

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

11 N° de publication :

2 951 461

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

21 N° d'enregistrement national :

09 57274

51 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 P 7/64 (2006.01), C 12 P 21/00, 19/00, C 11 B 1/  
10, 13/00, C 07 H 1/08, C 07 K 1/12, A 23 D 9/02

12

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 16.10.09.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 22.04.11 Bulletin 11/16.

56 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

71 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL POLYTECHNI-  
QUE DE LORRAINE INPL Etablissement public à  
caractère scientifique et culturel — FR.

72 Inventeur(s) : MUNIGLIA LIONEL, GIRARDIN  
MICHEL, PIFFAUT BERNADETTE et RICOCHON  
GUILLAUME.

73 Titulaire(s) : INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE  
DE LORRAINE INPL Etablissement public à caractère  
scientifique et culturel.

74 Mandataire(s) : BLOCH & BONNETAT.

54 PROCÉDE D'EXTRACTION ENZYMATIQUE EN MILIEU AQUEUX D'HUILES ET DE PROTEINES A PARTIR DE  
MATIERE VEGETALE.

57 L'invention concerne un procédé d'extraction enzyma-  
tique en milieu aqueux d'huiles, de protéines et de sucres  
fermentescibles à partir de matière végétale, comprenant  
les étapes suivantes:

a) addition d'eau à de la matière végétale présentant  
une taille de particule appropriée,

b) addition d'un mélange enzymatique contenant au  
moins une cellulase, au moins une hémicellulase et au  
moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectina-  
se et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0,14, de pré-  
férence compris entre 0,35 et 0,45, et le rapport entre  
l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant  
d'au moins  $7 \cdot 10^{-3}$ , de préférence compris entre  $1 \cdot 10^{-2}$  et  
 $2 \cdot 10^{-2}$ ,

c) incubation sous agitation de la matière végétale et du  
mélange enzymatique pour libérer dans le milieu réaction-  
nel des huiles, des protéines et des sucres fermentescibles,  
pendant une durée dépendant des rendements recherchés,

d) séparation du milieu réactionnel pour obtenir de l'huile  
libre, une phase aqueuse contenant des protéines et des  
sucres fermentescibles, et une phase solide,

e) éventuellement séparation d'une émulsion de l'huile  
libre ou de la phase aqueuse, et recyclage de l'émulsion

dans le milieu réactionnel,

f) séparation des protéines et des sucres fermentesci-  
bles de la phase aqueuse.

FR 2 951 461 - A1



La présente invention concerne un procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles, de protéines, et de sucres fermentescibles à partir de matière végétale.

5 Les procédés traditionnels d'extraction d'huiles font intervenir des solvants organiques, comme l'hexane. L'utilisation de ces solvants entraîne de nombreux problèmes de sécurité des installations et des personnels, de santé humaine et de préservation de l'environnement. On recherche en effet à réduire les émissions de composés organiques volatiles (COV).

10 Depuis une trentaine d'années, plusieurs équipes de recherche dans le monde travaillent à la mise au point de procédés « propres » pour l'extraction de graines d'oléagineux. Ces procédés sont fondés sur une extraction des huiles par voie aqueuse associant enzymes et catalyseurs biologiques. Ces procédés, bien que se voulant  
15 écologiques, prévoient d'utiliser malgré tout un solvant ou prévoient une étape de correction du pH par des composés alcalins ou acides. Ces procédés n'ont pas été validés à l'échelle industrielle car les catalyseurs utilisés ne permettaient pas de bons rendements à une telle échelle.

La présente invention a pour but de proposer un nouveau procédé  
20 d'extraction d'huiles à partir d'une matière végétale, exempt des inconvénients énumérés ci-dessus. Plus particulièrement, la présente invention a pour but de proposer un procédé d'extraction des huiles végétales permettant de supprimer l'emploi de tous les solvants organiques et d'obtenir un procédé propre permettant d'extraire des  
25 huiles, des protéines et d'autres co-produits de hautes qualités nutritionnelles.

La présente invention a également pour but de proposer un procédé pouvant être mis en œuvre au niveau industriel avec des rendements intéressants.

30 La présente invention a également pour but de proposer un procédé permettant d'utiliser tous les produits extraits issus du procédé.

A cet effet, la présente invention concerne un procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles, de protéines et de sucres fermentescibles à partir de matière végétale, comprenant les étapes suivantes :

- 5 a) addition d'eau à de la matière végétale présentant une taille de particule appropriée,
- b) addition d'un mélange enzymatique contenant au moins une cellulase, au moins une hémicellulase et au moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0,14, de préférence compris entre 0,35 et 0,45, et le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant d'au moins  $7 \cdot 10^{-3}$ ; de préférence compris entre  $1 \cdot 10^{-2}$  et  $2 \cdot 10^{-2}$ ,
- 10 c) incubation sous agitation de la matière végétale et du mélange enzymatique pour libérer dans le milieu réactionnel des huiles, des protéines et des sucres fermentescibles, pendant une durée dépendant des rendements recherchés,
- 15 d) séparation du milieu réactionnel pour obtenir de l'huile libre, une phase aqueuse contenant des protéines et des sucres fermentescibles, et une phase solide,
- 20 e) éventuellement séparation d'une émulsion de l'huile libre ou de la phase aqueuse, et recyclage de l'émulsion dans le milieu réactionnel,
- f) séparation des protéines et des sucres fermentescibles de la phase aqueuse.

25

La présente invention concerne également l'utilisation, dans un procédé tel que défini ci-dessus, d'un mélange enzymatique tel que défini ci-dessus, pour supprimer toute étape de correction du pH dans ledit procédé.

30

Selon l'invention, le procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles, de protéines et de sucres fermentescibles à partir de matière végétale, comprend les étapes suivantes :

- 5 a) addition d'eau à de la matière végétale présentant une taille de particule appropriée,
- b) addition d'un mélange enzymatique contenant au moins une cellulase, au moins une hémicellulase et au moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0,14, et le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant d'au moins  $7 \cdot 10^{-3}$ ,
- 10 c) incubation sous agitation de la matière végétale et du mélange enzymatique pour libérer dans le milieu réactionnel des huiles, des protéines et des sucres fermentescibles, pendant une durée dépendant des rendements recherchés,
- d) séparation du milieu réactionnel pour obtenir de l'huile libre, une phase aqueuse contenant des protéines et des sucres fermentescibles, et une phase solide,
- 15 e) éventuellement séparation d'une émulsion de l'huile libre ou de la phase aqueuse, et recyclage de l'émulsion dans le milieu réactionnel,
- f) séparation des protéines et/ou des sucres fermentescibles de la phase aqueuse, en fonction des produits que l'on souhaite récupérer.
- 20

En ce qui concerne l'étape a), la taille de particule appropriée de la matière végétale est avantageusement obtenue par broyage de ladite matière végétale. Le broyage doit être le plus fin possible pour favoriser l'action des enzymes. Idéalement, toutes les particules doivent avoir une taille proche de 50  $\mu\text{m}$ , de préférence proche de 10  $\mu\text{m}$ .

25

Avantageusement, le volume d'eau est minimisé de façon à réduire les effluents à traiter et concentrer les produits extraits. De préférence, la masse d'eau ajoutée à la matière végétale est égale à 1 à 2 fois la masse de ladite matière végétale et ne dépasse pas cette quantité.

30 De préférence, le procédé selon l'invention comprend en outre, après l'étape a), une étape de désactivation des enzymes endogènes du mélange eau/matière végétale. Cette désactivation se fait de préférence

par la chaleur. Le mélange eau/matière végétale est chauffé à une température comprise entre 80°C et 105°C pendant 5 à 20 min. La température est ensuite ramenée à la température utilisée pour l'étape b).

5 En ce qui concerne l'étape b), le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase est de préférence compris entre 0,35 et 0,45, et le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase est de préférence compris entre  $1 \cdot 10^{-2}$  et  $2 \cdot 10^{-2}$ .

10 Plus particulièrement, le mélange enzymatique utilisé contient les activités enzymatiques dans les proportions suivantes :

- cellulases :

- betaglucosidase : entre 1 et 30  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 4,5 et 13  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,

15 - endocellulase : entre 20 et 200  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 27 et 120  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,

- exocellulase : entre 0 et 50  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 9 et 25,5  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,

- hemicellulases :

20 - arabinanase : entre 300 et 2000  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 465 et 1335  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,

- xylanase : entre 0 et 2000  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 300 et 1700  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,

- galactanase : entre 300 et 2000  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 750 et 1000  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,

25 - pectinases :

- endopolygalacturonase : entre 40 et 120  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 61 et 86  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,

- pectine méthylestérase : entre 1 et 20  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 1 et 5  $\mu\text{mol/min/ml}$ .

30 Ces enzymes sont disponibles dans le commerce.

Dans le cas particulier où la matière végétale est le colza, le mélange enzymatique utilisé peut contenir les activités enzymatiques dans les proportions suivantes :

- cellulases :
  - 5                   - betaglucosidase : entre 3 et 6  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - endocellulase : entre 110 et 130  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - exocellulase : entre 20 et 30  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
- hemicellulases :
  - 10               - arabinanase : entre 1200 et 1500  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - xylanase : entre 1500 et 2000  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - galactanase : entre 800 et 1200  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
- pectinases :
  - endopolygalacturonase : entre 50 et 70  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - pectine méthylestérase : entre 1 et 20  $\mu\text{mol/min/ml}$ .

