

Description

Titre : PROCEDE HMT DE L'AMIDON DE POIS

[0001] La présente invention est relative à un procédé hydrothermique d'augmentation de la teneur en fraction lentement digestible de l'amidon de pois.

- 5 Plus particulièrement ce procédé hydrothermique est un procédé par traitement à la chaleur humide, communément appelé traitement HMT, d'après le terme anglais de Heat-Moisture Treatment.

[0002] Elle est également relative aux amidons de pois ainsi obtenus et à leurs utilisations.

10 Contexte de l'invention

[0003] D'un point de vue physiologique, chez l'homme ou les animaux, l'essentiel des glucides ingérés lors de l'alimentation est représenté par l'amidon, molécule de réserve énergétique caractéristique des végétaux et composante principale des féculents (pâtes, farine, pommes de terre).

- 15 **[0004]** Lors de la digestion, les molécules d'amidon se dissocient en chaînes de glucanes plus petites, elles-mêmes dissociées en glucoses simples et assimilables par le système digestif.

[0005] La digestion de l'amidon débute dans la bouche pendant la mastication grâce à une enzyme de la salive : l'amylase salivaire.

- 20 **[0006]** Cette première décomposition de l'amidon est stoppée par l'acidité de l'estomac mais reprend dans le duodénum (première partie de l'intestin grêle) grâce à l'action des enzymes pancréatique et intestinale.

[0007] L'action successive de toutes ces amylases conduit à l'apparition d'un disaccharide, le maltose, qui sera lui-même transformé en deux monosaccharides,

- 25 des glucoses.

[0008] Synthétisé par voie biochimique, source d'hydrates de carbone, l'amidon est l'une des matières organiques les plus répandues du monde végétal, où il constitue la réserve nutritionnelle des organismes.

[0009] Il est ainsi naturellement présent dans les organes et tissus de réserve des végétaux supérieurs, en particulier dans les graines de céréales (blé, maïs...), les graines de légumineuses (pois, fèves ...), les tubercules (pomme de terre, igname...), les racines (manioc, patate douce, ...), les bulbes, les tiges et les fruits.

- 5 **[0010]** L'amidon est principalement un mélange de deux homopolymères, l'amylose et l'amylopectine, composés d'unités de D-glucose, liées entre elles par des liaisons α (1-4) et des liaisons α (1-6) qui sont à l'origine de ramifications dans la structure de la molécule.

- [0011]** Ces deux homopolymères diffèrent par leur degré de branchement et leur
10 degré de polymérisation.

[0012] L'amylose est légèrement ramifiée avec de courtes branches et présente une masse moléculaire comprise entre 10.000 et 1.000.000 Dalton. La molécule est formée de 100 à 10.000 molécules de glucose.

- [0013]** L'amylopectine est une molécule ramifiée avec de longues branches toutes
15 les 24 à 30 unités de glucose, par l'intermédiaire de liaisons α (1-6). Sa masse moléculaire va de 1.000.000 à 100.000.000 Dalton et son niveau de branchement est de l'ordre de 5 %. La chaîne totale peut compter 10.000 à 100.000 unités glucose.

- [0014]** Le ratio entre l'amylose et l'amylopectine dépend de la source botanique de
20 l'amidon.

[0015] L'amidon est stocké dans les organes et tissus de réserve dans un état granulaire, c'est-à-dire sous la forme de granules semi-cristallins.

[0016] Cet état semi-cristallin est essentiellement dû aux macromolécules d'amylopectine.

- 25 **[0017]** A l'état natif, les granules d'amidon présentent un taux de cristallinité allant de 15 à 45 % en poids qui dépend essentiellement de l'origine botanique et du procédé mis en œuvre pour leur extraction.

[0018] L'amidon granulaire, placé sous lumière polarisée, présente alors en microscopie une croix noire caractéristique, dite « croix de Malte ».

[0019] Ce phénomène de biréfringence positive est dû à l'organisation semi-cristalline des granules : l'orientation moyenne des chaînes de polymères étant radiale.

[0020] Pour une description plus détaillée de l'amidon granulaire, on pourra se
5 référer au chapitre II intitulé « Structure et morphologie du grain d'amidon » de S. Perez, dans l'ouvrage « Initiation à la chimie et à la physico-chimie macromoléculaires », Première Edition, 2000, vol. 13, pp. 41-86, Groupe Français d'Etudes et d'Applications des Polymères.

[0021] L'amidon sec renferme une teneur en eau qui varie de 12 à 20 % en poids
10 selon l'origine botanique. Cette teneur en eau dépend évidemment de l'humidité résiduelle du milieu (pour une $a_w = 1$, l'amidon peut fixer jusqu'à 0,5 g d'eau par gramme d'amidon).

[0022] Le chauffage, en excès d'eau, d'une suspension d'amidon à des
15 températures proches de sa température de gélatinisation entraîne un gonflement irréversible des granules et conduit à leur dispersion, puis à leur solubilisation.

[0023] Ce sont notamment ces propriétés qui confèrent à l'amidon ses propriétés technologiques d'intérêt.

[0024] Pour une plage de température donnée appelée « plage de gélatinisation »,
20 le grain d'amidon va gonfler très rapidement et perdre sa structure semi-cristalline (perte de la biréfringence).

[0025] Généralement, tous les granules seront gonflés au maximum sur un
intervalle de température de l'ordre de 5 à 20°C. On obtient un empois composé de granules gonflés qui constituent la phase dispersée et de molécules (amylose principalement) qui épaississent la phase continue aqueuse.

