

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

①① N° de publication :

3 104 906

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

19 15459

⑤① Int Cl⁸ : **A 23 L 11/00** (2019.12), A 23 L 5/20, A 23 J 1/14

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ ISOLAT DE PROTEINE DE POIS A FAIBLE TENEUR EN LIPIDES.

②② Date de dépôt : 23.12.19.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 25.06.21 Bulletin 21/25.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 04.10.24 Bulletin 24/40.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *ROQUETTE FRERES Société
anonyme — FR.*

⑦② Inventeur(s) : CALMON Lucile.

⑦③ Titulaire(s) : ROQUETTE FRERES Société
anonyme.

⑦④ Mandataire(s) : Plasseraud IP.

FR 3 104 906 - B1



Description

Titre de l'invention : ISOLAT DE PROTEINE DE POIS A FAIBLE TENEUR EN LIPIDES

Domaine technique

[0001] L'invention relève du domaine des protéines végétales, en particulier des isolats protéiques de légumineuses, encore plus particulièrement des isolats protéiques de pois ayant une faible teneur en lipides.

Technique antérieure

- [0002] Les besoins quotidiens humains en protéines sont compris entre 12 et 20% de la ration alimentaire. Ces protéines sont fournies aussi bien par des produits d'origine animale (viandes, poissons, œufs, produits laitiers) que par des produits d'origine végétale (céréales, légumineuses, algues).
- [0003] Cependant, dans les pays industrialisés, les apports en protéines sont majoritairement sous la forme de protéines d'origine animale. Or, de nombreuses études démontrent qu'une consommation excessive de protéines d'origine animale au détriment des protéines végétales est une des causes d'augmentation de cancers et maladies cardiovasculaires.
- [0004] Par ailleurs, les protéines animales présentent beaucoup de désavantages, tant sur le plan de leur allergénicité, concernant notamment les protéines issues du lait ou des oeufs, que sur le plan environnemental en relation avec les méfaits de l'élevage intensif.
- [0005] Ainsi, il existe une demande croissante des industriels pour des composés d'origine végétale possédant des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles intéressantes sans pour autant présenter les inconvénients de composés d'origine animale.
- [0006] Néanmoins, le remplacement des protéines animales par des protéines végétales n'est pas toujours aisé car leurs propriétés physiques et physico-chimiques sont différentes, et cela a un impact sur les qualités sensorielles des aliments dans lesquels sont incorporées ces protéines.
- [0007] Depuis les années 70, les légumineuses à graines, dont en particulier le pois, se sont fortement développées en Europe, majoritairement en France, comme ressource protéique alternative aux protéines animales à destination de l'alimentation animale et humaine. Le pois contient environ 27 % en poids de matières protéiques. Le terme « pois » est ici considéré dans son acception la plus large et inclut en particulier toutes les variétés sauvages de « pois lisse » (« smooth pea »), et toutes les variétés mutantes de « pois lisse » et de « pois ridé » (« wrinkled pea »), et ce quelles que soient les utilisations auxquelles on destine généralement lesdites variétés (alimentation humaine,

nutrition animale et/ou autres utilisations). Ces graines sont non-OGM au contraire du soja, et ne nécessitent pas de déhuilage solvanté.

