

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

3 064 635

②1 N° d'enregistrement national : **17 52674**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 07 K 1/30** (2017.01), C 07 K 1/34, 14/405, A 23 L 5/
46

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 30.03.17.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 05.10.18 Bulletin 18/40.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *FERMENTALG Société anonyme —
FR.*

⑦② Inventeur(s) : CAGNAC OLIVIER, ATHANE AXEL et
DEMOL JULIEN.

⑦③ Titulaire(s) : FERMENTALG Société anonyme.

⑦④ Mandataire(s) : LTL SAS.

⑤④ **PURIFICATION DES PHYCOBILIPROTEINES.**

⑤⑦ La présente invention concerne un nouveau procédé
de purification des phycobiliprotéines, en particulier résis-
tantes aux pH acides, les phycobiliprotéines obtenues et
leurs utilisations.

FR 3 064 635 - A1



PURIFICATION DES PHYCOBILIPROTEINES

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un nouveau procédé de purification des phycobiliprotéines, en particulier résistantes aux pH acides, les phycobiliprotéines obtenues et leurs utilisations.

ETAT DE LA TECHNIQUE

La purification de phycobiliprotéines de *Galdieria sulphuraria*, en particulier de C-Phycocyanine (C-PC), est beaucoup plus complexe que celle d'*Arthrospira platensis* (*Spiruline*) ou que d'autres cyanobactéries. Cela est partiellement dû à la composition de la paroi cellulaire de *Galdieria sulphuraria* qui nécessite une action mécanique pour être rompue (Sorensen *et al.*, 2013). La lyse mécanique engendre la formation de micelles qui ne sont que partiellement éliminés par ultracentrifugation. La présence de chlorophylle a et de caroténoïdes dissouts dans ces micelles contribue à augmenter les valeurs d'absorbance à 280 nm (absorbance dans les UV spécifique des protéines) ce qui peut expliquer les faibles taux de pureté des extraits brut de C-PC comparativement à ceux de Spiruline (Sorensen *et al.*, 2013). Le taux de pureté de l'extrait brut peut donc être augmenté en éliminant les micelles et les protéines solubles autres que les phycobiliprotéines.

La purification de phycobiliprotéines extraites de *Galdieria sulphuraria* et de Spiruline par précipitation au sulfate d'ammonium a déjà été décrite dans la littérature (Moon *et al.*, 2015 ; Cruz de Jesús *et al.*, 2006) mais elle est très difficilement applicable à l'échelle industrielle car elle demande beaucoup de sulfate d'ammonium, ce qui pose de gros problèmes de retraitement du sulfate d'ammonium et du surnageant.

Les autres méthodes de purification décrites permettant d'obtenir un taux de pureté telles que des méthodes de chromatographie sont très coûteuses à mettre en œuvre.

L'invention concerne donc un procédé de purification de phycobiliprotéines produites par culture en bioréacteur de microorganismes producteurs de phycobiliprotéines, aisé à mettre en œuvre et économiquement adapté pour une mise en œuvre à l'échelle industrielle.

Par ailleurs, les phycobiliprotéines, en particulier les phycocyanines, sont des

mélanges de c-phycoyanine et d'allophycoyanine. Les procédés connus de purification ne permettent pas de les séparer de manière contrôlée industriellement. La purification par précipitation au sulfate d'ammonium entraîne les deux protéines de manière non contrôlée, de sorte qu'il peut être difficile d'obtenir un pigment aux propriétés stables. Cette méthode de précipitation engendre également des pertes de rendement d'extraction importante (Cruz de Jesús *et al.*, 2006)

L'invention concerne donc aussi la préparation de phycobiliprotéines purifiées, en particulier de phycoyanine purifiée comprenant essentiellement de la c-phycoyanine ou bien essentiellement de l'allophycoyanine, en particulier de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides de composition contrôlée en phycoyanines.

EXPOSE DE L'INVENTION

L'invention concerne donc un procédé de purification de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides à partir d'un extrait brut de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de

- a) ajustement du pH de l'extrait brut de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides à un pH inférieur à 6 de manière à faire précipiter les matières organiques autres que les phycobiliprotéines résistantes aux pH acides,
- b) récupération du surnageant comprenant les phycobiliprotéines résistantes aux pH acides et
- c) isolation des phycobiliprotéines résistantes aux pH acides à partir du surnageant.

L'invention concerne aussi les phycobiliprotéines résistantes aux pH acides obtenues par le procédé et en particulier, des phycoyanines résistantes aux pH acides comprenant un mélange de c-phycoyanine et d'allophycoyanine, plus particulièrement dont le rapport molaire c-phycoyanine / allophycoyanine est d'au moins 2.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1. Augmentation de l'indice de pureté de l'extrait brut en fonction du pH à partir d'un lysat de cellules fraîches.

Figure 2. Mesure de la concentration en C-PC et APC dans différents extraits bruts obtenus par centrifugation d'un lysat de cellules fraîches à différents pH. En gris sont représentées les concentrations en APC en mg/ml, et en noir les concentrations

en C-PC en mg/ml.

Figure 3. Mesure de la concentration en C-PC et APC dans les culots obtenus par centrifugation d'un lysat de cellules fraîches à différents pH. En gris sont représentées les concentrations en APC en mg/g de MS, et en noir les concentrations en C-PC en mg/g de MS.

Figure 4. Augmentation de l'indice de pureté de l'extrait brut en fonction du pH à partir d'un lysat de cellules lyophilisées et réhydratées.

Figure 5. Mesure de la concentration en C-PC et APC dans différents extraits bruts obtenus par centrifugation d'un lysat de cellules, lyophilisées et réhydratée, à différents pH. En gris sont représentées les concentrations en APC en mg/ml, et en noir les concentrations en C-PC en mg/ml.

Figure 6. Purification et concentration de la C-PC par filtration tangentielle. L'extrait brut préalablement purifié par précipitation à pH acide, est filtré en utilisant un système de fibre creuse.

Figure 7. Augmentation de la concentration en C-PC dans le rétentat lors de la filtration sur fibre creuse.

DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

L'invention concerne donc un procédé de purification de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides à partir d'un extrait brut de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides.

L'extrait brut de phycobiliprotéines est généralement obtenu à partir de cellules de microorganismes cultivés de manière industrielle dans des bioréacteurs de grande capacité, de préférence de manière à obtenir des moûts de fermentation comprenant de grandes densités de microorganismes producteurs de phycobiliprotéines (par grandes densités on entend généralement plus de 50g de matière sèche (MS) par litre de moût de fermentation, préférentiellement plus de 100g/L). Ces méthodes de culture sont connues de l'homme du métier, pouvant être menées en autotrophie, hétérotrophie ou mixotrophie, notamment décrites dans les demandes WO 2017/050917, WO 2017/050918 et PCT/EP2016/079325 déposée le 30 novembre 2016. Les phycobiliprotéines produites par les microorganismes cultivés doivent être libérées après lyse cellulaire. En effet, les cellules de microorganismes contiennent de grandes quantités de phycobiliprotéines (Moon *et al.*, 2015, Sorensen *et al.*, 2013, Eriksen 2008). Par conséquent, la mise en œuvre du procédé selon l'invention,

nécessite d'abord la préparation d'un extrait aqueux provenant du moût de fermentation.

L'extrait aqueux peut être préparé directement à partir du moût de fermentation tel qu'il est récupéré du réacteur en fin de fermentation, éventuellement additionné
5 d'une quantité appropriée d'eau.

Il peut être préparé à partir de cellules fraîches séparées du moût de fermentation par toute méthode de séparation bien connue de l'homme du métier. Il peut également être préparé à partir de cellules préalablement lyophilisées ou séchées pour leur conservation.

10 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'extrait aqueux est préparé à partir de cellules fraîches séparées du moût de fermentation après culture.

La lyse cellulaire peut se faire par tout moyen de lyse cellulaire connu de l'homme du métier. Elle peut se faire alors que les cellules sont en suspension dans l'eau, moût de fermentation ou suspension reconstituée.

15 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la lyse cellulaire est faite sur les cellules séparées du moût de fermentation, avant leur remise en suspension.

De préférence, l'extrait aqueux est obtenu à partir de la suspension comprenant les cellules lysées en séparant les solides, par tout moyen de séparation connu de l'homme du métier pour éliminer les résidus solides de lyse cellulaire, notamment de
20 filtration.

On obtient alors un extrait aqueux appelé « extrait de brut de phycobiliprotéines » ou encore « extrait brut » qui comprend, outre les phycobiliprotéines recherchées, en particulier résistantes aux pH acides, d'autres matières organiques comme les micelles et d'autres protéines hydrosolubles.

25 L'extrait brut de phycobiliprotéines peut être préparé à partir de cellules fraîches lysées (directement dans le moût de fermentation ou après séparation du moût de fermentation) ou à partir de cellules lyophilisées ou séchées, la lyse cellulaire intervenant avant ou après lyophilisation ou séchage.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'extrait brut est préparé à
30 partir de cellules fraîches.

Le procédé de purification selon l'invention consiste à séparer les phycobiliprotéines, en particulier résistantes aux pH acides, recherchées de ces autres matières organiques telles que micelles et les autres protéines hydrosolubles.