25 **[0026]** Les propriétés rhéologiques de l'empois dépendent de la proportion relative de ces deux phases et du volume de gonflement des granules. La plage de gélatinisation est variable selon l'origine botanique de l'amidon.

[0027] La viscosité maximale est obtenue quand l'empois d'amidon renferme un
grand nombre de granules très gonflés. Quand on continue de chauffer avec
30 cisaillement, les granules vont éclater et le matériel va se disperser dans le milieu.

[0028] Les complexes amylose-lipide présentent des retards au gonflement car l'association empêche l'interaction de l'amylose avec les molécules d'eau et il faut des températures supérieures à 90°C pour obtenir le gonflement total des granules (cas de l'amylomais complexé aux lipides).

- 5 **[0029]** La disparition des granules et la solubilisation des macromolécules entraînent une diminution de la viscosité.

[0030] L'abaissement de température (par refroidissement) de l'empois d'amidon provoque une gélification ou une insolubilisation des macromolécules puis on assiste à une cristallisation de ces macromolécules.

- 10 **[0031]** Ce phénomène est connu sous l'appellation de rétrogradation.

[0032] Quand un empois renferme de l'amylose, c'est cette première molécule qui subira la rétrogradation.

- [0033]** Elle consistera à la formation de double hélice et à l'association de ces dernières pour former des « cristaux » qui donneront par l'intermédiaire de zones
15 de jonction un réseau tridimensionnel.

- [0034]** Ce réseau est formé très rapidement, en quelques heures, et continue à se développer jusqu'à quelques semaines plus tard. L'association des molécules entre-elles par l'intermédiaire de liaisons pont hydrogène formant des doubles hélices déplace les molécules d'eau associées dans le réseau et provoque une
20 synérèse importante.

[0035] La complexité structurale de l'amidon et ses propriétés physico-chimiques font que cette classe d'hydrates de carbone sera assimilée puis digérée de façon variable chez l'homme et les animaux.

- [0036]** C'est la raison pour laquelle l'amidon peut être classé en trois catégories, en
25 fonction de sa digestibilité : rapidement digestible, lentement digestible, ou non digestible.

[0037] L'amidon qui se présente sous forme naturellement granulaire / semi cristalline, peut être converti en « amidon rapidement digestible » (acronyme

anglosaxon « RDS » pour Rapid Digestible Starch) après exposition à la chaleur, la pression et/ou à l'humidité durant les processus alimentaires.

[0038] L'amidon lentement digestible (acronyme anglosaxon « SDS » pour Slow Digestible Starch) prend plus longtemps à être dégradé par les enzymes digestives en comparaison avec les RDS parce qu'il présente une structure encore cristalline, et parce qu'il est moins accessible aux enzymes de digestion.

[0039] La digestion de cette fraction SDS conduit à une libération modérée et régulière de glucose dans le sang. On parlera alors d'amidons présentant un faible indice glycémique (acronyme anglosaxon « low G.I. » pour low Glycemic Index ou faible indice glycémique).

[0040] Des aliments qui présentent un contenu élevé en SDS provoqueront alors des réponses glycémiques post prandiales plus faibles et des réponses insulinémiques post prandiales plus basses que des aliments ne contenant qu'un faible contenu en SDS.

[0041] Inversement, les RDS sont des hydrates de carbones nutritifs, car ils libèreront leur glucose dans le sang beaucoup plus rapidement. Attention cependant à ce que la source nutritive n'en contienne trop, ce qui peut entraîner des syndromes métaboliques.

[0042] Quant aux amidons dits résistants (acronyme anglosaxon « RS » pour Resistant Starch), ils sont quant à eux assimilables à des fibres non digestibles (tels que le son de maïs, les fibres d'avoine, les gommages) par les enzymes intestinales.

[0043] Il est admis, dans l'état de l'art, que l'amidon total est la somme de ses trois composantes RDS, SDS et RS.

[0044] Les différents types d'amidon sont donc digérées à des rythmes différents dans le système digestif humain.

[0045] On admet donc que les SDS ont une vitesse de digestion plus lente que les RDS. Les RS sont une fraction de l'amidon qui résiste à la digestion enzymatique dans l'intestin grêle. Ces derniers seront fermentés dans le gros intestin et peuvent dès lors être considérés comme des fibres alimentaires.

[0046] Les fractions SDS et RS sont donc des sources de glucose disponible.

[0047] Les SDS sont trouvés naturellement dans certaines graines non cuites des céréales comme le blé, le riz, l'orge, le seigle, le maïs, dans les légumineuses comme le pois, les féveroles et les lentilles.

5 **[0048]** Le contenu en SDS est principalement influencé par la gélatinisation de l'amidon lors du procédé alimentaire qui suivra.

[0049] En effet, lors de ce processus, l'exposition à la température, la pression et l'humidité conduit à la conversion de la fraction SDS en RDS, rendant l'amidon plus accessible à la digestion enzymatique.

10 **[0050]** Cette conversion peut être minimisée par le contrôle des conditions de cuisson pour limiter la gélatinisation de l'amidon.

[0051] De ce fait, le contenu originel en SDS dans la composition ou le produit alimentaire dépendra de la manière dont sa préparation aura été menée.

[0052] Il est ainsi connu que les produits alimentaires qui contiennent beaucoup de
15 SDS sont certaines pâtes alimentaires, le riz étuvé, l'orge perlé et certains biscuits, contrairement aux céréales soufflées du petit déjeuner ou au pain qui n'en contiennent habituellement que très peu.

[0053] Le contenu en SDS des aliments est classiquement déterminé en utilisant une méthode *in vitro* développée par H.N. ENGLYST et ses collaborateurs (publiée
20 en 1992 dans l'*Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 46, pp. S33 –S50).

