment avancés pour rendre le mélange pompable, on ouvre la vanne 3 et on met en marche la pompe 4 et le dépastilleur 5, les vannes 7 et 11 étant ouvertes et les vannes 10 et 15 fermées, de façon à faire passer les morceaux de betteraves dans le dépastilleur 5 et à les recycler au broyeur 1. Dans cette opération les morceaux de betteraves voient leur grosseur fortement réduite, par exemple à une grosseur de l'ordre de 0,1 mm environ ou moins. A la fin de cette opération, on ferme les vannes 7 et 11 et on ouvre les vannes 10 et 15, de façon à envoyer les betteraves broyées à l'état de pulpe ou suspension et préhydrolysées, au réacteur 14 où on les laisse le temps nécessaire pour achever l'hydrolyse. Enfin, les betteraves liquéfiées et hydrolysées sont évacuées du réacteur par la sortie 16, après ouverture de la vanne 17.

L'efficacité de l'hydrolyse est mesurée dans ces essais par le taux de conversion (ou taux de liquéfaction) X des matières normalement insolubles des betteraves :

$$X = \frac{S_o - S_t}{S_o} = 1 - \frac{S_t}{S_o}$$

où S_o est la concentration initiale des betteraves en matières insolubles et S_t est la concentration en matières insolubles au temps t .

Dans tous les essais, des betteraves à sucre ont été broyées dans un broyeur-malaxeur à hélice de marque LAMORT, d'un type utilisé dans l'industrie de la pâte à papier (pulpeur) en présence des additifs acide sulfurique (agent de réglage du pH), formol (agent bactériostatique) et mélange d'enzymes. Les betteraves ont été traitées dans le broyeur-malaxeur pendant environ 1 heure en faisant fonctionner ce dernier de façon intermittente de façon à ne pas dépasser environ 50°C, et soumises à trois passes successives dans le dépastilleur, également de marque LAMORT et d'un type utilisé dans l'industrie de la pâte à papier (affineur) avec recyclage au broyeur de façon que la durée de préhydrolyse dans le broyeur, soit d'environ 2-3 heures. Ensuite, le produit broyé préhydrolysé a été transféré au réacteur pour compléter l'hydrolyse. La proportion de formol était de 0,1% en poids par rapport au poids de betteraves. Le Ph et la proportion d'enzymes étaient tels qu'indiqués dans le Tableau récapitulatif suivant qui résume les conditions opératoires du traitement et le résultat des essais.

T A B L E A U

Essai	Mélange d'enzymes		Hydrolyse		Taux de conversion, %	Viscosité du produit obtenu, mPa.s (cP)
	nature	proportion, litre/tonne	pH	temp., °C durée, heure		
1	A(1)	0,83	4,7	50	61	300
2	A(1)	1,67	4	50	80	55
3	A(1)	1,25	4	50	77	85
4	A(1)	1,25	4	50	76/84	70/ < 30
5	B(2)	1,25	4	55	78	65
6 (3)	A(1)	1,25	4	50	86	35
7 {	A(1)	1,26	3,68	50	76,1	30
	+ SP 300	0,2 kg/t				
8 {	A(1)	1,26	3,60	50	68,5	115
	+ Pectinex					
	3XL	1,25				

(1) mélange, en poids, de 75% de SP 249, 20% de Celluciant et 5% de Novozym 188

(2) mélange, en poids, de 75% de SP 249, 20% de SP 300 et 5% de Novozym 188.

(3) essai réalisé à partir de betteraves fourragères contenant 12,3% de sucre.

(4) Pectinex 3XL est une pectinase vendue par NIDETRENT A.G., Rode (Suisse)

EXEMPLE 9

Cet exemple illustre l'emploi facultatif d'un traitement thermique.

20 kg de betteraves sucrières entières sont placées dans un récipient muni d'un dispositif d'alimenta-

tion en vapeur. On laisse pénétrer la vapeur dans le récipient ; la température, à coeur, de la betterave croît de 3 ° C (initialement) à 75 ° C en 1h 30 environ.

