

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
20 mars 2008 (20.03.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/031982 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A23L 1/229 (2006.01) C12P 19/30 (2006.01)
C12N 1/06 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/051905

(22) Date de dépôt international :
11 septembre 2007 (11.09.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0653686 12 septembre 2006 (12.09.2006) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LESAF-
FRE ET COMPAGNIE [FR/FR]; 41, rue Étienne Marcel,
F-75001 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : ORIOL,
Eric [FR/FR]; 20, rue Charles Infroit, F-94500 Champigny
sur Marne (FR). KAID, Nadia [FR/FR]; 35, allée Georges
Politzer, F-92000 Nanterre (FR).

(74) Mandataires : GALLOIS, Valérie etc.; Becker & Asso-
ciés, 25, rue Louis Le Grand, F-75002 Paris (FR).

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

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(54) Title: NOVEL PREPARATION OF PHOSPHODIESTERASE OF PLANT ORIGIN

(54) Titre : NOUVELLE PREPARATION DE PHOSPHODIESTERASE D'ORIGINE VÉGÉTALE

(57) Abstract: The present invention relates to the preparation of a 5'-phospho-diesterase extracted from sorghum, and to the use thereof for the preparation of a composition rich in 5'-nucleotides, in particular of a yeast extract.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à la préparation d'une 5' phosphodiesterase extraite du sorgho, et à son utilisation pour la préparation d'une composition riche en 5' nucléotides, en particulier d'un extrait de levure.



WO 2008/031982 A2

NOUVELLE PREPARATION DE PHOSPHODIESTERASE D'ORIGINE VEGETALE

La présente invention concerne un procédé de préparation d'un agent de
5 sapidité par traitement enzymatique de levure, l'agent de sapidité obtenu et ses utilisations.

Les extraits de levure sont disponibles commercialement sous forme de poudre et de pâte, et sont largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme agent aromatisant.

10 Les extraits de levure se définissent comme des concentrés de la fraction soluble des levures généralement obtenus par autolyse ou hydrolyse.

L'autolyse est essentiellement un procédé visant à endommager la membrane plasmique de la levure réalisé en activant les propres enzymes de dégradation des levures (protéases) et résultant en une solubilisation des composés intracellulaires.

15 Les extraits de levure peuvent également être obtenus par hydrolyse en utilisant des réactifs ou des enzymes exogènes qui permettent le relargage du contenu intracellulaire sous une forme fortement dégradée.

Les extraits de levure ont été largement acceptés dans l'industrie agroalimentaire sous la dénomination d'agents aromatisants naturels.

20 Ils sont également très compétitifs sur le plan financier, en comparaison d'autres agents aromatisants (qui sont souvent non naturels), avec une intensité aromatique équivalente.

Ces traitements enzymatiques des levures sont bien connus dans l'état de la technique.

25 Les autolysats de levure, préparés en soumettant la levure à une dégradation par son propre matériel enzymatique endogène, sont bien connus comme additifs alimentaires.

L'autolyse peut être déclenchée en incubant les cellules de levure à une haute température, en ajoutant des solvants organiques, en utilisant une concentration
30 croissante de NaCl ou en combinant ces différentes méthodes.

Durant l'autolyse, la conversion principale ayant lieu est la dégradation des protéines en peptides et acides aminés.

Les autolysats obtenus ont par conséquent une saveur amère et une note levure typique prononcée. Un autre inconvénient est que les autolysats ne contiennent principalement que des 3'-ribonucléotides, qui n'ont aucune contribution en terme de saveur, car les ribonucléases endogènes convertissent l'ARN intracellulaire en 3'-ribonucléotides.

Dans le brevet EP 0 354 610 B1 de Quest International B.V., il est enseigné un procédé de préparation d'un extrait de levure dans lequel, tout d'abord la paroi est dégradée avec des enzymes protéolytiques exogènes dans des conditions anaérobiques, puis ensuite l'ARN est dégradé avec des enzymes exogènes en conditions oxydantes. Ce procédé permet d'obtenir un autolysat riche en 5'-nucléotides.