Les microorganismes cultivés pour produire des phycobiliprotéines sont bien connus de l'homme du métier, en particulier choisis parmi le groupe des Cyanophyceae comme *Arthrospira platensis* (Spiruline), *Spirulina maxima*, *Synechococcus elongatus*, ou bien le groupe des cyanidiophyceae tel que *Galdieria sulphuraria*, *Cyanidium caldarium*, *Cyanidioschyzon merolae*.

De manière préférée, les phycobiliprotéines sont des phycocyanines résistantes aux pH acides. Par phycobiliprotéines résistantes aux pH acides ou phycocyanines résistantes aux pH acides, on entend des phycobiliprotéines qui résistent à la précipitation aux pH acides. Par pH acide, on entend selon l'invention un pH inférieur à 7, avantageusement de 6 ou moins. Avantageusement, les phycobiliprotéines résistantes aux pH acides ne précipitent pas dans une solution aqueuse à des pH inférieurs à 6. On pourra également les qualifier indifféremment de résistantes ou de stables aux pH acides.

Bien entendu, les phycobiliprotéines purifiées selon l'invention seront plus ou moins stables selon le pH acide considéré. Certaines seront stables dans une plage de valeur de pH voisine de 6. D'autres seront stables à des valeurs de pH bien inférieures à 6. Par conséquent, par phycobiliprotéine résistante au pH acide, on entend également un mélange de phycobiliprotéines dont la majorité ne précipite pas à un pH inférieur à 7, avantageusement inférieur à 6 ou moins.

De manière avantageuse, l'invention concerne des phycobiliprotéines stables à des pH inférieurs à 5, préférentiellement inférieurs ou égaux à 4, plus préférentiellement allant de 4 à 2, encore plus préférentiellement inférieurs ou égaux à 3,5.

De telles phycocyanines résistantes aux pH acides sont connues de l'homme du métier, notamment décrites dans la demande WO 2016/099261 ou la demande WO 2017/050918. Il s'agit en particulier de phycocyanines produites par des souches de microalgues des genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*, notamment choisis parmi les espèces *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Cyanidioschyzon merolae* DBV201, *Cyanidium caldarium*, *Cyanidium daedalum*, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita*, *Galdieria sulphuraria*, en particulier des souches de *Galdieria sulphuraria*, *Cyanidium caldarium* et *Cyanidioschyzon merolae*.

Ces phycocyanines sont un mélange de c-phycocyanine (C-PC) et d'allophycocyanine (APC).

Avantageusement, l'apoprotéine de la C-PC comprend la protéine de SEQ ID NO 1 ou de SEQ ID NO 2 ou un variant de celles-ci. En particulier, l'apoprotéine de la sous-unité α de la C-PC comprend la protéine de SEQ ID NO 1 et l'apoprotéine de la sous-unité β de la C-PC comprend la protéine de SEQ ID NO 2 ou des variants de
5 celles-ci.

SEQ ID 1 : MKTPITEAIA AADNQRFLS NTELQAVNGR YQRAAASLEA
ARSLTSNAQR LINGAAQAVY SKFPYTSQMP GPQYASSAVG KAKCARDIGY
YLRMVTYCLV VGGTGPMDEY LIAGLEEINR TFDLSPSWYV EALNYVKS NH
GLSGQAANEA NTYIDYAINA LS

10 SEQ ID 2 : MLDAFAKVVA QADARGEFLS NTQLDALSKM VSEGNKRLDV
VNRITSNASA IVTNAARALF SEQPQLIQPG GNAYTNRMA ACLRDMEIIL
RYVSYAIIAG DSSVLDDRCL NGLRETYQAL GVP GASVAVG VEKMKDSAIA
IANDPSGITT GDCSALMAEV GTYFDRAATA VQ

Également avantageusement, la sous-unité α de ladite APC comprend la SEQ
15 ID NO 3 ou des variants de celles-ci et l'apoprotéine de la sous-unité β de ladite APC
comprend la SEQ ID NO 4 ou des variants de celles-ci.

SEQ ID 3 : MSLISQIINT ADEELRYPNG GELSTLIYFF NTANTRINII
NKLKEREKDI IQNASKKLFQ LHPEYVSSGG NASGPKQRAL CLR DYGWYLR
LV TYGILAGD ITPIEKIGII GVKDMYNSLG VPIIGMYDAI KCLKEASINI FELSEEKDLI
20 IPYFDYLSNA ILS

SEQ ID 4 : MSIVTKSIVN ADAEARYLSP GELDRIKSFV LSGQRRLRIA
QILTDNRERI VKQAGQQLFQ QRPDIVSPGG NAYGEEMTAT CLRDLDY YLR
LV TYGVVAGD ISPIEEIGLE DFMQDAITAV INTADVQGKY LDNSSIEK LK
GYFQTGELRV RAAATIAANA AGIIKDAVAK SLLYSDITRP GGNMYTTRRY
25 AACIRDLDY LRYATYSMLA GDPSILDERV LNGLKETYNS LGVPIGATI Q
SIQAMKEVTS SLV

Les apoprotéines des C-PC et APC d'une même source de phycocyanines ont généralement des points isoélectriques différents. En baissant le pH, il sera possible de séparer au moins en partie les C-PC des APC.

30 En effet, les inventeurs ont constaté que plus le pH de l'extrait brut était ajusté bas, plus les C-PC obtenues étaient pures.

De manière avantageuse, lorsque la phycobiliprotéine est une phycocyanine résistante aux pH acides, l'abaissement du pH en deçà du point isoélectrique de l'APC

permet d'obtenir une phycocyanine comprenant un mélange C-PC/APC dont le rapport molaire est d'au moins 5, préférentiellement d'au moins 10, plus préférentiellement d'au moins 15.

De préférence, le pH de l'extrait brut dans l'étape a) est ajusté à un pH inférieur à 5. On peut obtenir alors de la phycocyanine résistante aux pH acides comprenant moins de 5% Molaires d'APC, préférentiellement moins de 1%, plus préférentiellement moins de 0,1% d'APC, les pourcentages étant exprimés par rapport à la somme totale d'APC et de C-PC.

Dans l'étape a), l'ajustement du pH se fait par l'ajout d'un acide, minéral ou organique, fort ou faible, sous forme de solide ou de solution, la quantité d'acide ajoutée étant déterminée par le pH de l'extrait brut à traiter et la valeur de pH que l'homme du métier cherchera à obtenir. Parmi les acides minéraux bien connus de l'homme du métier, on citera plus particulièrement l'acide chlorhydrique et l'acide phosphorique. Parmi les acides organiques bien connus de l'homme du métier, on citera en particulier l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide tartrique, l'acide lactique, de préférence l'acide citrique. On peut également citer les polyphénols acides comme l'acide rosmarinique, l'acide tannique, l'acide digallique, l'acide quercitannic, l'acide gallotannique, les tannins acides comme la quercitrine, les ellagitannines, castalagine, castaline, casuariticine, grandinine, punicaligine, punicaline, roburine A, tellimagrandine II, terflavine B, vescaligine, pendunculagine, casuariine, castline, vescaline, de préférence l'acide tannique. De préférence, les acides employés sont des acides autorisés pour un usage alimentaire, en particulier l'acide phosphorique, l'acide citrique ou l'acide tannique.

Pour l'étape b) de récupération du surnageant comprenant les phycobiliprotéines résistantes aux pH acides, toute méthode de séparation connue de l'homme du métier pourra être employée, notamment par filtration tangentielle sur membranes céramiques ou membranes organiques tel que les fibres creuses en polyethersulfone. Les seuils de ces filtres peuvent être choisis pour séparer des molécules de poids moléculaire supérieur ou inférieur aux phycobiliprotéines ciblées.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la séparation à l'étape b) est faite par filtration tangentielle. Cette étape permet de concentrer et d'éliminer une partie des protéines autre que les phycobiliprotéines, augmentant ainsi le taux de pureté du produit final.

L'étape c) de séchage/déshydratation des phycobiliprotéines résistantes aux pH acides à partir du surnageant se fait par toute méthode d'élimination du solvant, l'eau en l'occurrence, par exemple par évaporation à pression atmosphérique ou sous vide. On citera en particulier l'atomisation, la lyophilisation, la zéodratation, le séchage par
5 infra rouge, ou le séchage par fenêtre de réfraction.

Dans l'éventualité d'une évaporation par chauffage, l'homme du métier fera attention à ne pas employer des températures trop élevées susceptibles de provoquer une dénaturation des phycobiliprotéines.

Il est possible, après récupération du surnageant à l'étape b), de recycler les
10 phycobiliprotéines contenues dans le précipité. Pour ce faire, les phycobilliprotéines résiduelles sont solubilisées dans une solution aqueuse de pH acide, d'environ 6, ou moins, pH auquel les impuretés restent insolubles alors que les phycobiliprotéines sont solubles.

Ces phycobiliprotéines résiduelles sont alors séparées des impuretés et isolées
15 en reprenant les étapes b) et c) du procédé. C'est un processus itératif qui peut être répété autant de fois que nécessaire. Lorsque les conditions employées pour le procédé selon l'invention permettent une purification préférentielle des C-PC, les phycobiliprotéines résiduelles sont un mélange C-PC/APC enrichi en APC.