Les betteraves ainsi traitées sont ensuite chargées dans un pulpeur LAMORT 201 et refroidies en cours de pulpage jusqu'à 45 ° C, le pH est ajusté à 5 avec de l'acide sulfurique et on ajoute du formol (1 litre/t) et un mélange d'enzymes constitué, en poids, de 50% de SP 311, 20% de Celluclast et 30% de Novozym 188 à la dose de 11/t. La SP 311 est une préparation brute de SPS-ase commercialisée par NOVO INDUSTRI A/S. On effectue la préhydrolyse pendant 3h 30 environ, temps au bout duquel la viscosité a

5 décré jusqu'à 1100 mPa.s. Le produit est ensuite raffiné par deux passages consécutifs dans un raffineur de laboratoire (Megatron MT) 48/2). L'hydrolyse est poursuivie ensuite dans un réacteur agité à pH = 4 et

10 T = 55 ° C.

Après 24 heures d'hydrolyse la viscosité n'est plus que de 28 mPa.s et le taux de conversion des insolubles est de 78%. Après 48 heures la viscosité est très largement inférieure à 30 mPa.s (limite de mesure de l'instrument) et le taux de conversion atteint 89%.

15 EXEMPLES 10 et 11 et EXEMPLE-TEMOIN A

Ces exemples illustrent respectivement l'emploi d'une étape de post-hydrolyse et l'addition d'un mélange d'enzymes invertase/inulinase (Novozym 230) au mélange d'enzymes de base.

Le tableau suivant récapitule les conditions opératoires et les résultats obtenus :

20

<u>EXEMPLE</u>	<u>A</u>	<u>10</u>	<u>11</u>
Betterave type	Virtus	Virtus	Virtus
<u>Etape de préhydrolyse*</u>			
Mélange d'enzymes de l'ex.9			

25

30

35

40

45

50

55

	1/tonne de betteraves	0,7	0,7	0,7
	Novozym 230, 1/tonne			
5	de betteraves	-	-	0,05
	Formol, 1/t	1	1	1
	durée, h	3	3	3
10	TEMPERATURE, °C	45	45	45
	pH	4,6-5	4,6-5	5
	étape de broyage fin**,			
	nombre de passes	2	2	2
15	<u>Etape d'hydrolyse</u>			
	durée, h	48	48	48
	température, °C	55	55	55
20	ph	4	4	4
	<u>Post-hydrolyse</u>			
	durée, h	-	7	-
25	température, °C	-	70	-
	pH	-	3	-
	<u>Composition de l'hydrolysat, % par rapport aux sucres</u>			
	totaux			
30	Glucose,	24	46	45
	Fructose,	21	41	42
	DP2,	33	8	5
35	DP3,	6	0,9	1
	DP4,	16	0	2
	DPn,	-	3,6	5
40	* avant la préhydrolyse, les betteraves avaient été broyées grossièrement dans un pulpeur LAMORT 201.			
	**nombre de passes dans un raffineur de Laboratoire MEGATRON MT 48/2.			

On voit d'après ces résultats que la mise en oeuvre d'un traitement de post-hydrolyse ou l'addition d'invertase/inulinase améliore fortement les taux de conversion en glucose et fructose.

50 EXEMPLES 12 et 13

Ces exemples illustrent le traitement de racines de chicorée par le procédé de l'invention. Dans chacun de ces exemples on a traité 10 kg environ de racines de chicorée préalablement lavées.