Les composés gustatifs connus contenus dans les autolysats de levure incluent les acides aminés, les peptides, les acides nucléiques comme les 5'-nucléotides, les saccharides et les acides organiques. Le contenu en 5'-nucléotides est d'une importance considérable pour la saveur et la saveur. De tels acides nucléiques sont utilisés comme composés bruts dans l'aromatisation de préparations alimentaires, par exemple le 5'-inosine mono-phosphate (5'-IMP) ou le 5'-guanosine mono-phosphate (5'-GMP), mais trouvent également des applications dans l'élaboration de produits pharmaceutiques.

La saveur umami est considérée comme la cinquième saveur basique au même titre que les saveurs sucrée, salée, amère et acide. Les 5'-nucléotides à fort pouvoir exhausteur de goût sont également générateurs de la saveur umami, et renforcent ainsi l'effet du mono sodium glutamate (MSG), naturellement présent dans les extraits de levure.

L'obtention de 5'-nucléotides nécessite l'hydrolyse de l'ARN brut au moyen d'une enzyme bien spécifique, la 5'-phosphodiesterase (5'-PDE). Cohn et Volkin (1953) ont été les premiers à démontrer la présence d'une activité 5'-phosphodiesterase dans le venin de serpent. Malgré sa très grande efficacité, elle ne peut être utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour des raisons évidentes.

D'autres sources importantes de 5'-PDE incluent certains champignons comme *Penicillium citrinum* et certains *Actinomyces* comme *Streptomyces aureus*.

D'ailleurs, la 5'-PDE provenant de *Penicillium citrinum* est disponible commercialement chez Amano Enzyme entre autre, sous le nom de Nucléase RP-1G (ou EC3.1.30.1). Du fait de son coût de revient très élevé, cette enzyme est principalement utilisée à une échelle industrielle dans une forme immobilisée. Son utilisation dans un procédé de production d'extraits de levure enrichis en 5'-nucléotides induit des coûts enzymatiques supplémentaires très importants.

La présence d'une activité 5'-PDE dans certains germes de plantes a été démontrée par Schuster (1957). De nombreuses études postérieures ont fait l'objet de demandes de brevet et décrivent principalement des méthodes de production d'extraits de levure riches en 5'-nucléotides à partir d'extraits de radicules de malt (le malt étant de l'orge germé). Le malt est un sous-produit de l'industrie brassicole, et peut donc par conséquent représenter une source bon marché d'enzyme pour la production de 5'-nucléotides à partir d'ARN de levure. Dans ce cas, la 5'-PDE est préparée par simple décoction d'une poudre de radicules de malt dans une solution aqueuse contenant de l'acétate de zinc pour stabiliser l'enzyme, et son emploi induit un faible surcoût pour la fabrication d'extrait de levure enrichi en 5'-nucléotides produit.

Des procédés d'obtention de dérivés de levure riche en 5'-nucléotides en utilisant le malt d'orge comme source d'enzymes sont par exemple décrits dans les documents US-A-4 810 509, EP-A-0299078, FR 75 08446 ainsi que dans l'ouvrage de référence « Yeast Technology » de G. Reed et T.W. Nagodawithana, 2ème édition (Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442 – 31892 – 8), pages 382 à 385.

L'inconvénient majeur de l'utilisation de 5'-PDE provenant du malt ou orge germé est qu'il possède un caractère allergène. En effet, la matière première dont est issue l'enzyme, en l'occurrence l'orge, contient de l'hordéine, une prolamine proche de la gliadine de blé qui présente un caractère allergène et entraîne des intolérances (maladie coeliaque). D'ailleurs, l'orge est répertoriée par la Directive CE 2000/13/EC, amendée par la directive CE 2003/89/EC comme faisant partie des céréales contenant du gluten. Ainsi selon cette directive, dite Directive « allergènes », les produits contenant de l'orge ou ses dérivés sont soumis à étiquetage.

La principale caractéristique de ces protéines est qu'elles ne sont pas dégradées par l'environnement acide de l'estomac, ni par les enzymes digestives intestinales. Demeurées intactes, ces protéines sont absorbées telles quelles par l'intestin et peuvent ainsi déclencher une réaction immunitaire. Dans le cas de la

5 maladie coeliaque, c'est la consommation de ces prolamines qui entraîne une réaction de l'organisme. Toutes ces protéines prolamines sont toxiques pour les personnes dites coeliaques, car leur consommation entraîne une forte réaction inflammatoire qui endommage la surface des cellules de l'intestin grêle. Cela a pour effet de réduire leur

10 capacité d'absorption des nutriments tels les protéines, les matières grasses, les glucides, les vitamines et les minéraux. L'allergie est associée à des symptômes de nature gastro-intestinales: crampes abdominales, ballonnements et diarrhée chronique. De ceux-là peuvent découler la malabsorption de plusieurs nutriments (fer, calcium, acide folique), la malnutrition (anémie et perte de poids), la fatigue, la douleur osseuse, les crampes musculaires et l'irritabilité.