Par le recyclage du précipité on obtient alors des phycobiliprotéines comprenant
20 un mélange C-PC/APC dont le rapport Molaires est inférieur à 5, en particulier inférieur à 4, avantageusement de l'ordre de 3 à 0,1.

En reprenant les étapes a) à c) du procédé, précédemment décrit, on peut par un processus itératif, d'une part épuiser le précipité en C-PC, qui peut être jointe aux fractions précédemment obtenues pour en enrichir la teneur et d'autre part enrichir le
25 mélange résiduel de phycobiliprotéines en APC, avec un rapport APC/C-PC d'au moins 5, préférentiellement d'au moins 10, plus préférentiellement d'au moins 15.

On peut obtenir alors un mélange d'APC comprenant moins de 5% Molaires de
CPC, préférentiellement moins de 1%, plus préférentiellement moins de 0,1% de
CPC, les pourcentages étant exprimés par rapport à la somme totale d'APC et de C-
30 PC.

Ces APC isolées à partir du précipité peuvent ensuite être à nouveau purifiées par des techniques de chromatographie préparative bien connues de l'homme du métier pour la production d'allophycocyanines susceptible d'être employées comme dans le domaine de l'imagerie médicale par exemple de part ces propriétés

fluorescentes

L'invention concerne également les phycobiliprotéines résistantes aux pH acides, en particulier phycocyanines, susceptibles d'être obtenues par le procédé de purification.

5 L'invention concerne aussi des phycocyanines purifiées résistantes aux pH acides comprenant un mélange C-PC/APC dont le rapport molaire est d'au moins 2.

En particulier, l'invention concerne une phycocyanine résistante aux pH acides qui comprend au moins 95% Molaires de C-PC et moins de 5% Molaires d'APC, préférentiellement au moins 99% Molaires de C-PC et moins de 1% Molaires d'APC,
10 les pourcentages étant exprimés par rapport à la somme totale d'APC et de C-PC.

Ces C-PC sont connues de l'homme du métier et notamment définies précédemment, en particulier celles dont la sous-unité α de la C-PC comprend la protéine de SEQ ID NO 1 et l'apoprotéine de la sous-unité β de la C-PC comprend la protéine de SEQ ID 2 ou des variants de celles-ci.

15 De manière avantageuse, les variants selon l'invention présentent une identité de séquence d'au moins 83 % pour les sous-unités α de la C-PC, et d'au moins 82% pour les sous-unités β de la C-PC.

De manière préférentielle, les variants selon l'invention ont une identité d'au moins 90% pour les sous-unités α (SEQ ID NO 1) et β (SEQ ID NO 2).

20 L'invention concerne également une phycocyanine purifiée enrichie en APC susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention.

En particulier, l'invention concerne de la phycocyanine purifiée qui comprend un mélange enrichi en APC dont le rapport Molaire C-PC/APC est inférieur à 5, en particulier 4, avantageusement de l'ordre 3 à 0,1.

25 Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le mélange enrichi en APC a un rapport APC/C-PC d'au moins 5, préférentiellement d'au moins 10, plus préférentiellement d'au moins 15.

Selon un mode plus particulier de réalisation de l'invention, la phycocyanine est constituée essentiellement d'APC, avec au moins 95% Molaires d'APC et moins de
30 5% Molaires de C-PC, préférentiellement au moins 99% Molaires d'APC et moins de 1% Molaires de C-PC, les pourcentages étant exprimés par rapport à la somme totale d'APC et de C-PC.

Ces APC sont connues de l'homme du métier et notamment définies précédemment, en particulier celles dont la sous-unité α de ladite APC comprend la SEQ ID NO 3 ou des variants de celles-ci et l'apoprotéine de la sous-unité β de ladite APC comprend la SEQ ID NO 4 ou des variants de celles-ci.

5 De manière avantageuse, les variants selon l'invention présentent une identité de séquence d'au moins 83 % pour les sous-unités α de l'APC, et d'au moins 82% pour les sous-unités β de l'APC.

L'homme du métier sait comment mesurer une identité de séquences protéiques selon les méthodes usuelles à sa disposition, notamment le programme BLASTP
10 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

De même, l'homme du métier sait comment identifier des variants desdites séquences et vérifier qu'ils conservent les mêmes propriétés structurales par simple essai de stabilité en pH acide, par exemple en pratiquant un essai comme l'essai présenté à l'exemple 3 de la demande WO 2017/050918.

15 Il est connu de l'homme du métier qu'un polypeptide peut être modifié par substitution, insertion et/ou délétion d'au moins un acide aminé sans modifier de manière substantielle sa fonction.

Par exemple, la substitution d'un acide aminé à une position donnée par un autre acide aminé chimiquement équivalent est un exemple connu de variation de séquence
20 qui n'affecte pas de manière substantielle les propriétés de la protéine.

Ces substitutions "conservatrices" peuvent être définies comme des échanges à l'intérieur des groupes d'acides aminés suivants

- Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
- Asp, Asn, Glu, Gln
- 25 - His, Arg, Lys
- Met, Leu, Ile, Val, Cys et
- Phe, Tyr, Trp

Ainsi, les variants des apoprotéines des phycocyanines et/ou des allophycocyanines selon l'invention peuvent comprendre de 1 à 30 acides aminés de
30 différence en nombre par rapport à la séquence dite de référence correspondante, particulièrement pour ce qui concerne les sous unités α et/ou β de la phycocyanine, dans la mesure où le variant obtenu conserve les propriétés de la protéine de référence et les pourcentages d'homologie/identité énoncés ci-dessus.

Plus précisément selon l'invention,

- 5 - pour les variants des apoprotéines de la sous-unité α des phycocyanines utilisables dans les compositions acides selon l'invention, issus de substitutions, d'insertions et/ou de délétions, ils peuvent comprendre de 1 à 27 acides aminés de différence par rapport à la séquence dite de référence correspondante, dans la mesure où le variant obtenu conserve les propriétés de la protéine de référence et les pourcentages d'identité énoncés ci-dessus;
- 10 - pour les variants des apoprotéines de la sous-unité β des phycocyanines utilisables dans les compositions acides selon l'invention, issus de substitutions, d'insertions et/ou de délétions, ils peuvent comprendre de 1 à 30 acides aminés de différence par rapport à la séquence dite de référence correspondante, dans la mesure où le variant obtenu conserve les propriétés de la protéine de référence et les pourcentages d'identité énoncés ci-dessus;
- 15 - pour les variants des apoprotéines de la sous-unité α des allophycocyanines utilisables dans les compositions acides selon l'invention, issus de substitutions, d'insertions ou de délétions, ils peuvent comprendre de 1 à 24 acides aminés de différence par rapport à la séquence dite de référence correspondante, dans la mesure où le variant obtenu conserve les propriétés de la protéine de référence et les pourcentages d'identité énoncés ci-dessus;
- 20 - pour les variants des apoprotéines de la sous-unité β des allophycocyanines utilisables dans les compositions acides selon l'invention, issus de substitutions, d'insertions et/ou de délétions, ils peuvent comprendre de 1 à 20 acides aminés de différence par rapport à la séquence dite de référence correspondante, dans la mesure où le variant obtenu conserve les propriétés de la protéine de
- 25 référence et les pourcentages d'identité énoncés ci-dessus.

Très particulièrement selon l'invention, et quelle que soit la séquence de référence considérée (sous-unité α et/ou β de la phycocyanine et/ou sous-unité α et/ou β de l'allophycocyanine) les variants desdites sous-unités peuvent comprendre avantageusement de 1 à 15 acides aminés de différence, de préférence de 1 à 10

30 acides aminés de différence, en particulier 1 ou 2 ou 3 ou 4 ou 5 ou 6 ou 7 ou 8 ou 9 ou 10 acides aminés de différence par rapport à la séquence dite de référence correspondante, dans la mesure où le variant obtenu conserve les propriétés de la protéine de référence et les pourcentages d'identité énoncés ci-dessus.

De préférence, l'invention concerne la C-PC dont la protéine de la sous unité

alpha consiste en la protéine de SEQ ID 1 et la protéine de la sous unité bêta consiste en la protéine de SEQ ID 2.

Selon un autre mode préféré, l'invention concerne l'APC dont la protéine de la sous unité alpha consiste en la protéine de SEQ ID 3 et la protéine de la sous unité
5 bêta consiste en la protéine de SEQ ID 4.

Les phycobiliprotéines sont des colorants naturels essentiellement employés pour la coloration des aliments.

L'invention concerne aussi l'utilisation des phycobiliprotéines résistantes aux pH acides obtenues par le procédé selon l'invention et en particulier les phycocyanines
10 résistantes aux pH acides définies ci-dessus comme colorant dans un produit alimentaire.

L'invention concerne aussi une composition en particulier alimentaire comprenant de la phycobiliprotéine résistante aux pH acides obtenue par le procédé selon l'invention et en particulier de la phycocyanine résistante aux pH acides définies
15 ci-dessus.

De telles utilisations et de telles compositions sont connues de l'homme du métier.

De manière préférentielle, le produit alimentaire ou la composition alimentaire est une composition acide, telle que définie dans la demande WO 2017/050918.

