



CH626781

Bibliography Description Claims

esp@cenet



Decaffeination process

Patent Number: CH626781-
Publication date: 1981-12-15
Inventor(s): FARR DAVID ROBERT (CH)
Applicant(s): NESTLE SA (CH)
Requested Patent: ☐ CH626781
Application Number: CH19780001205 19780203
Priority Number(s): CH19780001205 19780203
IPC Classification: A23F5/20; A23F3/36
EC Classification: A23F5/20D, C12R1/01
Equivalents:

Abstract

According to the invention, an aqueous extract of vegetable material, containing caffeine, is exposed to a microorganism of the species *Acinetobacter* sp., the suspension obtained is incubated under aerobic conditions until a substantial quantity of the caffeine is metabolised, and the microbial cells are separated from the aqueous extract. The decaffeinated vegetable material obtained does not contain chlorinated residues and does not undergo colour or flavour modification or loss of aroma.

Data supplied from the esp@cenet database - 12



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

51 Int. Cl.³: A 23 F 5/20
A 23 F 3/36

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein



12 FASCICULE DU BREVET A5

11

626 781

21 Numéro de la demande: 1205/78

73 Titulaire(s):
Société des Produits Nestlé S.A., Vevey

22 Date de dépôt: 03.02.1978

24 Brevet délivré le: 15.12.1981

45 Fascicule du brevet
publié le: 15.12.1981

72 Inventeur(s):
David Robert Farr, Brent

54 Procédé de décaféination.

57 Selon l'invention on met un extrait aqueux de la matière végétale contenant de la caféine en présence d'un microorganisme de l'espèce *Acinetobacter* Sp., on *bacteria* incube la suspensions obtenue en conditions aérobies jusqu'à métabolisation d'une quantité substantielle de la caféine et on sépare les cellules du microorganisme de l'extrait aqueux.

La matière végétale décaféinée obtenue ne contient pas de résidus chlorés et ne subit pas d'altération de couleur, flaveur, de pertes en arômes.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de décaféination d'une matière végétale contenant de la caféine, caractérisé par le fait que l'on met un extrait aqueux de cette matière en présence d'un microorganisme de l'espèce *Acinetobacter Sp.*, qu'on incube la suspension obtenue en conditions aérobie jusqu'à métabolisation d'une quantité substantielle de la caféine, et qu'on sépare les cellules du microorganisme de l'extrait aqueux.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microorganisme utilisé est la souche NCIB 11 377.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on ensemence l'extrait aqueux à décaféiner avec inoculum de cellules bactériennes obtenues par culture du microorganisme en conditions submergées dans un milieu nutritif liquide contenant de la caféine comme seule source d'azote et de carbone. □ X

4. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on stabilise les cellules de microorganisme par traitement avec le glutaraldéhyde.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'on conduit la décaféination dans une cellule d'ultrafiltration et qu'on sépare l'extrait aqueux décaféiné sous forme de perméat.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la matière végétale à décaféiner est du café.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la matière à décaféiner est une infusion de café vert.

8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la matière à décaféiner est une infusion de café torréfié et moulu.

9. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la matière à décaféiner est une infusion de café soluble instantané.

10. Matière végétale décaféinée obtenue par la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications précédentes.

L'invention concerne un procédé de décaféination d'une matière végétale contenant de la caféine.

Un procédé largement utilisé dans la préparation du café décaféiné consiste à extraire la caféine par contact de la matière végétale avec un solvant, notamment un solvant chloré qui est ensuite enlevé, par exemple, par entraînement à la vapeur.

Celui-ci n'est cependant jamais totalement éliminé et cette opération s'accompagne d'une perte en arômes.

Une alternative à l'extraction par solvant chloré est la décaféination par voie microbiologique.

Cette méthode consiste à sélectionner un microorganisme capable de se développer en utilisant la caféine comme principale source de carbone et/ou d'azote et à la cultiver sur la matière à décaféiner, ce qui doit permettre de transformer la caféine en des métabolites pratiquement dépourvus d'activité stimulante. On a ainsi proposé l'utilisation de différents organismes tels qu'une bactérie de l'espèce *Bacillus coagulans*, des moisissures des espèces *Stemphyllum*, *Penicillium roquefortii* (S. Schwimmer et coll., «Archives of Biochemistry and Biophysics» 147, 103-113, 1971).