15 La purification de la PDE de malt d'orge peut constituer une alternative si l'on arrive à séparer l'enzyme de la prolamine d'orge. Cependant, les travaux publiés par Ai-Yu Wang *et al.* ((1993) Biochemistry and Molecular Biology International, pp 1095-1102. Vol 29, N°6), ou par Beluhan *et al.* ((2003) in Biotechnology Letters 25, pp 1099-1103) se sont attachés à caractériser la 5'-PDE de malt d'orge purifiée sans

20 mesurer la présence de la prolamine d'orge dans leurs préparations. Cette alternative de purification apparaît coûteuse et n'exonère pas d'un dossier analytique démontrant l'élimination du gluten de la préparation enzymatique mais surtout d'un dossier clinique prouvant l'absence de caractère allergène du produit résultant de l'action de cette enzyme.

25 Une deuxième alternative consiste à utiliser une 5'-PDE d'origine microbienne obtenue à partir de souches de champignons filamenteux comme *Penicillium citrinum* ou *Aspergillus niger*, ou de bactéries comme *Actinomyces* ou *Streptomyces*. Cependant, ce sont des développements longs qui passent par des phases d'amélioration des souches. En outre, ce type de production requiert des

30 installations industrielles de fermentation/purification et un procédé qui, au final, aboutit à une enzyme coûteuse.

Une troisième alternative serait de cloner une 5'-PDE végétale dans un micro-organisme industriel. Cette alternative a été évaluée par les équipes de chercheurs de la Demanderesse, mais, outre le fait que les séquences codant pour cette enzyme ne sont pas connues, cela conduirait à une enzyme issue d'un organisme génétiquement modifié (OGM), type de produit encore très mal perçu par les différents clients
5 utilisateurs.

Ainsi le problème jusqu'à présent non résolu, consiste-t-il à trouver une source d'enzyme alimentaire dépourvue de gluten et qui ne présente pas de désavantage économique comme c'est le cas des enzymes commerciales
10 actuellement disponibles sur le marché. Cette préparation doit d'autre part être exempte de nucléases ou phosphatases qui dégradent les fragments d'ARN ou les nucléotides, et conduisent à des produits de dégradation sans pouvoir exhausteur de goût. Elle ne doit pas non plus générer de goûts ou de notes aromatiques qui pourraient être perçus de manière gênante à la dégustation.

15 La demanderesse vient maintenant de découvrir, de manière particulièrement inattendue et surprenante, que le malt de sorgho pouvait parfaitement remplacer le malt d'orge à caractère allergène dans la préparation d'extraits de levure riches en 5'nucléotides. Qui plus est, le sorgho ne fait pas partie de la liste des céréales à gluten selon la Directive C2003/89/CE, et ne présente par conséquent aucun
20 caractère allergène comme le gluten.

La demanderesse a mis au point une préparation enzymatique de 5'-PDE à partir d'un mélange contenant des germes et des radicules de malt de sorgho.

Plus particulièrement, la 5'-phosphodiesterase de sorgho est obtenue grâce à une décoction de radicules de sorgho malté. Ainsi, une poudre de radicules de sorgho d'une granulométrie comprise entre 20 et 2000 µm, de préférence entre 100 et
25 200 µm, est mise en suspension dans une solution aqueuse d'acétate de zinc ou d'un agent équivalent, c'est à dire un agent présentant le même effet de stabilisation de la 5'-PDE. La suspension est incubée à une température comprise entre 50 et 80 °C pendant 30 min à 4 h. De préférence, cette décoction est effectuée sous agitation. Par
30 exemple, la poudre de radicules peut être utilisée dans une proportion de 5 à 20 % P/P), de préférence 10 à 15 %, et notamment 13 %. La concentration d'acétate de zinc est de préférence comprise entre 0,2 et 5 g/l. Dans un mode de réalisation

alternatif, on utilise un malt intégral de sorgho contenant des radicelles. Ensuite, dans un mode de réalisation préféré, on récupère la partie soluble de la solution. Par exemple, la préparation peut être séparée sur décanteur centrifuge, puis le surnageant est clarifié dans un clarificateur centrifuge.