Par composition acide on entend selon l'invention toute composition comprenant
20 un acide minéral ou organique et de la phycocyanine. Cette composition peut être liquide, fluide ou visqueuse, pâteuse ou solide qui présente un pH acide et dans laquelle de la phycocyanine résistante au pH acide est incorporée.

Pour les compositions liquides aqueuses, le pH est mesuré de manière usuelle.
25 Pour les compositions liquides non aqueuses ou pour les compositions pâteuses ou solides, le pH est mesuré après dissolution de la composition dans une quantité d'eau suffisante pour dissoudre les composés solubles qu'elle contient, dont les acides minéraux ou organiques et la phycocyanine.

De manière avantageuse la composition selon l'invention est une composition
30 liquide aqueuse, éventuellement sous forme d'un gel, ou une composition pâteuse ou solide destinée à être dissoute dans une solution aqueuse ou dans une composition solide ou pâteuse comprenant de l'eau. Selon un autre mode avantageux de réalisation de l'invention, la composition acide composition pâteuse ou solide destinée à être employée et/ou stockée dans un environnement humide.

Les acides minéraux ou organiques susceptibles d'être employés dans les compositions selon l'invention sont bien connus de l'homme du métier. Parmi les acides minéraux, on citera en particulier les acides carbonique, phosphorique, chlorhydrique, sulfurique, perchlorique, sulfonique et nitrique. Parmi les acides organiques, on citera en particulier les acides citrique, lactique, malique, tartrique, succinique, avantageusement l'acide citrique.

Par composition alimentaire acide selon l'invention on entend toute composition destinée à être ingérée par l'homme ou les animaux qui entre dans la définition précédente. Les compositions acides nutraceutiques doivent être considérées comme entrant dans la définition des compositions alimentaires acides au sens de l'invention.

Les compositions alimentaires acides selon l'invention sont bien connues de l'homme du métier. Elles peuvent comprendre un véhicule pouvant comprendre des constituants structurels associé à des composés actifs identifiés au regard de leurs apports nutritifs ou encore pour leurs propriétés bénéfiques à la santé de l'homme ou de l'animal. La composition alimentaire acide selon l'invention peut également comprendre des additifs alimentaires comme des agents de texture, des agents de saveur, des agents conservateurs, tous constituants bien connus de l'homme du métier. Le véhicule peut comprendre de l'eau et/ou des protéines et/ou des matières grasses et/ou des fibres et/ou des sucres. Les constituants du véhicule peuvent avoir uniquement des propriétés structurelles mais ils sont généralement connus pour leurs apports nutritifs.

La composition alimentaire acide selon l'invention peut être prête à l'emploi ou bien sous forme d'un additif alimentaire que l'on ajoute à une préparation solide, pâteuse ou liquide pour préparer l'aliment qui pourra être ingéré.

Pour les compositions alimentaires, l'acide sera choisi de préférence dans la liste des acidifiants autorisés dans l'alimentation, en particulier les acides carbonique, phosphorique, citrique, malique, tartrique et lactique, plus particulièrement l'acide citrique.

Concernant les compositions acides autres qu'alimentaires selon l'invention elles peuvent être entre autres pharmaceutiques, vétérinaires ou cosmétiques et comprendre en outre tout additifs et/ou actifs connus et utilisés dans ce genre de composition.

Dans une composition acide solide, liquide ou pâteuse selon l'invention, la

phycoyanine peut être incorporée par exemple sous forme de poudre. Ladite composition acide, particulièrement ladite composition alimentaire acide pourra alors se présenter sous toute forme usuelle connue telle que des crèmes, gels, mousses, pâtes, etc... Particulièrement pour une composition alimentaire solide on peut citer
5 notamment les gâteaux ou biscuits, les aliments secs à cuire, les poudres à diluer, les compositions gélatineuses solides ou "jelly", des mousses etc.

Selon l'invention, ladite composition acide liquide pourra être une composition aqueuse dans laquelle la phycoyanine est dissoute. Elle peut se présenter sous la forme d'une composition prête à l'emploi ou comme un concentré liquide à diluer,
10 notamment pour son ingestion ou à ajouter à un aliment solide soit pour sa préparation, soit pour son ingestion, par exemple une composition liquide concentrée d'enrobage ou "topping" qui sera déposée sur un gâteau pour lui apporter sa couleur. Parmi ces compositions concentrées, on peut citer les sirops, alcoolisés ou non.

La composition acide liquide selon l'invention peut être de viscosité variable et
15 comprendre ou non des additifs tels que des agents de viscosité, des gélifiants, et autres additifs structurants connus de l'homme du métier et usuels pour la préparation de compositions alimentaires liquides.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la composition alimentaire liquide peut être une boisson acide, gazeuse ou non. On citera en particulier les sodas,
20 les jus, les boissons pour sportifs, boissons d'effort, boissons de récupération, etc. Les compositions de ces boissons sont bien connues de l'homme du métier et peuvent comprendre, notamment, des sucres, des sels minéraux, des additifs alimentaires, du gaz dissout, etc. La boisson selon l'invention est une boisson acide usuelle dans laquelle le colorant habituellement employé a été remplacé en totalité ou en partie par
25 une phycoyanine résistante à un pH acide selon l'invention.

Selon l'invention la teneur en phycoyanine dans les compositions selon l'invention pourra être conforme aux usages de l'homme du métier.

Par exemple lorsque la phycoyanine sera utilisée pour colorer la composition acide alors la teneur en phycoyanine dans ladite composition pourra être conforme
30 aux usages de l'homme du métier en matière de coloration.

Dans une composition acide liquide au sens de l'invention la teneur en phycoyanine peut être comprise entre 2,5 mg/L et 2500 mg/L, préférentiellement entre 25 mg/L et 300 mg/L.

Dans une composition liquide de type boisson prête à l'emploi, la teneur en

phycocyanine peut être généralement comprise entre 25 mg/l et 300 mg/L, préférentiellement entre 50 mg/L et 100 mg/L.

Dans une composition liquide concentrée à diluer pour son usage, comme un sirop, la teneur en phycocyanine peut être généralement comprise entre 250 mg/l et 2500 mg/l, préférentiellement entre 500 mg/L et 1000 mg/L.

Dans une composition solide, la teneur en phycocyanine peut être généralement comprise entre 0,01 mg/g et 10 mg/g, préférentiellement entre 0,1 mg/g et 5,0 mg/g, très préférentiellement entre 0,25 mg/g et 2,5 mg/g.

10 **EXEMPLES**

Exemple 1. Purification par précipitation acide sur cellule fraîche.

Un moût de fermentation de cellule de *Galdieria sulphuraria* centrifugé puis rincé avec un volume équivalent d'eau à subir un broyage mécanique afin de libérer les phycobiliprotéines dans une phase aqueuse à pH 6. Le broyat est acidifié par pallier de 0,5 unité pH par ajout d'acide citrique. A chaque pallier, un prélèvement du mélange est effectué puis centrifugé 10 min à 11 000 g. Le surnageant contenant les phycobiliprotéines est prélevé et l'indice de pureté mesuré en faisant le rapport d'absorbance à 618 nm sur l'absorbance à 280 nm avec un spectrophotomètre (Amersham Biosciences Ultra Spec 2100 Pro).

Il apparaît clairement que plus le pH baisse plus le l'indice de pureté augmente (Figure 1). Cette augmentation de l'indice de pureté traduit une baisse des protéines contaminantes dans le surnageant, alors que la C-PC, elle, reste majoritairement dans le surnageant. De par sa résistance au pH acide il n'y a pas de perte importante de la teneur en C-PC dans le surnageant (Figure 2). De façon surprenante, l'allophycocyanine (APC) elle disparaît totalement du surnageant pour des valeurs de pH inférieures à 5, pour se retrouver dans le culot avec les autres protéines précipitées et les débris cellulaires (Figure 3). Dans ce culot on retrouve également de la C-PC et de l'APC avec une teneur plus élevée en APC (Figure 3).

L'acidification permet également d'obtenir une meilleure séparation des phases liquide et solide et d'obtenir un culot de débris cellulaire et de protéines plus compacte et plus facile à séparer de la phase aqueuse.

Exemple 2. Purification par précipitation acide sur cellule lyophilisée et réhydratées.

Un moût de fermentation de cellule de *Galdieria sulphuraria* centrifugé puis rincé avec un volume équivalent d'eau à subir un broyage mécanique afin de libérer les phycobiliprotéines dans une phase aqueuse à pH 6. Le broyat ensuite lyophilisé. La matière sèche lyophilisée est suspendue dans un volume d'eau équivalent au volume initial du moût puis acidifié par palier de 0,5 unité pH par ajout d'acide citrique. A chaque palier, un prélèvement du mélange est effectué puis centrifugé 10 min à 11 000 g. Le surnageant contenant les phycobiliprotéines est prélevé et l'indice de pureté mesuré en faisant le rapport d'absorbance à 618 nm sur l'absorbance à 280 nm avec un spectrophotomètre (Amersham Biosciences Ultra Spec 2100 Pro).

