

(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
07 décembre 2017 (07.12.2017)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2017/209587 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 1/14 (2006.01) C07K 1/36 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/MA2017/000013

(22) Date de dépôt international :
01 juin 2017 (01.06.2017)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
39079 01 juin 2016 (01.06.2016) MA

(71) Déposants : INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE
HALIEUTIQUE [—/MA] ; 2 Ain Diab, Casablanca, Ca-
sablanca (MA). Association pôle de compétitivité pou la
pêche et l'industrie de transformation des produits de la

mer [MA/MA] ; Immeuble l'ami, ancien port, ancien port,
Agadir 80010 (MA).

(72) Inventeurs : KHAROUBI, Mariem ; CSVTPM, pk7,
route d'Essaouira, Anza, BP1050, Agadir 80010 (MA).
BELLALI, Fatima ; rue 92 N°30, Famille Française, Ca-
sablanca (MA). TENZALI, Zakaria ; CSVTPM, pk7,
route d'Essaouira, Anza, BP 1050, Agadir 80090 (MA).
YOUSSEF, Radi ; CSVTPM, pk7, route d'Essaouira, An-
za, BP1050, Agadir 80010 (MA). CHAIRA, Jamal ;
CSVTPM, pk7, route d'Essaouira, Anza, BP1050, Aga-
dir 80010 (MA). HASSAN, Alhayane ; CSVTPM, pk7,
route d'Essaouira, Anza, BP1050, Agadir 80090 (MA).
HANOUN, Said ; CSVTPM, pk7, route d'Essaouira, An-
za, BP1050, Agadir 80090 (MA). AKESBI, Abdellah ;
CSVTPM, pk7, route d'Essaouira, Anza, BP1050, Agadir
80010 (MA). LAAZUIOUZ, Issam ; CSVTPM, pk7, route
d'Essaouira, Anza, BP1050, Agadir 80090 (MA).

(54) Title: METHOD FOR THE EXTRACTION AND PURIFICATION OF NATIVE MARINE COLLAGEN FROM SARDINA PILCHARDUS SARDINE SCALES

(54) Titre : PROCÉDÉ D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DE COLLAGÈNE MARIN NATIF À PARTIR DES ÉCAILLES DE SARDINE SARDINA PILCHARDUS

(57) Abstract: The present invention relates to a method for the low-temperature acid extraction and purification of soluble type I native marine collagen from fresh or frozen sardine scales (sardina pilchardus), characterised in that it comprises the steps of: 1) washing the scales with water, 2) drying the scales, 3) alkaline treatment to eliminate non-collagen proteins, 4) acid treatment to eliminate minerals, 5) cold-extraction at acid pH in order to solubilise the native collagen fibrils, 6) ultra-centrifugation to eliminate large aggregates, 7) precipitation of the collagen by adding a neutral salt, 8) re-suspension of the precipitated collagen, and 9) dialysis using a dialysis pouch. The method can be used to produce collagen having a maximum purity within a reasonable period of time, by removing almost all of the non-collagen impurities and minerals, solubilising all of the collagen and limiting the denaturation thereof. In addition to obtaining a high yield of type I native marine collagen, the method of the invention, optimised by the response surface method (RSM), can be used to reduce the duration of the alkaline and acid treatment and to considerably reduce the duration of the acid extraction. It can also be used to reduce the amount of reagents used, in this case soda, demineralisation acid and extraction acid. The method solves the particular problem of managing chemicals, in a more durable and cost-effective manner. The high-quality native collagen obtained is suitable for food, food-based cosmetics and biomedical uses.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'extraction acide à faible température et de purification de collagène marin natif type I soluble à partir des écailles de sardine (sardina pilchardus) fraîches ou congelées, caractérisée en ce qu'il comprend par les étapes de 1) lavage à l'eau des écailles, 2) séchage des écailles 3) traitement alcalin pour éliminer les protéines non collagéniques, 4) traitement acide pour éliminer les minéraux, 5) extraction à froid à pH acide pour solubiliser les fibrilles de collagène natif, 6) ultra-centrifugation pour éliminer les gros agrégats, 7) précipitation du collagène par adjonction d'un sel neutre 8) remise en suspension du collagène précipité et 9) dialyse au moyen d'un sac de dialyse. Ce procédé permet dans un délai raisonnable de produire un collagène avec une pureté maximale en supprimant la quasi-totalité des impuretés non collagéniques et des minéraux, en solubilisant la totalité du collagène et en limitant sa dénaturation. En plus de l'obtention de collagène marin natif type I avec un rendement considérable, ce procédé optimisé par la méthode de réponse de surface RSM permet de réduire la durée du traitement alcalin et acide, de diminuer considérablement la durée de l'extraction acide. Il permet également d'amoindrir la quantité de réactifs utilisés en l'occurrence, la soude, l'acide déminéralisateur et l'acide extracteur. Le procédé résout le problème particulier de la gestion des produits chimiques, de manière plus durable et plus économique. Le collagène natif de haute qualité ainsi obtenu est propice à des applications en alimentaire, en cosmétiques et en biomédical.