[0054] Dans la suite de cet exposé, il sera fait référence à cette méthode de 1992 « selon ENGLYST ».

[0055] Cette méthode a été élaborée pour simuler la digestion enzymatique qui se produit dans l'intestin grêle.

25 **[0056]** Un échantillon de produit ou d'amidon est introduit dans un tube, en présence d'enzymes digestives, et la libération du glucose est mesurée durant 120 minutes de réaction.

[0057] Cette méthode permet alors de différencier :

- La fraction RDS, par la mesure du glucose disponible rapidement (acronyme
30 anglosaxon « RAG »), en l'occurrence ici mesure du glucose libéré entre 0 et 20 minutes ;

- La fraction SDS, par la mesure du glucose disponible lentement (acronyme anglosaxon « SAG ») ; en l'occurrence ici mesure du glucose libéré entre 20 et 120 minutes ;

- La fraction RS, correspondant au glucose non libéré après 120 minutes, qui se calcule selon la méthode Englyst par la formule suivante : $TS - (RDS + SDS)$ où TS = amidon total (Total Starch considéré égal à 100 % lorsque les analyses sont réalisées sur l'amidon en tant que tel).

[0058] Des aliments riches en glucides contenant plus de 50 % en poids de carbohydrates disponibles provenant d'amidon, dont au moins 40 % en poids sont du SDS, sont classiquement considérés comme des aliments à haute richesse en SDS.

[0059] Ils sont donc préconisés pour limiter l'indice glycémique et la production d'insuline, en regard des aliments plus pauvre en SDS.

[0060] De tous les amidons classiquement mis en œuvre dans ces applications alimentaires, les amidons de légumineuses, et plus particulièrement l'amidon de pois est un candidat de choix.

[0061] En effet, les graines de pois sont connues pour leur richesse en amidon (entre 55 et 70 % en poids de matière sèche) et pour leur faible indice glycémique (RATNAYAKE et al. « *Pea starch, composition, structure and properties – A review* », Starch/Stärke, 2002, vol. 54, pp. 217-234).

[0062] Les amidons de pois natifs, présentant une teneur en SDS classiquement comprises entre 27 et 38 % en poids selon ENGLYST sont donc d'intérêt pour des applications nutritionnelles.

[0063] Cependant, pour préparer des aliments à haute richesse en SDS, il est nécessaire de disposer d'amidon présentant une plus haute teneur en fraction glucidique lentement digestible.

[0064] Il est connu dans l'état de l'art que les traitements hydrothermiques de type recuites (terme anglosaxon d'« annealing ») ou d'autres traitements hydrothermiques de type HMT permettent d'altérer la structure cristalline du granule d'amidon.

- [0065]** L'annealing est un terme utilisé en science des polymères pour décrire l'optimisation de la cristallisation par le chauffage d'un polymère à une température en-dessous de son point de fusion, afin que cela conduise à la croissance de régions cristallines, à la perfection des cristaux et au passage à des structures cristallines plus stables.
- [0066]** Au cours du processus d'annealing, on suppose que les granules d'amidon subissent un gonflement limité mais réversible sans détruire la structure granulaire et moléculaire ni la solubilisation des molécules des polymères d'amidon.
- [0067]** Cependant, Il est connu dans l'état de l'art que les procédés d'annealing n'ont pas pour objectif principal d'augmenter la teneur en fraction lentement digestible (SDS), mais au contraire de rendre plus digestible l'amidon, et notamment l'amidon de légumineuse comme le pois (cf. article de CHUNG et al, dans *Carbohydr. Polym.*, 2009, vol. 75, pp. 436-447), en en augmentant la teneur en fraction RDS.
- [0068]** Dans sa demande de brevet WO 2021/099747, la société Demanderesse a cependant optimisé cette technologie d'annealing, non pas pour augmenter la fraction RDS, mais bien pour augmenter le contenu en SDS de l'amidon de légumineuse, notamment du pois, en cherchant et trouvant des conditions opératoires d'annealing particulièrement adaptées à cette fin.
- [0069]** Le traitement HMT est quant à lui un traitement thermique effectué sur de l'amidon avec une humidité limitée (< 35 %) à une température élevée (>100°C) durant un certain temps.
- [0070]** En raison de l'humidité limitée, la température de gélatinisation de l'amidon est plus élevée que dans un excès d'eau (Donovan, *Biopolymers*, 1979, vol. 18 pp. 263-275), et l'amidon peut donc être chauffé à une température supérieure à 100°C sans provoquer de gélatinisation.
- [0071]** Pendant le traitement HMT, les molécules dans les granules d'amidon ont une mobilité locale accrue.
- [0072]** En conséquence, la structure cristalline des granules d'amidon est modifiée, ce qui change ses propriétés de gélatinisation et de digestibilité.

[0073] La société Demanderesse a donc choisi d'expérimenter cette technologie pour proposer un traitement alternatif à celui enseigné par sa demande de brevet WO 2021/099747.

[0074] Elle a ainsi trouvé des conditions opératoires permettant d'augmenter la teneur en fraction lentement digestible (SDS) de l'amidon de pois natif, plus particulièrement permettant de convertir la fraction amidon résistant (RS) de l'amidon de pois natif en amidon lentement digestible (SDS), en modifiant la structure cristalline de l'amidon de pois natif par HMT.

Brève description des dessins

[0075] D'autres caractéristiques, détails et avantages apparaîtront à la lecture de la description détaillée ci-après, et à l'analyse des dessins annexés, sur lesquels :

Fig. 1

[0076] [Fig. 1] montre le thermogramme de l'échantillon 1C.