10 Comme ce qui a été précédemment décrit dans l'exemple 1, nous pouvons constater une augmentation de l'indice de pureté corrélée avec une baisse du pH (Figure 4). Dans ce cas également, l'acidification permet également d'obtenir une meilleure séparation des phases liquides et solides et d'obtenir un culot de débris cellulaire et de protéines plus compacte et plus facile à séparer de la phase aqueuse. 15 De façon similaire à ce qui a été observé dans l'exemple 1, l'APC est retrouvée dans le culot et non dans la phase aqueuse (Figure 5) pour des pH inférieurs à 5. Pour des pH compris entre 6 et 5, la quantité d'APC diminue dans le surnageant en fonction de la baisse du pH.

20 **Exemple 3. Purification et concentration la C-PC par filtration tangentielle.**

L'extrait brut après précipitation acide et centrifugation est filtré sur un module de filtration tangentielle de type fibre creuse. La filtration à travers ce maillage permet d'éliminer une partie des protéines autres que la C-PC et d'augmenter ainsi l'indice de pureté (Figure 6). L'indice de pureté pouvant être atteint par cette méthode 25 approche des valeurs normalement obtenues par des méthodes beaucoup plus complexe faisant intervenir des extractions biphasiques, ou des précipitations au sulfate d'ammonium, voir même des méthodes de chromatographie (Sorensen et al., 2013 ; Cruz de Jesús *et al.*, 2006). En parallèle de la purification cette étape de filtration permet d'éliminer l'eau de l'extrait de C-PC (Figure 7), et de faciliter le 30 séchage du produit par la suite.

REFERENCES

- 5 - Moon, Myounghoon, Sanjiv K Mishra, Chul Woong Kim, William I Suh, Min S Park, and Ji-Won Yang. "Isolation and Characterization of Thermostable Phycocyanin from *Galdieria Sulphuraria*," Korean journal of chemical engineering, 31 (2014): 1–6.
- 10 - Verónica Cruz de Jesús, Gabriel Alfonso Gutiérrez-Rebolledo, Marcela Hernández-Ortega, Lourdes Valadez-Carmona, Angélica Mojica-Villegas, Gabriela Gutiérrez-Salmeán and Germán Chamorro-Cevallos. Methods for Extraction, Isolation and Purification of C-phycocyanin: 50 years of Research in Review. (2016) Int J Food Nutr Sci 3(3): 1- 10.
- Laila Sørensen, Andrea Hantke, Niels T. Eriksen. Purification of the photosynthetic pigment C-phycocyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. J Sci Food Agric. 2013 Sep;93(12):2933-8.
- 15 - Eriksen NT. Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. Appl Microbiol Biotechnol. 2008 Aug;80(1):1-14.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de purification de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides à partir d'un extrait brut de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides provenant de
5 cellules de microorganismes producteurs de phycobiliprotéines, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de
 - a) ajustement du pH de l'extrait brut de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides à un pH inférieur à 6 de manière à faire précipiter les matières organiques autres que les phycobiliprotéines résistantes aux pH acides,
 - 10 b) récupération du surnageant comprenant les phycobiliprotéines résistantes aux pH acides et
 - c) isolation des phycobiliprotéines résistantes aux pH acides à partir du surnageant.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la
15 phycobiliprotéine est de la phycocyanine résistante aux pH acides.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la phycocyanine comprend un mélange c-phycocyanine (C-PC) et d'allophycocyanine (APC), le rapport molaire C-PC/APC étant d'au moins 5.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le
20 pH du milieu de culture dans l'étape a) est ajusté à un pH inférieur à 5.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la phycobiliprotéine comprend au moins 95% de C-PC résistante aux pH acides et moins de 5% Molaires d'APC, les pourcentages étant exprimés par rapport à la somme totale d'APC et de C-PC.
- 25 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la récupération du surnageant est faite par filtration.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le microorganisme producteur de phycobiliprotéine est choisi parmi les souches de microalgues des genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*.
- 30 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la microalgue est choisie parmi les souches *Galdieria sulphuraria*, *Cyanidium caldarium* et *Cyanidioschyzon merolae*.
9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les phycobiliprotéines contenues dans le culot sont solubilisées dans une solution

aqueuse de pH acide et séparées des impuretés et isolées en reprenant les étapes b) et c).

10. Phycobiliprotéine résistante aux pH acides obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

5 11. Phycocyanine résistante aux pH acides comprenant un mélange c-phycocyanine (C-PC) et d'allophycocyanine (APC), caractérisée en ce que le rapport molaire C-PC/APC est d'au moins 5.

12. Phycocyanine selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend moins de 5% Molaires d'APC.

10 13. Phycocyanine selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce que l'apoprotéine de la sous-unité α de la C-PC comprend la SEQ ID NO 1 et l'apoprotéine de la sous-unité β de la C-PC comprend la SEQ ID 2 ou des variants de celles-ci.

15 14. Utilisation d'une phycobiliprotéine selon la revendication 10 ou d'une phycocyanine selon l'une des revendications 11 à 13, comme colorant dans un produit alimentaire.

15. Composition alimentaire caractérisée en ce qu'elle comprend une phycobiliprotéine selon la revendication 10 ou une phycocyanine selon l'une des revendications 11 à 13.

20 16. Phycocyanine comprenant un mélange d'allophycocyanine (APC) et de la c-phycocyanine (C-PC) dont le rapport Molaire C-PC/APC est inférieur à 5.

17. Phycocyanine selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'apoprotéine de la sous-unité α de l'APC comprend la SEQ ID NO 3 et l'apoprotéine de la sous-unité β de l'APC comprend la SEQ ID 4 ou des variants de celles-ci.