Les mêmes auteurs indiquent dans «Journal of Food Science», vol. 37 (1972), 921-3, qu'une autre moisissure de l'espèce *Penicillium crustosum* est capable de décaféiner des infusions de café torréfié et moulu en donnant de meilleurs résultats. Cependant, il est nécessaire d'ajouter 1-3% de sucrose à l'infusion pour obtenir une décaféination, et celle-ci est relativement lente et incomplète.

L'invention a trait à la décaféination d'une matière végétale contenant de la caféine par voie microbiologique, au moyen d'un microorganisme utilisant la caféine comme seule source de carbone et d'azote et permettant d'obtenir une métabolisation poussée de la

Le procédé selon l'invention permet non seulement de diminuer de façon substantielle le taux de caféine des matières végétales, mais présente encore l'avantage d'une mise en œuvre à basse température.

La matière végétale obtenue ne contient pas de résidus de solvant chlorés et ne subit pas d'altération de couleur, flaveur, de pertes en arômes ni de modification des proportions respectives de ces derniers.

Ce procédé est caractérisé par le fait que l'on met un extrait aqueux de cette matière en présence d'un microorganisme de l'espèce *Acinetobacter*, qu'on incube la suspension obtenue en conditions aérobie jusqu'à métabolisation d'une quantité substantielle de la caféine et qu'on sépare les cellules du microorganisme de l'extrait aqueux.

Dans la suite de l'exposé, on montrera, à titre d'exemple, l'application du procédé à la décaféination du café. Cependant, il va de soi que celui-ci peut être appliqué à toute autre matière végétale contenant de la caféine telle que thé, kola, maté, guarana, etc.

La matière végétale à décaféiner se présente avantageusement sous forme d'infusion. Pour le café, le procédé peut ainsi s'appliquer à une infusion de café vert ou torréfié ou à un extrait de café soluble reconstitué.

Le microorganisme particulier utilisé est une bactérie appartenant à la famille I *Neisseraceae*, genre IV *Acinetobacter*, espèce *Acinetobacter Sp.*, d'après «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», 8^e éd., 1974. Une souche de ce microorganisme, déposée auprès de la National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Ecosse, le 13 janvier 1978, sous le numéro NCIB 11 377, est accessible au public.

Il a été isolé à partir d'un échantillon de sol à La Tour-de-Peilz, Suisse. La souche, identifiée selon S.T. Cowan, K.J. Seel: «Manual for identification of medical bacteria», Cambridge University Press, 1970, et M.J. Thornley: «Properties of *Acinetobacter* and related genera» dans «Identification methods for microbiologists», Part B pp. 29-50, éd. B.M. Gibbs et D.A. Shapton (Academic Press, 1968), a les caractères suivants:

Morphologie des colonies:

Petites, lisses, aux bords réguliers, opaques.

Température:

La meilleure croissance est obtenue à la température de la chambre (20-25°C), mais les cultures se développent également, bien que plus lentement, à 4 et 37°C.

Milieux:

Le plus favorable des milieux testés pour la croissance de bactéries paraît être la gélose vert brillant. Les colonies sur ce milieu sont petites, rondes, opaques, et le milieu devient rouge (alcalin).

Les bactéries poussent aussi sur agar Columbia au sang (+++), agar DST (+++), agar ordinaire au sang (++), McConkey (+), gélose ordinaire (+), agar au sang cuit (+), bouillon ordinaire (+), bouillon Todd (+), bouillon Rosenow (±).

Par contre, aucune croissance n'est obtenue sur les milieux DCLS, TTC, TCA, Chapman (bactéries susceptibles aux sels biliaires, à l'hyperconcentration saline et au tétrasole).

Microscopie:

Observation à l'état frais: Bacilles minces, immobiles, polymorphes (formes bacillaires, coccoïdes, en paires, en amas ou en chaînettes).

Coloration Gram: Bacilles Gram négatif, coloration, généralement bipolaire, pas de spores.

Caractères biochimiques:

Bactéries aérobies strictes, immobiles, oxydase positive, catalase positive.