- [0008] Un inconvénient de certaines protéines végétales, en particulier des protéines de légumineuse, encore plus particulièrement des protéines de pois, est qu'elles ne sont pas dépourvues de goût. Elles peuvent donc amener des saveurs désagréables (en anglais « off-flavors ») dans les aliments dans lesquels elles sont incorporées. Ces goûts sont fréquemment décrits par les consommateurs comme des goûts de légumineuses (en anglais « beany »), de pois ou une amertume.
- [0009] Une solution connue à ce problème est de masquer ces saveurs désagréables en introduisant des composés chimiques tels que des arômes pendant le procédé de fabrication. Néanmoins, cette solution n'est souvent pas satisfaisante car elle ne permet pas de masquer la saveur désagréable mais seulement de la réduire faiblement. Un second inconvénient est que le procédé de fabrication des aliments est alors plus onéreux en raison de l'ajout d'ingrédients supplémentaires. Par ailleurs, de plus en plus de consommateurs se détournent des produits contenant des composés chimiques au profit d'une nourriture plus saine.
- [0010] Une solution plus avantageuse est d'utiliser directement un isolat de protéines végétales ayant peu ou pas de saveur désagréable. Quelques exemples de procédés permettant d'obtenir de tels isolats sont déjà décrits. Par exemple, la demande WO2015/071498 décrit un procédé d'extraction par broyage humide, combiné à une fermentation lactique, pour extraire un isolat de protéines de pois purifié. Un autre exemple dans la demande WO2017/120597 décrit un procédé de précipitation sous forme de sels, combiné à un lavage spécifique des protéines avec un grand volume d'une solution aqueuse à pH neutre. Néanmoins, ces procédés ne sont pas satisfaisants car ils résultent en des isolats protéiques présentant toujours un goût de pois et une amertume.
- [0011] Les lipides étant les substrats de la lipoxygénase et des réactions d'oxydation menant à la formation de composés volatiles responsable des « off-flavors » chez la protéine de légumineuses, l'extraction des lipides pourrait constituer une méthode efficace pour produire des isolats protéiques dépourvus de ces « off-flavors » et/ou dont la saveur serait plus stable lors du stockage, en particulier du à l'oxydation des lipides résiduels. En effet, il est décrit dans la littérature (Sessa and Rackis J. A.. Oil Chemists' Soc 1979, 56, 262-271) que la cause principale du développement de ces « off-flavors » pendant la récolte, la transformation et le stockage est l'oxydation des acides gras insaturés, en particulier des acides linoléique et linoléique.
- [0012] Parmi les voies étudiées pour l'extraction, figure l'utilisation de cyclodextrines qui sont des oligosaccharides cycliques composés de plusieurs unités de glucopyranose (C₆H₁₀O₅) liées par une liaison α -(1,4). Les plus communes sont les α -

cyclodextrines, β -cyclodextrines et γ -cyclodextrines constituées respectivement de 6, 7 et 8 glucopyranoses. Dans la littérature, l'utilisation de la β -cyclodextrine a été expérimentée pour éliminer les lipides et phospholipides résiduels des isolats protéiques de soja issus de farine délipidée. Les lipides étant les substrats de la lipoxygénase et des réactions d'oxydation menant à la formation de composés volatiles responsable des off-flavors chez les légumineuses, l'extraction des lipides par la β -cyclodextrine pourrait constituer une méthode efficace pour produire des isolats protéiques dépourvus de ces off-flavors.

[0013] Il est donc d'intérêt d'obtenir une protéine de légumineuse, en particulier un isolat protéique de légumineuse, encore plus particulièrement un isolat protéique de pois ayant une faible teneur en lipides.

Description générale de l'invention

[0014] Selon un premier aspect de l'invention, il est proposé un isolat protéique de légumineuse, la légumineuse étant notamment choisie parmi le pois, et la féverole, préférentiellement le pois, caractérisé en ce qu'il contient entre 7 g et 9 g, préférentiellement entre 7,5 g et 8,5 g de lipides totaux pour 100 g de protéines.

[0015] Selon un autre aspect, il est proposé un procédé de préparation d'un isolat protéique selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 1) mise en suspension de protéines de légumineuses, préférentiellement choisies entre le pois et la féverole, préférentiellement le pois, dans de l'eau ;
- 2) ajustement du pH à 8,5;
- 3) chauffage à une température comprise entre 40 et 50 °C, préférentiellement 45°C;
- 4) ajout d'une solution aqueuse comprenant un mélange de phospholipases et β -cyclodextrines caractérisée en ce que le ratio entre l'activité phospholipase A2 et la quantité de β -cyclodextrines, exprimé en unités d'activité PLA2 par g de β -cyclodextrines, est compris entre 10 et 100, préférentiellement entre 20 et 80, encore plus préférentiellement entre 25 et 50;
- 5) agitation pendant un temps compris entre 160 et 200 min, préférentiellement 180 minutes;
- 6) ajustement du pH à 4,5 ;
- 7) chauffage à une température comprise entre 50 et 70 °C, préférentiellement 60°C pendant 8 à 12 minutes, préférentiellement 10 minutes;
- 8) centrifugation suivie optionnellement d'un lavage dans de l'eau déminée, puis d'une seconde centrifugation ;
- 9) mise en suspension du culot protéique dans de l'eau, puis ajustement du pH à 7;
- 10) séchage de l'isolat protéique obtenu.

[0016] Selon un dernier aspect de l'invention, il est proposé les utilisations industrielles, en particulier alimentaires animales et humaines, de l'isolat protéique de légumineuse,

choisi entre le pois et la féverole, encore plus préférentiellement de l'isolat protéique de pois selon l'invention.