25

1/4

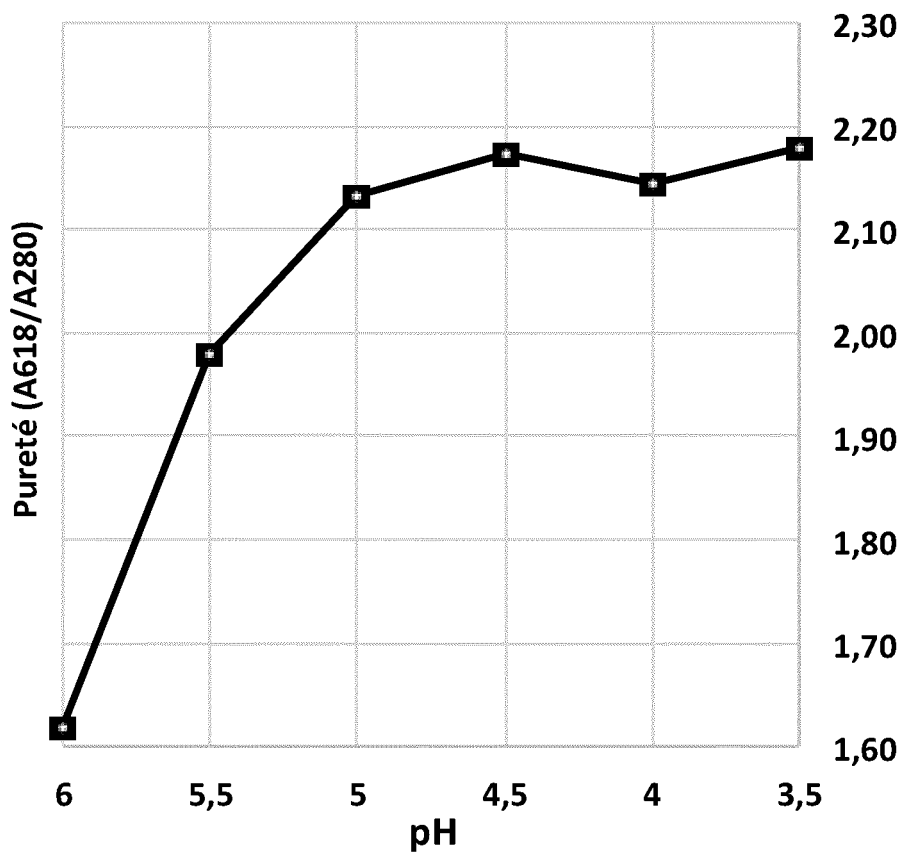


Fig. 1

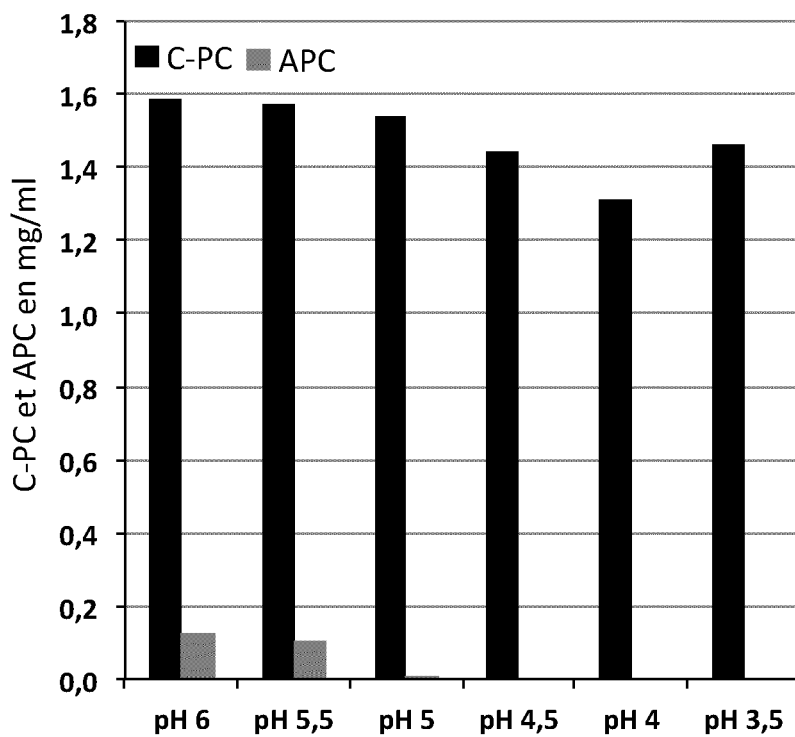


Fig. 2

2/4

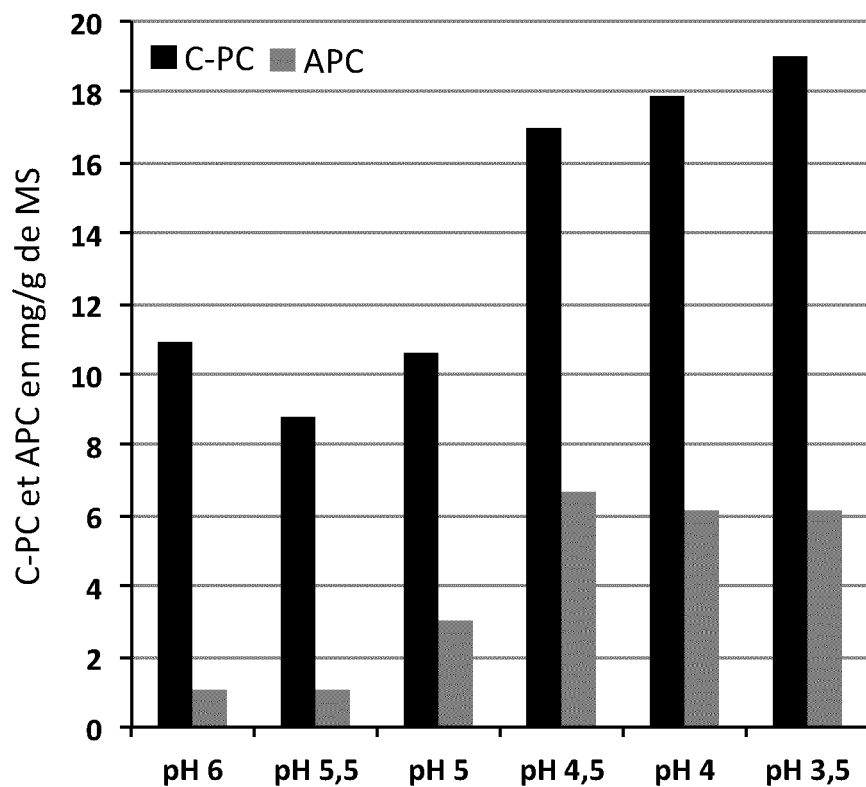


Fig. 3

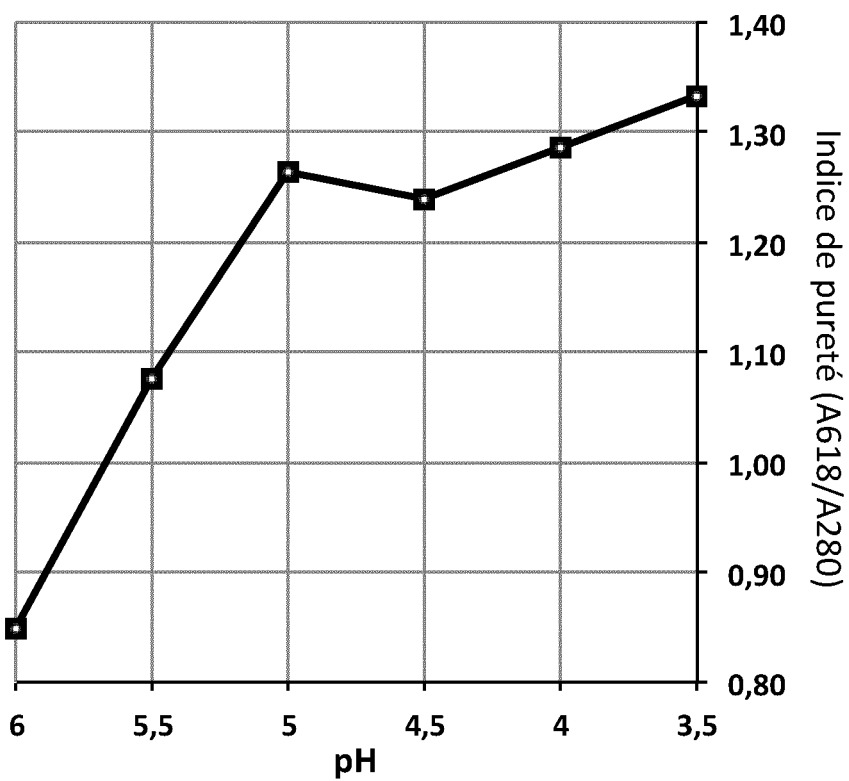


Fig. 4

3/4

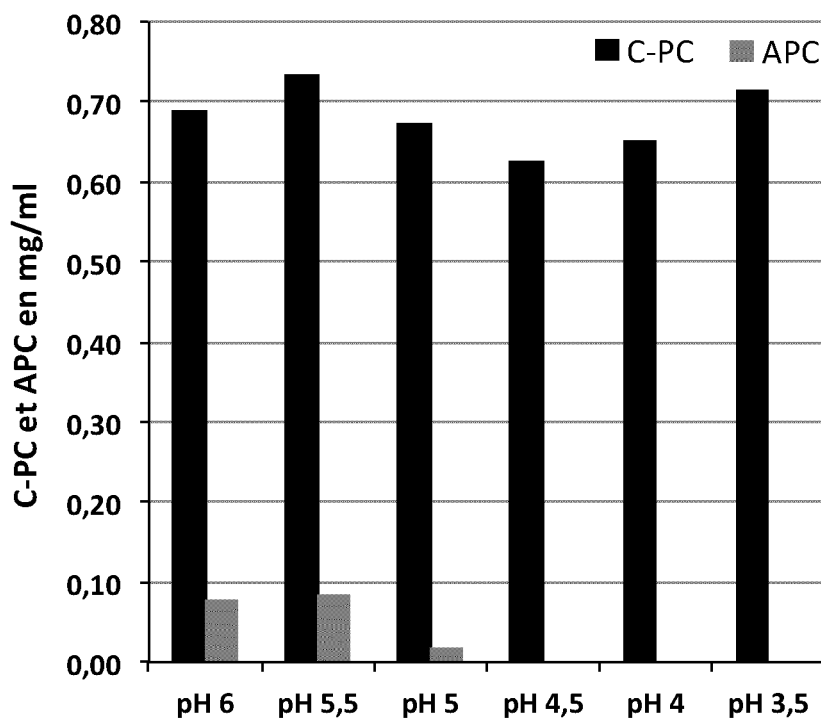


Fig. 5

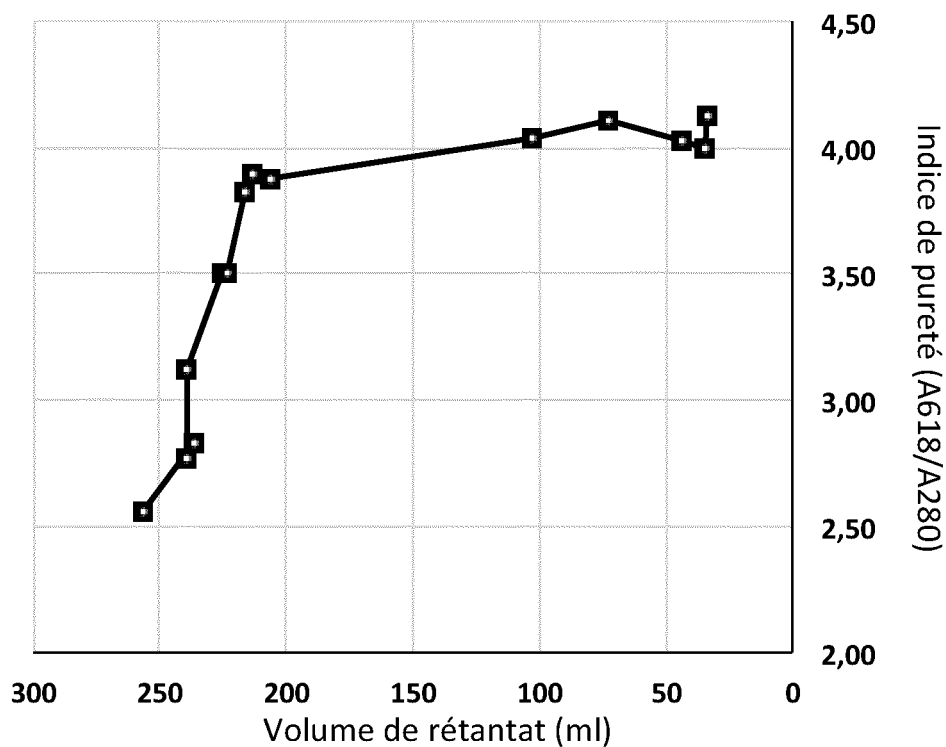


Fig. 6

4/4

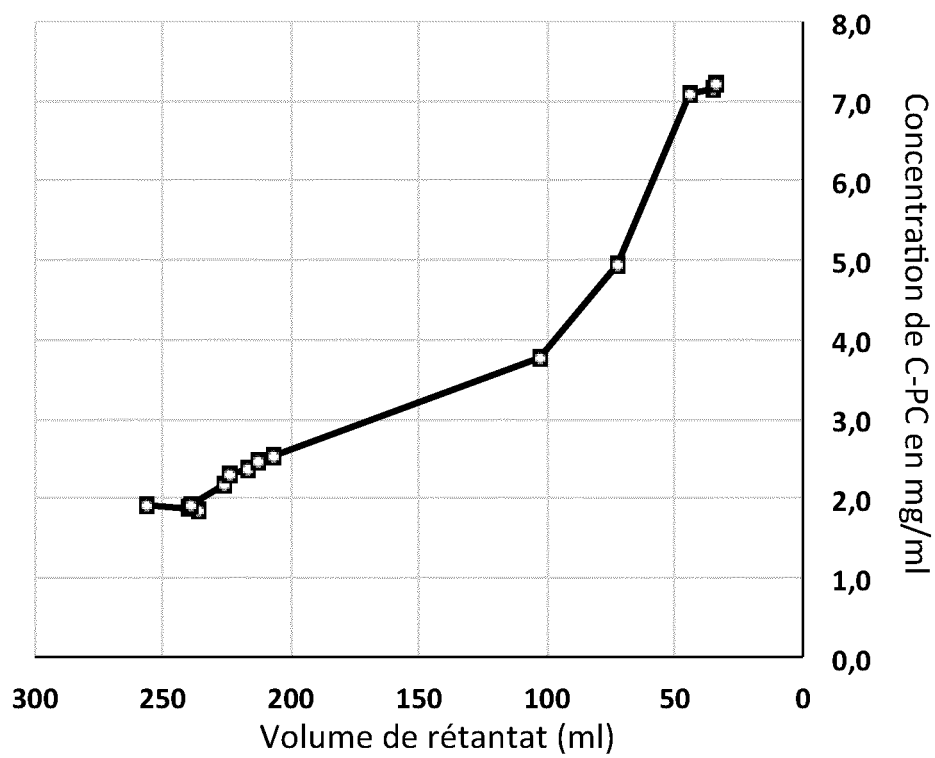


Fig. 7

P100090FR01 - SEQUENCE LISTING CORRIGE
SEQUENCE LISTING

<110> FERMENTALG

<120> PURIFICATION DES PHYCOBILIPROTEINES

<130> P100090FR01

<140> FR1752674

<141> 2017-03-30

<160> 4

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 162

<212> PRT

<213> Galdieria sulphuraria

<400> 1

```

Met Lys Thr Pro Ile Thr Glu Ala Ile Ala Ala Ala Asp Asn Gln Gly
1           5           10           15
Arg Phe Leu Ser Asn Thr Glu Leu Gln Ala Val Asn Gly Arg Tyr Gln
          20           25           30
Arg Ala Ala Ala Ser Leu Glu Ala Ala Arg Ser Leu Thr Ser Asn Ala
          35           40           45
Gln Arg Leu Ile Asn Gly Ala Ala Gln Ala Val Tyr Ser Lys Phe Pro
          50           55           60
Tyr Thr Ser Gln Met Pro Gly Pro Gln Tyr Ala Ser Ser Ala Val Gly
65           70           75           80
Lys Ala Lys Cys Ala Arg Asp Ile Gly Tyr Tyr Leu Arg Met Val Thr
          85           90           95
Tyr Cys Leu Val Val Gly Gly Thr Gly Pro Met Asp Glu Tyr Leu Ile
          100          105          110
Ala Gly Leu Glu Glu Ile Asn Arg Thr Phe Asp Leu Ser Pro Ser Trp
          115          120          125
Tyr Val Glu Ala Leu Asn Tyr Val Lys Ser Asn His Gly Leu Ser Gly
          130          135          140
Gln Ala Ala Asn Glu Ala Asn Thr Tyr Ile Asp Tyr Ala Ile Asn Ala
145          150          155          160
Leu Ser

```

<210> 2

<211> 172

<212> PRT

<213> Galdieria sulphuraria

<400> 2

```

Met Leu Asp Ala Phe Ala Lys Val Val Ala Gln Ala Asp Ala Arg Gly
1           5           10           15

```

P100090FR01 - SEQUENCE LISTING CORRIGE

Glu Phe Leu Ser Asn Thr Gln Leu Asp Ala Leu Ser Lys Met Val Ser
 20 25 30
 Glu Gly Asn Lys Arg Leu Asp Val Val Asn Arg Ile Thr Ser Asn Ala
 35 40 45
 Ser Ala Ile Val Thr Asn Ala Ala Arg Ala Leu Phe Ser Glu Gln Pro
 50 55 60
 Gln Leu Ile Gln Pro Gly Gly Asn Ala Tyr Thr Asn Arg Arg Met Ala
 65 70 75 80
 Ala Cys Leu Arg Asp Met Glu Ile Ile Leu Arg Tyr Val Ser Tyr Ala
 85 90 95
 Ile Ile Ala Gly Asp Ser Ser Val Leu Asp Asp Arg Cys Leu Asn Gly
 100 105 110
 Leu Arg Glu Thr Tyr Gln Ala Leu Gly Val Pro Gly Ala Ser Val Ala
 115 120 125
 Val Gly Val Glu Lys Met Lys Asp Ser Ala Ile Ala Ile Ala Asn Asp
 130 135 140
