

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
24 octobre 2019 (24.10.2019)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2019/201830 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A23J 1/06 (2006.01) C12P 21/06 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)

GEM, Polytech'Lille, Université Lille 1, Bd P. Langevin,
59655 VILLENEUVE D'ASCQ (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2019/059614

(74) Mandataire : **LE GUEN MAILLET 728** ; 3 impasse de la
Vigie, CS 71840, 35418 SAINT MALO Cedex (FR).

(22) Date de dépôt international :

15 avril 2019 (15.04.2019)

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

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1853361 17 avril 2018 (17.04.2018) FR

(71) Déposant : **SARIA INDUSTRIES** [FR/FR] ; 24, rue
Martre, 92110 CLICHY (FR).

(72) Inventeurs : **SION, Ludvine** ; C/O SARIA INDUS-
TRIES, 24, rue de Martre, 92110 CLICHY (FR). **PRZY-
BYLSKI, Rémi** ; C/O LABORATOIRE PROBIOGEM,
Polytech'Lille, Université Lille 1, Bd P. Langevin, 59655
VILLENEUVE D'ASCQ (FR). **DHULSTER, Pascal** ; C/O
LABORATOIRE PROBIOGEM, Polytech'Lille, Universi-
té Lille 1, Bd P. Langevin, 59655 VILLENEUVE D'ASCQ
(FR). **NEDJAR, Naïma** ; C/O LABORATOIRE PROBIO-

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

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING A PEPTIDE HYDROLYSATE FROM ANIMAL BLOOD PROTEINS, AND PEPTIDE HYDROLYSATE OBTAINED IN THIS WAY

(54) Titre : PROCEDE D'OBTENTION D'UN HYDROLYSAT PEPTIDIQUE A PARTIR DE PROTEINES DE SANG D'ANIMAUX, ET HYDROLYSAT PEPTIDIQUE AINSI OBTENU

(57) Abstract: The present invention concerns a method for obtaining a peptide hydrolysate, from blood proteins from slaughter houses, and a peptide hydrolysate obtained by such a method. To this end, the method comprises obtaining the blood, adding an anticoagulant, an enzymatic hydrolysis reaction, stopping the hydrolysis reaction, bleaching the hydrolysis product and separating the hydrolysis product into a fraction containing a peptide hydrolysate and a fraction containing haem, characterised in that the whole blood obtained is introduced into a reactor inside which all the enzymatic hydrolysis and bleaching reactions are carried out, at ambient temperature, the enzymatic hydrolysis reaction being carried out on the whole blood by adding enzyme and adjusting the pH to an acid value lower than 4 for a reaction time of up to 48 hours, then stopped by increasing the pH to a basic value higher than 8.5, the bleaching of the hydrolysis product then being carried out by reducing the pH to an acid value lower than 5, the constituents of the hydrolysis product then being separated into a bleached fraction containing peptides and a fraction containing haem residues.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'obtention d'un hydrolysat peptidique, à partir de protéines de sang issu d'abattoirs, ainsi qu'un hydrolysat peptidique obtenu par un tel procédé. A cet effet, le procédé comprend l'obtention du sang, l'ajout d'un anticoagulant, une réaction d'hydrolyse enzymatique, l'arrêt de la réaction d'hydrolyse, la décoloration du produit d'hydrolyse et la séparation du produit d'hydrolyse en une fraction contenant un hydrolysat peptidique et une fraction contenant de l'hème, caractérisé en ce que le sang entier obtenu est introduit dans un réacteur à l'intérieur duquel l'ensemble des réactions d'hydrolyse enzymatique et de décoloration sont réalisées, à température ambiante, la réaction d'hydrolyse enzymatique étant réalisée sur le sang entier par l'ajout d'enzyme et l'ajustement du pH à une valeur acide inférieure à 4 pendant un temps de réaction s'étendant jusqu'à 48h, puis arrêtée par élévation du p H jusqu'à une valeur basique supérieure à 8,5, la décoloration du produit de l'hydrolyse étant ensuite réalisée par abaissement du pH jusqu'à une valeur acide inférieure à 5, puis les constituants du produit de l'hydrolyse étant séparés en une fraction décolorée contenant des peptides et une fraction contenant des résidus d'hème.

Publiée:

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

PROCEDE D'OBTENTION D'UN HYDROLYSAT PEPTIDIQUE A
PARTIR DE PROTEINES DE SANG D'ANIMAUX, ET HYDROLYSAT
PEPTIDIQUE AINSI OBTENU

La présente invention concerne un procédé d'obtention d'un hydrolysat peptidique, à partir de protéines de sang issu d'abattoirs, ainsi qu'un hydrolysat peptidique obtenu par un tel procédé.

La production de viande issue des abattoirs produit annuellement une grande
5 quantité de co-produits, des déchets susceptibles d'engendrer des problèmes
environnementaux et économiques. Dans ce contexte, la question de la valorisation de
ces co-produits s'est développée. Ces co-produits contiennent, en effet, de la matière
valorisable, telle que le sang. Le sang, composé de plasma, de globules blancs, de
globules rouges et de plaquettes, est très riche en protéines, notamment en hémoglobine.
10 De plus chez certaines espèces telle que la volaille, le sang est également une source
d'acides nucléiques. En effet, dans le sang de volaille, contrairement au sang de
mammifères, les érythrocytes possèdent un noyau renfermant l'information génétique
sous forme d'acides nucléiques.

On sait aujourd'hui que les solutions riches en protéines, d'origine végétale ou
15 animale, présentent de hautes valeurs biologiques. De nombreuses études ont ainsi été
menées sur les activités biologiques d'hydrolysats de protéines issues de différentes
sources, notamment d'hémoglobine.

Des études ont ainsi démontré que des peptides obtenus après hydrolyse
enzymatique d'hémoglobine bovine présentaient une activité antimicrobienne (Nedjar-
20 Arroume et al. ; Peptides, Volume 29, June 2008; pages 969–77). De telles propriétés
sont tout à fait intéressantes et démontrent que ces hydrolysats peuvent être utilisés en
tant que conservateurs, en particulier pour la conservation de produits périssables, par
exemple des aliments. C'est notamment le cas du peptide α 137-141, la néokyotorphine,
obtenue à partir d'hémoglobine, dont les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes
25 utiles dans la conservation de la viande ont été validées (Rémi Przybylski, et al.,
Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its

potential application on meat as preservative, Food Chemistry, Volume 211, 15 November 2016, Pages 306-313).