Autres caractères:

	22°C			37°C		
	4 j.	8 j.	15 j.	4 j.	8 j.	15 j.
65						

86

30°C (6/10/70)

	22°C			37°C		
	4j.	8j.	15j.	4j.	8j.	15j.
ODC	pas de croissance			(aérobies strictes)		
LDC	pas de croissance					
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
tranche	-	-	-	-	-	-
Kligler	-	-	-	-	-	-
culot	-	-	-	-	-	-
Malonate	-	±	+	-	-	-
Citrate	+	+	+	-	+	+
(Simmons)						
Nitrate	réduit en nitrite					

Utilisation des sucres: Le milieu (bouillon) pour cette série de tests contient:

Peptone 10 g
Extrait de viande 3 g
NaCl 5 g/l.

	22°C			37°C		
	4j.	8j.	15j.	4j.	8j.	15j.
Glucose	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-
Inosite	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Adonite	-	-	-	-	-	-
Dulcité	-	-	-	-	-	-
Mannite	-	-	-	-	-	-
Sorbité	-	-	-	-	-	-
Esculine	-	-	-	-	-	-

On constate que la fermentation des carbohydrates dans les bouillons usuels est nulle.

Pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention, on prépare une infusion de café ou de toute autre matière à décaféiner de façon classique. On procède alors à la fermentation avec un inoculum d'*Acinetobacter*. Celui-ci peut être préparé comme suit à partir d'une culture d'entretien où on procède avantageusement à une subculture de surface sur un milieu approprié.

On prépare une solution nutritive aqueuse qu'on mélange à de l'agar et qu'on verse dans des boîtes de Petri. En variante, on peut faire la culture sur papier-filtre alimenté en milieu nutritif par capillarité. Un milieu nutritif convenable contient des sels minéraux et de la caféine comme unique source de carbone et d'azote. Ce peut être par exemple une solution de Hoagland ou Czapek modifiée par remplacement des nitrates par des chlorures et contenant 0,1 à 0,3% de caféine et dont le pH est ajusté à 5,0.

On a constaté qu'une croissance de l'organisme est possible à pH allant de 4 à 7. On préfère cependant opérer à pH de 5,0-5,2, car c'est le pH approximatif des infusions de café.

Ce milieu est alors inoculé avec *Acinetobacter* et on conduit la culture en conditions aérobies, par exemple à la température de 25°C. L'organisme est de préférence transféré sur milieu frais tous les 3 ou 4 jours. Il peut être gardé en collection à 4°C ou lyophilisé.

Pour préparer l'inoculum pour utilisation, l'organisme est de préférence cultivé en culture submergée dans des flacons à secousses contenant le milieu aqueux indiqué, inoculés avec la culture sur agar ci-dessus et maintenus à la température d'incubation choisie, par

oxygénation correcte du microorganisme, jusqu'à une croissance maximale, par exemple pendant environ 30 h. Bien qu'on puisse utiliser cette culture directement (ou des cellules isolées de la culture) pour servir d'inoculum dans une opération de décaféination d'une infusion de café, on préfère transférer celle-ci sur un milieu nutritif frais. Cette culture est alors utilisée pour inoculer un autre flacon à secousses contenant le milieu nutritif frais et incubé pendant environ 24 h à 25°C. Cette opération peut être avantageusement répétée plusieurs fois, après quoi on récolte aseptiquement les cellules, par exemple par centrifugation.

La décaféination proprement dite peut s'effectuer en conditions submergées, par exemple en fermenteur, dans les conditions habituelles de la fermentation bactérienne.

On introduit ainsi l'infusion à décaféiner dans le fermenteur, puis l'inoculum et on maintient le fermenteur en conditions aérobies, sous bonne agitation ou barbotage d'air, à une température de croissance du microorganisme, avantageusement de 20 à 40°C, la fermentation étant la plus rapide à 35°C.

La proportion de cellules ajoutées peut varier selon la durée de fermentation désirée. Ainsi, plus la quantité de cellules ajoutée est grande, plus la consommation de caféine est rapide. Pour une infusion contenant 1 à 1,5 mg de caféine/ml, la durée de décaféination complète peut aller de 4 à environ 40 h ou plus suivant la nature de l'infusion, la forme et la quantité d'inoculum ajoutée, la nature du dispositif utilisé ou les conditions de fermentation.