 Pro Ser Gly Ile Thr Thr Gly Asp Cys Ser Ala Leu Met Ala Glu Val
 145 150 155 160
 Gly Thr Tyr Phe Asp Arg Ala Ala Thr Ala Val Gln
 165 170

<210> 3

<211> 163

<212> PRT

<213> Galdieria sulphuraria

<400> 3

Met Ser Leu Ile Ser Gln Ile Ile Asn Thr Ala Asp Glu Glu Leu Arg
 1 5 10 15
 Tyr Pro Asn Gly Gly Glu Leu Ser Thr Leu Ile Tyr Phe Phe Asn Thr
 20 25 30
 Ala Asn Thr Arg Ile Asn Ile Ile Asn Lys Leu Lys Glu Arg Glu Lys
 35 40 45
 Asp Ile Ile Gln Asn Ala Ser Lys Lys Leu Phe Gln Leu His Pro Glu
 50 55 60
 Tyr Val Ser Ser Gly Gly Asn Ala Ser Gly Pro Lys Gln Arg Ala Leu
 65 70 75 80
 Cys Leu Arg Asp Tyr Gly Trp Tyr Leu Arg Leu Val Thr Tyr Gly Ile
 85 90 95
 Leu Ala Gly Asp Ile Thr Pro Ile Glu Lys Ile Gly Ile Ile Gly Val
 100 105 110
 Lys Asp Met Tyr Asn Ser Leu Gly Val Pro Ile Ile Gly Met Tyr Asp
 115 120 125
 Ala Ile Lys Cys Leu Lys Glu Ala Ser Ile Asn Ile Phe Glu Leu Ser
 130 135 140
 Glu Glu Lys Asp Leu Ile Ile Pro Tyr Phe Asp Tyr Leu Ser Asn Ala
 145 150 155 160
 Ile Leu Ser

<210> 4

<211> 253

<212> PRT

P100090FR01 - SEQUENCE LISTING CORRIGE

<213> Galdieria sulphuraria

<400> 4

```

Met Ser Ile Val Thr Lys Ser Ile Val Asn Ala Asp Ala Glu Ala Arg
1          5          10          15
Tyr Leu Ser Pro Gly Glu Leu Asp Arg Ile Lys Ser Phe Val Leu Ser
20          25          30
Gly Gln Arg Arg Leu Arg Ile Ala Gln Ile Leu Thr Asp Asn Arg Glu
35          40          45
Arg Ile Val Lys Gln Ala Gly Gln Gln Leu Phe Gln Gln Arg Pro Asp
50          55          60
Ile Val Ser Pro Gly Gly Asn Ala Tyr Gly Glu Glu Met Thr Ala Thr
65          70          75          80
Cys Leu Arg Asp Leu Asp Tyr Tyr Leu Arg Leu Val Thr Tyr Gly Val
85          90          95
Val Ala Gly Asp Ile Ser Pro Ile Glu Glu Ile Gly Leu Glu Asp Phe
100         105         110
Met Gln Asp Ala Ile Thr Ala Val Ile Asn Thr Ala Asp Val Gln Gly
115         120         125
Lys Tyr Leu Asp Asn Ser Ser Ile Glu Lys Leu Lys Gly Tyr Phe Gln
130         135         140
Thr Gly Glu Leu Arg Val Arg Ala Ala Ala Thr Ile Ala Ala Asn Ala
145         150         155         160
Ala Gly Ile Ile Lys Asp Ala Val Ala Lys Ser Leu Leu Tyr Ser Asp
165         170         175
Ile Thr Arg Pro Gly Gly Asn Met Tyr Thr Thr Arg Arg Tyr Ala Ala
180         185         190
Cys Ile Arg Asp Leu Asp Tyr Tyr Leu Arg Tyr Ala Thr Tyr Ser Met
195         200         205
Leu Ala Gly Asp Pro Ser Ile Leu Asp Glu Arg Val Leu Asn Gly Leu
210         215         220
Lys Glu Thr Tyr Asn Ser Leu Gly Val Pro Ile Gly Ala Thr Ile Gln
225         230         235         240
Ser Ile Gln Ala Met Lys Glu Val Thr Ser Ser Leu Val
245         250