D'autres propriétés tout à fait intéressantes des hydrolysats peptidiques issus de l'hémoglobine ont été par ailleurs démontrées. On citera notamment des activités
5 opioïdes, antihypertensives, analgésiques, potentialisatrices de la bradykinine, hématopoïétiques, coronaro-constrictrices, de stimulation de la croissance bactérienne, hypolipidémiantes (Nedjar-Arroume, et al.. 2008. Peptides, 29, 969-977) (Barkhudaryan, et al. 1993. FEBS Letters, 329, 215-218.) (Ivanov, V. T., et al. 1992. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 1271-1311.) (Kagawa, K., et al. Life
10 Sciences, 58, 1745-1755.) (Nyberg, F., et al. (1997). Biopolymers, 43, 147-156.) (Piot, J. M., et al. 1992. FEBS Letters, 299, 75-79.) (Takagi, H., et al. 1982. Life Sciences, 31, 1733-1736.) (Zhao, Q., et al. 1996a. Applied Microbiology and Biotechnology, 45(6), 778-784.) (Zhao, Q. Y. et al. 1997b. Neuropeptides, 2, 147-153.).

Ainsi, de par leur propriétés biologiques, telles qu'antimicrobiennes, les
15 hydrolysats peptidiques issus du sang pourraient potentiellement être utilisés dans de nombreux domaines, par exemple dans les domaines de l'alimentaire, en tant que conservateurs, ou de la thérapeutique ou nutraceutique, en tant qu'alternatives aux antibiotiques, notamment en nutrition animale, mais encore en tant que substances actives destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à
20 en prévenir l'action ou à les combattre dans l'agriculture.

Les acides nucléiques susceptibles d'être obtenus de sang de volailles, peuvent trouver des applications en pharmacie, en cosmétique, en nutrition et dans le domaine des diagnostics.

Cependant, si l'intérêt de récupérer et de valoriser le sang issu des abattoirs, de
25 manière à en obtenir des composés à activité biologique, tels que les hydrolysats peptidiques, une fraction héminique et/ou des acides nucléiques, est admis, il demeure encore le besoin de proposer des procédés de valorisation écologiques et économiques. En effet, un principe essentiel à respecter est que la valorisation des co-produits d'abattoirs ne doit pas être contrebalancée par des méthodes consommatrices d'énergie, peu économiques, ou qui nécessitent l'utilisation de matières ou de produits toxiques
30 ou polluants. En outre, les hydrolysats peptidiques obtenus se doivent d'être efficaces sur le plan de leurs activités biologiques, et aptes à être utilisés sans générer aucune problématique.

Or, l'ensemble de ces objectifs n'est pas réalisé dans l'état de la technique.

Les procédés d'obtention d'hydrolysats peptidiques de sang de l'état de la technique font intervenir, après la collecte de sang, une étape de séparation du plasma et du cruor. Le cruor, qui se trouve presque exclusivement composé d'hémoglobine, est conservé et l'hémoglobine qu'il contient est ensuite soumise à une digestion enzymatique à l'aide d'une enzyme, par exemple la pepsine porcine. Certains procédés de l'état de la technique proposent en outre d'extraire l'hémoglobine des globules rouges par hémolyse. Après digestion enzymatique, une fraction enrichie en peptides est obtenue. A l'issue de ce procédé, la fraction peptidique obtenue présente une coloration identique à celle du cruor. En effet, les solutions ou produits obtenus à partir du sang sont fortement colorés par l'hème portée par l'hémoglobine. Or, la présence de composés colorés est indésirable et incompatible avec les applications des hydrolysats peptidiques envisagées, en particulier lorsqu'il est envisagé de les utiliser en tant que conservateurs ou de les destiner à l'alimentation ou la thérapeutique. En effet le fer contenu dans l'hème active l'oxydation des aliments dans les formulations. De plus, on note que la présence des molécules responsables de cette coloration confère un goût et une odeur indésirables.

Pour obtenir des hydrolysats peptidiques issus d'hémoglobine ne présentant pas de phénomènes de coloration, il est nécessaire de rompre la liaison entre les molécules d'hème et la globine ou les peptides. Toutefois, cette liaison est forte. Pour y parvenir, il a été proposé dans l'état de la technique différentes méthodes, telles que l'utilisation de traitements à hautes pressions hydrostatiques (Toldrà et al. 2011), l'utilisation de solvants (Ontiveros et al., 2014 ; Adje et al., 2011 ; Froidevaux et al., 2006), l'utilisation de procédés membranaires (Lebrun et al. 1998 ; Dhulster et al. 2002) ou encore l'utilisation d'agents absorbants (Autio et al., 1984 ; demande de brevet n° EP 0159231 A1 (Piot et al. 1985) ; LEE et al., 1990). D'autres méthodes utilisant des agents blanchissants, tels que de l'eau oxygénée ou des alcools, tels que de l'éthanol, ont été également proposées.

Pour obtenir une fraction enrichie en acides nucléiques, les techniques identifiées dans l'état de l'art utilisent des détergents ou des alcools nécessitant des étapes lourdes de purification et de traitement et un nombre important d'étapes. Ces étapes sont destructrices pour le sang total : mis à part les acides nucléiques, rien d'autre ne peut être récupéré. Il ne peut donc pas y avoir de possibilité de produire un hydrolysat peptidique ou une fraction enrichie en hème.

Pour l'ensemble de ces méthodes, on relève un grand nombre d'inconvénients, notamment l'utilisation de produits peu écologiques, voire toxiques, nécessitant la mise en place de solutions de recyclage, des étapes souvent complexes à l'aide d'appareils coûteux, l'augmentation du coût du procédé, une efficacité de décoloration non satisfaisante, l'apparition de produits secondaires indésirables, l'obtention de caractéristiques gustatives, olfactives ou visuelles peu satisfaisantes des hydrolysats ainsi décolorés.

C'est dans ce contexte qu'a travaillé la société déposante de manière à proposer un procédé d'obtention d'un hydrolysate peptidique à partir de sang, qui ne présente pas les inconvénients précités des procédés connus et utilisés à ce jour.

Ainsi, un but de la présente invention est de proposer un procédé standardisé et contrôlé d'obtention d'un hydrolysate peptidique à partir de sang, qui soit éco-responsable, écologique et économique, de manière à rendre maximale la valorisation du sang, et grâce auquel les hydrolysats peptidiques obtenus sont à la fois fonctionnels sur le plan des activités biologiques, telles que celles mentionnées précédemment, et directement utilisables dans tout genre d'industrie, ou pour toute application alimentaire, agroalimentaire, agricole, thérapeutique ou nutraceutique, et qui pour ce faire, ne présente pas de phénomènes de coloration.