WO 2017/209587 A1

(74) **Mandataire : KHAROUBI, Mariem** ; CSVTPM, pk7,
route d'essaouira, Anza Bp1050, 80090, AGADIR (MA).

(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, 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.

(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), eurasién (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).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

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

Publiée:

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*
— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2(h))*

Domaine

Le domaine de l'invention est la biotechnologie marine plus particulièrement le domaine technique de l'extraction du collagène pour la production industrielle du collagène marin type I à des fins d'application en agro- alimentaire, en cosmetfood et éventuellement en application médicale.

DESCRIPTION DETAILLEE

Contexte

[0001]

Le collagène est une protéine extracellulaire fibreuse très largement répandue chez les animaux et sécrétée principalement par les cellules des tissus conjonctifs, comme la peau et les os.

[0002]

La prépondérance des résidus prolines et hydroxyproline confère à la triple hélice du collagène une rigidité caractéristique. Les groupements hydroxyles des résidus d'hydroxyproline participent à la formation de très nombreuses liaisons hydrogènes qui permettent de stabiliser l'ensemble de la structure (Kielty et Grant, 2002).

[0003]

Le collagène est un biopolymère largement utilisé dans la conception de biomatériaux visant à remplacer ou à traiter les tissus endommagés (Wallace, 2003). Ce collagène natif non dénaturé peut être ainsi utilisé par les industries cosmétique, pharmaceutique et médicale en raison de ses nombreuses autres caractéristiques. Notamment, quatre de ces propriétés sont particulièrement mises à contribution dans les biomatériaux: une forte résistance mécanique, un pouvoir hémostatique, une faible antigénicité et des effets sur la différenciation cellulaire (Fujioka et al, 1998).

[0004]

Actuellement, l'origine industrielle du collagène est bovine, porcine ou aviaire. Les origines porcines et bovines sont en tête de la production de collagène.

[0005]

En ce qui concerne cette production, elle se heurte à des restrictions religieuses dans certains pays musulmans ou juifs et à des restrictions sanitaires notamment celle relative à la crise de l'Encéphalopathie spongiforme et à celle de la grippe aviaire.

[0006]

La recherche d'autres ressources alternatives pour la production du collagène est donc particulièrement importante.

[0007]

Les écailles et les arrêtes du poisson renferment également du collagène qui s'apparente à celui des mammifères.

[0008]

Au Maroc, ces écailles ne sont pas actuellement valorisées et sont considérées comme des déchets.

[0008]

Au Maroc, les entreprises en amont notamment les industries de pêche et les industries transformatrices de la sardine génèrent des tonnages considérables d'écailles que l'on peut envisager de transformer en collagène marin.

Etat de la technique antérieure

Le brevet CN102839207 décrit un procédé de préparation de peptides de collagène à partir des écailles de poisson, caractérisé par les étapes principales suivantes :

- La récupération des écailles de poisson et leur immersion dans l'acide chlorhydrique pour éliminer le calcium; leur lavage pour neutraliser, leur séchage et leur broyage;
- L'ajout des écailles de poisson déminéralisées, séchées et broyées obtenus dans l'étape 1 dans un réacteur enzymatique avec de l'eau et un mélange de protéase mixte pour extraire le peptide de collagène. Après que l'extraction soit effectuée, la désactivation de l'enzyme et la centrifugation sont mises en œuvre pour obtenir une solution d'enzymolyse, dans laquelle la protéase mixte est un mélange de protéase neutre, de papaïne et de flavourzyme ;
- La réalisation de la concentration en film de la solution d'hydrolysate obtenu par l'étape 2, la congélation et le séchage de la solution concentrée pour obtenir la poudre de peptide de collagène.