- 5 La préparation de 5'-PDE de sorgho ainsi obtenue peut être utilisée pour la préparation d'une composition riche en 5'-nucléotides, d'un extrait de levure riche en 5' nucléotides, dénuée de gluten.

La présente invention concerne donc une méthode de préparation d'une 5'-PDE de sorgho comprenant la préparation d'une décoction de radicelles de sorgho
10 malté dans une solution aqueuse d'acétate de zinc (0,2 à 5 g/l) à une température comprise entre 50 et 80 °C pendant 30 min à 4 h, puis l'élimination de la fraction insoluble. Elle peut également comprendre une étape de concentration.

La présente invention concerne la préparation de 5'-PDE de sorgho susceptible d'être obtenue par ce procédé et son utilisation pour digérer de l'ARN,
15 plus particulièrement pour la préparation d'une composition riche en 5'-nucléotides, de préférence un extrait de levure, ladite composition étant dépourvue de gluten. Elle concerne également l'utilisation de 5'-PDE extraite à partir de malt de sorgho pour enrichir en 5'-nucléotides une composition contenant de l'ARN. Elle concerne donc une méthode de préparation d'une composition riche en 5'-nucléotides dépourvue de
20 gluten, de préférence un extrait de levure, comprenant le traitement de cellules microbiennes de façon à libérer l'ARN dans le milieu extra-cellulaire, et le traitement de la suspension obtenue par une préparation de 5'-PDE de sorgho pour convertir l'ARN libéré en 5'-nucléotides. Des exemples d'autres micro-organismes pouvant être utilisés dans ce procédé sont par exemple un champignon filamenteux de type
25 *Aspergillus* ou *Trichoderma* ou une bactérie, préférentiellement une bactérie lactique du genre *Lactobacillus*. La méthode peut comprendre une étape intermédiaire de purification totale ou partielle de l'ARN (voir JP 51106791).

Dans un mode de réalisation préféré, elle comprend le traitement d'un extrait de levure ou d'une suspension de levure avec une préparation de 5'-PDE de sorgho.

- 30 La présente invention concerne donc plus particulièrement une méthode de préparation d'un extrait de levure riche en 5'-nucléotides et dépourvu de gluten, comprenant :

- le chauffage d'une suspension de levure ;
- le traitement de la suspension de levure par une 5'-phosphodiesterase ;
- la séparation des matières insolubles de la suspension ; et
- la récupération de l'extrait de levure ;

5 caractérisée en ce que la 5'-phosphodiesterase est extraite à partir de sorgho, en particulier de sorgho malté, plus particulièrement de radicules de sorgho malté.

La levure utile dans la présente invention est une levure comestible. Selon l'invention, la levure utilisée pour préparer l'extrait appartient de préférence au genre *Saccharomyces* et encore de préférence appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, y compris celle appelée *Saccharomyces carlsbergensis*. Lesdites cellules de levures *Saccharomyces cerevisiae* sont également appelées souvent *Saccharomyces carlsbergensis* quand il s'agit de levure de bière, l'appellation taxonomique exacte étant *Saccharomyces cerevisiae* selon « THE YEASTS, a taxonomic study », 3^{ème} édition, édité par N.J.W. Kreger van Rij – 1984 (par contre selon la 4^{ème} édition de cet ouvrage de 1998, *Saccharomyces carlsbergensis* a deux synonymes *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces pastorianus*, c'est la 3^{ème} édition de cet ouvrage datant de 1984 qui est prise comme référence dans le présent document). Par ailleurs, la levure peut également provenir du genre *Candida* (par exemple, *C. utilis*), *Pichia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* (par exemple *K. lactis*, *K. marxianus* ou *K. fragilis*), *Torula*, *Fusarium*, *Zymonomas* et similaires. La levure peut provenir d'une culture de levures fraîches ou de levures ayant été utilisées dans des procédés de brassage. Dans un mode de réalisation préféré, la levure est du genre *Saccharomyces*, du genre *Candida* ou du genre *Kluyveromyces*.