[0017] L'invention sera mieux comprise grâce à la description détaillée ci-dessous.

Description détaillée de l'invention

[0018] Selon un premier aspect de l'invention, il est donc proposé un isolat protéique de légumineuse, la légumineuse étant notamment choisie parmi le pois et la féverole, préférentiellement le pois, caractérisé en ce qu'il contient entre 7 g et 9 g, préférentiellement entre 7,5 g et 8,5 g de lipides totaux pour 100 g de protéines. De manière préférentielle l'isolat protéique de légumineuse est un isolat protéique de pois.

[0019] Le terme «isolat protéique» doit se comprendre dans la présente demande comme une composition ayant une teneur en protéines supérieure à 70%, préférentiellement supérieure à 80%, encore plus préférentiellement supérieure à 85%, ce pourcentage s'entendant sur la matière sèche de la dite composition. La teneur en protéine se calcule à l'aide de toute méthodologie bien connue de l'homme du métier. En particulier, on réalise un dosage de l'azote total par Kjeldahl qu'on multiplie par le coefficient 6,25. La dite composition comporte donc des protéines, macromolécules formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques constituées de l'enchaînement de résidus d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Dans le cadre particulier des protéines de pois, la présente invention concerne plus particulièrement les globulines (environ 50-60% des protéines du pois). Les globulines de pois se subdivisent principalement en trois sous-familles : les légumines, les vicilines et les convicilines.

[0020] Par «légumineuse», on comprendra dans la présente demande la famille de plantes dicotylédones de l'ordre des *Fabales*. C'est l'une des plus importantes familles de plantes à fleurs, la troisième après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* par le nombre d'espèces. Elle compte environ 765 genres regroupant plus de 19 500 espèces. Plusieurs légumineuses sont d'importantes plantes cultivées parmi lesquelles le soja, les haricots, le pois, le pois chiche, la féverole, l'arachide, la lentille cultivée, la luzerne cultivée, différents trèfles, les fèves, le caroubier, la réglisse, le lupin.

[0021] Le terme « pois » dans la présente demande inclut les variétés de pois appartenant au genre *Pisum* et plus particulièrement aux espèces *sativum* et *aestivum*. Lesdites variétés mutantes sont notamment celles dénommées « mutants r », « mutants rb », « mutants rug 3 », « mutants rug 4 », « mutants rug 5 » et « mutants lam » tels que décrits dans l'article de C-L HEYDLEY et al. intitulé « Developing novel pea starches » Proceedings of the Symposium of the Industrial Biochemistry and Biotechnology Group of the Biochemical Society, 1996, pp. 77-87.

[0022] Le terme « lipides totaux » dans la présente demande est défini comme l'ensemble

des molécules lipidiques sans distinction. Ils comprennent ainsi les triglycérides, les phospholipides, les acides gras libres. Le dosage des lipides est réalisé par hydrolyse acide, suivi d'une extraction à l'hexane et d'un dosage spécifique des lipides ainsi extraits, préférentiellement par chromatographie phase gazeuse. La méthode préférée est décrite ci-dessous.

- [0023] De manière préférentielle, la légumineuse de l'isolat protéique est le pois.
- [0024] De manière préférentielle, l'isolat protéique selon l'invention est caractérisé en ce que sa teneur en acide linoléique est diminuée de 20% à 30%, préférentiellement 25%, par rapport à la teneur présente dans la graine de pois.
- [0025] Par « acide linoléique », on entend selon l'invention l'acide gras polyinsaturé oméga-6 correspondant à l'acide tout-cis- $\Delta 9,12$ C18:2 n-6. Sa formule semi-développée est : $H_3C-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$.
- [0026] Comme décrit par exemple dans (Sessa and Rackis 1977) "La principale cause du développement de « off-flavors » pendant la récolte, la manufacture et le stockage est l'oxydation des acides gras polyinsaturés (p.e. les acides linoléiques et linoléniques)". Comme il sera exemplifié plus bas, il est remarquable de voir que grâce à l'invention, la teneur en ces acides est considérablement réduite.
- [0027] Selon un autre aspect, il est proposé un procédé permettant de produire un isolat protéique de légumineuse selon l'invention caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 1) mise en suspension de protéines de légumineuses, préférentiellement choisies entre le pois et la féverole, préférentiellement le pois,, dans de l'eau ;
 - 2) ajustement du pH à 8,5;
 - 3) chauffage à une température comprise entre 40 et 50 °C, préférentiellement 45°C;
 - 4) ajout d'une solution aqueuse comprenant un mélange de phospholipases et β -cyclodextrines caractérisée en ce que le ratio entre l'activité phospholipase A2 et la quantité de β -cyclodextrines, exprimé en unités d'activité PLA2 par g de β -cyclodextrines, est compris entre 10 et 100, préférentiellement entre 20 et 80, encore plus préférentiellement entre 25 et 50;
 - 5) agitation pendant un temps compris entre 160 et 200 min, préférentiellement 180 minutes;
 - 6) ajustement du pH à 4,5 ;
 - 7) chauffage à une température comprise entre 50 et 70 °C, préférentiellement 60°C pendant 8 à 12 minutes, préférentiellement 10 minutes;
 - 8) centrifugation suivie optionnellement d'un lavage dans de l'eau déminée, puis d'une seconde centrifugation ;
 - 9) mise en suspension du culot protéique dans de l'eau, puis ajustement du pH à 7;
 - 10) séchage de l'isolat protéique obtenu.