A cet effet, l'invention concerne un procédé d'obtention d'un hydrolysate peptidique à partir de sang animal, comprenant l'obtention du sang, l'ajout d'un anticoagulant, une réaction d'hydrolyse enzymatique, l'arrêt de la réaction d'hydrolyse, la décoloration du produit d'hydrolyse et la séparation du produit d'hydrolyse en une fraction contenant un hydrolysate peptidique et une fraction contenant de l'hème. Le procédé selon l'invention se caractérise en ce que le sang entier obtenu est introduit dans un réacteur à l'intérieur duquel l'ensemble des réactions d'hydrolyse enzymatique et de décoloration sont réalisées, à température ambiante, la réaction d'hydrolyse enzymatique étant réalisée sur le sang entier par l'ajout d'enzyme et l'ajustement du pH à une valeur acide inférieure à 4 pendant un temps de réaction s'étendant jusqu'à 48h, puis arrêtée par élévation du pH jusqu'à une valeur basique supérieure à 8,5, la décoloration du produit de l'hydrolyse étant ensuite réalisée par abaissement du pH jusqu'à une valeur acide inférieure à 5, puis les constituants du produit de l'hydrolyse étant séparés en une fraction décolorée contenant des peptides et une fraction contenant l'hème.

Le procédé selon l'invention répond aux objectifs attendus. Il permet de manière éco-responsable, écologique et économique, de valoriser des co-produits d'abattoirs en obtenant un hydrolysate peptidique issu de protéines de sang présentant une composition constante en peptides, dépourvu d'hème ou de résidus d'hème susceptibles de lui conférer une couleur. En outre, les peptides présentent des activités biologiques, notamment opioïdes, antihypertensives, analgésiques, potentialisatrices de la bradykinine, hématopoïétiques, coronaro-constructrices, de stimulation de la croissance bactérienne, hypolipidémiantes, telles que celles décrites dans l'état de la technique.

Le procédé est mis en œuvre sur du sang entier, tel que collecté dans les abattoirs, c'est-à-dire sans séparation du plasma et du cruor, ni extraction d'hémoglobine par hémolyse des globules rouges. Cette caractéristique du procédé participe à la caractéristique d'éco-responsabilité puisqu'il utilise la totalité de la matière première. Elle permet d'obtenir un hydrolysate enrichi en peptides non seulement issus d'hémoglobine mais également issus de protéines du plasma. De plus, l'ajout d'anticoagulant au sang entier, tel que le citrate ou le phosphate de sodium, rend cette matière première homogène et évite également la perte de matière par phénomènes de coagulation.

L'ensemble des étapes du procédé se déroule à température ambiante, c'est-à-dire entre 15 et 25°C, plus généralement à 23°C. Le seul facteur dont dépendent les étapes d'hydrolyse enzymatique, d'arrêt de l'hydrolyse et de décoloration, est le pH. Il convient en effet de noter que dans les procédés de l'état de la technique, l'étape d'hydrolyse enzymatique est au contraire menée à une température proche de 37°C. Le respect de la température ambiante est avantageux en termes de réduction de la consommation d'énergie.

Ainsi, l'étape d'hydrolyse enzymatique est conduite à température ambiante à un pH acide, préférentiellement compris entre 3 et 4, de manière à conserver le milieu homogène, sans précipitation de l'hème, avec une hydrolyse totale des protéines et des chaînes alpha et bêta de l'hémoglobine sans perte de peptides.

L'arrêt de l'hydrolyse se fait en milieu alcalin par ajout de base jusqu'à un pH basique, préférentiellement compris entre 8,5 et 10, afin d'inactiver irréversiblement l'enzyme et de conserver un milieu homogène.

L'étape de décoloration ne fait intervenir ni solvants organiques, ni membranes, ni agents adsorbants, ni décolorants, ni traitements haute pression, ni autre étape intermédiaire complexe susceptible de diminuer le rendement d'obtention des peptides.

Cette étape est réalisée de manière simple et efficace, par abaissement du pH à une valeur acide, préférentiellement comprise entre 4 et 5. Lors de cette étape, 100% de l'hème est précipitée et la totalité des peptides obtenus à l'issue de l'hydrolyse est conservée.

- 5 Il convient de noter que les étapes d'hydrolyse enzymatique, d'arrêt de l'hydrolyse et de décoloration, sont réalisées au sein d'un même réacteur de manière à rendre le procédé simple, sans perte de matière, et d'économiser le temps.

La séparation des produits de l'hydrolyse est réalisée par une méthode de séparation physique du type de celles connues de l'homme du métier. La fraction
10 d'hydrolysats peptidique obtenue à l'issue du procédé contient plus de 99,9 % de peptides et moins de 0,1 % d'hème.

La fraction enrichie en peptides est directement valorisable. Elle peut être avantageusement neutralisée, déminéralisée, concentrée, séchée à basse température et/ou lyophilisée si nécessaire.

- 15 Selon une caractéristique de l'invention, le sang entier est du sang d'origine porcine, bovine, ovine, équine, lapine ou aviaire, de volailles, ou un mélange, préférentiellement du sang bovin ou porcin.

Lorsqu'il s'agit d'un mélange de sang de différents animaux, ce mélange est par exemple composé de 70 % de sang de bovin et de 30% de sang de porcin.

- 20 Avantageusement, l'enzyme utilisée lors de l'étape d'hydrolyse enzymatique est une enzyme protéolytique active à pH acide, de préférence de la pepsine porcine.

De manière préférée, il s'agira d'une pepsine porcine EC 3.4.23.1 (classification selon la Commission des Enzymes).

- Avantageusement, la réaction d'hydrolyse enzymatique est réalisée selon un
25 ratio enzyme/substrat (E/S) compris entre 1/10 et 1/1000.

Selon certains modes de réalisation, le procédé comporte, préalablement à l'hydrolyse enzymatique, une étape de dilution du sang, de manière à obtenir une solution qui contient entre 1 et 12 %, en poids, d'hémoglobine.

Avantageusement, cette dilution est réalisée à l'aide d'eau.

- 30 Avantageusement encore, dans le procédé selon l'invention, les ajustements du pH à des valeurs acides sont réalisés à l'aide d'acide chlorhydrique, d'acide phosphorique d'acide sulfurique ou d'un mélange. L'ajustement du pH à une valeur basique est, quant à lui, réalisé à l'aide d'hydroxyde ou de carbonate de sodium,

d'hydroxyde de calcium, d'hydroxyde d'ammonium ou d'un mélange desdits composés.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le procédé est réalisé sur du sang riche en acides nucléiques comme le sang de volaille et comprend, après l'arrêt
5 de la réaction d'hydrolyse et avant la décoloration du produit d'hydrolyse, une étape de séparation des acides nucléiques du reste du produit d'hydrolyse et la récupération de cette fraction.

La séparation des acides nucléiques du reste du produit de l'hydrolyse est réalisée par une méthode de séparation physique du type de celles connues de l'homme
10 du métier, par exemple, par centrifugation. La fraction obtenue à l'issue du procédé contient plus de 93 % d'acides nucléiques.