```



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

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

N° d'enregistrement
national

FA 839810
FR 1752674

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	EISELE L E ET AL: "Studies on C-phycoyanin from Cyanidium caldarium, a eukaryote at the extremes of habitat", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOENERGET, AMSTERDAM, NL, vol. 1456, no. 2-3, 10 janvier 2000 (2000-01-10), pages 99-107, XP004338930, ISSN: 0005-2728, DOI: 10.1016/S0005-2728(99)00110-3 * page 101, colonne 1, alinéa 3 - page 102, colonne 1, alinéa 2; figure 6 *	10,14,15	C07K1/30 C07K1/34 C07K14/405 A23L5/46
X	O H KAO ET AL: "Physical-chemical properties of C-phycoyanin isolated from an acido-thermophilic eukaryote, Cyanidium caldarium", BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 147, no. 1, 1 avril 1975 (1975-04-01), pages 63-70, XP055324293, GB ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/bj1470063 * le document en entier *	10,14,15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	* le document en entier *	1-9	C07K
X	WO 2016/099261 A1 (UNIV GRONINGEN [NL]) 23 juin 2016 (2016-06-23)	10,14,15	
A	* page 10, ligne 14; figures 4-7 * * page 11, ligne 4 - ligne 6 *	1-9	
X	WO 2005/065697 A1 (MINARD FLORENCE [FR]) 21 juillet 2005 (2005-07-21)	10,14,15	
A	* page 17; exemple 5 *	1-9	
X	WO 2015/090697 A1 (BASF SE [DE]) 25 juin 2015 (2015-06-25) * revendications; exemples 11,12 *	10,14,15	
	-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 décembre 2017		Bayrak, Sinasi	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite			
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

4

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

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

N° d'enregistrement
national

FA 839810
FR 1752674

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	J. L. HOOGLAND: "Prairie Dogs Disperse When All Close Kin Have Disappeared", SCIENCE, vol. 339, no. 6124, 7 mars 2013 (2013-03-07), pages 1205-1207, XP055431325, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1231689 * séquences 1-4 * -----	1-10,14,15	
E,D	WO 2017/050918 A1 (FERMENTALG [FR]) 30 mars 2017 (2017-03-30) * page 13, ligne 19 - ligne 31; revendications * -----	1-10,14,15	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 décembre 2017		Bayrak, Sinasi	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

4

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 839810
FR 1752674

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

1. revendications: 1-10(complètement); 14, 15(en partie)

Procédé de purification de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides; phycobiliprotéine résistante aux pH acides obtenue par le procédé, l'utilisation comme colorant dans un produit alimentaire; composition alimentaire caractérisée en ce qu'elle comprend une phycobiliprotéine résistante aux pH acides.

2. revendications: 11-13(complètement); 14, 15(en partie)

Phycocyanine résistante aux pH acides comprenant un mélange c-phycocyanine (C-PC) et d'allophycocyanine (APC), caractérisée en ce que le rapport molaire C-PC/APC est d'au moins 5; l'utilisation comme colorant dans un produit alimentaire; composition alimentaire caractérisée en ce qu'elle comprend une telle phycobiliprotéine.

3. revendications: 16, 17

Phycocyanine comprenant un mélange d'allophycocyanine (APC) et de la c-phycocyanine (C-PC) dont le rapport Molaire C-PC/APC est inférieur à 5.

La première invention a été recherchée.

On considère qu'il existe 3 inventions couvertes par les revendications: Invention 1 (revendications 1-10 et 14,15 (dans la mesure où ces revendications sont liées aux revendications 1-10)): Procédé de purification de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides; phycobiliprotéine résistante aux pH acides obtenue par le procédé, l'utilisation d'une phycobiliprotéine résistante aux pH acides comme colorant dans un produit alimentaire; composition alimentaire caractérisée en ce qu'elle comprend telle phycobiliprotéine. Invention 2 (revendications 11-13 et 14,15 (dans la mesure où ces revendications sont liées aux revendications 1 1-13)): Phycocyanine résistante aux pH acides comprenant un mélange c-phycocyanine (C-PC) et d'allophycocyanine (APC), caractérisée en ce que le rapport molaire C-PC/APC est d'au moins 5; l'utilisation de telle phycocyanine comme colorant dans un produit alimentaire; composition alimentaire caractérisée en ce qu'elle comprend une telle phycobiliprotéine. Invention 3 (revendications 16,17): Phycocyanine comprenant un mélange d'APC et de la C-PC dont le rapport Molaire C-PC/APC est inférieur à 5. (i) Le problème que l'invention 1 se propose de résoudre peut être considéré comme fournir un procédé de purification d'une phycobiliprotéine résistante aux pH acides/ et comme fournir une phycobiliprotéine résistante aux pH acides obtenue selon le procédé. La solution proposée est un procédé de purification de phycobiliprotéines

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 839810
FR 1752674

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

résistantes aux pH acides à partir d'un extrait brut caractérisé en ce qu'il comprend l'étape d'ajustement du pH de l'extrait à un pH inférieur à 6 et une phycobiliprotéine résistante aux pH acides obtenue par ce procédé.

(ii) Le problème que l'invention 2 se propose de résoudre peut être considéré comme fournir des nouvelles phycobiliprotéines résistantes aux pH acides pour ses utilisations comme colorants dans un produit/composition alimentaire.

La solution proposée est une phycocyanine résistante aux pH acides comprenant un mélange de la C-PC et d'APC, caractérisée en ce que le rapport molaire C-PC/APC est d'au moins 5.

(iii) Le problème que l'invention 3 se propose de résoudre peut être considéré comme fournir une phycobiliprotéine.

La solution proposée est une phycocyanine comprenant un mélange d'APC et de la C-PC dont le rapport molaire C-PC/APC est inférieur à 5.

Les inventions à priori apportent des solutions à différents problèmes. L'objet commun qui lie entre elles les inventions peut être considéré comme la phycobiliprotéine, en particulier la phycocyanine.

Les raisons pour lesquelles les inventions ne sont pas liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général sont les suivantes:

Les documents D1-D4 révèlent des phycobiliprotéines, en particulier des phycocyanines résistantes aux pH acides. Le document D1 décrit une C-PC résistante aux pH acides. Le microorganisme producteur de phycobiliprotéine est l'eucaryote *C. caldarium* (voir la page 101, colonne 2, alinéa 1; page 104, colonne 2, alinéa 2). Le document D2 décrit une C-PC. Le microorganisme producteur de phycobiliprotéine est l'eucaryote *C. caldarium* (voir les passages cités dans le rapport de recherche). Les documents D3 et D4 révèlent des phycocyanines. Le microorganisme producteur est l'eucaryote *C. merolae* (voir les passages cités dans le rapport de recherche). De plus, l'utilisation de phycocyanines résistantes aux pH acides comme colorant dans un produit alimentaire et une composition alimentaire caractérisée en ce qu'elle comprend telle phycocyanine sont révélées dans D3 et D4 (voir les passages cités dans le rapport de recherche).

Donc, des phycobiliprotéines, en particulier des phycobiliprotéines résistantes aux pH acides et des phycocyanines résistantes aux pH acides sont bien connues dans l'art antérieur.

Par conséquent, les inventions 1-3 ne sont pas liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général. Par conséquent, la présente demande ne satisfait pas aux exigences d'unité de l'invention.

Pour ces raisons, une recherche significative n'a pu être effectuée au regard de l'ensemble de l'objet exposé dans les revendications. L'étendue de la recherche a par conséquent été limitée à l'invention 1 (revendications 1-10 et 14,15 (dans la mesure où ces revendications sont liées aux revendications 1-10)).

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1752674 FA 839810**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **21-12-2017**

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2016099261 A1	23-06-2016	AUCUN	

WO 2005065697 A1	21-07-2005	EP 1732576 A1	20-12-2006
		FR 2863615 A1	17-06-2005
		WO 2005065697 A1	21-07-2005

WO 2015090697 A1	25-06-2015	AU 2014365657 A1	23-06-2016
		CN 105813471 A	27-07-2016
		EP 3091852 A1	16-11-2016
		JP 2017509316 A	06-04-2017
		KR 20160098272 A	18-08-2016
		PH 12016501093 A1	11-07-2016
		US 2016324745 A1	10-11-2016
		WO 2015090697 A1	25-06-2015

WO 2017050918 A1	30-03-2017	FR 3041505 A1	31-03-2017
		FR 3041653 A1	31-03-2017
		WO 2017050917 A1	30-03-2017
		WO 2017050918 A1	30-03-2017