- [0028] De manière préférée, l'étape 1 est réalisée en mettant en suspension des protéines de légumineuses caractérisées en ce qu'elles sont composées à plus de 50% de globulines, préférentiellement plus de 70%, encore plus préférentiellement plus de 80%. On peut facilement obtenir de telles globulines en broyant la graine en farine, puis en mettant celle-ci en suspension dans de l'eau et en séparant les fibres & l'amidon à l'aide d'hydrocyclones et de centrifugeuses. La solution surnageante enrichie en protéines va ensuite être rectifiée au pH isoélectrique (environ 4,5) et subir un chauffage contrôlé, afin de séparer les globulines dans un coagulat qui floccule. Un tel procédé est décrit dans le brevet EP1400537 de la présente demanderesse.
- [0029] Dans les étapes 1 et 8, par « eau » on entend tout type d'eau convenant à l'extraction de protéine en vue de consommation alimentaire. De manière préférée, on utilisera de l'eau potable, décarbonatée ou déminéralisée.
- [0030] De manière préférée, le séchage de l'étape 10 est réalisé par lyophilisation.
- [0031] Concernant l'étape 4, le ratio entre l'activité phospholipase A2 et la quantité de β -cyclodextrines, exprimé en unités d'activité PLA2 par g de β -cyclodextrines, est compris entre 10 et 100, préférentiellement entre 20 et 80, encore plus préférentiellement entre 25 et 50.
- [0032] De manière préférée, la quantité de β -cyclodextrines est calculée par rapport à la quantité de lipides totaux dans l'isolat de protéines. Cette quantité varie entre 0,04 et 0,8 g/g de lipides. La quantité de phospholipase est calculée afin d'être en conformité avec le ratio décrit ci-dessus.
- [0033] Les phospholipases sont des enzymes qui ont pour action d'hydrolyser les phospholipides. Une phospholipase pouvant être utilisée dans le cadre du procédé selon l'invention est une phospholipase de type A2, notamment la PLA2 Nagase 10P/R produite par Nagase ChemteX Corporation, et qui dérive de *Streptomyces violaceoruber* NBRC 15146.
- [0034] L'activité PLA2 est mesurée avec de la lécithine de soja comme substrat. Celle-ci est placée à 37°C et pH 8,0, et l'activité est mesurée à l'aide par exemple d'un kit enzymatique NEFA-C Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Une unité d'activité d'enzyme correspond à l'hydrolyse d'1 μ mol d'acide gras en une minute.
- [0035] L'enzyme PLA2 Nagase 10P/R titre ainsi 100,000 U/g.
- [0036] Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composés de plusieurs unités de glucopyranose ($C_6H_{10}O_5$) liées par une liaison α -(1,4). Les plus communes sont les α -cyclodextrines, β -cyclodextrines et γ -cyclodextrines constituées respectivement de 6, 7 et 8 glucopyranoses. L'un des principaux intérêts des cyclodextrines est leur capacité à former des complexes d'inclusions avec des composés divers du fait de leur structure en « cylindre conique ».
- [0037] Selon un dernier aspect de l'invention, il est proposé les utilisations industrielles, en

particulier alimentaires animales et humaines, de la composition protéique de légumineuse, préférentiellement de l'isolat protéique de légumineuse, choisi entre le pois et la féverole, encore plus préférentiellement de l'isolat protéique de pois selon l'invention.