Les conditions opératoires utilisées et les résultats obtenus sont résumés ci-dessous :

55

	<u>EX. 12</u>	<u>EX.13</u>
<u>Traitement thermique à</u>		
<u>la vapeur d'eau</u>	néant	pendant 1h 30
5 <u>broyage grossier dans un</u>		
<u>pulpeur LAMORT 201</u>	oui	oui
<u>Préhydrolyse</u>		
10 enzyme(s) utilisée(s)	SP 249	SP 311 (50%)
		+ Celluclast (20%)
		+ Novozym 188 (30%)
15 proportion d'enzymes,		
1/tonne de substrat	1,25	1
proportion de formol,		
1/tonne de substrat	1	0,5
20 durée, heures	4	3
température, °C	45	45
pH	5	5
25 broyage fin, nb. de passes		
dans un raffineur Megatron	2	2
MT 48/2		
<u>Hydrolyse</u>		
30 durée, heures	42	44
température, °C	55	55
pH	4	4
<u>Post-hydrolyse</u>		
35 enzyme supplémentaire	Novozym 230	néant
ajoutée, l/tonne de	0,1	
substrat		
40 durée, h	24	)
température, °C	55	)néant
pH	4,5	)
45 <u>Composition et propriété</u>		
<u>de l'hydrolysat</u>		
Glucose, g/kg	26,9	33,7
Fructose, g/kg	104,3	105,9
50 Saccharose (DP2), g/kg	2,2	3,8

55

Sucres fermentescibles

totaux exprimés sous forme	133,4	143,5
de glucose g/kg		
Taux de conversion	71	72
Viscosité, mPa.s	180	30

Revendications

1. Un procédé de liquéfaction de betteraves ou de racines de chicorée comprenant les étapes suivantes :
 - a) broyer grossièrement des betteraves ou des racines de chicorée préalablement lavées de façon à les réduire en petits morceaux ;
 - b) ajouter et mélanger aux betteraves ou aux racines de chicorée, pendant ou après leur broyage, une proportion efficace d'un mélange d'enzymes comprenant au moins une SPS-ase, une cellulase et une cellobiase, et un acide de façon à régler le pH du produit broyé dans la gamme de 3 à 5,5 environ ;
 - c) laisser le mélange d'enzymes effectuer une préhydrolyse du produit broyé pendant 1 à 6 heures environ,
 - d) pendant ou après l'étape c) broyer finement le produit à l'état de bouillie ;
 - e) poursuivre l'hydrolyse du produit broyé à l'état de bouillie par le mélange d'enzymes pendant 20 à 120 heures environ ; et
 - f) récupérer le produit hydrolysé liquide résultant.
2. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, dans l'étape b), le pH est ajusté dans la gamme de 3,5 à 5.
3. Un procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'étape de préhydrolyse a une durée de 1-3 heures.
4. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que, dans l'étape d), les matières solides sont broyées à une grosseur de particules de 0,1 mm ou moins.
5. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'étape d'hydrolyse e) a une durée de 24 à 72 heures.
6. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la température dans les étapes c) et e) est maintenue dans la gamme de 35 à 60 ° C.
7. Un procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la température est maintenue entre 35 et 55 ° C dans l'étape c) et entre 45 et 55 ° C dans l'étape e).
8. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les enzymes sont utilisées dans les proportions suivantes, exprimées en termes d'unités d'activité par kg de matières sèches contenues dans les betteraves ou les racines de chicorée :

SPS-ase	15 à 800
Cellulase	380 à 42000
Cellobiase	10 à 4500.

9. Un procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les enzymes sont utilisées dans les proportions suivantes :

SPS-ase	20 à 190 U/kg de matières sèches
Cellulase	700 à 7000 U/kg de matières sèches
Cellobiase	20 à 400 U/kg de matières sèches.

5

10. Un procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le mélange d'enzymes contient, en outre, les enzymes suivantes dans les proportions indiquées, exprimées en terme d'unités d'activité par kg de matières sèches contenues dans les betteraves ou les racines de chicorée :

10

polygalacturonase	5000 à 250000
pectinase	1000 à 55000
β -glucanase fongique	40 à 2500
hémicellulase	120 à 6000.

15

11. Un procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les enzymes indiquées sont utilisées dans les proportions suivantes exprimées en terme d'unités d'activité par kg de matières sèches contenues dans les betteraves ou les racines de chicorée :

20

polygalacturonase	9000 à 60000
pectinase	2000 à 14000
β -glucanase fongique	80 à 550
hémicellulase	200 à 1500.