L'invention concerne encore un hydrolysate peptidique tel que celui obtenu à l'issue du procédé décrit précédemment. Un tel hydrolysate peptidique présente les
15 caractéristiques suivantes :

- absence de protéines non hydrolysées,
- absence de résidus d'hème,
- 100% de peptides présentant un poids moléculaire inférieur à 10 000

Da.

20 Le profil moléculaire est standardisé et la composition des peptides est constante. Parmi ces peptides, sont identifiés des peptides à activités opioïdes, antihypertensives, analgésiques, potentialisatrices de la bradykinine, hématopoïétiques, hypolipémiants ou coronaro-constrictives.

L'absence de protéines non hydrolysées permet de limiter, voire de supprimer,
25 les éventuels phénomènes d'allergies lorsque l'hydrolysate selon l'invention est destiné à l'alimentation humaine ou animale.

L'hydrolysate étant produit à partir de sang entier, des peptides issus de protéines du plasma sont avantageusement obtenus.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un hydrolysate peptidique obtenu à
30 l'aide d'un procédé selon l'invention à titre d'agent antimicrobien naturel et/ou d'antioxydant, en particulier à titre de conservateur d'aliments tels que les produits carnés, notamment destinés aux animaux, à titre de supplément nutritionnel destiné aux animaux, pour renforcer les défenses immunitaires des animaux, lutter contre le stress et/ou améliorer le calme et le bien-être des animaux, réguler la prise alimentaire des

animaux, les animaux étant de préférence des animaux de compagnie ou d'élevage, et de préférence encore des chiens ou des chats.

Enfin, l'invention concerne encore une fraction d'acides nucléiques susceptible d'être obtenu par un procédé tel que défini précédemment, à partir de sang de volaille, la fraction comprenant au moins 93 % d'acides nucléiques, en poids.

Les caractéristiques de l'invention mentionnées ci-dessus, ainsi que d'autres, apparaîtront plus clairement à la lecture de la description suivante d'un de ses modes de réalisation.

Exemple 1 :

10

Le produit de départ est un mélange de sang entier 70% bovin 30% porcin, récupéré d'abattoir. A ce sang est ajouté du citrate de sodium (concentration 10% en masse) en tant qu'anticoagulant dès la récolte en abattoir pour conserver un milieu homogène et sans perte de matière première. Le sang est ensuite introduit dans un réacteur. L'ensemble est conservé à 4°C. Cette étape permet d'inhiber la croissance de contaminants tels que des bactéries.

15

La concentration en hémoglobine est dosée puis ajustée à 10% massique par ajout d'eau le jour de la mise en œuvre du procédé.

La solution est amenée à température ambiante (23°C) et le pH est ajusté à 4 par l'ajout d'acide phosphorique dilué à ¼ volumique. Pour un rapport enzyme substrat de 1/50 (mole/mole), 44000 UA de pepsine par g d'hémoglobine sont dilués dans un tampon phosphate 0,2 M à pH 3 puis ajoutés à 1 litre du mélange de sang 70% bovin-30% porcin, dilué à 10% en hémoglobine. Le pH du réacteur est abaissé à une valeur de 3 par ajout d'acide phosphorique ¼ volumique sans précipitation de l'hème et en milieu homogène.

25

L'ensemble est maintenu 24 heures sous agitation à 23°C.

L'arrêt de l'hydrolyse est réalisé par ajout d'une solution de NaOH à 30% jusqu'à un pH de 9 au sein du même réacteur. L'hydrolysât peptidique obtenu est homogène.

30

La décoloration du produit de l'hydrolyse est ensuite effectuée par abaissement du pH à 4 par ajout d'acide phosphorique ¼ volumique.

La séparation de l'hème est réalisée par centrifugation durant 10 minutes à 5000 g. Le surnageant contenant l'hydrolysât peptidique récupéré est décoloré. 100%

de l'hème est récupéré dans le culot. Le séchage du surnageant est réalisé par lyophilisation ou atomisation.

L'hydrolysate peptidique obtenu a été analysé par spectrométrie de masse de manière à vérifier et valider la présence de peptides issus de l'hémoglobine et dont les activités biologiques ont été caractérisées. Les références bibliographiques décrivant les
5 activités biologiques connues de chacun de ces peptides sont indiquées dans les Tableaux 1 à 8 ci-dessous.

Tableau 1 : Peptides antimicrobiens

Position	Séquence	Références
α 1-23	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAE	Nedjar et al., (2008)
α 1-27	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAE	Nedjar et al., (2008)
α 1-28	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEA	Nedjar et al., (2008)
α 1-29	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEAL	Nedjar et al., (2008)
α 1-32	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERM	Nedjar et al., (2008)
α 1-33	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMF	Adje et al., (2011a)
α 1-46	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHF	Adje et al., (2011a)
α 3-36	SAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMFLSF	Adje et al., (2011a)
α 33-45	FLSFPTTKTYFPH	Nedjar et al., (2008)
α 33-46	FLSFPTTKTYFPHF	Nedjar et al., (2008)
α 33-66	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	Nedjar et al., (2008)
α 33-83	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSEL	Nedjar et al., (2008)
α 33-97	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVN	Nedjar et al., (2008)
α 33-98	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	Nedjar et al., (2008)
α 34-46	LSFPTTKTYFPHF	Nedjar et al., (2008)
α 34-65	LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAA	Adje et al., (2011a)
α 34-66	LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	Nedjar et al., (2008)
α 34-83	LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSEL	Nedjar et al., (2008)
α 34-98	LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	Nedjar et al., (2008)
α 36-45	LSFPTTKTYFPH	Nedjar et al., (2008)
α 36-97	FPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVN	Nedjar et al., (2008)
α 37-46	PTTKTYFPHF	Nedjar et al., (2008)
α 37-98	PTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	Nedjar et al., (2008)
α 62-91	VAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKL	Adje et al., (2011a)
α 67-106	TKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSL	Adje et al., (2011a)
α 73-105	LDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSL	Adje et al., (2011a)
α 86-109	LHAHKLRVDPVNFKLLSHSLVTL	Adje et al., (2011a)
α 96-106	VNFKLLSHSL	Adje et al., (2011a)
α 99-105	KLLSHSL	Adje et al., (2011a)