[0038] L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples non-limitatifs ci-dessous.

Exemples

[0039] On utilise pour ces exemples des pois jaunes dont la teneur en lipides totaux de la farine est de 2,3% de la matière sèche. L'acide linoléique représente 53,3% des acides gras totaux de cette farine.

[0040] La BCD (Bétacyclodextrine) utilisée est le Kleptose® de la société Roquette.

[0041] La phospholipase utilisée est la Nagase PLA2 10P/R, diluée à une concentration de 1% poids/poids avec de l'eau déminéralisée. La solution contient également 0,5% de NaCl et 0,1% de CaCl₂.

[0042] Exemple 1a : Production d'un isolat protéique de légumineuse selon l'invention à partir de globulines préalablement extraites

[0043] Les globulines sont extraites selon une extraction classique. On utilise dans le présent exemple des graines de pois jaune. Après décortilage des fibres externes sur broyeur à marteaux, on broie des graines de pois afin d'obtenir une farine. Celle-ci est ensuite mise à tremper dans de l'eau à la concentration finale de 16,5 % en poids de matière sèche par rapport au poids de ladite suspension, à un pH de 6,5, pendant 30 minutes à température ambiante. La suspension de farine à 25 % en poids de matière sèche est alors introduite dans une batterie d'hydrocyclones, séparant une phase légère constituée du mélange protéines, fibres internes (pulpes) et solubles et une phase lourde, renfermant l'amidon. La phase légère en sortie d'hydrocyclones est ensuite amenée à une teneur en matière sèche de 11,2 % par rapport au poids de ladite suspension. On procède à la séparation des fibres internes par passage sur des décanteurs centrifuges de type WESPHALIA. La phase légère en sortie de décanteur centrifuge renferme un mélange de protéines et de solubles, tandis que la phase lourde renferme les fibres de pois. On procède à la coagulation des protéines à leur point isoélectrique par ajustement de la phase légère de sortie de décanteur centrifuge à un pH de 4,6 et chauffage à 70°C de cette solution pendant 4 min. Après coagulation des protéines, on récupère un floc protéique composé majoritairement de globulines.

[0044] Le floc protéique est remis en suspension dans de l'eau déminéralisée puis est introduit dans le réacteur où sont ajoutés les réactifs, β CD et PLA2, dans des conditions spécifiques de température (45°C) et de pH (8,5). Les quantités de β CD et de PLA2 sont calculées par rapport à la quantité résiduelle de lipides, dans un dosage respectivement égal à 0,04 g de β CD par g de lipides et 0,002 g d'une solution à 1% de

phospholipase Nagase PLA2 10P/R par g de lipides. Après 180 min de réaction, la solution est chauffée à 60°C pendant 10 min afin d'inhiber la PLA2. Puis la solution traitée est flocculée 10 min à 60°C à pH 4,5 avant d'être centrifugée 2 fois à 8000g pendant 10 min pour éliminer les complexes β CD. Enfin les globulines sont remises en suspension dans de l'eau déminéralisée et le pH est remonté à 7 avant lyophilisation.

[0045] Exemple 1b : Production d'un isolat protéique de légumineuse à partir de farine

[0046] Cet exemple varie de l'exemple 1a en ce que le point d'injection de la β CD et de la phospholipase est situé en amont, lors de l'étape de suspension de la farine de pois.

[0047] On utilise dans le présent exemple des graines de pois jaune. Après décorticage des fibres externes sur broyeur à marteaux, on broie des graines de pois afin d'obtenir une farine. Celle-ci est ensuite mise à tremper dans un réacteur, avec de l'eau à la concentration finale de 16,5 % en poids de matière sèche par rapport au poids de ladite suspension. On introduit dans le réacteur les réactifs, β CD et PLA2, et on place la solution ainsi obtenue dans des conditions spécifiques de température (45°C) et de pH (8,5). Les quantités de β CD et de PLA2 sont calculées par rapport à la quantité résiduelle de lipides, dans un dosage respectivement égal à 0,04 g de β CD par g de lipides et 0,002 g d'une solution à 1% de phospholipase Nagase PLA2 10P/R par g de lipides. Après 180 min de réaction, la solution est chauffée à 60°C pendant 10 min afin d'inhiber la PLA2. La suspension de farine est alors introduite dans une batterie d'hydrocyclones, séparant une phase légère constituée du mélange protéines, fibres internes (pulpes) et solubles et une phase lourde, renfermant l'amidon. La phase légère en sortie d'hydrocyclones est ensuite amenée à une teneur en matière sèche de 11,2 % par rapport au poids de ladite suspension. On procède à la séparation des fibres internes par passage sur des décanteurs centrifuges de type WESPHALIA. La phase légère en sortie de décanteur centrifuge renferme un mélange de protéines et de solubles, tandis que la phase lourde renferme les fibres de pois. On procède à la coagulation des protéines à leur point isoélectrique par ajustement de la phase légère de sortie de décanteur centrifuge à un pH de 4,6 et chauffage à 70°C de cette solution pendant 4 min. Après coagulation des protéines, on récupère un floc protéique composé majoritairement de globulines.