25

12. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le mélange d'enzymes comprend, en poids, 50-75% de SPS-ase, 5-50% de cellulase et 5-50% de cellobiase.

30

13. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que, en outre, on effectue avant ou pendant l'étape (a), un traitement thermique des betteraves ou des racines de chicorée consistant à les chauffer à une température de 70 à 90 °C pendant quelques minutes à 1 heure environ.

35

14. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que, en outre, on effectue, après l'étape d'hydrolyse (e), une post-hydrolyse à une température comprise entre 55 et 75 °C et pendant quelques minutes à 10 heures environ.

40

15. Un procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la post-hydrolyse est effectuée à un pH inférieur au pH utilisé pour l'hydrolyse (e).

45

16. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que, en outre, on utilise en plus du mélange d'enzymes défini, une enzyme invertase ou une enzyme inulinase ou un mélange des deux.

17. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que, en outre, on ajoute un agent bactériostatique dans l'étape (b).

50

18. Un produit aqueux liquide obtenu directement par hydrolyse enzymatique de betteraves ou de racines de chicorée, caractérisé en ce qu'il contient, comme principaux ingrédients, du glucose, du fructose, des polyosides ayant des degrés de polymérisation de 2 et 3, des pentoses, de l'acide galacturonique et des composés azotés, ce produit ayant un pH acide, une viscosité non supérieure à 300 mPa.s, et une teneur en matières solides en suspension n'excédant pas 2% en poids.

55

19. Un produit selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il a un pH de 4 à 5 et une viscosité non supérieure à 150 mPa.s.

20. Produit aqueux liquide obtenu par concentration et éventuellement, clarification d'un produit selon la revendication 18 ou 19.

Claims

- 5 1. A process for the liquefaction of beets or chicory roots, comprising the following stages :
- 10 a) coarse grinding of beets or of chicory roots which have previously been washed, so as to reduce them into small pieces;
- b) adding to and mixing with the beets or the chicory roots during or after their grinding, an effective proportion of a mixture of enzymes containing at least one SPS-ase, one cellulase and one cellobiase, and an acid so as to adjust the pH of the ground product to within the range approximately from 3 to 5.5;
- 15 c) leaving the enzyme mixture to accomplish a prehydrolysis of the ground product for approximately 1 to 6 hours;
- d) during or after stage c), fine grinding of the product into a slurry form;
- e) continuing the hydrolysis of the ground product in the slurry form by the enzyme mixture for approximately 20 to 120 hours; and
- f) recovering the resulting liquid hydrolysed product.
- 20 2. A process as claimed in claim 1, characterized in that, in stage b), the pH is adjusted to within the range from 3.5 to 5.
3. A process as claimed in claim 1 or 2, characterized in that the prehydrolysis stage lasts for 1-3 hours.
- 25 4. A process as claimed in any one of claims 1 to 3, characterized in that, in stage d), the solids are ground to a particle size of 0.1 mm or less.
5. A process as claimed in any one of claims 1 to 4, characterized in that the hydrolysis stage e) lasts for 24 to 72 hours.
- 30 6. A process as claimed in any one of claims 1 to 5, characterized in that the temperature in stages c) and e) is maintained within the range from 35 to 60 ° C.
7. A process as claimed in claim 6, characterized in that the temperature is maintained between 35 and 55 ° C in stage c) and between 45 and 55 ° C in stage e).
- 35 8. A process as claimed in any one of claims 1 to 7, characterized in that the enzymes are employed in the following proportions, expressed in terms of activity units per kg of dry matter contained in the beets or the chicory roots :

SPS-ase	15 to 800
Cellulase	380 to 42000
Cellobiase	10 to 4500

- 45 9. A process as claimed in claim 8, characterized in that the enzymes are employed in the following proportions:

SPS-ase	20 to 190 U/kg of dry matter
Cellulase	700 to 7000 U/kg of dry matter
Cellobiase	20 to 400 U/kg of dry matter

- 50 10. A process as claimed in claim 8, characterized in that the enzyme mixture additionally contains the following enzymes in the proportions mentioned, expressed in terms of activity units per kg of dry matter contained in the beets or the chicory roots :

Polygalacturonase	5000 to 250000
Pectinase	1000 to 55000
Fungal β -glucanase	40 to 2500
Hemicellulase	120 to 6000

11. A process as claimed in claim 10, characterized in that the enzymes mentioned are employed in the following proportions expressed in terms of activity units per kg of dry matter contained in the beets or in the chicory roots:

Polygalacturonase	9000 to 60000
Pectinase	2000 to 14000
Fungal β -glucanase	80 to 550
Hemicellulase	200 to 1500

12. A process as claimed in any one of claims 1 to 9, characterized in that the enzyme mixture contains, by weight, 50-70% of SPS-ase, 5-50% of cellulase and 5-50% of cellobiase.

13. A process as claimed in any one of claims 1 to 12, characterized in that, in addition, before or during stage a), a heat treatment of the beets or of the chicory roots, which consists in heating them to a temperature from 70 to 90° C for a few minutes to approximately 1 hour, is carried out.

14. A process as claimed in any one of claims 1 to 13, characterized in that, in addition, after the hydrolysis stage e), a post-hydrolysis at a temperature from 55 to 75° C and for a period of a few minutes to approximately 10 hours, is carried out.

15. A process as claimed in claim 14, characterized in that the post-hydrolysis is carried out at a pH below the pH employed for the hydrolysis (e).

16. A process as claimed in any one of claims 1 to 13, characterized in that, in addition to the enzyme mixture defined, an invertase enzyme or an inulinase enzyme or a mixture of the two is additionally employed.

17. A process as claimed in any one of claims 1 to 16, characterized in that, in addition, a bacteriostatic agent is added in stage (b).

18. A liquid aqueous product obtained directly by the enzymatic hydrolysis of beets or of chicory roots, characterized in that it contains, as main ingredients, glucose, fructose, polysaccharides having degrees of polymerization of 2 and 3, pentoses, galacturonic acid and nitrogen-containing compounds, this product having an acid pH, a viscosity not greater than 300 mPa.s and a solids content in suspension which does not exceed 2% by weight.

19. A product as claimed in claim 18, which has a pH from 4 to 5 and a viscosity not greater than 150 mPa.s.

20. Liquid aqueous product obtained by concentrating and optionally clarifying a product as claimed in claim 18 or 19.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Verflüssigung von Rüben oder Zichorienwurzeln, das folgende Stufen umfaßt:
- Grobzerkleinerung der vorher gewaschenen Rüben oder Zichorienwurzeln, so daß kleine Stücke erhalten werden;
 - Hinzufügen und Beimischen während oder im Anschluß an die Zerkleinerung der Rüben oder Zichorienwurzeln einer wirksamen Menge eines Enzymgemisches, das wenigstens eine SPS-ase,

eine Cellulase und eine Cellobiase enthält sowie eine Säure, um den pH-Wert des zerkleinerten Produktes in dem Bereich von ungefähr 3 bis 5,5 einzustellen;

c) Vorhydrolyse des zerkleinerten Produktes durch das Enzymgemisch, im Verlauf von etwa 1 bis 6 Stunden,

d) während Stufe c), oder im Anschluß daran Feinzerkleinerung des Produktes bis zum Brei;

e) Fortführung der Hydrolyse des breiig zerkleinerten Produktes mit Hilfe des Enzymgemisches während ungefähr 20 bis 120 Stunden; und

f) Gewinnung des flüssigen, gewonnen Hydrolyseproduktes.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Stufe b) der pH-Wert im Bereich 3,5 bis 5 eingestellt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Stufe der Vorhydrolyse 1 bis 3 Stunden dauert.

4. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in Stufe d) die festen Bestandteile auf eine Partikelgröße von wenigstens 0,1 mm zerkleinert werden.

5. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrolysestufe e) 24 bis 72 Stunden dauert.

6. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur in den Stufen c) und e) in einem Bereich von 35 bis 60 °C gehalten wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur in der Stufe c) zwischen 35 und 55 °C gehalten wird und in Stufe e) zwischen 45 und 55 °C.

8. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme in folgenden Mengenverhältnissen verwendet werden, ausgedrückt in Aktivitätseinheiten pro kg Trockenmasse, bezogen auf die Rüben oder die Zichorienwurzeln:

SPS-ase	15 bis 800
Cellulase	380 bis 42000
Cellobiase	10 bis 4500

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme in folgenden Mengenverhältnissen verwendet werden:

SPS-ase	20 bis 190 U/kg Trockenmasse
Cellulase	700 bis 7000 U/kg Trockenmasse
Cellobiase	20 bis 400 U/kg Trockenmasse

10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzymgemisch zusätzlich folgende Enzyme in dem angegebenen Mengenverhältnis enthält, ausgedrückt in Aktivitätseinheiten pro kg Trockenmasse bezogen auf die Rüben oder Zichorienwurzeln:

Polygalacturonase	5000 bis 250000
Pectinase	1000 bis 55000
Pilz β -Glucanase	40 bis 2500
Hemicellulase	120 bis 6000

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die angeführten Enzyme in den folgenden

Mengenverhältnissen benutzt werden, ausgedrückt in Aktivitätseinheiten pro kg Trockenmasse, bezogen auf die Rüben und Zichorienwurzeln:

Polygalacturonase	9000 bis 60000
Pectinase	2000 bis 14000
Pilz β - Glucanase	80 bis 550
Hemicellulase	200 bis 1500

5

10

12. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzymgemisch, bezogen auf sein Gewicht, 50 - 75% SPS-ase, 5 bis 50% Cellulase und 5 bis 50% Cellobiase umfaßt.

15

13. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich vor oder während Stufe a) eine Wärmebehandlung der Rüben oder Zichorienwurzeln durchgeführt wird, die darin besteht, daß sie während ungefähr einiger Minuten bis zu einer Stunde, auf eine Temperatur von 70 bis 90 °C erhitzt werden.

20

14. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich nach der Hydrolysestufe e) eine Nachhydrolysierung bei einer Temperatur zwischen 55 und 75 °C während ungefähr einiger Minuten bis zu 10 Stunden vorgenommen wird.

25

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachhydrolysierung bei einem pH-Wert unterhalb von dem für die Hydrolyse (e) durchgeführt wird.

30

16. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich zu der definierten Enzymmischung eine Enzyminvertase oder eine Enzyminulase oder ein Gemisch aus beiden benutzt wird.

35

17. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich in die Stufe (b) ein Bakteriostatikum gegeben wird.

18. Wäßriges, flüssiges Produkt, das direkt durch enzymatische Hydrolyse aus Rüben oder Zichorienwurzeln erhalten wird, dadurch gekennzeichnet, daß es als hauptsächliche Inhaltstoffe Glucose, Fructose, Polyoside mit einem 2- und 3-fachen Polymerisationsgrad, Pentosen, Galacturonsäure und stickstoffhaltige Verbindungen enthält, wobei dieses Produkt einen sauren pH, eine Viskosität nicht oberhalb von 300 mPa·s und einen Gehalt an festen in Suspension befindlichen Bestandteilen, der 2 Gew.-% nicht überschreitet, besitzt.

40

19. Produkt nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es einen pH-Wert von 4 bis 5 hat und eine Viskosität nicht oberhalb von 150 mPa·s.

45

20. Wäßriges, flüssiges Produkt, erhalten durch Konzentrierung und gegebenenfalls durch Klärung aus einem nach Anspruch 18 oder 19 gewonnenen Produkt.

50

55

