

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2021/130446 A1

(43) Date de la publication internationale
01 juillet 2021 (01.07.2021)

(51) Classification internationale des brevets :
A23J 1/14 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2020/052598

(22) Date de dépôt international :
22 décembre 2020 (22.12.2020)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
FR1915459 23 décembre 2019 (23.12.2019) FR

(71) Déposant : **ROQUETTE FRERES** [FR/FR] ; 1 rue de la Haute Loge, 62136 LESTREM (FR).

(72) Inventeur : **CALMON, Lucile** ; 7 rue de Toul, Appartement 53, 59800 LILLE (FR).

(74) Mandataire : **PLASSERAUD IP** ; 66 rue de la Chaussée d'Antin, 75440 PARIS CEDEX 09 (FR).

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title: LOW-LIPID PEA PROTEIN ISOLATE

(54) Titre : ISOLAT DE PROTEINE DE POIS A FAIBLE TENEUR EN LIPIDES

(57) Abstract: The invention relates to leguminous protein isolates, particularly pea protein isolates having a low lipid content, as well as to a process for the preparation thereof.

(57) Abrégé : L'invention porte sur des isolats protéiques de légumineuse, particulièrement des isolats protéiques de pois ayant une faible teneur en lipides ainsi que leur procédé de préparation.



WO 2021/130446 A1

Description

Titre : 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 cardio-vasculaires.

[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 œufs, 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 flaveur 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.. Oll 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. Dans ce domaine, on peut citer le document Zhu et al., Food Chemistry, 264 (2018), qui préconise d'utiliser une α -cyclodextrine, ainsi que les documents Akshay Arora et al., Food Chemistry, 127, n°3, 2011 et US20110045128 A1 qui préconisent d'utiliser un traitement ultrasons associé à l'utilisation de cyclodextrine.

[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, préférablement 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, les 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 légumineuse.

[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 : $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$.

[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 linoléiques)". 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] L'isolat protéique peut présenter l'avantage de ne pas contenir de traces de solvant organique, c'est-à-dire contenant moins de 100 ppm de solvant par rapport à la masse sèche d'isolat. Préférentiellement, l'isolat contient préférentiellement moins de 10 ppm par rapport à la masse sèche d'isolat, tout préférentiellement n'en comprend pas du tout. Par solvant organique, on entend un solvant fait de molécules comprenant au moins un atome de carbone. Au contraire, l'isolat peut comprendre des solvants inorganiques, typiquement l'eau. C'est un avantage par rapport aux isolats fabriqués par un procédé comprenant une étape d'extraction des lipides par un solvant organique tel que l'hexane.

[0028] L'isolat protéique de l'invention peut présenter de bonnes propriétés fonctionnelles, par une bonne rétention en huile ou en eau.

[0029] 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.

[0030] 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 coagulât qui floccule. Un tel procédé est décrit dans le brevet EP1400537 de la présente demanderesse.

[0031] 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.

[0032] 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.

[0033] 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.

[0034] 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.

[0035] 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 µmol d'acide gras en une minute.

[0036] L'enzyme PLA2 Nagase 10P/R titre ainsi 100,000 U/g.

[0037] Les cyclodextrines 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. 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 ».

[0038] Selon l'invention, le séchage de la composition peut se faire par toute méthode connue en soi, préférentiellement par lyophilisation, passage sur tambour sécheur ou atomisation (« spray-drying »), notamment par lyophilisation.

[0039] Un avantage du procédé est qu'il peut ne pas comprendre d'étape de traitement ultrasons. Une étape de traitement ultrasons, connue en soi, consiste une étape d'application d'ultrasons à de la matière (farine, isolat, etc...) lors du procédé.

[0040] 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.

[0041] L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples non-limitatifs ci-dessous.

Exemples

[0042]_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.

[0043]La BCD (Bétacyclodextrine) utilisée est le Kleptose® de la société Roquette.

[0044]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.

[0045]Exemple 1a : Production d'un isolat protéique de légumineuse selon l'invention à partir de globulines préalablement extraites

[0046]Les globulines sont extraites selon une extraction classique. 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 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.

[0047]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 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.

[0048] Exemple 1b : Production d'un isolat protéique de légumineuse à partir de farine

[0049] 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.

[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 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.

[0051] 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

[0052] Le but de cet exemple est de démontrer l'importance du ratio β CD/lipase

[0053] 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 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,.

[0054] 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.

[0055] 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.

[0056] Le tableau ci-dessous résume et compare les différents essais :
[Tableau 1]

	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 linoléique (%)
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 ou 2 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 légumineuse.

[Revendication 4] Isolat protéique selon l'une des revendications revendication 1 à 3 caractérisé en ce qu'il ne contient pas de solvant organique.