Selon cette invention, le peptide de collagène des écailles de poisson obtenu par méthode enzymatique en utilisant la protéase neutre, la papaïne et le flavourzyme fait intervenir une seule étape, de telle sorte que non seulement le temps d'hydrolyse enzymatique (9 heures) est réduit, mais le taux d'extraction du peptide de collagène est également améliorée(72,72%). Par ailleurs, le procédé résout le problème particulier de la saveur du goût amer du peptide de collagène rencontré dans les autres techniques.

Le brevet CN102586373 divulgue un procédé d'extraction de collagène de haute qualité à basse température.

Le procédé comprend les étapes suivantes:

- Récupération des écailles de poisson ou des peaux de poisson ;
- Traitement par hydrolyse enzymatique à une température de 6 ° C;
- Filtration de l'hydrolysate enzymatique pour obtenir une solution de collagène
- Séchage de la solution de collagène pour obtenir une poudre de collagène.

Selon l'invention, le procédé décrit est sûr, pratique et respectueux de l'environnement. En plus, en raison de l'adoption de l'extraction à basse température, l'activité du peptide de collagène est conservée à une étendue maximale.

Le brevet CN102633877 traite un procédé de préparation industrielle d'une poudre de collagène à partir des peaux de poisson et à partir des écailles de poissons, caractérisé par une extraction à basse température, à quatre reprises.

Le procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes consistant à:

- la dilution de l'acide et de la base et le déshuilage à basse température,
- l'extraction à basse température, à quatre reprises,
- la désodorisation par du charbon actif et par de la porcelaine,
- la séparation par centrifugation papillon des particules solides, de l'huile et de l'eau,
- L'adsorption par résine macroporeuse de telle sorte que les métaux lourds sont éliminés, le liquide de collagène est obtenu et le pigment est élué.
- La concentration par ultrafiltration
- Le séchage par pulvérisation, de sorte que le collagène et deux pigments peuvent être obtenus;
- La réalisation d'une extraction supercritique au dioxyde de carbone, de sorte que l'huile de poisson comestible peut être obtenue.

Selon le procédé, non seulement la toxicité provoquée par le solvant résiduel est éliminée, mais l'huile de poisson peut également être obtenue. Grâce à la résine macroporeuse, non seulement la couleur et l'odeur de poisson sont complètement enlevées, mais le pigment naturel peut également être obtenu. La méthode présente les effets bénéfiques que 1) le collagène est blanc et sans odeur 2) le rendement est considérable 3) le pigment naturel est non-toxique, de couleur vive et stable 4) l'huile de poisson est comestible.

Les quatre produits ainsi obtenus peuvent être utilisés pour des produits de soins et de santé, des aliments et des additifs alimentaires. La poudre de collagène est un matériau médicinal et biochimique.

L'invention CN10 23 21 719 relate la technologie de préparation de production de collagène particulièrement la technologie de préparation de production de collagène par hydrolyse enzymatique des écailles de poisson, appartenant au domaine technique de l'extraction de collagène. La présente technologie passe par les étapes suivantes de 1) lavage. 2) Traitement alcalin 4) Décalcification 5) Cuisson 6) Refroidissement 7) Hydrolyse enzymatique préliminaire 8) Hydrolyse enzymatique secondaire 9) Fermentation par levure de la solution du collagène des écailles de poisson 10) Réaction d'adsorption par le charbon actif 11) Filtration 12) Concentration 13) Stérilisation 13) Atomisation .

La méthode fournie par l'invention, en plus de l'effet de l'obtention de peptides de collagène à forte concentration et à faible poids moléculaire à partir des écailles de poisson, elle apporte les effets de l'élimination des pigments qui affectent l'apparence du produit de collagène et réduit l'odeur de poisson de collagène, ce qui améliore la valeur du produit fini du collagène marin.

Description détaillée de l'invention

Pour résoudre le problème

Les extractions acides de collagène marin nécessitent des traitements préliminaires pour éliminer les impuretés minérales et les impuretés sous forme de protéines non collagénique. Ces traitements de déprotéinisation et de déminéralisation consomment des quantités considérables de produits chimiques (bases et acides) et sont de longue durée. La déprotéinisation avec l'hydroxyde de sodium peut durer jusqu'à 24 heures avec des concentrations comprises entre 0,3 M et 2, 5 M selon un ratio compris entre 1 : 10 et 1 : 30. Quant à la déminéralisation, sa durée peut aller jusqu'à 48 h. Similairement, l'extraction acido-soluble nécessite un investissement important en temps qui avoisinent les 48 heures et en quantité d'acide extracteur, ce qui se répercute inéluctablement sur la rentabilité industrielle de tout le procédé.