α 99-106	KLLSHSLL	Adje et al., (2011a)
α 100-105	LLSHSL	Adje et al., (2011a)
α 106-141	LVTLASHLPSDFTP AVHASL DKFLANVSTVLT SKYR	Adje et al., (2011a)
α 107-128	VTLASHLPSDFTP AVHASL DKF	Adje et al., (2011a)
α 107-133	VTLASHLPSDFTP AVHASL DKFLANVSTVL	Nedjar et al., (2008)
α 107-136	VTLASHLPSDFTP AVHASL DKFLANVS	Nedjar et al., (2008)
α 107-141	VTLASHLPSDFTP AVHASL DKFLANVSTVLT SKYR	Nedjar et al., (2008)
α 110-141	ASHLPSDFTP AVHASL DKFLANVSTVLT SKYR	Adje et al., (2011a)
α 133-141	TVLT SKYR	Nedjar et al., (2008)
α 137-141	TSKYR	Nedjar et al., (2008)
β 1-13	MLTAE EKAAVTAFW	Nedjar et al., (2008)
β 1-30	MLTAE EKAAVTAFW GKVKVDEVGGEALGRLL	Nedjar et al., (2008)
β 77-125	LDDLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFKLLGNVLVVVLARN FGKEFTPVL	Adje et al., (2011a)
β 79-104	LKGTFAALSELHCDKLHVDPENFKL	Adje et al., (2011a)
β 85-105	ALSELHCDKLHVDPENFKLL	Adje et al., (2011a)
β 114-124	LLGNVLVVVLA	Adje et al., (2011a)
β 114-145	LLGNVLVVVLARNFGKEFTPVLQADFQKVVAGVANALAH RYH	Nedjar et al., (2008)
β 121-145	TPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH	Nedjar et al., (2008)
β 126-145	ADFQKVVAGVANALAHRYH	Nedjar et al., (2008)
β 140-145	LAHRYH	Nedjar et al., (2008)

Tableau 2 : Peptides opioïdes

Position	Séquence	Références
α 137-141	TSKYR	Takagi et al. (1982)
α 137-140	TSKY	Blishchenko et al. (1996)
α 137-139	TSK	Orts et al. (1978)
α 140-141	YR	Fukui et al. (1983)
β 31-40	LVVYPWTQRF	Piot et al. (1992)
β 32-40	VVYPWTQRF	Piot et al. (1992)
β 31-39	LVVYPWTQR	Glamsta et al. (1991)
β 32-39	VVYPWTQR	Nyberg et al. (1997)
β 34-39	YPWTQR	Nyberg et al. (1997)
β 31-38	LVVYPWTQ	Zhao et al. (1997b)
β 32-38	VVYPWTQ	Zhao et al. (1997b)
β 34-38	YPWTQ	Brantl et al. (1986)
β 31-37	LVVYPWT	Lignot et al. (1999)
β 32-37	VVYPWT	Lignot et al. (1999)
β 34-37	YPWT	Brantl et al. (1986)

Tableau 3 : Peptides antihypertenseurs

Position	Séquence	Références
α 67-106	TKAVEHLDDLPGALSELSDL- - -- HAHKLRVDPVNFKLLSHSL	Adje et al. (2011b)
α 73-105	LDDLPGALSELSDLHAHKL-- --RVDPVNFKLLSHSL	
α 99-105	KLLSHSL	
α 100-105	LLSHSL	

5

Tableau 4 : Peptide analgésique et potentialisateur de la bradykinine

Position	Séquence	Références
α 110-125	ASHLPSTFTPAVHASL	Zhao et al., 1996
α 129-134	LANVST	Piot et al. (1992)
β 129-134	QKVVAG	Piot et al., 1992

Tableau 5 : Peptides hématopoïétiques

Position	Séquence	Références
α 1-8	VLSAADKG	Ivanov et al., 1992
α 1-13	VLSAADKGNVKAA	Ivanov et al., 1992
α 1-16	VLSAADKGNVKAAWGK	Ivanov et al., 1992
α 3-10	SAADKGNV	Ivanov et al., 1992
α 16-28	KVGGHAAEYGAEA	Ivanov et al., 1992
α 17-29	VGGHAAEYGAEAL	Ivanov et al., 1992
α 17-28	VGGHAAEYGAEA	Ivanov et al., 1992
α 22-29	AEYGAEAL	Ivanov et al., 1992
α 25-31	GAEALER	Ivanov et al., 1992
α 27-30	EALE	Ivanov et al., 1992
β 2-12	LTAEKAAVTA	Ivanov et al., 1992
β 2-11	LTAEKAAVT	Ivanov et al., 1992
β 2-10	LTAEKAAV	Ivanov et al., 1992
β 16-31	KVKVDE	Ivanov et al., 1992
β 22-31	VGGEALGRLL	Ivanov et al., 1992
β 115-122	RNFGKEFT	Ivanov et al., 1992
α 76-82	LPGALSE	Vercaigne-Marko et al., 2000
β 94-100	KLHVDPE	Vercaigne-Marko et al., 2000

Tableau 6 : Peptides coronaro-constructeurs

Position	Séquence	Références
β 32-36	VVYPW	Barkhudaryan et al. (1992)
α 1-21	VLSAADKGNVKAAWGKVGGA	Barkhudaryan et al. (1993)
β 133-145	VAGVANALAHRYH	Barkhudaryan et al. (1993)

5

Tableau 7 : Peptide stimulateur de la croissance bactérienne

Position	Séquence	Références
β 48-52	STADA	Zhao et al. (1996a)

Tableau 8 : Peptide hypolipidémiant

Position	Séquence	Références
β 32-35	VVYP	Kagawa et al. (1996)

Tableau 9 : Peptides inhibiteurs de l'angiotensine convertase (ECA-I)

Position*	Séquence	Références
β 129-134*	KVVAGV	Mito et al. (1996)
β 129-135*	KVVAGVA	Mito et al. (1996)
β 118-126*	KEFTPVLQA	Mito et al. (1996)
β 64-69*	GKKVLQ	Mito et al. (1996)
β 130-135*	FKVVAG	Mito et al. (1996)
β 130-136*	FKVVAGV	Mito et al. (1996)
β 34-46*	LGFP TTKTYFPHF	Yu et al. (2006)
β 34-39*	VVYPWT	Yu et al. (2006)
α 67-106	TKAVEHLDDLPGALSELSDL- -HAHKLRVDPVNFKLLSHSLL	Yaba Adje et al. (2010)
α 73-105	LDDLPGALSELSDLHAHKL- -RVDPVNFKLLSHSL	Yaba Adje et al. (2010)
α 99-105	KLLSHSL	Yaba Adje et al. (2010)
α 100-105	LLSHSL	Yaba Adje et al. (2010)

Tableau 10 : Peptides inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase IV

Position	Séquence	Références
α 130-134	ANVST	Caron et al. (2016)
α 63-66	VAAA	Caron et al. (2016)
α 68-73	TKAVEH	Caron et al. (2016)
β 6-10	KAAVT	Caron et al. (2016)