La levure sera choisie de sorte qu'elle présente une forte teneur en ARN. Dans un mode de réalisation particulier, la teneur en ARN est comprise entre 6 et 15 % en poids sec.

La levure peut avoir subi un traitement préalable permettant d'augmenter sa teneur en ARN. De tels traitements sont décrits dans US 3,909,352 et JP 11-196856 par mutation et sélection des levures et dans JP 5-176757 en limitant le sulfate de potassium dans le milieu de culture.

La teneur en ARN de la suspension de levure peut être augmentée par ajout d'ARN issu d'un micro-organisme autorisé en alimentation humaine ou animale. Des

exemples de tels micro-organismes sont par exemple un champignon filamenteux de type *Aspergillus* ou *Trichoderma* ou une bactérie, préférentiellement une bactérie lactique du genre *Lactobacillus*. Dans ce cas, le micro-organisme est traité de manière à libérer son contenu en ARN. Dans un mode de réalisation particulier, l'ARN peut être totalement ou partiellement purifié par les méthodes connues (Ultrafiltration, chromatographie, ou précipitation).

Les procédés de préparation d'un extrait de levure sont bien connus de l'homme du métier. De tels procédés sont par exemple décrits dans les brevets suivants : EP 249 435 ; EP 299 078 ; EP 354 610 ; EP 466 922 ; EP 1 199 353 ; EP 1 479 299 ; US 3,961,080 ; US 4,303,680 ; US 4,810,509. Ces procédés comprennent d'une manière générale une étape de chauffage d'une suspension de levure, éventuellement une étape d'autolyse et/ou d'hydrolyse de la levure, et, de préférence, une étape de séparation des matières insolubles de la suspension. La suspension de levure est une suspension de levures vivantes.

De préférence, la suspension de levure est plasmolysée de manière à inactiver les enzymes de la levure, dont les phosphatases et nucléases, à perméabiliser la levure pour qu'elle libère son contenu cellulaire et son ARN, et, de préférence, à solubiliser sélectivement l'ARN dans le milieu extra-cellulaire, ce qui permet au final d'obtenir des titres en 5'-nucléotides supérieurs au contenu en ARN de la suspension de levure. De préférence, la suspension de levure comprend entre 10 à 25 % de matière sèche. Dans un mode de réalisation préféré, la suspension de levure est chauffée pendant 5 min à 3 h à une température allant de 5 à 95°C. En particulier, la suspension peut être chauffée pendant 2 h à 75°C puis refroidie à 60°C.

On peut également utiliser d'autres techniques bien connues de l'homme du métier pour libérer le contenu cellulaire de la levure, par exemple par un traitement mécanique (presse de French, billes de verre, champ électromagnétique pulsé, etc...), par traitement chimique (acides, bases, sels, solvants, détergents, etc...) ou par traitement enzymatique (β -glucanases, chitinases, protéases, ...).

Par ailleurs, la méthode peut également comprendre une étape de digestion enzymatique, les enzymes pouvant être choisies parmi les protéases, les β -glucanases, des amylases, les lipases, etc...

Ainsi, la présente invention concerne une méthode de préparation d'un extrait de levure riche en 5'-nucléotide, comprenant :

- a) le chauffage d'une suspension de levure ;
- b) l'autolyse et/ou l'hydrolyse enzymatique de la levure ;
- 5 c) la séparation des matières insolubles de la suspension ; et
- d) la récupération de l'extrait de levure ;

caractérisée en ce que la méthode comprend le traitement de la suspension de levure par une 5'-phosphodiesterase extraite à partir de malt de sorgho.

L'étape b est de préférence effectuée en utilisant des enzymes exogènes à la
10 levure, en particulier des protéases pour augmenter la dégradation des protéines de levure. Des exemples de telles protéases sont les protéases végétales (papaïne, bromélaïne, ...) ou microbiennes (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, ...).

La méthode peut comprendre une étape de purification totale ou partielle de l'ARN avant l'étape de traitement par la 5'-phosphodiesterase de sorgho.