15           Dans le cas particulier où la matière végétale est le tournesol, le mélange enzymatique utilisé peut contenir les activités enzymatiques dans les proportions suivantes :

- cellulases :
  - 20               - betaglucosidase : entre 11 et 14  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - endocellulase : entre 25 et 35  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - exocellulase : entre 8 et 12  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
- hemicellulases :
  - 25               - arabinanase : entre 450 et 550  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - xylanase : entre 0 et 300  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - galactanase : entre 700 et 900  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
- pectinases :
  - endopolygalacturonase : entre 75 et 95  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - pectine méthylestérase : entre 1 et 5  $\mu\text{mol/min/ml}$ .

30           De préférence, la quantité utilisée du mélange enzymatique tel que défini ci-dessus est comprise entre 0,25% et 10%, de préférence entre 1% et 6%, en volume du mélange eau/matière végétale.

- De plus, le mélange enzymatique peut également comprendre une phénolate estérase, de préférence une férulate estérase, dont l'activité est comprise entre 1 et 15  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , de préférence comprise entre 4,5 et 7,5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , et de préférence comprise entre 7.5 et 15  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  dans le cas particulier du colza et entre 4 et 6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  dans le cas particulier du tournesol.
- Avantageusement, l'incubation selon l'étape c) est réalisée pendant 4 à 20 heures, de préférence entre 4 et 12 heures, à une température comprise entre 25°C et 75°C, de préférence entre 40°C et 60°C, et de préférence autour de 50°C.
- D'une manière avantageuse, aucune étape de correction du pH n'est prévue, en particulier lorsque la matière végétale traitée est du colza ou du tournesol.
- Le pH du milieu réactionnel doit être compris entre 5,5 et 4,5, et de préférence compris entre 4,8 et 5.
- Cependant, il peut être nécessaire dans certains cas de corriger le pH pour correspondre au pH optimum des enzymes. Dans ce cas, on peut utiliser des acides tels que l'acide acétique (E 260) ou l'acide citrique (E 330).
- L'agitation prévue à l'étape c) est réalisée de préférence au moyen d'un mélangeur comprenant des pales plates favorisant le mélange et limitant le cisaillement. L'agitation doit être suffisante pour assurer le transfert de chaleur mais minimisée pour éviter l'apparition d'émulsion.
- La durée d'incubation est adaptée en fonction de la quantité des produits extraits souhaitée. En effet, du temps d'hydrolyse va dépendre la libération en huiles, en sucres et en protéines. La majorité des protéines se solubilise très rapidement, par exemple en moins d'une heure. Le rendement en huiles se stabilise entre 4 et 6 heures, puis il continue de progresser plus lentement. Les concentrations en sucres fermentescibles augmentent régulièrement jusqu'à 12 heures, et au-delà.

La réaction d'hydrolyse est ensuite stoppée par désactivation des enzymes par chauffage de préférence entre 80°C et 105°C pendant par exemple 5 à 20 minutes.

5 Puis le milieu réactionnel est séparé, selon l'étape d), en utilisant toutes les techniques de séparation connues adaptées, telle que la centrifugation ou la décantation. Idéalement cette séparation s'effectue sous 3000 g pendant 5 minutes à 80°C.

10 D'une manière avantageuse, la séparation des produits extraits est réalisée au moyen d'un tricanteur. Un tel appareil est un décanteur centrifuge horizontal pour la séparation continue du milieu réactionnel en trois phases : l'huile libre, une phase aqueuse contenant une partie des protéines et des sucres fermentescibles, et une phase solide constituée par des tourteaux partiellement déshuilés. Le tricanteur permet le recyclage des matières et la gestion de temps d'hydrolyse  
15 différents en fonction des produits que l'on souhaite récupérer.

En fonction de la matière végétale dont on veut extraire les huiles, de l'émulsion peut se former dans la phase huileuse ou dans la phase aqueuse.

20 Le mélange enzymatique utilisé dans l'invention permet de limiter la quantité d'émulsion, en particulier pour le tournesol.

Lorsqu'il se forme de l'émulsion, celle-ci est séparée de la phase avec laquelle elle a été recueillie par exemple au moyen d'un décanteur. L'émulsion peut être recyclée et réinjectée dans le tricanteur afin de subir une nouvelle hydrolyse pour libérer les huiles qu'elle renferme.

25 Dans le tableau I ci-dessous sont indiquées les quantités de produits obtenus à partir de 10 kg de graines (à 50% d'huile) mélangées à 10 kg d'eau, traités selon le procédé de l'invention:

30

Tableau I

| Produits                        | Quantité à partir de 10 kg de graines et 10 kg d'eau |
|---------------------------------|------------------------------------------------------|
| Huile                           | 4 à 4,7 kg                                           |
| Phase aqueuse et l'émulsion     | 11 à 15 kg                                           |
| Dont sucres                     | 60 à 100 g/l de phase aqueuse                        |
| Dont protéines                  | 25 à 35 g/l de phase aqueuse                         |
| Tourteaux (le reste de graines) | 2-4 kg                                               |