Tableau 11 : Peptides issus de l'hydrolyse de l'albumine bovine

Position	Séquence	Références
22-23	FR	(Lafarga et al. 2016)
25-64	DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHV	(Bah et al. 2015)
103-105	SLR	(Lafarga et al. 2016)
139-160	LKPDPNTLCDEFKADEKKFWGK	(Bah et al. 2015)
168-199	RHPYFYAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDKGA	(Bah et al. 2015)
179-180	YY	(Lafarga et al. 2016)
239-241	LAR	(Di Bernardini et al. 2011)
318-340	KDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK	(Bah et al. 2015)
347-371	DAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLR	(Bah et al. 2015)
400-408	LKHLVDEPQ	(Bah et al. 2015)
421-433	LGEYGFQNALIVR	(Bah et al. 2015)
437-451	KVPQVSTPTLVEVSR	(Bah et al. 2015)
467-468	ER	(Lafarga et al. 2016)
467-482	ERMPCTEDYLSLILNR	(Bah et al. 2015)
508-521	RPCFSALTPDETYV	(Bah et al. 2015)
558-580	HKPKATEEQLKTVMENFVAFVDK	(Bah et al. 2015)

La présence de peptides issus de protéines de plasma a également été vérifiée. Ces
5 peptides sont indiqués dans le Tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12 : peptides issus de protéines du plasma

Position	Séquence	Références
22-23	FR	(Lafarga et al. 2016)

25-64	DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIASFQYLQQCPFDEHV	(Bah et al. 2015)
103-105	SLR	(Lafarga et al. 2016)
139-160	LKPDPNTLCDEFKADEKKFWGK	(Bah et al. 2015)
168-199	RHPYFYAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDKGA	(Bah et al. 2015)
179-180	YY	(Lafarga et al. 2016)
239-241	LAR	(Di Bernardini et al. 2011)
318-340	KDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK	(Bah et al. 2015)
347-371	DAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLR	(Bah et al. 2015)
400-408	LKHLVDEPQ	(Bah et al. 2015)
421-433	LGEYGFQNALIVR	(Bah et al. 2015)
437-451	KVPQVSTPTLVEVSR	(Bah et al. 2015)
467-468	ER	(Lafarga et al. 2016)
467-482	ERMPCTEDYLSLILNR	(Bah et al. 2015)
508-521	RPCFSALTPDETYV	(Bah et al. 2015)
558-580	HKPKATEEQLKTVMENFVAFVDK	(Bah et al. 2015)

5

Exemple 2

Le produit de départ est un sang de volailles, récupéré en abattoir. À celui-ci est immédiatement ajouté à hauteur de 10% massique une solution de citrate de sodium à 10% (poids/volume) comme anticoagulant. Le sang est ensuite introduit dans un réacteur. Le sang est conservé à 4°C sous agitation.

Le sang est dilué jusqu'à atteindre une concentration d'hémoglobine égale à 10% (poids/volume) dans le réacteur enzymatique.

La solution est amenée à température ambiante (23°C) et le pH est ajusté à 3 par ajout d'acide phosphorique dilué (2M). L'enzyme, une pepsine porcine, dissoute préalablement dans un tampon d'acide phosphorique et d'hydrogénophosphate de sodium (0,1 M) à pH 3, est introduite dans le réacteur à hauteur d'un ratio enzyme/substrat de 1/50 (mole/mole).

La durée totale de l'hydrolyse est de 24 heures dès l'introduction de l'enzyme. Elle s'effectue sous agitation et thermostat constants.

L'arrêt de l'hydrolyse est réalisé avec une solution de NaOH (5 M) jusqu'à atteindre un pH de 8,5.

Le produit d'hydrolyse est centrifugé (4000 g, 15 min). Le culot récupéré constitue une fraction enrichie en acides nucléiques, à plus de 93% (poids). Le surnageant est quant à lui redirigé dans le réacteur.

- 5 La décoloration de l'hydrolysate peptidique est effectuée par abaissement du pH à une valeur de 4 par ajout d'acide phosphorique dilué (2 M).

La séparation de l'hydrolysate décoloré et de la fraction héminique est réalisée par centrifugation (4000 g, 15 min). Le surnageant contient l'hydrolysate peptidique décoloré, c'est-à-dire sans hème (au moins 99% de peptides (poids)). Le culot représente la fraction enrichie en hème (au moins 99% d'hème (poids)).

Références bibliographiques des Tableaux 1 à 8 :

- 5 **Adje, E. Y., Balti, R., Kouach, M., Dhulster, P., Guillochon, D. & Nedjar-Arroume, N.** (2011a). "Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin". *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 143-153.
- Adje, E. Y., Balti, R., Kouach, M., Guillochon, D. & Nedjar-Arroume, N.** (2011b). "α67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides". *European Food Research and Technology*, 232, 637-646.
- 10 **Barkhudaryan, N. A., Kellermann, J., Galoyan, A. A. & Lottspeich, F.** (1993). "High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the β-chain of hemoglobin". *FEBS Letters*, 329, 215-218.
- Barkhudaryan, N. A., Oberthuer, W., Lottspeich, F. & Galoyan, A.** (1992). "Structure of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factors". *Neurochemical Research*, 17, 1217-1221.
- 15 **Blishchenko, E. Y., Mernenko, O. A., Mirkina, I. I., Satpaev, D. K., Ivanov, V. S., Tchikin, L. D., Ostrovsky, A. G., Karelin, A. A. & Ivanov, V. T.** (1996). "Tumor cell cytolysis mediated by valorphin, an opioid-like fragment of hemoglobin β-chain". *Peptides*, 18, 79-85.
- 20 **Brantl, V., Gramsch, C., Lottspeich, F., Mertz, R., Jaeger, K. H. & Herz, A.** (1986). "Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins". *European Journal of Pharmacology*, 106, 213-214.
- Fukui, K., Shiomi, H., Takagi, H., Hayashi, K., Kiso, Y. & Kitagawa, K.** (1983). "Isolation from bovine brain of a novel analgesic peptapeptide, neo-kyotorphin, containing the Tyr-Arg (kyotorphin) unit". *Neuropharmacology*, 22, 191-196.
- 25 **Glamsta, E. L., Meyerson, B., Silberring, J., Terenius, L. & Nyberg, F.** (1991). "Isolation of a hemoglobin-derived opioid peptide from cerebrospinal fluid of patients with cerebrovascular bleedings". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184, 1060-1066.
- 30 **Ivanov, V. T., Karelin, A. A., Mikhaleva, I. I., Vaskovsky, B. V., Sviryaev, V. I. & Nazimov, I. V.** (1992). "Isolation, structure and properties of endogenous peptides". *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 1271-1311.
- Kagawa, K., Matsukata, H., Fukuhama, C., Watanaka, Y. & Fujino, H.** (1996). "Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hypertlyceridemia and Val-Val-Tyr-Pro, one of its constituents, possesses most superior effects". *Life Sciences*, 58, 1745-1755.
- 35