La présente invention concerne un procédé dont lequel les traitements préliminaires de déprotéinisation et de déminéralisation et l'extraction acido-soluble sont optimisés par la méthode de réponse de surface de telle manière à minimiser la quantité des intrants, la durée du process tout en réussissant des performances maximales de déminéralisation, de déprotéinisation, de récupération de collagène natif avec un haut degré de pureté.

Les moyens de résolution du problème

L'invention concerne un procédé acide de préparation de collagène marin natif type I, de bonne qualité, à partir des écailles de sardine, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de lavage à l'eau des écailles, de traitement alcalin, de traitement acide, d'extraction à froid à pH acide, d'ultracentrifugation, de précipitation et de dialyse (figure 1).

La matière première est constituée des écailles fraîches ou décongelées, obtenues en grande quantité, lors de la pêche et lors la transformation industrielle de la sardine.

Dans le procédé de l'invention, les écailles fraîches ou congelées sont lavées suffisamment à l'eau courante 3 fois pour éliminer les composés indésirables, tels que par exemple le sang, les graisses, les lambeaux de chair et les algues.

Les écailles sont ensuite séchées dans séchoir électrique à froid.

Après lavage et séchage, les écailles sont immergées, sous agitation, dans un bain alcalin froid de soude afin d'éliminer les protéines non collagénique et obtenir un collagène avec un haut degré de pureté.

Le bain alcalin est suivi d'un lavage à l'eau pour éliminer l'excès de soude et d'une filtration pour récupérer les résidus déprotéinisés.

Nous avons montré par la méthode de réponse de surface RSM qu'une combinaison judicieuse des paramètres réactionnels tels que la concentration de la soude, le ratio soude écaille et la durée de la déprotéinisation permettaient l'élimination des protéines non collagénique avec un rendement satisfaisant sans altérer l'intégrité du collagène. Les trois

facteurs étudiés pour la déprotéinisation sont donc la concentration de NaOH, le temps de traitement et le ratio NaOH /écailles. La teneur en protéines totales et en hydroxyproline en solution ont été analysées respectivement en vue de déterminer la quantité des protéines non collagénique solubilisés et les pertes de collagène durant la déprotéinisation et la déminéralisation.

De ce fait, et selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, nous utiliserons la soude à raison de **0,1M** de NaOH avec un ratio uniquement de **1:8** pendant seulement **4h**. Après cette déprotéinisation, les écailles sont immergées dans un bain acide froid sous agitation.

D'une manière avantageuse, et comparés aux travaux décrits dans la littérature, nous avons trouvé par la méthode de réponse de surface RSM qu'une combinaison judicieuse des paramètres réactionnels tels que la nature de l'acide, la concentration de l'acide et la durée de la déminéralisation permettaient d'extraire le maximum de minéraux avec un rendement satisfaisant supérieur à 99% en seulement **18 h** sans altérer l'intégrité du collagène.

Deux acides peuvent être utilisés pour la déminéralisation, soit l'acide diaminotétracarboxylique l'EDTA ou l'acide minéral : l'acide chlorhydrique.

D'une manière avantageuse, la déminéralisation a été effectuée à une concentration de **0,1M HCL** pendant **18h**.

D'une manière profitable, la déminéralisation a été effectuée à une concentration de **0,3 M EDTA** pendant **18h**.

On comprend ainsi que l'invention permet de résoudre les problèmes techniques de la longueur du traitement acide et alcalin énoncés précédemment avec seulement 4H et un ratio de 1 :8 pour le traitement alcalin et une diminution de 24 H à 18H pour le traitement acide.

Les écailles ainsi déprotéinisées et déminéralisées sont ensuite lavées à l'eau jusqu'à neutralisation.

Les écailles déprotéinisées, déminéralisées et neutralisées sont solubilisées dans un bain acide froid sous agitation.

D'une manière avantageuse, l'extraction acidosoluble a été effectuée à une concentration de **0,5 M d'acide acétique** pendant seulement **30 H**.

On comprend ainsi que l'invention permet de contourner le problème techniques de la durée d'extraction acide qui se voit baisser de 48 H à 30H avec seulement 0,5 M d'acide acétique.