15 Dans un mode de réalisation préféré, l'étape de traitement de la suspension de levure avec la 5'-PDE de sorgho est de préférence réalisée à un pH compris entre 5,0 et 7,5 avec une température comprise entre 35 et 70°C. Le temps d'incubation de la suspension de levure avec la 5'-PDE de sorgho peut varier de 5 à 30 h. De préférence, la préparation de 5'-PDE de sorgho est ajoutée à la suspension de levure
20 à raison de 10 % P/P. Par exemple, l'étape de traitement de la suspension de levure avec la 5'-PDE de sorgho peut être faite à 60°C pendant 18 h à un pH de 6,3.

De préférence, l'extrait de levure est riche en 5'-GMP et/ou 5'-IMP. Notamment, des taux de 5'-GMP et de 5'-IMP de 0,1 à 15 % chacun (exprimé sous forme de sel di sodé et hepta-hydraté) peuvent être atteints, de préférence 2 à 5 %.

25 L'extrait de levure obtenu est dépourvu de gluten.

La méthode peut en outre comprendre une étape de traitement de la suspension de levure avec une déaminase. Ce traitement peut être fait pendant ou après le traitement de la suspension de levure avec la PDE de sorgho. Dans un mode de réalisation préféré, cette étape de traitement par une déaminase est effectuée
30 simultanément ou après l'étape de traitement par la PDE de sorgho. Par exemple, la déaminase peut être ajoutée pendant les dernières heures du traitement à la 5'-PDE, après avoir refroidi la suspension, par exemple à 45°C. Cette étape permet de

transformer le 5'-AMP en 5'-IMP désiré. Cette étape additionnelle est bien connue de l'homme du métier et est décrite par exemple dans EP 249 435 et EP 354 610. Un exemple de déaminase commercialement disponible est la Déamizyme 50000G produite par Amano. Dans un mode de réalisation particulier, la méthode comprend
5 une étape de fermentation permettant de convertir les polysaccharides en acides organiques comme l'acide lactique ou succinique. Cette étape est bien connue de l'homme du métier et est par exemple décrite dans EP 191 513 et EP 354 610. Cette fermentation peut être effectuée de préférence à l'aide de bactéries du genre *Lactobacillus* ou équivalent.

10 De préférence, l'extrait de levure est ensuite séparé de la partie insoluble des cellules de levure. L'extrait de levure ainsi séparé de la partie insoluble offre l'avantage d'une meilleure conservation sans apparition de notes aromatiques dues à l'oxydation des lipides membranaires de la partie insoluble. Par exemple, cette étape peut être effectuée par une centrifugation ou filtration et une récupération de la
15 fraction liquide.

La fraction liquide peut ensuite subir tous les traitements en aval connus des extraits de levure, et notamment la concentration, la filtration, la pasteurisation et/ou le séchage.

Comme précédemment indiqué, les extraits de levure sont couramment
20 utilisés comme exhausteur de goût. Par « extrait de levure », on comprend selon l'invention, des concentrés de la fraction soluble des levures, généralement obtenus par autolyse ou hydrolyse.

L'extrait de levure riche en 5'-nucléotides peut se présenter sous différentes formes, telles que, par exemple, sous forme liquide, pâteuse ou solide. L'extrait de
25 levure comprend de matière avantageuse au moins 90% en masse, de préférence entre 94 et 98 % en masse, de matières sèches.

L'invention concerne donc les extraits de levure obtenus ou susceptibles d'être obtenus par le procédé selon la présente invention et leurs applications dans le domaine alimentaire. Ces extraits de levure sont dénués de gluten. Ils comprennent
30 de préférence des taux de 5'-GMP et de 5'-IMP de 0,1 à 15 % chacun (exprimé sous forme de sel di sodé et hepta-hydraté)

La présente invention concerne l'utilisation des extraits de levure selon la

présente invention dans une formule alimentaire, la formule alimentaire ainsi obtenue et le produit alimentaire de consommation obtenu à base de cette formule. La formule alimentaire peut, par exemple être une formule de bouillon, d'un potage, d'une sauce, d'un plat cuisiné, d'une pâte de boulangerie ou d'un condiment.