[0048] Exemple 1c : Production d'un isolat protéique de légumineuse selon l'invention à partir de globulines préalablement extraites, avec un ratio β CD/Lipase hors invention

[0049] Le but de cet exemple est de démontrer l'importance du ratio β CD/lipase

[0050] On utilise dans le présent exemple des graines de pois jaune. Après décorticage des fibres externes sur broyeur à marteaux, on broie des graines de pois afin d'obtenir une farine. Celle-ci est ensuite mise à tremper dans de l'eau à la concentration finale de 16,5 % en poids de matière sèche par rapport au poids de ladite suspension, à un pH de 6,5, pendant 30 minutes à température ambiante. La suspension de farine à 25 % en

poids de matière sèche est alors introduite dans une batterie d'hydrocyclones, séparant une phase légère constituée du mélange protéines, fibres internes (pulpes) et solubles et une phase lourde, renfermant l'amidon. La phase légère en sortie d'hydrocyclones est ensuite amenée à une teneur en matière sèche de 11,2 % par rapport au poids de ladite suspension. On procède à la séparation des fibres internes par passage sur des décanteurs centrifuges de type WESPHALIA. La phase légère en sortie de décanteur centrifuge renferme un mélange de protéines et de solubles, tandis que la phase lourde renferme les fibres de pois. On procède à la coagulation des protéines à leur point iso-électrique par ajustement de la phase légère de sortie de décanteur centrifuge à un pH de 4,6 et chauffage à 70°C de cette solution pendant 4 min. Après coagulation des protéines, on récupère un floc protéique composé majoritairement de globulines,.

[0051] Le floc protéique est remis en suspension dans de l'eau déminéralisée puis est introduit dans le réacteur où sont ajoutés les réactifs, β CD et PLA2, dans des conditions spécifiques de température (45°C) et de pH (8,5). Les quantités de β CD et de PLA2 sont calculées par rapport à la quantité résiduelle de lipides, dans un dosage respectivement égal à 0,71 g de β CD par g de lipides et 0,002 g d'une solution à 1% de phospholipase Nagase PLA2 10P/R par g de lipides. Après 180 min de réaction, la solution est chauffée à 60°C pendant 10 min afin d'inhiber la PLA2. Puis la solution traitée est floculée 10 min à 60°C à pH 4,5 avant d'être centrifugée 2 fois à 8000g pendant 10 min pour éliminer les complexes β CD. Enfin les globulines sont remises en suspension dans de l'eau déminéralisée et le pH est remonté à 7 avant lyophilisation.

[0052] Exemple 2 : Mesure des lipides totaux dans différents isolats selon l'invention

On analyse les lipides totaux ainsi que la teneur en différents acides gras présents.

Le protocole pour analyser les lipides totaux est le suivant :

Le protocole pour analyser la teneur en acide linoléique est le suivant :

Ces deux valeurs sont exprimées par rapport à la teneur en protéines afin de comparer les différents échantillons. La teneur en protéines est obtenue en dosant la teneur en azote de l'échantillon, qui sera multipliée par le coefficient 6,25.