- 5 L'huile libre récupérée est immédiatement stockée sous azote en attendant son raffinage si nécessaire. Elle contient une grande proportion de tocophérols. Ces antioxydants recherchés sont classiquement entraînés lors de l'étape de désodorisation. Leur présence en grand nombre dans les huiles extraites selon le procédé de l'invention, fait qu'ils sont en partie préservés lors de l'étape de désodorisation.
- 10 Les tourteaux sont séchés et stockés ou recyclés pour subir une seconde hydrolyse. Ils peuvent être utilisés pour l'alimentation animale. Les sucres fermentescibles et les protéines contenus dans la phase aqueuse sont séparés par tout moyen le permettant, notamment par des techniques de filtrations (nano-ultrafiltration), ou par des techniques de précipitation.
- 15 Les sucres fermentescibles de la phase aqueuse subissent une fermentation par des micro-organismes (bactéries, levures, champignons) adaptés tels que *Saccharomyces cerevisiae*, pour produire de l'éthanol, que l'on peut utiliser comme biocarburant.
- 20 Les protéines sont extraites de manière importante, les rendements d'extraction étant environ 10 fois supérieurs aux procédés traditionnels d'extraction. Les protéines sont de très bonnes qualités, très peu dénaturées.
- 25 Ainsi, tous les produits extraits peuvent être valorisés.

De préférence, le procédé selon l'invention est mis en œuvre avec de la matière végétale choisie parmi le groupe comprenant les tourteaux gras issus de la première pression et les graines d'oléagineux.

5 Les oléagineux sont choisis de préférence parmi le groupe comprenant le colza et le tournesol. Le procédé selon l'invention peut aussi être appliqué à des fruits oléagineux, tels que les olives.

Les exemples suivants illustrent la présente invention sans toutefois en limiter la portée.

## 10 Exemples

### Exemples 1 à 5

750 grammes de graines de tournesol sont broyées dans un broyeur à couteau pendant 1min30 (3 fois 30 secondes). Le volume d'eau distillé  
15 nécessaire est ajouté au broyat, mélangé et mis à bouillir dans un four à micro-ondes afin de désactiver les enzymes endogènes. Le chauffage est arrêté lorsque l'ébullition commence. Parallèlement, le mélange enzymatique est réalisé dans un bécher. Afin d'éviter un choc thermique, les enzymes étant stockées à 4°C, le bécher est plongé  
20 dans un bain-marie à température ambiante. Le bain-marie est alors mis en marche avec une température de consigne de 50°C pour que les enzymes subissent une montée en température graduelle. Les graines broyées sont versées dans un fermenteur de 2L et la régulation de température et l'agitation sont mises en marche. Lorsque le milieu  
25 atteint 50°C, le mélange enzymatique est ajouté et la réaction d'hydrolyse débute. Le pH est proche du pH optimum des enzymes et ne nécessite pas de correction. Au bout de 4 heures, le milieu réactionnel est séparé au moyen d'une centrifugeuse à 9000g pendant 15 min à 20°C. On récupère les différentes phases.

30 Pour les exemples 1, 3 et 4, l'émulsion séparée de la phase aqueuse n'est pas recyclée.

Pour l'exemple 2, l'émulsion séparée de la phase aqueuse est recyclée.

On mesure le pourcentage massique d'huile contenue dans chaque fraction extraite (huile libre, phase aqueuse + émulsion, phase solide) par rapport à la totalité des huiles recueillies dans les trois fractions (huile libre / phase aqueuse + émulsion / phase solide), sans recyclage de l'émulsion et avec recyclage de l'émulsion.

5

A titre d'exemple comparatif, un lot de graines est traité de la même manière mais sans enzyme (Exemple 5 comparatif).

Les résultats sont indiqués dans le tableau II suivant :

10

15

20

25

Tableau II

|                                     | Ex. 1<br>(inv.) | Ex. 2<br>(inv.) | Ex. 3<br>(inv.) | Ex. 4<br>(inv.) | Ex.5<br>(comp.) |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Temps (h)                           | 4               | 4 +<br>recycl.  | 12              | 4               | 4               |
| Température (°C)                    | 50              | 50              | 50              | 50              | 50              |
| Agitation (rpm)                     | 340             | 340             | 340             | 340             | 450             |
| pH                                  | 5,2             | 5,1             | 4,9             | 5,1             | 5,5             |
| Rapport graines/eau                 | 0,9             | 0,9             | 0,9             | 0,9             | 0,9             |
| Rapport enzyme/graine               | 0,05            | 0,05            | 0,05            | 0,05            | 0               |
| betaglucosidase <sup>a</sup>        | 12,7            | 12,7            | 12,7            | 20,2            | 0               |
| endocellulase <sup>a</sup>          | 27,1            | 27,1            | 27,1            | 10,3            | 0               |
| exocellulase <sup>a</sup>           | 9,4             | 9,4             | 9,4             | 0,7             | 0               |
| arabinanase <sup>a</sup>            | 468,6           | 468,6           | 468,6           | 3,4             | 0               |
| xylanase <sup>a</sup>               | 8,4             | 8,4             | 8,4             | 0               | 0               |
| Galactanase <sup>a</sup>            | 775,8           | 775,8           | 775,8           | 153             | 0               |
| endopolygalacturonase <sup>a</sup>  | 85,1            | 85,1            | 85,1            | 76,9            | 0               |
| pectine méthylestérase <sup>a</sup> | 1,8             | 1,8             | 1,8             | 1,7             | 0               |
| Férulate estérase <sup>a</sup>      | 3,8             | 3,8             | 3,8             | 4,2             | 0               |
| Masse d'huile libre (g)             | 270,3           | 335,7           | 329,4           | 278,7           | 127,9           |
| Masse huile émulsion (g)            | 26,3            | 14,6            | 33,3            | 56,3            | 26,7            |
| Masse huile phase solide (g)        | 56,5            | 32,18           | 35,6            | 72,7            | 197,0           |
| Masse totale huile (g)              | 353,1           | 383,2           | 398,3           | 407,8           | 351,6           |
| Masse huile libre (%)               | 76,5            | 87,6            | 82,7            | 68,5            | 36,4            |
| Masse huile émulsion (%)            | 7,5             | 3,8             | 8,4             | 13,2            | 7,6             |
| Masse huile phase solide (%)        | 16,0            | 8,4             | 9,0             | 17,3            | 56,0            |