5 L'invention concerne aussi des agents de sapidité comportant un extrait de levure suivant la présente invention. L'agent de sapidité suivant la présente invention peut également comprendre des matières insolubles.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un agent de sapidité suivant la présente invention dans une formule alimentaire, la formule alimentaire ainsi obtenue
10 et le produit alimentaire de consommation obtenu à base de cette formule. La formule alimentaire peut, par exemple être une formule de bouillon, d'un potage, d'une sauce, d'un plat cuisiné, d'un produit de boulangerie ou d'un condiment.

Ainsi, l'invention concerne un procédé d'aromatisation de produits alimentaires, caractérisé en ce qu'on utilise un agent de sapidité selon la présente
15 invention.

Les exemples ci-après sont fournis pour illustrer l'invention et ne doivent en aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

EXEMPLE 1

20 Préparation de l'extrait de radicules de sorgho

Les radicules utilisées sont issues d'une malterie de sorgho africaine.

13g de radicules de sorgho sont broyés ou moulus, de façon à obtenir une poudre possédant une granulométrie moyenne de 500 µm.

Cette poudre est mise en décoction à 13% (P/P), dans une solution aqueuse d'acétate
25 de zinc à 0,2g/l, à une température de 60°C, pendant 2 heures.

L'extrait de radicules de sorgho est obtenu après extraction des matières solides et insolubles de la décoction par deux étapes de séparation centrifuge.

EXEMPLE 2**Préparation d'un extrait de levure riche en 5'-nucléotides –
Comparaison entre la 5'-PDE issue du sorgho et l'enzyme commerciale**

- 5 1000 g de crème de levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* ayant une
matière sèche de 15% et une teneur en ARN de 9,5% (mesurée par hydrolyse selon la
méthode de Trevelyan telle que décrite dans : Induction of Autolytic Breakdown of
RNA in Yeast by Addition of Ethanol and by Drying/Rehydration ; Trevelyan, J.,
Sci. Food Agric., 1977, 28, 579-588; et dans Processing Yeast to Reduce its Nucleic
10 Acid Content. Induction of Intracellular RNase Action by a Simple Heat-shock
Procedure, and an Efficient Chemical Method Based on Extraction of RNA by Salt
Solutions at low pH; Trevelyan, J., Soc. Chem. Ind., 1978, pp141-174) est traitée
thermiquement à 75°C pendant 2 heures, puis refroidie à 56°C et ajustée à un pH de
5,3 (plasmolyse).
- 15 Cette crème est mélangée avec le surnageant de la décoction de racines de
sorgho contenant la 5'-PDE (10% P/P). L'ensemble est laissé à incuber sous
agitation lente pendant 15 h à 56 °C, de façon à hydrolyser l'ARN en 5'-nucléotides.
Les solides sont ensuite séparés par centrifugation et subissent un lavage à l'eau
deminéralisée avant d'être de nouveau centrifugés. Les deux surnageants sont
20 regroupés, concentrés et séchés par atomisation. L'analyse de la poudre montre une
teneur de 5'-GMP de 2,44 % (exprimé sous forme de sel di sodé et hepta-hydraté).
Le dosage est réalisé par RP-HPLC, tel que décrit dans : Enzymatic Production of
Ribonucleotides from Autolysates of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey ;
Belem, M.A.F., *et al.*, Journal of Food Science, 62, pp 851-854.
- 25 1 kg de la même crème plasmolysée dans des conditions identiques et mise à
incuber pendant 15 h avec 1 g de 5'-PDE commerciale d'Amano (nom commercial =
PDE RP-1, Amano Enzyme Europe, Ltd) conduit après séparation, concentration et
séchage à une poudre titrant 2,60 % de 5'-GMP. L'efficacité d'hydrolyse est donc
similaire dans les deux cas, et la 5'-PDE issue du sorgho est aussi efficace en terme
30 d'hydrolyse de l'ARN que l'enzyme commerciale beaucoup plus chère.

EXEMPLE 3

Le procédé est mis en œuvre à partir de 13 g de radiceles de sorgho malté et 1000 g de crème de levure comme décrit dans les exemples précédents. Cependant, après 15 h d'incubation, la température est diminuée à 45°C et 0,1 g de 5'-adénylic déaminase d'Amano (nom commercial = Déamizyme 50000G, Amano Enzyme Europe, Ltd) sont ajoutés. L'ensemble est incubé pendant 5 h pour permettre la conversion de 5'-AMP en 5'-IMP par la 5'-adénylic déaminase. Les solides sont ensuite séparés par centrifugation et subissent un lavage à l'eau déminéralisée avant d'être de nouveau centrifugés. Les deux surnageants sont regroupés, concentrés et séchés par atomisation. L'analyse de la poudre montre une teneur de 5'-GMP de 2,80 % et une teneur de 5'-IMP de 3,21 % (dosage par RP-HPLC, tous deux exprimés sous forme de sel di sodé et hepta-hydraté).