Fig. 2

[0077] [Fig. 2] montre le thermogramme de l'échantillon 1B.

Description détaillée

[0078] Ainsi, l'invention concerne un procédé de préparation d'un amidon de légumineuse, de préférence de l'amidon de pois, à haute teneur en fraction lentement digestible (SDS), procédé de traitement à la chaleur humide (HMT) caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 1) Ajuster la teneur en eau de l'amidon de pois natif à une valeur inférieure à 35 %, de préférence comprise entre 20 et 30 % en poids, de manière encore plus préférée entre 20 et 25% en poids,
- 2) Chauffer l'amidon ainsi préparé à une température de plus de 100°C, de préférence de 105°C à 135°C pendant plus de 5 heures, de préférence pendant plus de 10 heures, et plus préférentiellement encore pendant 24 heures,
- 3) Récupérer et éventuellement sécher l'amidon ainsi traité.

[0079] Par « haute teneur en fraction lentement digestible », au sens de la présente invention, on entend une augmentation de la teneur en SDS de 5 à 25 % en poids sec, de préférence 10 à 20 % en poids sec par rapport à la l'amidon à partir duquel il est préparé.

- 5 **[0080]** Par « légumineuse » au sens de la présente invention, on entend toute plante appartenant aux familles des césalpiniacées, des mimosacées ou des papilionacées et notamment toute plante appartenant à la famille des papilionacées comme, par exemple, le pois, le haricot, la fève, la fève, la fève, la lentille, la luzerne, le trèfle ou le lupin.
- 10 **[0081]** Cette définition inclut notamment toutes les plantes décrites dans les tableaux de l'article de HOOVER et al. intitulé « *Composition, structure, functionality and chemical modification of legume starches : a review* », *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991, vol. 69, pp. 79-92).

- [0082]** De préférence, la légumineuse est choisie dans le groupe comprenant le
15 pois, le haricot, la fève et la fève.

[0083] Avantageusement, il s'agit de pois, le terme « pois » étant ici considéré dans son acception la plus large et incluant en particulier :

- toutes les variétés sauvages de « pois lisse » (« smooth pea »), et
- toutes les variétés mutantes de « pois lisse » et de « pois ridé » (« wrinkled pea »)

- 20 et ce, quelles que soient les utilisations auxquelles on destine généralement lesdites variétés (alimentation humaine, nutrition animale et/ou autres utilisations).

- [0084]** Lesdites variétés mutantes sont notamment celles dénommées « mutants r », « mutants rb », « mutants rug 3 », « mutants rug 4 », « mutants rug 5 » et « mutants lam » tels que décrits dans l'article de HEYDLEY et al. intitulé « *Developing novel pea starches* » *Proceedings of the Symposium of the Industrial Biochemistry and Biotechnology Group of the Biochemical Society*, 1996, pp. 77-87.
- 25

[0085] Selon une autre variante avantageuse, les légumineuses (par exemple des variétés de pois ou de fève) sont des plantes donnant des graines contenant au moins 25 %, de préférence au moins 40 %, en poids d'amidon (sec/sec).

[0086] Par « amidon de légumineuse », on entend toute composition extraite et ce, de quelque manière que ce soit, d'une légumineuse et notamment d'une papilionacée, et dont la teneur en amidon est supérieure à 40 %, de préférence supérieure à 50 % et encore plus préférentiellement supérieure à 75 %, ces
5 pourcentages étant exprimés en poids sec par rapport aux poids sec de ladite composition.

[0087] Avantageusement, cette teneur en amidon est supérieure à 90 % (sec/sec). Elle peut en particulier être supérieure à 95 % en poids, y compris supérieure à 98 % en poids.

10 **[0088]** Par amidon « natif », on entend un amidon qui n'a subi aucune modification chimique.

[0089] Afin de déterminer leur teneur de base en fraction SDS, les amidons de pois selon l'invention ou non sont analysés suivant les conditions opératoires de digestion *in vitro* de la méthode de ENGLYST et al. intitulé « *Classification and*
15 *measurement of nutritionally important starch fractions* », *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1992, vol. 46 (Supp. 2), pp. S33-S50.

[0090] La méthode consiste à mesurer les fractions d'amidon rapidement digestible (RDS), lentement digestible (SDS) et non digestible (résistants) (RS) contenues dans un aliment.

20 **[0091]** Ces fractions sont déterminées après digestion enzymatique avec de la pancréatine, de l'amyloglucosidase et de l'invertase.

[0092] Le glucose libéré est mesuré par colorimétrie, en utilisant un kit de glucose oxydase Glucose GOD FS référencé 1 2500 99 10 923, commercialisé par la société DiaSys Distribution France Sarl en suivant le protocole dudit kit.

25 **[0093]** Le détail de la méthode mise en œuvre pour la mesure de la digestion selon ENGLYST est similaire à celui donné par la société Demanderesse dans sa demande brevet WO 2021/099747.

[0094] Les réactifs utilisés :

- Acétate de sodium anhydre (réf : 71184, de la société SIGMA)

- Acide benzoïque (réf : 242381, de la société SIGMA)
- CaCl_2 (réf : 1.02378.0500, de la société MERCK)
- Acide acétique 0,1M (réf : 33209, de la société SIGMA)
- Pancréatine de porc 8 x USP (réf : P 7545 de la société SIGMA)
- 5 - Amyloglucosidase EC 3.2.1.3 (de la société SIGMA, d'activité ≥ 260 U/ml / ≈ 300 AGU/ml, Cat. NO. A7095)
- Invertase EC 3.2.1.26 (de la société SIMA, d'activité ≥ 300 units/mg solid, Cat. NO. I-4504)
- Guar (réf : G4129, de la société SIGMA)
- 10 - Ethanol à 66°

Mode opératoire

[0095] Le tampon acétate (0,1 M) a été préparé en dissolvant 8,203 g d'acétate de sodium anhydre dans 250 ml de solution saturée d'acide benzoïque, en le diluant à 500 ml avec de l'eau RO, en ajustant le pH à 5,2 avec de l'acide acétique 0,1 M, en le diluant à nouveau à 1000 ml avec de l'eau RO et en ajoutant 4 ml de CaCl_2 1 M par litre de tampon.

[0096] La solution enzymatique a été préparée fraîchement avant les expériences. Quatre tubes à centrifuger de 50 ml ont été préparés, chacun contenant 2,5 g de pancréatine porcine (8 x USP, P7545, Sigma) et mélangé à 20 ml d'eau RO.

20 Le mélange a été agité pendant 10 minutes et centrifugé pendant 10 minutes à $1500 \times g$.

Les surnageants (13,5 ml de chaque tube) ont été combinés et mélangés avec 2,775 ml d'amyloglucosidase (EC 3.2.1.3, A7095, Sigma), 3,225 ml d'eau RO et 33,3 mg d'invertase (EC 3.2.1.26, I4504, Sigma) prédissoûs dans 4 ml d'eau RO.

25 [0097] Chaque échantillon (0,8 g, base sèche) a été mélangé avec 20 ml de tampon acétate et 50 mg de gomme de guar dans un tube de 50 ml.

[0098] Un témoin « blanc » a été préparé en utilisant 20 ml de tampon acétate et 50 mg de gomme de guar, sans échantillon, tandis qu'un étalon contenait 0,5 g de glucose anhydre et 50 mg de gomme de guar dans 20 ml de solution tampon acétate.

30 [0099] La gomme de guar peut être prédissoûte dans le tampon acétate, par exemple, 750 mg de gomme de guar dans 300 ml de tampon acétate.

Les échantillons, le blanc et l'étalon ont été équilibrés à 37°C dans un bain-marie avec agitation pendant 15 minutes.

[0100] Une aliquote (0,1 ml) a été prélevée dans chaque tube avant d'ajouter les enzymes (0 minute) et mélangée avec 0,9 ml de solution d'éthanol à 66 %.

- 5 En prenant un tube par minute, 5 ml de solution enzymatique ont été ajoutés aux échantillons, au blanc et à l'étalon.

[0101] Immédiatement après le mélange, les tubes ont été replacés dans le bain-marie à 37°C pendant 120 min sous agitation.

- [0102]** Une aliquote (0,1 ml) a été prélevée dans chaque tube à 20 et 120 minutes
10 et bien mélangée avec 0,9 ml de solution d'éthanol à 66 % v/v.

Les mélanges de solutions alcoolisées ont été centrifugés à 1500 × g pendant trois minutes.

- [0103]** La teneur en glucose (G_0 , G_{20} et G_{120} pour 0, 20 et 120 minutes, respectivement) dans chaque surnageant a été analysée à l'aide d'une méthode
15 colorimétrique, et utilisée pour calculer l'amidon rapidement digestible (RDS), l'amidon lentement digestible (SDS) et l'amidon résistant (RS) comme suit :

$$\text{- RDS} = (G_{20} - G_0) \times 0,9$$

$$\text{- SDS} = (G_{120} - G_{20}) \times 0,9$$

$$\text{- RS} = 100 \% - (\text{RDS} + \text{SDS}) = 100 \% - (G_{120} \times 0.9)$$

- 20 **[0104]** La méthode d'ENGLYST classique ne permet pas d'hydrolyser les échantillons d'amidon jusqu'à épuisement, car comme la société Demanderesse l'a constaté, une plus grande quantité d'amidon peut être hydrolysée après 2 heures de réaction.

- [0105]** Cette observation a permis à la société Demanderesse d'exploiter cette
25 propriété en découvrant l'existence d'une fraction très lentement digestible, issue de la fraction RS de l'amidon de pois, dans sa demande de brevet WO 2021/099748. Cette fraction a été définie comme la fraction vSDS (pour very Slow Digestible Starch).

[0106] Par conséquent, la méthode AOAC 2002.02, qui utilise une hydrolyse de 16 heures, a été utilisée pour obtenir la teneur absolue en RS, et le résultat peut être revendiqué comme fibre alimentaire.

[0107] Pour différencier les deux teneurs en RS, les paramètres RS_E et RS_A ont été
5 utilisés pour désigner les teneurs en RS obtenues par la méthode d'ENGLYST (RS_E) et par AOAC 2002.02 (RS_A), respectivement.

[0108] La différence entre RS_E et RS_A est considérée comme de l'amidon très lentement digestible (vSDS), la partie digestible de l'amidon qui nécessite plus de 2 heures pour être hydrolysée en utilisant la méthode d'ENGLYST.

10 **[0109]** Selon cette méthode, l'amidon de pois natif présente classiquement une teneur :

- en RDS comprise entre 13 et 16 % en poids,
- une teneur en SDS comprise entre 24 et 38 % en poids,
- une teneur en RS_E comprise entre 50 et 65 % en poids,
- 15 - une teneur en RS_A comprise entre 9 et 20 % en poids,
- une teneur en vSDS comprise entre 35 et 45 % en poids.

Ces valeurs sont données avec un écart type de +/- 2%, étant donné la variabilité intrinsèque au test enzymatique ENGLYST.

[0110] Pour augmenter le taux de SDS, le procédé de traitement à la chaleur
20 humide (HMT) selon l'invention, développé par la société Demanderesse, repose sur une conduite hydrothermique précise.

[0111] L'invention est alors relative à un procédé de préparation d'un amidon de légumineuse, de préférence de l'amidon de pois, à haute teneur en fraction
lentement digestible (SDS), procédé de traitement hydrothermique caractérisé en

25 ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 1) Ajuster la teneur en eau de l'amidon de pois natif à une valeur inférieure à 35 %, de préférence comprise entre 20 et 30 % en poids, de manière encore plus préférée entre 20 et 25% en poids,
- 2) Chauffer l'amidon ainsi préparé à une température de plus de 100°C, de
30 préférence de 105°C à 135°C et pendant plus de 5 heures, de préférence pendant

plus de 10 heures, et plus préférentiellement encore pendant 24 heures,

3) Récupérer et éventuellement sécher l'amidon ainsi traité.

[0112] La première étape dudit procédé conforme à l'invention consiste à ajuster la teneur en eau de l'amidon de pois natif à une valeur inférieure à 35 %, de préférence comprise entre 20 et 30 % en poids de manière encore plus préférée entre 20 et 25% en poids.

[0113] La seconde étape du procédé conforme à l'invention consiste à chauffer l'amidon ainsi préparé à une température de plus de 100°C, de préférence de 105°C à 135°C et pendant plus de 5 heures, de préférence pendant plus de 10 heures, et plus préférentiellement encore pendant 24 heures,.

[0114] En fonction de la teneur en eau de l'amidon de pois natif choisie, la société Demanderesse recommande d'adapter la température de traitement.

[0115] Dans un premier mode préférentiel de réalisation du procédé conforme à l'invention, à une teneur en eau de l'ordre de 25 %, comme il sera exemplifié ci-après, il est préféré chauffer, pendant 24 heures, à une température de l'ordre de 105°C, tandis qu'à une teneur en eau réduite, de l'ordre de 20 %, il est préféré chauffer, pendant 24 heures, à une température plus élevée, de l'ordre de 135°C. Ces deux traitements conduiront à augmenter significativement la teneur en SDS (de 10 à 20%) sans augmenter la teneur en RDS de plus de 5 à 10%).

[0116] Dans un second mode préférentiel de réalisation du procédé conforme à l'invention, à une teneur en eau de l'ordre de 30 % et une température de l'ordre de 105°C, ou à une teneur en eau de l'ordre de 25 % et une température de l'ordre de 120°C, l'augmentation de la teneur en SDS (de 4 à 15%) s'accompagne d'une augmentation de la teneur en RDS de 10 à 30%. Ces combinaisons de teneur en humidité et de température conduisent en effet à un plus haut degré de gélatinisation de l'amidon de pois, conduisant à une plus grande digestibilité des structures glucidiques de l'amidon de pois natif que dans le premier mode de réalisation du procédé de l'invention.

[0117] Dans un troisième mode de réalisation du procédé conforme à l'invention, à une teneur en eau de l'ordre de 20 % et une température de 105°C ou de 120 °C,

ces conditions intermédiaires de traitement peuvent permettre d'augmenter la teneur en SDS, même si de moins grande amplitude.

[0118] La troisième et dernière étape du procédé conforme à l'invention consiste alors en la récupération et éventuellement le séchage de l'amidon ainsi traité, tel qu'exemplifié ci-après.

[0119] La teneur en humidité résiduelle de l'amidon sec obtenu est inférieure à 15 % en poids, de préférence inférieure ou égale à 12 % en poids.

[0120] La mesure Englyst de digestibilité de ces produits donne des valeurs en SDS augmentées de 5 à 25 % en poids sec, de préférence 10 à 20 % en poids sec par rapport à l'amidon de départ.

[0121] Comme il sera exemplifié ci-après, cette valeur en SDS pour l'amidon de pois est de plus de 35 % en poids sec, de préférence comprise entre 40 et 50 % en poids sec.

[0122] La présente invention concerne également un amidon de pois à haute teneur en fraction lentement digestible préparé selon l'un des procédés décrits ci-dessus, caractérisé en ce que la teneur en SDS est supérieure à 35% en poids, de préférence comprise entre 40 et 50% en poids.

[0123] Ces amidons à haute teneur en SDS seront alors avantageusement mis en œuvre dans les domaines d'applications alimentaires (destinés notamment aux sportifs) ou médicale (nutrition spécialisée).

[0124] L'invention concerne également l'utilisation d'un amidon selon l'invention dans les domaines d'applications alimentaires et médicales, notamment pour l'alimentation des sportifs ou en nutrition spécialisée.

[0125] L'invention sera encore mieux comprise à la lecture des exemples qui suivent, lesquels se veulent illustratifs en faisant seulement état de certains modes de réalisation et de certaines propriétés avantageuses selon l'invention, et non limitatifs.

[0126] Exemple 1 : Traitement d'un premier lot d'amidon natif de pois présentant une teneur en SDS de l'ordre de 33 %

[0127] La teneur en eau d'un lot d'amidon de pois (amidon de pois LN 30 commercialisé par la société Demanderesse), a été ajustée à 20, 25 ou 30 % par agitation dans un robot ménager (Thermomix TM3300, Vorwerk, Allemagne).

[0128] Les échantillons dont l'humidité a été ajustée ont été scellés dans des pots
5 de verre et laissés à l'équilibre pendant une nuit à température ambiante.

[0129] Les échantillons dans les pots scellés ont ensuite été chauffés dans un four à 105, 120 et 135°C pendant 24 heures. Les détails des traitements sont indiqués dans le tableau I.