<sup>a</sup> activité en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$

- 5 Le procédé selon l'invention permet d'obtenir des résultats proches de ceux obtenus par les industries traditionnelles utilisant des solvants.

L'émulsion obtenue contient très peu d'huile. A titre comparatif, il reste généralement 4-5% d'huile dans l'émulsion dans les procédés traditionnels avec solvant, et il reste 10-15% d'huile dans l'émulsion dans les procédés connus sans solvant, selon les graines.

- 5 Les concentrations en sucres varient de 40 à 90 g/l de phase aqueuse, pour un temps d'hydrolyse de 4 à 12 heures.

#### Exemples 6 à 10

- 10 Les Exemples 6 à 10 sont traités de la même manière que les exemples ci-dessus mais sur des graines de colza et sans recyclage de l'émulsion séparée de la phase aqueuse.

Pour les exemples 6 et 7, la durée d'hydrolyse est de 15 heures.

L'exemple 6 est exempt d'activité férulate estérase.

- 15 A titre d'exemple comparatif, un lot de graines est traité de la même manière mais sans enzyme. (Exemple 10 comparatif)

Les résultats sont indiqués dans le tableau III suivant :

20

25

30

Tableau III

|                                     | Ex. 6<br>(inv.) | Ex. 7<br>(inv.) | Ex. 8<br>(inv.) | Ex. 9<br>(inv.) | Ex. 10<br>(comp.) |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Temps (h)                           | 15              | 15              | 4               | 4               | 4                 |
| Température (°C)                    | 50              | 50              | 50              | 50              | 50                |
| Agitation                           | 300             | 300             | 300             | 300             | 450               |
| pH                                  | 5,0             | 4,9             | 5,0             | 4,9             | 5,2               |
| Rapport graines/eau                 | 0,67            | 0,67            | 0,67            | 0,67            | 0,67              |
| Rapport enzyme/graine               | 0,05            | 0,05            | 0,05            | 0,05            | 0                 |
| betaglucosidase <sup>a</sup>        | 8               | 8               | 8               | 4,7             | 0                 |
| endocellulase <sup>a</sup>          | 14              | 14              | 14              | 119,8           | 0                 |
| exocellulase <sup>a</sup>           | 2               | 2               | 2               | 25,3            | 0                 |
| arabinanase <sup>a</sup>            | 10              | 10              | 10              | 1334,8          | 0                 |
| xylanase <sup>a</sup>               | 0               | 0               | 0               | 1713,9          | 0                 |
| Galactanase <sup>a</sup>            | 450             | 450             | 450             | 1000,8          | 0                 |
| endopolygalacturonase <sup>a</sup>  | 57,9            | 57,9            | 57,9            | 61,7            | 0                 |
| pectine méthylestérase <sup>a</sup> | 3,5             | 3,5             | 3,5             | 0,3             | 0                 |
| Férulate estérase <sup>a</sup>      | 0               | 27              | 27              | 6,5             | 0                 |
| Masse d'huile libre (g)             | 180,9           | 202,0           | 51,7            | 118,8           | 15,0              |
| Masse huile émulsion (g)            | 58,5            | 45,7            | 176,53          | 114,0           | 188,8             |
| Masse huile phase solide (g)        | 44,3            | 39,4            | 66,42           | 63,67           | 95,9              |
| Masse totale huile(g)               | 284             | 287,3           | 295,2           | 296,6           | 299,7             |
| Masse huile libre (%)               | 63,7            | 70,3            | 17,5            | 40,1            | 5                 |
| Masse huile émulsion (%)            | 20,6            | 15,9            | 59,8            | 38,4            | 63                |
| Masse huile phase solide (%)        | 15,6            | 13,7            | 22,5            | 21,5            | 32                |

<sup>a</sup> activité en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$

5

Ces expériences mettent en évidence le rôle de la férulate estérase.