- Lignot, B., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N. & Guillochon, D.** (1999). "Solvent effect on kinetics of appearance of neokytorphin, VVh4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30, 201-207.
- 5 **Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E. Y., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G. & Guillochon, D.** (2008). "Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides". *Peptides*, 29, 969-977.
- Nyberg, F., Sanderson, K. & Glamsta, E. L.** (1997). "The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin". *Biopolymers*, 43, 147-156.
- 10 **Orts, R. J., Liao, T. H., Sartin, J. L. & Bruot, B.** (1978). "Purification of a tripeptide with anti-reproductive properties isolated from bovine pineal glands". *Physiologist*, 21, 87.
- Piot, J. M., Zhao, Q. Y., Guillochon, D., Ricart, G. & Thomas, D.** (1992). "Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide from a bovine peptic hemoglobin hydrolysate". *FEBS Letters*, 299, 75-79.
- 15 **Takagi, H., Shiomi, H., Fukui, K., Hayashi, K., Kiso, Y. & Kigatawa, K.** (1982). "Isolation of a novel analgesic pentapeptide, neo-kytorphin, from bovine brain". *Life Sciences*, 31, 1733-1736.
- Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Nedjar-Arroume, N. & Guillochon, D.** (2000). "Improvement of *Staphylococcus aureus*-V8-protease hydrolysis of bovine haemoglobin by its adsorption on to a solid phase in the presence of SDS: Peptide mapping and obtention of two haemopoietic peptides". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(2), 127-134.
- 20 **Zhao, Q., Piot, J. M., Gautier, V. & Cottenceau, G.** (1996a). "Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(6), 778-784.
- Zhao, Q. Y. & Piot, J. M.** (1997b). "Investigation of inhibition angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and opioid activity of two hemorphins, LVV-hemorphin-5 and VV-hemorphin-5, isolated from a defined peptic hydrolysate of bovine hemoglobin". *Neuropeptides*, 2, 147-153.
- 30

REVENDICATIONS

1) Procédé d'obtention d'un hydrolysate peptidique à partir de sang d'animaux, comprenant l'obtention du sang, l'ajout d'un anticoagulant, une réaction d'hydrolyse enzymatique, l'arrêt de la réaction d'hydrolyse, la décoloration du produit d'hydrolyse et la séparation du produit d'hydrolyse en une fraction contenant un hydrolysate peptidique et une fraction contenant de l'hème, caractérisé en ce que le sang entier obtenu est introduit dans un réacteur à l'intérieur duquel l'ensemble des réactions d'hydrolyse enzymatique et de décoloration sont réalisées, à température ambiante, la réaction d'hydrolyse enzymatique étant réalisée sur le sang entier par l'ajout d'enzyme et l'ajustement du pH à une valeur acide inférieure à 4 pendant un temps de réaction s'étendant jusqu'à 48h, puis arrêtée par élévation du pH jusqu'à une valeur basique supérieure à 8,5, la décoloration du produit de l'hydrolyse étant ensuite réalisée par abaissement du pH jusqu'à une valeur acide inférieure à 5, puis les constituants du produit de l'hydrolyse étant séparés en une fraction décolorée contenant des peptides et une fraction contenant des résidus d'hème.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le sang entier est d'origine porcine, bovine, ovine, équine, lapine, aviaire, volailles, ou un mélange, préférentiellement du sang bovin, porcin ou de volailles.

3) Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'enzyme est une pepsine porcine.

4) Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la réaction d'hydrolyse enzymatique est réalisée selon un ratio enzyme/substrat (E/S) compris entre 1/10 et 1/1000.

5) Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte une étape de dilution du sang entier de manière à obtenir une solution qui contient entre 1 et 12 %, en poids, d'hémoglobine, à l'aide d'eau.

6) Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les ajustements de pH à des valeurs acides sont réalisés à l'aide d'acide chlorhydrique, d'acide phosphorique, d'acide sulfurique ou d'un mélange.

5 7) Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'ajustement du pH à une valeur basique est réalisé à l'aide d'hydroxyde ou de carbonate de sodium, d'hydroxyde de calcium, d'hydroxyde d'ammonium ou d'un mélange desdits composés.

10 8) Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est réalisé sur du sang de volaille et comprend, après l'arrêt de la réaction d'hydrolyse et avant la décoloration du produit d'hydrolyse, une étape de séparation des acides nucléiques du reste du produit d'hydrolyse et la récupération de cette fraction.

15 9) Hydrolysats peptidiques susceptibles d'être obtenus par un procédé tel que défini dans l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils présentent les caractéristiques suivantes :

- absence de protéines non hydrolysées,
- absence de résidus d'hème,
- 20 - 100% de peptides présentant un poids moléculaire inférieur à 10 000 Da

10) Hydrolysats peptidiques selon la revendication 9 pour leur utilisation à titre d'agent antimicrobien naturel et/ou d'antioxydant, en particulier à titre de conservateur d'aliments tels que les produits carnés, notamment destinés aux animaux ou à titre de
25 substance active destinée à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre, notamment en agriculture.

11) Hydrolysats peptidiques selon la revendication 9 pour leur utilisation à titre de supplément nutritionnel destiné aux animaux, pour renforcer les défenses immunitaires
30 des animaux, lutter contre le stress et/ou améliorer le calme et le bien-être des animaux, pour réguler la prise alimentaire des animaux, les animaux étant de préférence des animaux de compagnie ou d'élevage, et de préférence encore des chiens ou des chats.

12) Fraction d'acides nucléiques susceptible d'être obtenu par un procédé tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, incluant la revendication 8, caractérisé en ce qu'elle comprend au moins 93 % d'acides nucléiques, en poids.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/059614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**A23J 1/06**(2006.01)i; **A23J 3/34**(2006.01)i; **C12P 21/06**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23J; C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PRZYBYLSKI RÉMI ET AL. "Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative" <i>FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL</i> , Vol. 211, 13 May 2016 (2016-05-13), pages 306-313 DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2016.05.074 ISSN: 0308-8146, XP029571363	9-11
Y	abstract page 306, paragraph 2 - page 307, left-hand column, paragraph 5	1-8
Y	DE 2831338 A1 (NORDFLEISCH AG) 31 January 1980 (1980-01-31) abstract; claims 1-13	1-8
X	EP 1483978 A1 (CIE GENERALE DE DIETETIQUE [FR]) 08 December 2004 (2004-12-08)	9
A	abstract; claims 1-12 paragraph [0058]	1-8
X	EP 0354100 A1 (CIBEVIOL [FR]; IMEDEX [FR]) 07 February 1990 (1990-02-07)	9
A	abstract; claims 1-16; examples 1-4	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 May 2019