[0130] Si nécessaire, les échantillons HMT ont été séchés à l'aide d'un séchoir à lit
10 fluidisé (TG200, Retch) à 60°C jusqu'à une humidité égale ou inférieure à 12%, et broyés à l'aide du Thermomix TM3300.

[0131] Tableau I.

Référence des lots traités	Contenu en eau après ajustement (%)	Température (°C)	Durée du traitement (h)
1A	20	105	24
1B	25	105	24
1C	30	105	24
2A	20	120	24
2B	25	120	24
3A	20	135	24

[0132] La digestibilité *in vitro* de l'amidon de pois traité a été analysée selon
15 ENGLYST tel qu'indiqué ci-avant, et les résultats présentés dans le tableau II suivant.

Tableau II

	RDS (%)	SDS (%)	RS _E (%)	RS _A (%)	vSDS (%)
Amidon de pois LN 30	16	33	51	10	41
1A	20	30	50	7	43
1B	18	44	38	8	30
1C	46	37	17	7	10
2A	19	26	55	8	47
2B	37	41	22	8	14
3A	25	48	27	7	20

[0133] À l'exception des traitements 1A et 2A, tous les échantillons HMT ont montré une teneur en RS_E plus faible et une teneur en SDS plus élevée que la contrepartie native.

- [0134]** Tous les échantillons HMT ont également montré une teneur en RDS plus élevée que la contrepartie native. Les résultats indiquent que le HMT a affaibli la structure cristalline de l'amidon de pois natif et a augmenté sa digestibilité, mais en maintenant la teneur en RDS faible à modérée.
- 5 **[0135]** La teneur en SDS la plus élevée provenait de l'échantillon du traitement 3A, suivi de celui du traitement 1B.
- [0136]** Les traitements 1C et 2B ont produit les RDS les plus élevés car ces traitements impliquaient une forte humidité et/ou une température élevée.
- [0137]** Comme décrit précédemment, la température de gélatinisation de l'amidon
- 10 diminue avec l'augmentation de la teneur en humidité.
- [0138]** Par conséquent, les échantillons des traitements 1C et 2B pourraient avoir le degré de gélatinisation le plus élevé, comme l'indique leur enthalpie de gélatinisation inférieure à celle des autres échantillons et de l'amidon de pois natif (Tableau 3 ci-dessous).
- 15 **[0139]** La teneur en RS_A de l'amidon de pois natif a légèrement diminué après le HMT. Cependant, il y avait de grandes différences entre le RS_E et le RS_A , ce qui indique que la plupart du RS_E dans l'amidon de pois natif et les échantillons traités pouvaient être hydrolysés après 2 heures de digestion, c'est-à-dire de l'amidon très lentement digestible (vSDS).
- 20 **[0140]** Les propriétés de gélatinisation ont été analysées à l'aide du DSC 8000 (Perkin Elmer, USA).
- [0141]** Chaque échantillon d'amidon a été mélangé à de l'eau pour obtenir une suspension d'amidon à 18 % (p/p).
- [0142]** La suspension d'amidon (15 mg) a été placée dans un creuset en aluminium
- 25 et fermée hermétiquement. Elle a ensuite été équilibrée à 5°C avant d'être chauffée de 5°C à 110°C à 10°C/min. La température de début (terme anglosaxon d'onset température ou T_o), la température de pointe (peak temperature ou T_p), la température de conclusion (conclusion temperature ou T_c) et l'enthalpie de gélatinisation ont été déterminées à partir de leurs thermogrammes.

[0143] Les résultats obtenus figurent dans le Tableau III suivant

[0144] Tableau III

	T_o (°C)	T_{p1} (°C)	T_{p2} (°C)	T_c (°C)	ΔH (J/g d'amidon)
Amidon de pois LN 30	63.4	71.2	ND*	78.2	13.6
1A	67.7	75.3	ND	81.2	13.7
1B	70.7	Epaulement	84.2	88.5	13.6
1C	78.8	Epaulement	88.5	92.2	13.4
2A	70.7	74.4	83.5	88.5	13.9
2B	67.7	77.1	88.0	91.7	12.3
3A	67.7	75.9	86.3	90.3	13.7

*Non-détecté

[0145] Une augmentation de la température de gélatinisation (T_o , T_p et T_c) a été observée pour tous les échantillons HMT, indiquant que la structure cristalline a été modifiée par les traitements.

[0146] A l'exception du traitement 1A, les autres échantillons de HMT ont montré une T_p supplémentaire à $>80^\circ\text{C}$ (T_{p2}).

[0147] Pour les traitements 1B et 1C, le T_{p2} était plus dominant que le T_{p1} où ce dernier apparaissait comme un épaulement.

[0148] En fait, l'épaulement de l'échantillon après le traitement 1C était plus petit que celui après le traitement 1B (cf. Fig. 1 et 2), probablement en raison de l'humidité plus élevée dans le premier.

[0149] Les résultats ont également indiqué que les échantillons HMT étaient plus résistants à la chaleur que l'amidon de pois natif.

[0150] Exemple 2 : Traitement d'un deuxième lot d'amidon natif de pois présentant une teneur en SDS de l'ordre de 24 %

[0151] La teneur en eau d'un lot d'amidon de pois natif (amidon de pois natif N-735 commercialisé par la société Demanderesse), a été ajustée comme dans l'exemple 1.

Tableau IV

Référence des lots traités	Contenu en eau après justement (%)	Température (°C)	Durée du traitement (h)
4A	20	105	24
4B	25	105	24
4C	30	105	24

5A	20	120	24
5B	25	120	24
6A	20	135	24

[0152] Les échantillons ont été testés pour leur digestibilité *in vitro* et leurs propriétés de gélatinisation en suivant les mêmes méthodes que dans l'exemple 1.