Les cellules peuvent être séparées, une fois la majeure partie de la caféine éliminée, par toute méthode connue. On peut par exemple chauffer le mélange à une température d'environ 100°C pendant quelques dizaines de secondes à 1 min et séparer les cellules du liquide par décantation, centrifugation ou filtration. En variante, on peut procéder à la filtration du liquide sans destruction du microorganisme sur filtre Millipore.

Suivant un autre mode de réalisation, on peut stabiliser les cellules par traitement par une solution de glutaraldéhyde tamponnée à pH neutre pendant quelques minutes. Il peut être comme d'immobiliser ensuite les cellules ainsi stabilisées en gel de polyacrylamide par polymérisation en masse en présence des cellules. De cette manière, on peut par tamisage obtenir de fines particules solides qu'on peut utiliser comme remplissage d'une colonne à travers laquelle on peut faire circuler l'infusion à décaféiner. En variante, ces particules peuvent être mises en suspension dans la solution à décaféiner soumise à une agitation modérée, la suspension étant ensuite décantée, centrifugée ou filtrée.

Un mode de réalisation particulièrement avantageux consiste à effectuer la décaféination dans un module d'ultrafiltration muni d'un dispositif d'agitation. Celui-ci est alors rempli avec l'infusion à décaféiner et des cellules bactériennes stabilisées, comme indiqué ci-dessus.

Après incubation sous agitation, le module étant ouvert à air libre jusqu'au taux de décaféination désiré, on met celui-ci sous pression d'azote et on recueille le perméat. On peut en variante opérer sous pression, par exemple d'oxygène ou d'air avec recyclage du perméat jusqu'à obtention du taux de décaféination voulu.

L'infusion décaféinée peut ensuite être évaporée, séchée par toute méthode connue telle qu'atomisation, lyophilisation, etc.

Une étude du métabolisme de la caféine traitée par *Acinetobacter* marquée au C¹⁴ a montré que celle-ci est transformée dans un premier stade en théobromine, laquelle est ensuite métabolisée en méthylxanthine et acide diméthylurique.

Les exemples non limitatifs suivants illustrent la façon dont le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre.

Exemple 1:

On effectue la culture d'*Acinetobacter* souche NC1B 11377 par subculture de routine sur milieu nutritif qu'on mélange à de l'agar et

1000-1100 g/l
40-40A

Le milieu nutritif a la composition suivante:

		%
A	NaCl KH₂PO₄ Na₂HPO₄ Caféine	0,058 0,3 0,78 0,1
B	MgSO₄ · 7H₂O CaCl₂ · 2H₂O	0,012 0,0011
C	FeCl ₃	0,000016
	Eau distillée	balance à 100%

Ce milieu nutritif est préparé de la façon suivante: à une solution obtenue par dissolution des constituants A dans l'eau distillée, on ajoute une solution des constituants B jusqu'à un volume légèrement inférieur à 1 l et on ajuste le pH à 5. On complète alors à 1 l par adjonction d'une solution du constituant C et on ajuste de nouveau le pH à 5.

On ajoute ensuite un inoculum préparé comme ci-dessus dans 100 ml du même milieu nutritif et incubé dans un flacon à secousses New Brunswick à 25°C jusqu'à croissance maximale, généralement 30 h.

Le contenu du flacon est utilisé pour inoculer 5 flacons de 2 l contenant chacun 500 ml de milieu caféiné, et on laisse incubé 24 h. On récolte ensuite les cellules aseptiquement par centrifugation à 10000 tr/min pendant 20 min.

On a procédé à l'étude des différents facteurs influençant l'utilisation de la caféine par le microorganisme.

Dans la suite de l'exposé, le taux de caféine des échantillons a été déterminé par chromatographie en couche mince (lames minces Merck) d'aliqots de 2 µ avec éluant acétate d'éthyle/éthanol/eau/ammoniaque, par comparaison avec une solution standard contenant 1 mg/ml de caféine et examen des plaques en lumière UV à 254 nm ou au moyen d'un photomètre Zeiss pour les mesures quantitatives (274 nm). Pour analyse, les échantillons provenant de cultures sont centrifugés pendant 10 min à 5000 t/min et le supernatant est appliqué directement sur les lames.