La solution de collagène ainsi obtenue est ensuite centrifugée à froid à 20 000g à 4°C pendant 1 heure dans le but d'éliminer les gros agrégats non dissous.

Le surnageant récupéré est précipité sélectivement par un sel neutre. De préférence ce sel est le chlorure de sodium

Après 12 h d'agitation à 4°C, un précipité de collagène se forme.

Le collagène précipité est ensuite récupéré sous forme de culots par centrifugation à 20 000g pendant 1 heure à 4°C.

Ces culots sont solubilisés dans l'acide acétique.

On procédera ensuite à deux dialyses successives effectuées contre de l'acide acétique d'une part et contre l'eau distillée d'autre part. La dialyse a été réalisée grâce à un sac de dialyse dont le seuil de rupture est de 14 KDA.

Le collagène ainsi purifié est un hétérodimère qui se compose de deux chaînes alpha et une chaîne Béta (Fig.2).

La température de début de dénaturation du collagène purifié à partir des écailles est de 27,5°C. La température de dénaturation des collagènes acido-solubles de mammifères est de l'ordre de 38 ° C tandis que la température de début de dénaturation du collagène à partir des écailles conforme à l'invention est voisine de 27,5 °C. Cette température plus basse constitue une caractéristique avantageuse du collagène de l'invention.

Les solutions de collagène sont transparentes à une concentration en collagène comprise entre 4 mg/ml et 5,23 mg/ml d'acide acétique.

Le rendement d'extraction obtenu par ce procédé est de 26,7%.

Brèves description de figures

La figure 1 décrit le procédé acide de préparation de collagène marin à partir des écailles de sardines en qui comprend : Le lavage, le traitement alcalin, le traitement acide, l'extraction à froid à pH acide, l'ultracentrifugation, la précipitation du collagène, la remise en suspension du collagène et la dialyse.

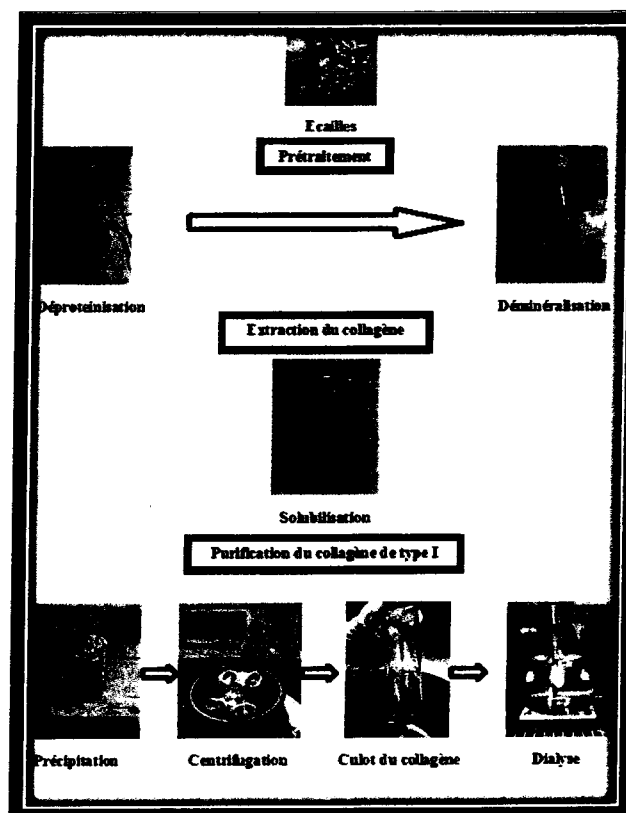


Fig. 1. Procédé acide de préparation de collagène marin natif à partir des écailles de sardine

La figure 2 décrit l'identification moléculaire par électrophorèse du collagène purifié. Comparé avec un marqueur moléculaire (à gauche), le collagène purifié est un hétérodimère qui se compose de :

Deux chaînes alpha dont le poids moléculaire est situé entre 116 et 97 KDa

Une chaîne Béta d'un poids moléculaire approximatif de 200 KDa

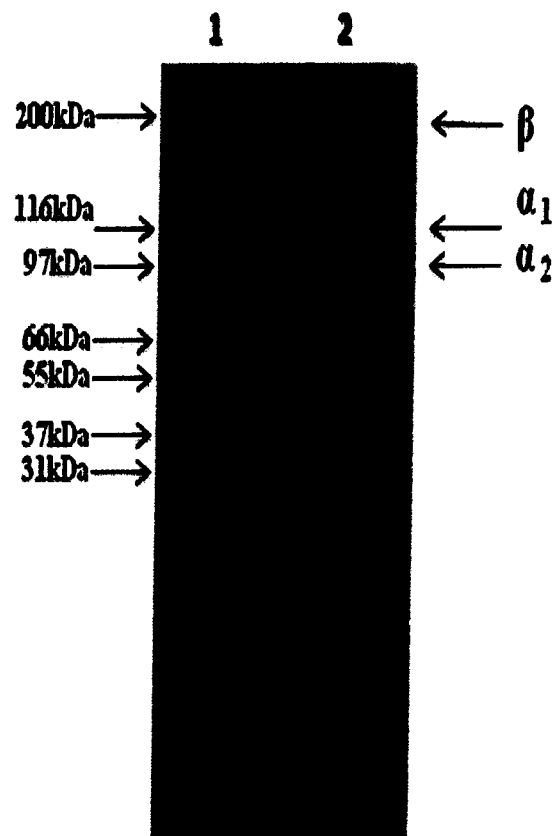


Figure 2. Electrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes

Exemple

L'invention est illustrée de manière non limitative par l'exemple ci-dessous :

Exemple

- 40 g des écailles de sardine congelées sont mises à décongeler en chambre froide (4°C). Après, on procède à une déprotéinisation par 360 mL de NaOH (0,1M) sous agitation pendant 4H à 4°C. Les écailles déprotéinisées ont été filtrées et lavées 3 fois avec 360 ml chaque fois
- Les résidus déprotéinisés sont ensuite déminéralisés dans une solution 400 ml HCL 0.1M pendant 18 h à 4°C.
- Les écailles sont ensuite totalement solubilisés dans 400 ml de l'acide acétique ml 0.5M sous agitation pendant 30 h à 4°C .
- La solution de collagène est centrifugée par la suite à 20 000g à 4°C pendant 1 heure. On récupère le surnageant, le culot est resolubilisé dans 320ml d'acide acétique (0,5M).
- Cette opération d'extraction est réalisée deux fois. Le deux surnageant sont réunis et le collagène qu'ils renferment est précipité par addition de 60g de chlorure de sodium (concentration 0,7 M final).
- Le collagène obtenu est récupéré sous forme de culots par centrifugation à 20 000g pendant 1 heure à 4°C. Ces culots sont resolubilisés dans 3 ml d'acide acétique à 0.5M. La solution de collagène est dialysée contre de l'acide acétique à 0,5 M pendant 24h et contre l'eau distillée (24h) (Il faut environ 10 volumes de la solution de l'eau distillé ou a acétique pour un volume de collagène dialysé).
- Le rendement calculé selon la formule suivante ci-dessous est de 26,7%

Rendement= masse du collagène purifié / masse initiale des écailles x 100

$$\frac{10,6 \text{ g}}{40 \text{ g} \times 100} = 26,7\%$$

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de collagène à partir des écailles de sardine fraîches ou décongelées, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de lavage à l'eau des écailles, de traitement alcalin, de traitement acide d'extraction acide à froid, ultracentrifugation, précipitation et dialyse
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le lavage à l'eau est un lavage à l'eau courante 3 fois.
3. Procédé selon les revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les écailles de sardine sont utilisées séchées.
4. Procédé selon les revendications 1, 2 et 3 caractérisés en ce que les écailles séchées sont déprotéinsées par la soude à raison de 0,1M de NaOH, ratio 1 : 8 pendant 4h.
5. Procédé selon la revendication 1, 2, 3 et 4, caractérisé en ce que les écailles déprotéinsées sont déminéralisées par un acide diaminotétracarboxylique ou un acide minéral.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'acide déminéralisateur est choisi parmi les acides minéraux comme étant l'acide chlorhydrique.
7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'acide déminéralisateur est choisi parmi les acides diaminotétracarboxylique comme étant l'EDTA.
8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le acide chlorhydrique est utilisé de préférence à une concentration de 0,1M pendant 18 h.
9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'EDTA est utilisé de préférence à une concentration de 0,3 M pendant 18 h.
10. Procédé selon la revendication 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 caractérisé en ce qu'on procède à un lavage des écailles déprotéinsées et déminéralisées à l'eau jusqu'à neutralisation
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 caractérisé en ce que l'extraction acido-soluble du collagène est effectuée par un acide organique.
12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'extraction est effectuée à froid, de préférence à une concentration de 0,5 M d'acide acétique pendant 30H 4°C.
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend en outre par une étape de précipitation saline avec le chlorure de sodium, après 12 h d'agitation à 4°C.
14. Procédé selon les revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la solution de collagène précipité est ensuite récupérée sous forme de culots par centrifugation.
15. Procédé selon la revendication 14 selon laquelle la centrifugation est effectuée à 20 000g pendant 1 heure à 4°C.
16. Procédé selon la revendication 1 à 15 selon lesquelles les culots récupérés sont resolubilisés dans l'acide acétique.
17. Procédé selon la revendication 1 à 16 selon lesquelles on procédera ensuite à deux dialyses successives effectuées contre de l'acide acétique d'une part et contre l'eau distillée d'autre part avec un sac de dialyse dont le seuil de rupture est 14 KDA.
18. Procédé selon la revendication 1 à 17 selon lesquelles le collagène purifié est un hétérodimère qui se compose de deux chaînes alpha et une chaîne Béta.

19. Procédé selon la revendication 1 à 18 selon lesquelles le collagène purifié a une température de dénaturation de 27,5°C.
20. Procédé selon la revendication 1 à 19 que le rendement en collagène natif est de 26,7%.
21. Procédé selon la revendication 1 à 20 que les solutions de collagène sont transparentes à une concentration en collagène comprise entre 4 mg/ml et 5,23 mg/ml d'acide acétique.
22. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, caractérisé en ce que les écailles proviennent de poissons marins ou d'eau douce.
23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 caractérisé en ce que le dit poisson est la sardine marocaine *sardina pilchardus*.

CITATIONS

Citation hors brevet

Fujiokai, K., Maeda, M.W.T., Akami, H. & Sano, A. (1998). Protein release from collagen matrices. *Advanced drug delivery reviews*, 31: 247-266.

Kielty, CM, Grant, ME. (2002). The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. In : Dir. Royce, PM., Steinmann, B. (2nd Ed), *Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic, and medical aspects*. New York : Wiley-Liss. pp.159-221.

Wallace, D.G., & Rosenblatt, J. (2003). Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12):1631.

Citations de brevets

Brevet cité	Date de dépôt	Date de publication	Déposant	Titre
CN 104726527(A)	24- 03 - 2015	24- 0 - 2015	NingDE Xiyawei food corporation LTD	Preparation technology for producing collagen through enzymolysis of fish scales
CN102839207	17- 09 - 2012	28- 12 - 2012	Wenz Hou University	METHOD FOR PREPARING COLLAGEN PEPTIDE FROM FISH SCALES
CN102586373	16- 01 - 2012	18- 07 - 2012	Yu Xiaob Ing	METHOD FOR EXTRACTING HIGH-QUALITY COLLAGEN AT LOW TEMPERATURE
CN102633877	07- 02 - 2011	15- 08 - 2012	Li Shitai	PREPARATION METHOD OF COLLAGEN POWDER BY USING FISH SKIN AND FISH SCALE
CN102321719	07- 02 - 2011	15- 08 - 2012	Li Shitai	INDUSTRIAL PRODUCTION METHOD FOR PREPARING COLLAGEN FROM FISH SCALE BY ENZYME METHOD

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/MA2017/000013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K1/14 C07K14/78 C07K1/36
ADD.

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)
C07K

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, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGAI TAKESHI ET AL: "Fish scale collagen. Preparation and partial characterization.", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY, vol. 39, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 239-244, XP002775172, ISSN: 0950-5423	1-3,5,7, 10,11, 13-23
Y	page 239, column 2, paragraph Fish; Preparation of scale collagen ----- -/--	1-23



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

31 October 2017

Date of mailing of the international search report

13/11/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mabit, Hélène

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/MA2017/000013

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KANOKWAN MATMAROH ET AL: "Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish ()", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL, vol. 129, no. 3, 20 May 2011 (2011-05-20), pages 1179-1186, XP028099708, ISSN: 0308-8146, DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.05.099 [retrieved on 2011-05-26] paragraphs [02.2], [02.3] -----	1-23
Y	NOMURA YOSHIHIRO ET AL: "Preparation and some properties of type I collagen from fish scales", BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY, vol. 60, no. 12, 1996, pages 2092-2094, XP002775173, ISSN: 0916-8451 page 2092 page 2093, column 1 -----	1-23
Y	F Bellali ET AL: "RESPONSE SURFACE METHODOLOGY OPTIMIZATION OF DEPROTEINIZATION FROM SARDINE (SARDINA PILCHARDUS) SCALE OF MOROCCAN COAST The International Journal of Biotechnology", The International Journal of Biotechnology, International Journal of Biotechnology, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 182-192182, XP055419773, Retrieved from the Internet: URL:http://www.inrh.ma/sites/default/files/al_ijb_211_182-192_m_kharroubi.pdf page 190, paragraph 4 -----	1-23
Y	Fatima Bellali ET AL: "E-ISSN: 2320-7078 P-ISSN: 2349-6800 JEZS Response surface methodology optimization of demineralization from sardine (Sardina pilchardus) scale", "554" Journal of Entomology and Zoology Studies, 1 January 2016 (2016-01-01), XP055419776, Retrieved from the Internet: URL:http://www.entomoljournal.com/archives/2016/vol4issue2/Parth//4-3-26.pdf abstract ----- -/--	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/MA2017/000013

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FATIMA BELLALI ET AL: "Alkali Pre-Treatment Optimization of Sardine Scales", INTERNATIONAL JOURNAL OF INNOVATIVE RESEARCH IN SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY, vol. 4, no. 10, 15 October 2015 (2015-10-15), pages 9510-9515, XP055419778, ISSN: 2347-6710, DOI: 10.15680/IJIRSET.2015.0410002 paragraphs [0002], [0005] -----	1-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/MA2017/000013

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07K1/14 C07K14/78 C07K1/36 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) C07K		
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, BIOSIS, WPI 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	NAGAI TAKESHI ET AL: "Fish scale collagen. Preparation and partial characterization.", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY, vol. 39, no. 3, mars 2004 (2004-03), pages 239-244, XP002775172, ISSN: 0950-5423	1-3,5,7, 10,11, 13-23
Y	page 239, colonne 2, alinéa Fish; Preparation of scale collagen ----- -/--	1-23
☒ 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 31 octobre 2017	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 13/11/2017	
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 Mabit, Hélène

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	KANOKWAN MATMAROH ET AL: "Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish ()", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL, vol. 129, no. 3, 20 mai 2011 (2011-05-20), pages 1179-1186, XP028099708, ISSN: 0308-8146, DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.05.099 [extrait le 2011-05-26] alinéas [02.2], [02.3] -----	1-23
Y	NOMURA YOSHIHIRO ET AL: "Preparation and some properties of type I collagen from fish scales", BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY, vol. 60, no. 12, 1996, pages 2092-2094, XP002775173, ISSN: 0916-8451 page 2092 page 2093, colonne 1 -----	1-23
Y	F Bellali ET AL: "RESPONSE SURFACE METHODOLOGY OPTIMIZATION OF DEPROTEINIZATION FROM SARDINE (SARDINA PILCHARDUS) SCALE OF MOROCCAN COAST The International Journal of Biotechnology", The International Journal of Biotechnology, International Journal of Biotechnology, 1 janvier 2013 (2013-01-01), pages 182-192182, XP055419773, Extrait de l'Internet: URL:http://www.inrh.ma/sites/default/files/al_ijb_211_182-192_m._kharroubi.pdf page 190, alinéa 4 -----	1-23
Y	Fatima Bellali ET AL: "E-ISSN: 2320-7078 P-ISSN: 2349-6800 JEZS Response surface methodology optimization of demineralization from sardine (Sardina pilchardus) scale", "554" Journal of Entomology and Zoology Studies, 1 janvier 2016 (2016-01-01), XP055419776, Extrait de l'Internet: URL:http://www.entomoljournal.com/archives/2016/vol4issue2/ParthH//4-3-26.pdf abrégé ----- -/--	1-23

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FATIMA BELLALI ET AL: "Alkali Pre-Treatment Optimization of Sardine Scales", INTERNATIONAL JOURNAL OF INNOVATIVE RESEARCH IN SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY, vol. 4, no. 10, 15 octobre 2015 (2015-10-15), pages 9510-9515, XP055419778, ISSN: 2347-6710, DOI: 10.15680/IJIRSET.2015.0410002 alinéas [0002], [0005] -----	1-23