[0153] Tableau V

	RDS (%)	SDS (%)	RS _E (%)	RS _A (%)	vSDS (%)
Amidon de pois natif N-735	15	24	61	17	44
4A	15	34	51	10	41
4B	18	43	39	8	31
4C	42	37	21	6	15
5A	14	36	50	9	40
5B	35	39	26	6	20
6A	21	41	38	8	30

[0154] Tous les échantillons HMT ont également montré une teneur en SDS plus élevée et une teneur en RS_E plus faible que la contrepartie native, indiquant que le HMT a affaibli la structure cristalline de l'amidon de pois natif et a augmenté sa digestibilité.

[0155] A l'exception des traitements 4C et 5B, les teneurs en RDS sont restées faibles (21 % ou moins). Comme dans l'exemple 1, les deux teneurs en SDS les plus élevées provenaient des échantillons des traitements 4B et 6A.

[0156] Comme dans l'exemple 1, les traitements 4C et 5B ont produit les RDS les plus élevés parce que ces traitements impliquaient une humidité et/ou une température élevée. En conséquence, ces échantillons pourraient avoir le plus haut degré de gélatinisation comme l'indique leur enthalpie de gélatinisation plus basse que celle des autres échantillons et de l'amidon de pois natif (Tableau VI ci-après).

[0157] La teneur en RS_A de l'amidon de pois natif a légèrement diminué après la HMT. Cependant, comme dans l'exemple 1, il y avait de grandes différences entre le RS_E et le RS_A, indiquant que la plupart du RS_E dans l'amidon de pois natif et les échantillons traités étaient des vSDS.

[0158] Les propriétés de gélatinisation sont déterminées comme dans l'exemple 1.

[0159] Tableau VI

	T _o (°C)	T _{p1} (°C)	T _{p2} (°C)	T _c (°C)	ΔH (J/g starch)
--	---------------------	----------------------	----------------------	---------------------	-----------------

Amidon de pois natif N-735	61.0	69.3	ND	78.2	13.6
4A	67.4	75.9	ND	82.5	14.2
4B	69.7	Epaulement	82.2	88.0	12.7
4C	66.2	Epaulement	85.0	89.5	11.9
5A	70.6	Epaulement	81.6	87.5	13.1
5B	66.9	76.5	86.9	91.0	11.5
6A	67.6	75.9	86.3	90.3	12.3

[0160] Comme dans l'exemple 1, une augmentation de la température de gélatinisation (T_o , T_p et T_c) a été observée pour tous les échantillons HMT, indiquant que la structure cristalline a été modifiée par les traitements. A l'exception du traitement 4A, les autres échantillons HMT ont montré une T_p2 à $>80^\circ\text{C}$.

- 5 **[0161]** Il semble qu'il y ait eu deux populations de granules après le traitement HMT, peut-être parce que l'humidité limitée n'a pas été distribuée uniformément parmi les granules d'amidon.

[0162] Les résultats indiquent également que les échantillons HMT étaient plus résistants à la chaleur que l'amidon de pois natif.

Revendications

[Revendication 1] Procédé de préparation d'un amidon de légumineuse à haute teneur en fraction lentement digestible (SDS), procédé de traitement à la chaleur humide (HMT) caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 1) Ajuster la teneur en eau de l'amidon de pois natif à une valeur inférieure à 35 %, de préférence comprise entre 20 et 30 % en poids, de manière encore plus préférée encore 20 et 25% en poids,
- 2) Chauffer l'amidon ainsi préparé à une température de plus de 100°C, de préférence de 105°C à 135°C et pendant plus de 5 heures, de préférence pendant
- 10 plus de 10 heures, et plus préférentiellement encore pendant 24 heures,
- 3) Récupérer et éventuellement sécher l'amidon ainsi traité.

[Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'amidon de légumineuse est choisi dans le groupe des amidons le pois, de haricot, de fève, de fève, de lentille, de luzerne, de trèfle et de lupin, et est particulièrement

15 l'amidon de pois.

[Revendication 3] Procédé selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la haute teneur en fraction lentement digestible (SDS) correspond une augmentation de 5 à 25 % en poids sec, de préférence 10 à 20 % en poids sec par rapport à l'amidon de départ.

20 **[Revendication 4]** Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste à ajuster la teneur en eau de l'amidon de pois natif à 25 % en poids et à le chauffer à 105°C ou bien à ajuster sa teneur en eau à 20 % en poids et le chauffer à 135°C, de manière à augmenter la teneur en SDS de 10 à 20 % par rapport à l'amidon de pois natif de départ sans augmenter la teneur en

25 RDS de plus de 5 à 10 %.

[Revendication 5] Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à ajuster la teneur en eau de l'amidon de pois natif à 30 % en poids et à le chauffer à 105°C ou bien à ajuster sa teneur en eau à 25 % en poids et le chauffer à 120°C de manière à augmenter la teneur en SDS de 4 à 15 % par rapport à

l'amidon de pois natif de départ, et à augmenter la teneur en RDS de 10 à 30 % par rapport à l'amidon de pois natif de départ.

- [Revendication 6]** Amidon de pois à haute teneur en fraction lentement digestible préparé selon le procédé de l'une quelconque des revendications précédentes,
- 5 caractérisé en ce que la teneur en SDS est supérieure à 35% en poids, de préférence comprise entre 40 et 50 % en poids.

[Revendication 7] Utilisation d'un amidon selon la revendication 6 dans des domaines d'applications alimentaires et médicales, notamment pour l'alimentation des sportifs ou en nutrition spécialisée.