[Revendication 5] Procédé de préparation d'un isolat protéique selon les revendications 1 à 4 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 6] Procédé selon la revendication 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 5 ou 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] Procédé selon l'une des revendications 5 à 7 caractérisé en ce qu'il ne comprend pas d'étape de traitement ultrasons.

[Revendication 9] Utilisation de l'isolat protéique selon les revendications 1 à 4 pour l'alimentation humaine ou animale.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2020/052598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>A23J 1/14</i> (2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A23J Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011045128 A1 (DAMODARAN SRINIVASAN [US] ET AL) 24 February 2011 (2011-02-24) claims; examples	1-9
X	ZHU DAN ET AL. "Removal of off-flavour-causing precursors in soy protein by concurrent treatment with phospholipase A2 and cyclodextrins" <i>FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL</i> , Vol. 264, 09 May 2018 (2018-05-09), pages 319-325 DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2018.05.045 ISSN: 0308-8146, XP085402647 paragraph [0001] paragraph [02.3] paragraph [03.1] - paragraph [03.4]	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 18 February 2021		Date of mailing of the international search report 26 February 2021
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Vernier, Frédéric Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2020/052598

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AKSHAY ARORA ET AL. "Removal of soy protein-bound phospholipids by a combination of sonication, -cyclodextrin, and phospholipase A treatments" <i>FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL</i> , Vol. 127, No. 3, 19 January 2011 (2011-01-19), pages 1007-1013, [retrieved on 2011-01-26] DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.01.073 ISSN: 0308-8146, XP028176529 paragraph [0001] paragraph [02.2] paragraph [03.2]	1-9
A	FR 3071132 A1 (ROQUETTE FRERES [FR]) 22 March 2019 (2019-03-22) claims; examples	1-9
A	FR 2889417 A1 (ROQUETTE FRERES [FR]) 09 February 2007 (2007-02-09) claims; examples; table II	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2020/052598

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2011045128	A1	24 February 2011	NONE			
FR	3071132	A1	22 March 2019	AU	2018334101	A1	26 March 2020
				BR	112020005133	A2	15 September 2020
				CA	3074325	A1	21 March 2019
				CN	111093383	A	01 May 2020
				EP	3681306	A1	22 July 2020
				FR	3071132	A1	22 March 2019
				JP	2020533010	A	19 November 2020
				KR	20200049784	A	08 May 2020
				US	2020277344	A1	03 September 2020
				WO	2019053387	A1	21 March 2019
FR	2889417	A1	09 February 2007	AT	537705	T	15 January 2012
				CA	2617697	A1	15 February 2007
				EP	1915061	A1	30 April 2008
				EP	2272379	A1	12 January 2011
				ES	2381934	T3	01 June 2012
				ES	2438992	T3	21 January 2014
				FR	2889417	A1	09 February 2007
				US	2008226811	A1	18 September 2008
				WO	2007017571	A1	15 February 2007

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2020/052598

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A23J1/14 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A23J		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 2011/045128 A1 (DAMODARAN SRINIVASAN [US] ET AL) 24 février 2011 (2011-02-24) revendications; exemples -----	1-9
X	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 alinéa [0001] alinéa [02.3] alinéa [03.1] - alinéa [03.4] ----- -/--	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 18 février 2021		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 26/02/2021
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Vernier, Frédéric

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	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] alinéa [0001] alinéa [02.2] alinéa [03.2]	1-9
A	----- FR 3 071 132 A1 (ROQUETTE FRERES [FR]) 22 mars 2019 (2019-03-22) revendications; exemples	1-9
A	----- FR 2 889 417 A1 (ROQUETTE FRERES [FR]) 9 février 2007 (2007-02-09) revendications; exemples; tableau II -----	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2020/052598

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2011045128	A1	24-02-2011	AUCUN

FR 3071132	A1	22-03-2019	AU 2018334101 A1 26-03-2020
			BR 112020005133 A2 15-09-2020
			CA 3074325 A1 21-03-2019
			CN 111093383 A 01-05-2020
			EP 3681306 A1 22-07-2020
			FR 3071132 A1 22-03-2019
			JP 2020533010 A 19-11-2020
			KR 20200049784 A 08-05-2020
			US 2020277344 A1 03-09-2020
			WO 2019053387 A1 21-03-2019

FR 2889417	A1	09-02-2007	AT 537705 T 15-01-2012
			CA 2617697 A1 15-02-2007
			EP 1915061 A1 30-04-2008
			EP 2272379 A1 12-01-2011
			ES 2381934 T3 01-06-2012
			ES 2438992 T3 21-01-2014
			FR 2889417 A1 09-02-2007
			US 2008226811 A1 18-09-2008
			WO 2007017571 A1 15-02-2007