Influence de la concentration en caféine:

On ajoute une suspension fraîche d'*Acinetobacter* dans 5 flacons contenant chacun 100 ml de milieu nutritif et des concentrations progressives de caféine à raison de 0,036 mg (poids sec) de bactéries/ml. Par incubation à 25°C à pH 5, on a obtenu les résultats suivants:

Concentration initiale en caféine (mg/100 ml)	Durée d'élimination totale de la caféine (h)	Concentration finale des bactéries en mg/ml (poids sec)
100	11,5	0,18
200	22,5	0,23
400	45,5	0,30
600	68	0,37
750	120	0,42

Influence de la concentration en bactéries:

En maintenant la concentration en caféine à 1 mg/ml sur 100 ml de milieu nutritif par flacon, et en ajoutant des concentrations progressives de bactéries avec incubation à 25°C à pH 5, on a obtenu les résultats suivants:

Concentration initiale des bactéries en mg/ml (poids sec)	Durée d'élimination totale de la caféine (h)
0,18	8
0,36	6
0,72	4

Influence du pH:

En inoculant plusieurs flacons maintenus à des pH différents à 25°C et contenant 1 mg/ml de caféine avec des aliqots de 41 mg (poids sec) de bactéries, on a obtenu, en 8 h, 100% de décaféination à pH 5, 6 et 7 et 75% de décaféination à pH 4.

Influence de la température:

On a procédé à la culture en milieu caféiné contenant 1 mg/ml à pH 5 et à différentes températures. On a ainsi constaté une utilisation maximale de la caféine à 35°C, celle-ci étant totalement éliminée en 22 h à cette température (élimination complète en 27 h à 25°C et élimination incomplète après 40 h à 45°C).

Exemple 2:

Des cellules d'*Acinetobacter* cultivées en conditions standards (pH 5, 25°C) sont stabilisées par passage dans une solution de 3% de glutaraldéhyde tamponnée à pH 7 pendant 3 min et lavage soigné avec la même solution tampon. 920 mg de bactéries (poids sec) sont alors immobilisées dans 15 ml de gel de polyacrylamide par polymérisation en masse selon Maurer H.R. («Disc Electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis», de Gruyter, 1971) et tamisées à travers un tamis de 80 mesh. 5 g de particules de gel sont mis en suspension dans 50 ml d'une solution contenant 0,5 mg/ml de caféine dans un flacon à secousses avec agitation modérée à 25°C. On a constaté une élimination complète de la caféine après 41 h.

Exemple 3:

500 mg/ml en poids sec de bactéries sont stabilisés avec le glutaraldéhyde, comme décrit à l'exemple 2, mis en suspension dans 100 ml de milieu caféiné contenant 1 mg/ml de caféine et placés dans une unité d'ultrafiltration Amicon de volume 450 ml munie d'un agitateur magnétique. L'unité est maintenue en contact avec l'atmosphère à 25°C et la suspension est modérément agitée. Après 30 h, la caféine a été totalement éliminée.

La séparation de la solution décaféinée est effectuée par mise du module d'ultrafiltration sous pression d'azote, celle-ci traversant la membrane comme perméat et les cellules de microorganisme restant dans l'unité comme rétentat.

Exemple 4:

Des cellules fraîches sont récoltées par centrifugation à partir d'une culture sur milieu nutritif contenant 1 mg/ml de caféine, lavées avec une solution nutritive dépourvue de caféine, puis centrifugées, et 500 mg en poids sec de celles-ci sont mises une nouvelle fois en suspension dans 150 ml d'une infusion de café vert à 5% à pH 5,2 et contenant 1,5 mg de caféine/ml. La suspension est alors incubée à 25°C et le taux de caféine mesuré. On a constaté que la concentration en caféine n'est plus que de 0,4 mg/ml après 55 h.

Exemple 5:

Des cellules fraîches récoltées et lavées comme indiqué à l'exemple 4 sont remises en suspension dans 80 ml d'une infusion à 4% de café soluble instantané à pH 5,2 et contenant 1,2 mg de caféine/ml, et incubées à 25°C.

On a constaté une élimination totale de la caféine en 16 h.