L'exemple 9 d'une durée de 4 heures, montre le rôle du temps d'hydrolyse. Tout comme les exemples 7 et 8 réalisés avec le même mélange enzymatique mais avec une durée d'hydrolyse différente.

Les concentrations en sucres varient de 40 à 90 g/l de phase aqueuse, pour un temps d'hydrolyse de 4 à 12 heures.

Les concentrations en protéines sont de 30 à 35 g/l de phase aqueuse dès la première heure d'hydrolyse.

## Revendications

1. Procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles, de protéines et de sucres fermentescibles à partir de matière végétale, comprenant les  
5 étapes suivantes :
  - a) addition d'eau à de la matière végétale présentant une taille de particule appropriée,
  - b) addition d'un mélange enzymatique contenant au moins une  
10 cellulase, au moins une hémicellulase et au moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0,14, de préférence compris entre 0,35 et 0,45, et le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant d'au moins  $7 \cdot 10^{-3}$ , de préférence compris entre  $1 \cdot 10^{-2}$  et  $2 \cdot 10^{-2}$ ,
  - 15 c) incubation sous agitation de la matière végétale et du mélange enzymatique pour libérer dans le milieu réactionnel des huiles, des protéines et des sucres fermentescibles, pendant une durée dépendant des rendements recherchés,
  - d) séparation du milieu réactionnel pour obtenir de l'huile libre, une  
20 phase aqueuse contenant des protéines et des sucres fermentescibles, et une phase solide,
  - e) éventuellement séparation d'une émulsion de l'huile libre ou de la phase aqueuse, et recyclage de l'émulsion dans le milieu réactionnel,
  - 25 f) séparation des protéines et des sucres fermentescibles de la phase aqueuse.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la taille de particule appropriée de la matière végétale est obtenue par broyage de ladite matière végétale.
- 30 3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, dans lequel la masse d'eau ajoutée à la matière végétale est égale à 1 à 2 fois la masse de ladite matière végétale.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre, après l'étape a), une étape de désactivation des enzymes endogènes du mélange eau/matière végétale.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le mélange enzymatique contient les activités enzymatiques dans les proportions suivantes :
- cellulases :
    - betaglucosidase : entre 1 et 30  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , de préférence entre 4,5 et 13  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ,
    - 10 - endocellulase : entre 20 et 200  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , de préférence entre 27 et 120  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ,
    - exocellulase : entre 0 et 50  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , de préférence entre 9 et 25,5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ,
  - hemicellulases :
    - 15 - arabinanase : entre 300 et 2000  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , de préférence entre 465 et 1335  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ,
    - xylanase : entre 0 et 2000  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , de préférence entre 300 et 1700  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ,
    - galactanase : entre 300 et 2000  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , de préférence entre 750 et 1000  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ,
    - 20 - pectinases :
      - endopolygalacturonase : entre 40 et 120  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , de préférence entre 61 et 86  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ,
      - pectine méthylestérase : entre 1 et 20  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , de préférence entre 1 et 5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ .
      - 25
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le mélange enzymatique comprend en outre une phénolate estérase, de préférence une férulate estérase, dont l'activité est comprise entre 1 et 15  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , et de préférence entre 4,5 et 7,5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ .
- 30 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la quantité du mélange enzymatique est comprise entre 0,25% et

- 10% en volume du mélange eau/matière végétale, de préférence entre 1% et 6%.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'incubation selon l'étape c) est réalisée pendant 4 à 20 heures, à une température comprise entre 25°C et 75°C.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'agitation prévue à l'étape c) est réalisée au moyen d'un mélangeur comprenant des pales plates favorisant le mélange et limitant le cisaillement.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel aucune étape de correction du pH n'est prévue.
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'étape de séparation d) est réalisée au moyen d'un tricanteur.
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la matière végétale est choisie parmi le groupe comprenant les tourteaux gras issus de la première pression et les graines d'oléagineux.
13. Procédé selon la revendication 12, dans lequel les oléagineux sont choisis parmi le groupe comprenant le colza et le tournesol.
14. Utilisation, dans un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, d'un mélange enzymatique contenant au moins une cellulase, au moins une hémicellulase et au moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0,14, de préférence compris entre 0,35 et 0,45, et le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant d'au moins  $7 \cdot 10^{-3}$ , de préférence compris entre  $1 \cdot 10^{-2}$  et  $2 \cdot 10^{-2}$ , pour supprimer toute étape de correction du pH dans ledit procédé.
15. Utilisation selon la revendication 14, selon laquelle le mélange enzymatique contient les activités enzymatiques dans les proportions suivantes :
- cellulases :
  - betaglucosidase : entre 1 et 30  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 4,5 et 13  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,

- endocellulase : entre 20 et 200  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 27 et 120  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
- exocellulase : entre 0 et 50  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 9 et 25,5  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
- 5        - hemicellulases :
  - arabinanase : entre 300 et 2000  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 465 et 1335  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
  - xylanase : entre 0 et 2000  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 300 et 1700  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
- 10       - galactanase : entre 300 et 2000  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 750 et 1000  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
- pectinases :
  - endopolygalacturonase : entre 40 et 120  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 61 et 86  $\mu\text{mol/min/ml}$ ,
- 15       - pectine méthylestérase : entre 1 et 20  $\mu\text{mol/min/ml}$ , de préférence entre 1 et 5  $\mu\text{mol/min/ml}$ .



# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 730655  
FR 0957274

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Revendication(s)<br>concernée(s) | Classement attribué<br>à l'invention par l'INPI                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Citation du document avec indication, en cas de besoin,<br>des parties pertinentes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                  |                                                                                                     |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | WO 03/028473 A1 (BIOVELOP INTERNAT B V [NL]; KVIST STEN [SE]; CARLSSON TOMMIE [SE]; LAW) 10 avril 2003 (2003-04-10)<br>* abrégé *<br>* page 2, ligne 5-18 *<br>* page 4, ligne 10 - page 9, ligne 16;<br>figure 1; exemples 1-4 *<br>-----                                                                                                                                                                           | 1-4,7-14                         | C12P7/64<br>C12P21/00<br>C12P19/00<br>C11B1/10<br>C11B13/00<br>C07H1/08<br>C07K1/12<br>A23D9/02     |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | WO 01/60182 A1 (LIPOGENICS INC [US]; LANE RONALD H [US]) 23 août 2001 (2001-08-23)<br>* page 1, ligne 22 - page 2, ligne 8 *<br>* page 7, ligne 11 - page 11, ligne 25 *<br>* page 5, ligne 21-23 *<br>-----                                                                                                                                                                                                         | 1-4,7-14                         | C12P19/14<br>A23J1/1/4P#<br>C07K1/14<br>C11B1/0/2B#                                                 |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | EP 1 658 360 B1 (SUED CHEMIE AG [DE])<br>9 mai 2007 (2007-05-09)<br>* revendications 1-5, 9-13 *<br>* alinéa [0122]; exemple 1 *<br>-----                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1-4,7-14                         |                                                                                                     |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | SENGUPTA R ET AL: "ENZYMATIC EXTRACTION OF MUSTARD SEED AND RICE BRAN"<br>JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, SPRINGER, BERLIN, DE,<br>vol. 73, no. 6,<br>1 janvier 1996 (1996-01-01), pages<br>687-692, XP008039851<br>ISSN: 0003-021X DOI: 10.1007/BF02517941<br>* abrégé *<br>* page 687, colonne de gauche, alinéa 1 -<br>page 688, colonne de gauche, dernier<br>alinéa; tableaux 2, 3, 9 *<br>----- | 1-4,7-14                         | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHÉS (IPC)<br><br>C12P<br>A23D<br>A23J<br>C07K<br>C11B<br>C13K<br>C13D |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | EP 0 113 165 A1 (IMP BIOTECHNOLOGY [GB])<br>11 juillet 1984 (1984-07-11)<br>* abrégé *<br>* revendications 1-5; exemples 13-16 *<br>-----<br>-/-                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1-15                             |                                                                                                     |
| Date d'achèvement de la recherche                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Examineur                        |                                                                                                     |
| 29 juin 2010                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Schröder, Gunnar                 |                                                                                                     |
| <p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul<br/>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br/>A : arrière-plan technologique<br/>O : divulgation non-écrite<br/>P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br/>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.<br/>D : cité dans la demande<br/>L : cité pour d'autres raisons<br/>-----<br/>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                  |                                                                                                     |



# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

N° d'enregistrement national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 730655  
FR 0957274

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Revendication(s) concernée(s) | Classement attribué à l'invention par l'INPI |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes                                                                                                                                                                                                                                                                        |                               |                                              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | JUHASZ T ET AL: "Characterization of cellulases and hemicellulases produced by Trichoderma reesei on various carbon sources"<br>PROCESS BIOCHEMISTRY, ELSEVIER, NL, vol. 40, no. 11, 1 novembre 2005 (2005-11-01), pages 3519-3525, XP025306694<br>ISSN: 1359-5113 DOI: 10.1016/J.PROCBIO.2005.03.057 [extrait le 2005-11-01]<br>* abrégé; tableau 2 * | 1,5,14, 15                    |                                              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | DONAGHY J A ET AL: "Novel screening assay for the detection of phenolic acid esterases"<br>WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 10, no. 1, 1994, pages 41-44, XP002588811<br>ISSN: 0959-3993<br>* page 43, colonne de droite, alinéa 2; tableau 3 *                                                                                   | 6                             | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)         |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | DATABASE FSTA [Online]<br>INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANKFURT-MAIN, DE; 1994,<br>KARLOVIC D J ET AL: "Corn germ oil extraction by a new enzymatic process."<br>XP002588812<br>Database accession no. FS-1995-10-N-0053<br>* abrégé *<br>& ACTA ALIMENTARIA, vol. 23, no. 4, 1994, pages 389-400,<br>-----<br>-/--                 | 1-15                          |                                              |
| Date d'achèvement de la recherche                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Examineur                     |                                              |
| 29 juin 2010                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Schröder, Gunnar              |                                              |
| <p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul<br/>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br/>A : arrière-plan technologique<br/>O : divulgation non-écrite<br/>P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br/>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.<br/>D : cité dans la demande<br/>L : cité pour d'autres raisons<br/>-----<br/>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                               |                                              |



# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 730655  
FR 0957274

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Revendication(s)<br>concernée(s) | Classement attribué<br>à l'invention par l'INPI |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Citation du document avec indication, en cas de besoin,<br>des parties pertinentes                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                  |                                                 |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | SHAO BING ZHANG ET AL: "Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates." JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, vol. 84, no. 1, 1 janvier 2007 (2007-01-01), pages 97-105, XP002588813 DOI: 10.1007/S11746-006-1004-6 * abrégé; figures 1-4; tableau 1 * * page 100, colonne de droite, alinéa 3 - page 101, colonne de droite, alinéa 2 * | 1-15                             | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)            |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | RAMADAN M F ET AL: "Oil extractability from enzymatically treated goldenberry (Physalis peruviana L.) pomace: range of operational variables." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY, vol. 44, no. 3, 1 mars 2009 (2009-03-01), pages 435-444, XP002588814 DOI: 10.1111/J.1365-2621.2006.01511.X * abrégé; figures 1-6; tableaux 1, 2 *                                          | 1-15                             |                                                 |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | PICURIC-JOVANOVIC K ET AL: "Aqueous-enzymatic extraction of plum kernel oil." FETT/LIPID, vol. 99, no. 12, 1 décembre 1997 (1997-12-01), pages 433-435, XP002588815 DOI: 10.1002/LIPI.19970991205 * abrégé; tableau 1 * * page 433, ligne 4-9, alinéa 2.1 *                                                                                                                                   | 1-15                             |                                                 |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | US 4 904 483 A (CHRISTENSEN FLEMMING M [CH] ET AL) 27 février 1990 (1990-02-27) * abrégé; exemples 1-3 * * colonne 2, ligne 3 - colonne 3, ligne 29 *                                                                                                                                                                                                                                         | 1-15                             |                                                 |
| Date d'achèvement de la recherche                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Examineur                        |                                                 |
| 29 juin 2010                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Schröder, Gunnar                 |                                                 |
| <p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul<br/>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br/>A : arrière-plan technologique<br/>O : divulgation non-écrite<br/>P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br/>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.<br/>D : cité dans la demande<br/>L : cité pour d'autres raisons<br/>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                  |                                                 |

3  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE****RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0957274 FA 730655**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **29-06-2010**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche |    | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|----|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| WO 03028473                                     | A1 | 10-04-2003             | AT 385701 T                             | 15-03-2008             |
|                                                 |    |                        | BR 0213055 A                            | 28-09-2004             |
|                                                 |    |                        | CA 2462538 A1                           | 10-04-2003             |
|                                                 |    |                        | EP 1437944 A1                           | 21-07-2004             |
|                                                 |    |                        | JP 2005503816 T                         | 10-02-2005             |
|                                                 |    |                        | RU 2295250 C2                           | 20-03-2007             |
|                                                 |    |                        | SE 524075 C2                            | 22-06-2004             |
|                                                 |    |                        | SE 0103329 A                            | 05-04-2003             |
|                                                 |    |                        | US 2005136162 A1                        | 23-06-2005             |
| WO 0160182                                      | A1 | 23-08-2001             | AU 3822501 A                            | 27-08-2001             |
|                                                 |    |                        | CN 1423531 A                            | 11-06-2003             |
| EP 1658360                                      | B1 | 09-05-2007             | DE 10339010 A1                          | 24-03-2005             |
|                                                 |    |                        | EP 1658359 A1                           | 24-05-2006             |
|                                                 |    |                        | EP 1658360 A1                           | 24-05-2006             |
|                                                 |    |                        | WO 2005021694 A1                        | 10-03-2005             |
|                                                 |    |                        | WO 2005021695 A1                        | 10-03-2005             |
|                                                 |    |                        | ES 2281824 T3                           | 01-10-2007             |
|                                                 |    |                        | ES 2282889 T3                           | 16-10-2007             |
| EP 0113165                                      | A1 | 11-07-1984             | GB 2127425 A                            | 11-04-1984             |
| US 4904483                                      | A  | 27-02-1990             | DK 77788 A                              | 17-08-1989             |
|                                                 |    |                        | GB 2215980 A                            | 04-10-1989             |
|                                                 |    |                        | IN 169299 A1                            | 21-09-1991             |
|                                                 |    |                        | SG 37192 G                              | 22-05-1992             |