Date of mailing of the international search report

03 June 2019

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Gurdjian, Didier

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ESTELLE YABA ADJE ET AL. "Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin" <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES</i> , ELSEVIER BV, NL, Vol. 49, No. 2, 04 April 2011 (2011-04-04), pages 143-153, [retrieved on 2011-04-12] DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2011.04.004 ISSN: 0141-8130, XP028227800 cited in the application	9-11
Y	abstract	1-8
X	NEDJAR-ARROUME N ET AL. "Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides" <i>PEPTIDES</i> , ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Vol. 29, No. 6, 01 June 2008 (2008-06-01), pages 969-977, [retrieved on 2008-01-31] DOI: 10.1016/J.PEPTIDES.2008.01.011 ISSN: 0196-9781, XP022646982 cited in the application	9-11
Y	abstract last paragraph; tables 2,3	1-8
X	ZHAO Q Y ET AL. "Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate" <i>APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY</i> , SPRINGER, BERLIN, DE, Vol. 45, No. 6, 01 July 1996 (1996-07-01), pages 778-784 DOI: 10.1007/S002530050762 ISSN: 1432-0614, XP035171433 cited in the application	9-11
	abstract page 779, paragraph 2	
X	BARKHUDARYAN N ET AL. "High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the beta-chain of hemoglobin" <i>FEBS LETTERS</i> , ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Vol. 329, No. 1-2, 23 August 1993 (1993-08-23), pages 215-218, [retrieved on 1993-08-23] DOI: 10.1016/0014-5793(93)80224-I ISSN: 0014-5793, XP025576476 cited in the application	9-11
	abstract	
X	WO 9607664 A1 (ELEVEURS DE LA CHAMPAGNE SA [FR]; BIERNE JACQUES [FR] ET AL.) 14 March 1996 (1996-03-14)	12
Y	the whole document	9
X	CN 1207394 A (LI JINGHUA [CN]) 10 February 1999 (1999-02-10)	12
Y	the whole document	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/059614

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☐ forming part of the international application as filed:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☒ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/059614

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
DE	2831338	A1	31 January 1980	NONE		
EP	1483978	A1	08 December 2004	AT	323429	T 15 May 2006
				CN	1572153	A 02 February 2005
				DE	602004000665	T2 10 May 2007
				EP	1483978	A1 08 December 2004
				ES	2263117	T3 01 December 2006
				FR	2855722	A1 10 December 2004
				JP	2005040128	A 17 February 2005
				US	2005089608	A1 28 April 2005
EP	0354100	A1	07 February 1990	DE	68903205	D1 19 November 1992
				DE	68903205	T2 18 March 1993
				EP	0354100	A1 07 February 1990
				ES	2044174	T3 01 January 1994
				FR	2635114	A1 09 February 1990
				GR	3006794	T3 30 June 1993
				US	5108908	A 28 April 1992
WO	9607664	A1	14 March 1996	AU	3261595	A 27 March 1996
				EP	0778840	A1 18 June 1997
				FR	2724173	A1 08 March 1996
				WO	9607664	A1 14 March 1996
CN	1207394	A	10 February 1999	NONE		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2019/059614

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A23J1/06 A23J3/34 C12P21/06 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A23J C12P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PRZYBYLSKI RÉMI ET AL: "Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL, vol. 211, 13 mai 2016 (2016-05-13), pages 306-313, XP029571363, ISSN: 0308-8146, DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2016.05.074	9-11
Y	abrégé page 306, alinéa 2 - page 307, colonne de gauche, alinéa 5	1-8
Y	DE 28 31 338 A1 (NORDFLEISCH AG) 31 janvier 1980 (1980-01-31) abrégé; revendications 1-13 ----- -/-	1-8
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 24 mai 2019		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 03/06/2019
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Gurdjian, Didier

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 1 483 978 A1 (CIE GENERALE DE DIETETIQUE [FR]) 8 décembre 2004 (2004-12-08)	9
A	abrégé; revendications 1-12 alinéa [0058] -----	1-8
X	EP 0 354 100 A1 (CIBEVIAL [FR]; IMEDEX [FR]) 7 février 1990 (1990-02-07)	9
A	abrégé; revendications 1-16; exemples 1-4 -----	1-8
X	ESTELLE YABA ADJE ET AL: "Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, ELSEVIER BV, NL, vol. 49, no. 2, 4 avril 2011 (2011-04-04), pages 143-153, XP028227800, ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2011.04.004 [extrait le 2011-04-12] cité dans la demande	9-11
Y	abrégé -----	1-8
X	NEDJAR-ARROUME N ET AL: "Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides", PEPTIDES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 29, no. 6, 1 juin 2008 (2008-06-01), pages 969-977, XP022646982, ISSN: 0196-9781, DOI: 10.1016/J.PEPTIDES.2008.01.011 [extrait le 2008-01-31] cité dans la demande	9-11
Y	abrégé dernier alinéa; tableaux 2,3 -----	1-8
X	ZHAO Q Y ET AL: "Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 45, no. 6, 1 juillet 1996 (1996-07-01), pages 778-784, XP035171433, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S002530050762 cité dans la demande abrégé page 779, alinéa 2 -----	9-11
	----- -/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BARKHUDARYAN N ET AL: "High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the beta-chain of hemoglobin", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 329, no. 1-2, 23 août 1993 (1993-08-23), pages 215-218, XP025576476, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/0014-5793(93)80224-I [extrait le 1993-08-23] cité dans la demande abrégé	9-11
X	----- WO 96/07664 A1 (ELEVEURS DE LA CHAMPAGNE SA [FR]; BIERNE JACQUES [FR] ET AL.) 14 mars 1996 (1996-03-14)	12
Y	le document en entier	9
X	----- CN 1 207 394 A (LI JINGHUA [CN]) 10 février 1999 (1999-02-10)	12
Y	le document en entier	9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2019/059614

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 2831338	A1	31-01-1980	AUCUN	
EP 1483978	A1	08-12-2004	AT 323429 T CN 1572153 A DE 602004000665 T2 EP 1483978 A1 ES 2263117 T3 FR 2855722 A1 JP 2005040128 A US 2005089608 A1	15-05-2006 02-02-2005 10-05-2007 08-12-2004 01-12-2006 10-12-2004 17-02-2005 28-04-2005
EP 0354100	A1	07-02-1990	DE 68903205 D1 DE 68903205 T2 EP 0354100 A1 ES 2044174 T3 FR 2635114 A1 GR 3006794 T3 US 5108908 A	19-11-1992 18-03-1993 07-02-1990 01-01-1994 09-02-1990 30-06-1993 28-04-1992
WO 9607664	A1	14-03-1996	AU 3261595 A EP 0778840 A1 FR 2724173 A1 WO 9607664 A1	27-03-1996 18-06-1997 08-03-1996 14-03-1996
CN 1207394	A	10-02-1999	AUCUN	