EXEMPLE 4

Le procédé est mis en œuvre à partir de 13 g de radiceles de sorgho malté et 1000 g de crème de levure comme décrit dans les exemples précédents. Cependant, avant ajout de la 5'-PDE de malt de sorgho, 0,5 g de papaine sont ajoutés afin d'augmenter la solubilisation de la matière sèche de la levure. La suite du procédé est identique, y compris comme dans l'exemple 3, l'addition de 5'-adénylic déaminase. L'analyse de la poudre résultante montre une teneur de 5'-GMP de 1,96 % et une teneur de 5'-IMP de 2,07 % (dosage par RP-HPLC, tous deux exprimés sous forme de sel di sodé et hepta-hydraté).

EXEMPLE 5

Le procédé est mis en œuvre comme dans les exemples 1 et 2, sauf que la crème de levure *Saccharomyces cerevisiae* est remplacée par une crème de *Candida utilis* de matière sèche 13 % et titrant 12,5 % d'ARN. L'analyse de la poudre résultante montre une teneur de 5'-GMP de 3,75 % et une teneur de 5'-IMP de 3,98 % (tous deux exprimés sous forme de sel di sodé et hepta-hydraté).

REVENDICATIONS

1- Procédé de préparation d'un extrait de levure riche en 5'-nucléotides et dépourvu de gluten, comprenant :

- 5 a) le chauffage d'une suspension de levures ;
 b) le traitement de la suspension de levure par une 5'-phosphodiesterase ;
 c) la séparation des matières insolubles de la suspension ; et
 d) la récupération de l'extrait de levure ;

10 caractérisé en ce que la 5'-phosphodiesterase est extraite à partir de radicules de malt de sorgho.

2- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la 5'-phosphodiesterase extraite à partir de radicules de malt de sorgho est préparée par décoction d'une poudre de radicules de sorgho en suspension dans une solution
15 aqueuse d'acétate de zinc (0,2 à 5 g/l) à une température comprise entre 50 et 80 °C pendant 30 min à 4 h et par élimination de la fraction insoluble.

3- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la granulométrie de la poudre est comprise entre 20 et 2000 µm, de préférence entre 100 et 200 µm.

20

4- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1-3, caractérisé en ce que l'étape de traitement de la suspension de levure avec la 5'-phosphodiesterase de sorgho est réalisée à un pH compris entre 5,0 et 7,5 avec une température comprise entre 35 et 70°C et pendant 5 à 30 h.

25

5- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1-4, caractérisé en ce que le procédé comprend en outre une étape de digestion enzymatique de la suspension de levure après l'étape de chauffage.

30 6- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1-5, caractérisé en ce que le procédé comprend en outre une étape de purification totale ou partielle de l'ARN avant l'étape de traitement par la 5'-phosphodiesterase de sorgho.

7- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1-6, caractérisé en ce que le procédé comprend en outre une étape de traitement par une déaminase.

5 8- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1-7, caractérisé en ce que la teneur en ARN de la levure est comprise entre 6 et 15 % sur poids sec.

9- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1-8, caractérisé en ce que la levure est du genre *Saccharomyces*, du genre *Candida* ou du genre
10 *Kluyveromyces*.

10- Extrait de levure riche en 5'-nucléotides susceptible d'être obtenu par le procédé selon les revendications 1-9 et dépourvu de gluten.

15 11- Agent de sapidité comprenant un extrait de levure riche en 5'-nucléotides selon la revendication 10 ou susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1-9.

12- Procédé d'aromatisation de produits alimentaires, caractérisé en ce qu'on
20 utilise un agent de sapidité selon la revendication 11.

13- Produit alimentaire comprenant un agent de sapidité selon la revendication 11.

25 14 - Utilisation d'une 5'-phosphodiesterase extraite à partir de malt de sorgho pour la préparation d'une composition riche en 5'-nucléotides.