[0053] Le tableau ci-dessous résume et compare les différents essais :

[Tableaux1]

	Lipides totaux (en g/100g protéines sèches)	Réduction de la teneur en lipides (%)	Acide linoléique (en g/100g protéines sèches)	Réduction de la teneur en acide li- noléique (%)
Pois	12	-	3,8	-
Exemple 1a	7,3	39%	2,9	23,6%
Exemple 1b	10	16%	3,7	2,6%
Exemple 1c	9,3	20%	3,6	5,2%

Ces essais montrent à la fois l'importance du point d'injection de la β CD et de la phospholipase, ainsi que du ratio β CD/lipase. En effet, seul l'exemple 1a selon l'invention permet d'obtenir un isolat protéique ayant :

- une forte réduction de la teneur en lipides conduisant à un taux de moins de 9 g de lipides totaux pour 100 g de protéines ;
- une forte réduction de la teneur en acide linoléique de plus de 20% (23,6 %).

Revendications

- [Revendication 1] Isolat protéique de légumineuse, caractérisé en ce qu'il contient entre 7 g et 9 g, préférablement entre 7,5 g et 8,5 g de lipides totaux pour 100 g de protéines.
- [Revendication 2] Isolat protéique selon la revendication 1 dans lequel la légumineuse est choisie parmi le pois, et la féverole et plus préférentiellement le pois.
- [Revendication 3] Isolat protéique selon la revendication 1 caractérisé en ce que sa teneur en acide linoléique est diminuée de 20% à 30%, préférentiellement 25%, par rapport à la teneur présente dans la graine de pois.
- [Revendication 4] Procédé de préparation d'un isolat protéique selon les revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 1) mise en suspension de protéines de légumineuses, préférentiellement choisies entre le pois et la féverole, préférentiellement le pois, dans de l'eau ;
 - 2) ajustement du pH à 8,5;
 - 3) chauffage à une température comprise entre 40 et 50 °C, préférentiellement 45°C;
 - 4) ajout d'une solution aqueuse comprenant un mélange de phospholipases et β -cyclodextrines caractérisée en ce que le ratio entre l'activité phospholipase A2 et la quantité de β -cyclodextrines, exprimé en unités d'activité PLA2 par g de β -cyclodextrines, est compris entre 10 et 100, préférentiellement entre 20 et 80, encore plus préférentiellement entre 25 et 50;
 - 5) agitation pendant un temps compris entre 160 et 200 min, préférentiellement 180 minutes;
 - 6) ajustement du pH à 4,5 ;
 - 7) chauffage à une température comprise entre 50 et 70 °C, préférentiellement 60°C pendant 8 à 12 minutes, préférentiellement 10 minutes;
 - 8) centrifugation suivie optionnellement d'un lavage dans de l'eau déminérée, puis d'une seconde centrifugation ;
 - 9) mise en suspension du culot protéique dans de l'eau, puis ajustement du pH à 7;
 - 10) séchage de l'isolat protéique obtenu.
- [Revendication 5] Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que le séchage de l'étape 10 est réalisé par lyophilisation.
- [Revendication 6] Procédé selon l'une des revendications 4 à 5, caractérisé en ce que la quantité de β -cyclodextrines mise en œuvre à l'étape 4 est comprise

- entre 0,04 et 0,8 g/g de lipides totaux dans l'isolat de protéines.
- [Revendication 7] Procédé selon l'une des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que les protéines de légumineuses mises en suspension à l'étape 1 sont composées de plus de 50% de globulines, préférentiellement plus de 70%, encore plus préférentiellement plus de 80%.
- [Revendication 8] Utilisation de l'isolat protéique selon les revendications 1 à 3 pour l'alimentation humaine ou animale.

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

US 2011/045128 A1 (DAMODARAN SRINIVASAN
[US] ET AL) 24 février 2011 (2011-02-24)

ZHU DAN ET AL: "Removal of
off-flavour-causing precursors in soy
protein by concurrent treatment with
phospholipase A2 and cyclodextrins",
FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL,
vol. 264, 9 mai 2018 (2018-05-09), pages
319-325, XP085402647,
ISSN: 0308-8146, DOI:
10.1016/J.FOODCHEM.2018.05.045

AKSHAY ARORA ET AL: "Removal of soy
protein-bound phospholipids by a
combination of sonication, -cyclodextrin,
and phospholipase A treatments",
FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL,
vol. 127, no. 3,
19 janvier 2011 (2011-01-19), pages
1007-1013, XP028176529,
ISSN: 0308-8146, DOI:
10.1016/J.FOODCHEM.2011.01.073
[extrait le 2011-01-26]

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

FR 3 071 132 A1 (ROQUETTE FRERES [FR])
22 mars 2019 (2019-03-22)

FR 2 889 417 A1 (ROQUETTE FRERES [FR])
9 février 2007 (2007-02-09)

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT