

(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
04 octobre 2018 (04.10.2018)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/178334 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 14/405 (2006.01)

Publiée:

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2(g))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2(a))

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2018/058294

(22) Date de dépôt international :
30 mars 2018 (30.03.2018)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1752674 30 mars 2017 (30.03.2017) FR

(71) Déposant : FERMENTALG [FR/FR] ; 4 Rue Rivière,
33500 Libourne (FR).

(72) Inventeurs : CAGNAC, Olivier ; 60 Boulevard Beausé-
jour, 33500 Libourne (FR). ATHANE, Axel ; 4 rue Pasteur,
33560 Carbon-Blanc (FR). DEMOL, Julien ; 57 Route de
Paris A21, 33500 Les Billaux (FR).

(74) Mandataire : TETAZ, Franck ; 9 rue Paul Chevrel, 69370
Saint Didier au Mont d'Or (FR).

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

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

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

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

(54) Title: PURIFICATION OF PHYCOBILIPROTEINS

(54) Titre : PURIFICATION DES PHYCOBILIPROTEINES

(57) Abstract: The present invention relates to a novel method for the purification of phycobiliproteins, in particular acid-pH-resistant phycobiliproteins, the resulting phycobiliproteins, and the uses thereof.

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



WO 2018/178334 A2

PURIFICATION DES PHYCOBILIPROTEINES

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un nouveau procédé de purification des
5 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
10 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.
15 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
20 protéines solubles autres que les phycobiliprotéines.

La purification de phycobiliprotéines extraites de *Cyanidioschyzon merolae*, de
Cyanidium caldarium, de *Galdieria sulphuraria* et de Spiruline par précipitation au
sulfate d'ammonium a déjà été décrite dans la littérature (WO 2016/099261 ; Eisele
et al., 2000 ; Kao *et al.* Moon *et al.*, 1975 ; 2015 ; Cruz de Jesús *et al.*, 2006) mais elle
25 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
30 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-phycocyanine et d'allophycocyanine. 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 phycocyanine purifiée comprenant essentiellement de la c-phycocyanine ou bien essentiellement de l'allophycocyanine, en particulier de phycobiliprotéines résistantes aux pH acides de composition contrôlée en phycocyanines, la résistance aux pH acides ne nécessitant pas l'ajout d'agents stabilisants comme l'acide ascorbique (WO 2005/065697) ou les polyphénols (WO 2015/090697).

15

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

- 20 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
25 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 phycocyanines résistantes aux pH acides comprenant un mélange de c-phycocyanine et d'allophycocyanine, plus particulièrement dont le rapport molaire c-phycocyanine / allophycocyanine est d'au moins 2.

30

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.

5 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.

10 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.

15 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.

20

DESCRIPTION DETAILLEE 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.

25 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
30 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 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.

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.

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 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.

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 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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 celles-ci.

SEQ ID 1 : MKTPITEAIA AADNQGRFLS NTELQAVNGR YQRAAASLEA
ARSLTSNAQR LINGAAQAVY SKFPYTSQMP GPQYASSAVG KAKCARDIGY
10 YLRMVTYCLV VGGTGPMDEY LIAGLEEINR TFDLSPSWYV EALNYVKSNH
GLSGQAANEA NTYIDYAINA LS

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

Également avantageusement, 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.

SEQ ID 3 : MSLISQIINT ADEELRYPNG GELSTLIYFF NTANTRINII
20 NKLKEREKDI IQNASKKLFO LHPEYVSSGG NASGPKQRAL CLRDYGWYLR
LVTYGILAGD ITPIEKIGII GVKDMYNSLG VPIIGMYDAI KCLKEASINI
FELSEEKDLI IPYFDYLSNA ILS

SEQ ID 4 : MSIVTKSIVN ADAEARYLSP GELDRIKSFV LSGQRRLRIA
QILTDNRERI VKQAGQQLFO QRPDIVSPGG NAYGEEMTAT CLRDLDYYLR
25 LVTYGVVAGD ISPIEEIGLE DFMQDAITAV INTADVQGY LDNSSIEKLG
GYFQTGELRV RAAATIAANA AGIIKDAVAK SLLYSDITRP GGNMYTTRRY
AACIRDLDYY LRYATYSMLA GDPSILDERV LNGLKETYS LGVPIGATIQ
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.

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
5 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
10 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
15 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
20 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,
25 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.
30 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
5 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 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
10 une dénaturation des phycobiliprotéines.

Il est possible, après récupération du surnageant à l'étape b), de recycler les 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
15 sont solubles.

Ces phycobiliprotéines résiduelles sont alors séparées des impuretés et isolées 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
20 phycobiliprotéines résiduelles sont un mélange C-PC/APC enrichi en APC.

Par le recyclage du précipité on obtient alors des phycobiliprotéines comprenant un mélange C-PC/APC dont le rapport Molaire 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
25 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 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
30 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-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
5 acides, en particulier phycocyanines, susceptibles d'être obtenues par le procédé de purification.

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
10 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, 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
15 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.

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.

20 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).

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
25 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.

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.

30 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 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
5 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.

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.

10 L'homme du métier sait comment mesurer une identité de séquences protéiques selon les méthodes usuelles à sa disposition, notamment le programme BLASTP (<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
15 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.

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.

20 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 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

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

30 Ainsi, les variants des apoprotéines des phycocyanines et/ou des allophycocyanines selon l'invention peuvent comprendre de 1 à 30 acides aminés de 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 référence et les pourcentages d'identité énoncés ci-dessus.
- 25

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
30 avantageusement de 1 à 15 acides aminés de différence, de préférence de 1 à 10 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 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 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 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 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. 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 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 phycocyanine peut être incorporée par exemple sous forme de poudre. Ladite
5 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 notamment les gâteaux ou biscuits, les aliments secs à cuire, les poudres à diluer, les compositions gélatineuses solides ou "jelly", des mousses etc.

10 Selon l'invention, ladite composition acide liquide pourra être une composition aqueuse dans laquelle la phycocyanine est dissoute. Elle peut se présenter sous la forme d'une composition prête à l'emploi ou comme un concentré liquide à diluer, 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
15 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 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
20 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, 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
25 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 une phycocyanine résistante à un pH acide selon l'invention.

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

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

Dans une composition acide liquide au sens de l'invention la teneur en

phycocyanine 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.

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
5 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
10 000 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).

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
15 (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.
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
20 pH compris entre 6 et 5, la quantité d'APC diminue dans le surnageant en fonction de
la baisse du pH.

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
25 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
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 (Soresen et al.,
30 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
séchage du produit par la suite.

REFERENCES

- Cruz de Jesús *et al.*, "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.
- 5 - Eisele *et al.*, "Studies on C-phycocyanin from *Cyanidium caldarium*, a eukaryote at the extremes of habitat" Biochemica et Biophysica Acta 1456 (2000) 1456, 2-3, 99-107.
- Eriksen NT. "Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine" Appl Microbiol Biotechnol. 2008 Aug;80(1):1-10 14.
- Kao *et al.*, "Physical-chemical properties of C-phycocyanin isolated from an acidothermophilic eukaryote, *Cyanidium caldarium*" Biochem. J. (1975) 147, 63-70
- Myounghoon *et al.* "Isolation and Characterization of Thermostable Phycocyanin from *Galdieria Sulphuraria*," Korean journal of chemical engineering, 31 (2014): 1-15 6.
- Sørensen *et al.* "Purification of the photosynthetic pigment C-phycocyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*" J Sci Food Agric. 2013 Sep;93(12):2933-8
- WO 2005/065697, WO 2015/090697, WO 2016/099261, WO 2017/050917, WO 2017/050918 et PCT/EP2016/079325 déposée le 30 novembre 2016

- REVENDICATIONS

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.

14. Utilisation d'une phycobiliprotéine selon la revendication 10 ou d'une
15 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.

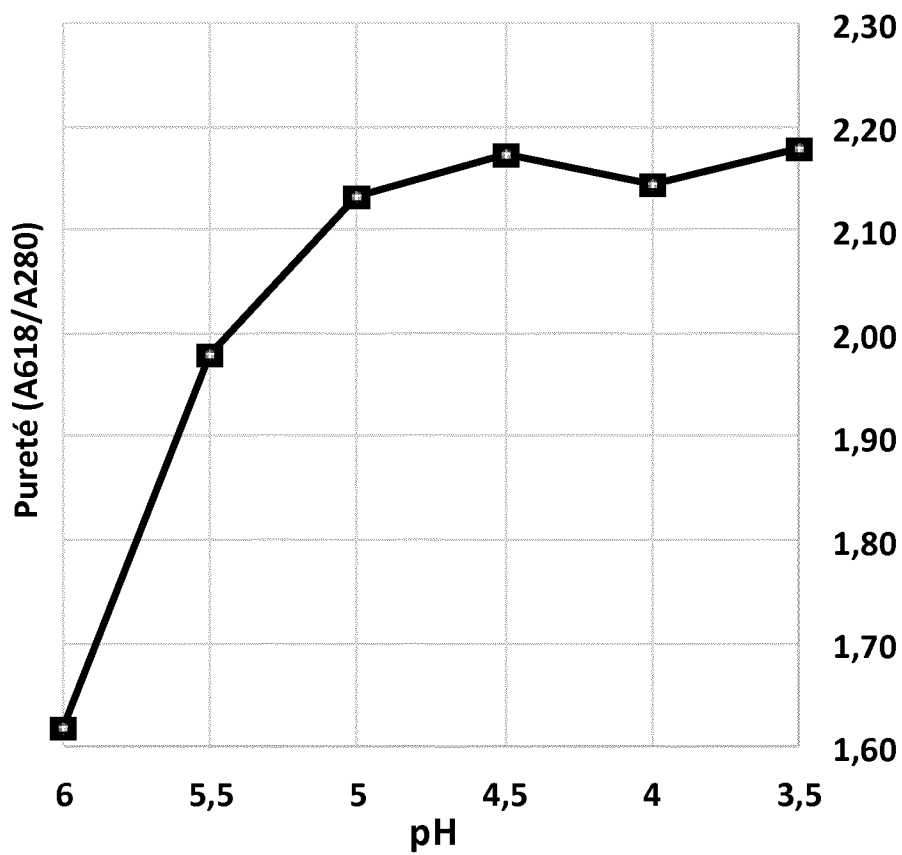


Fig. 1

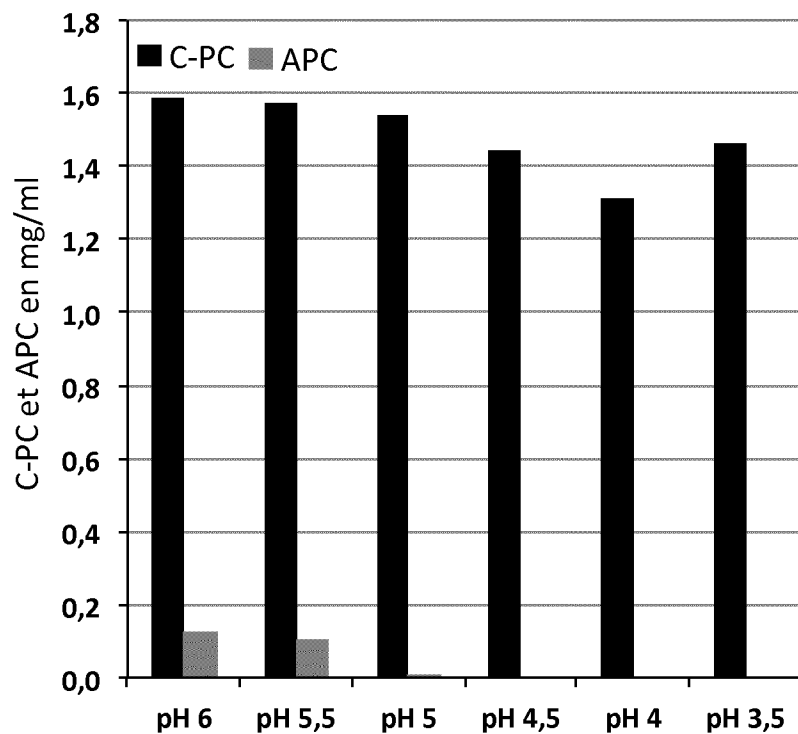


Fig. 2

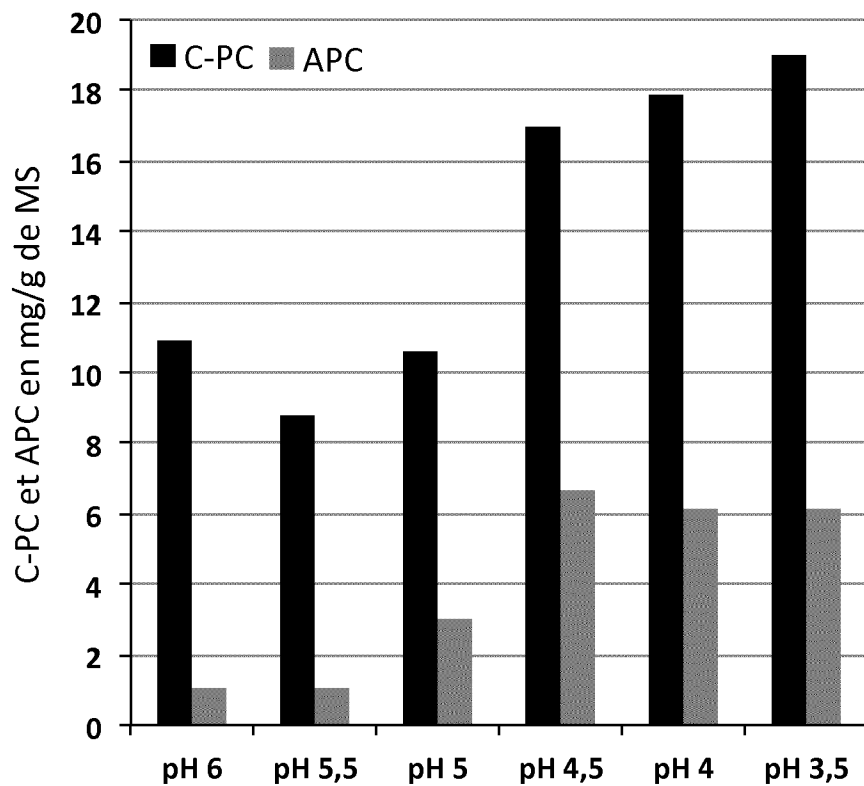


Fig. 3

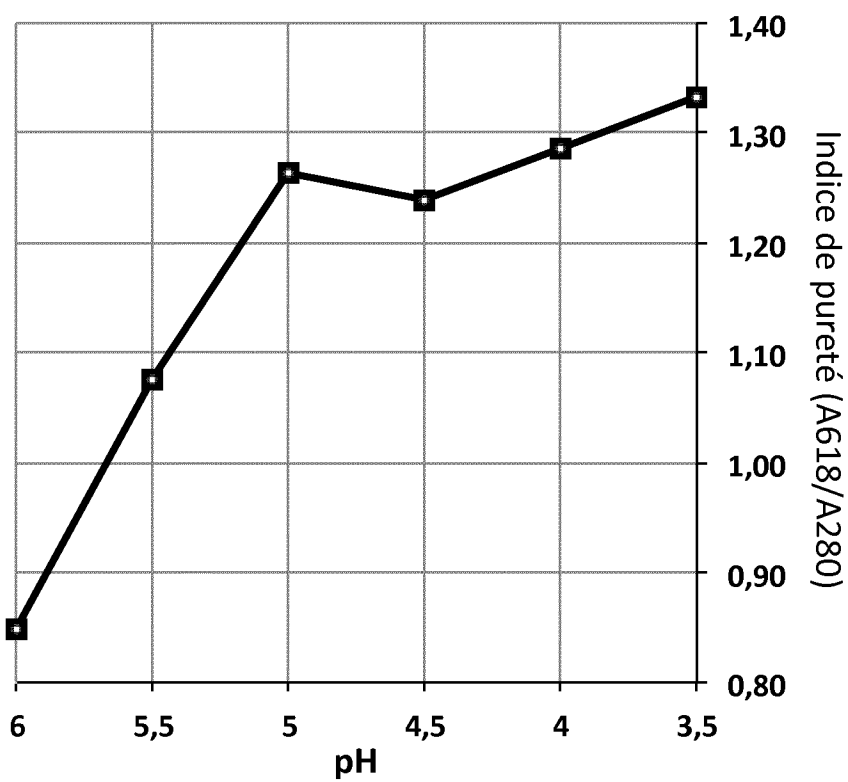


Fig. 4

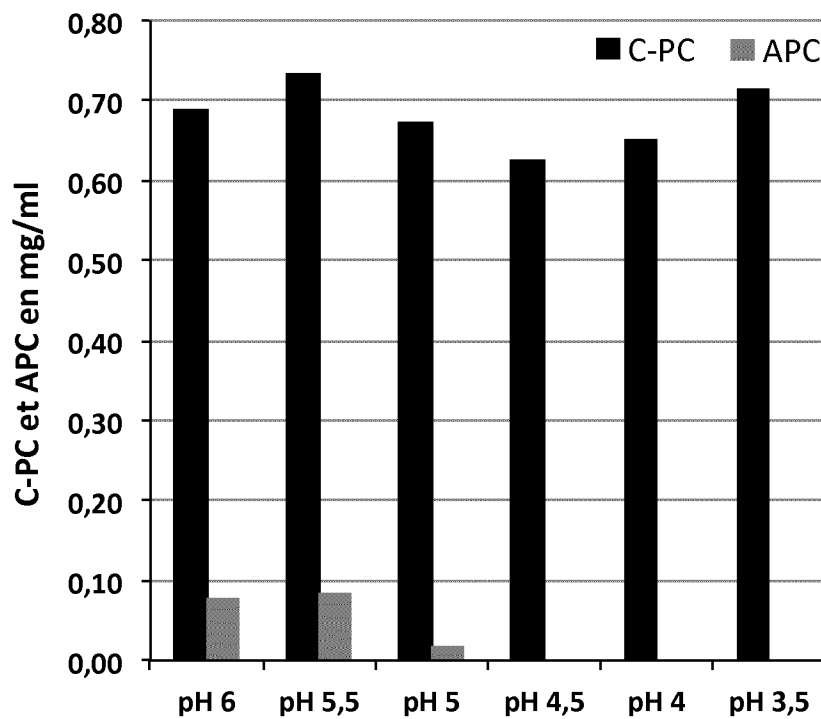


Fig. 5

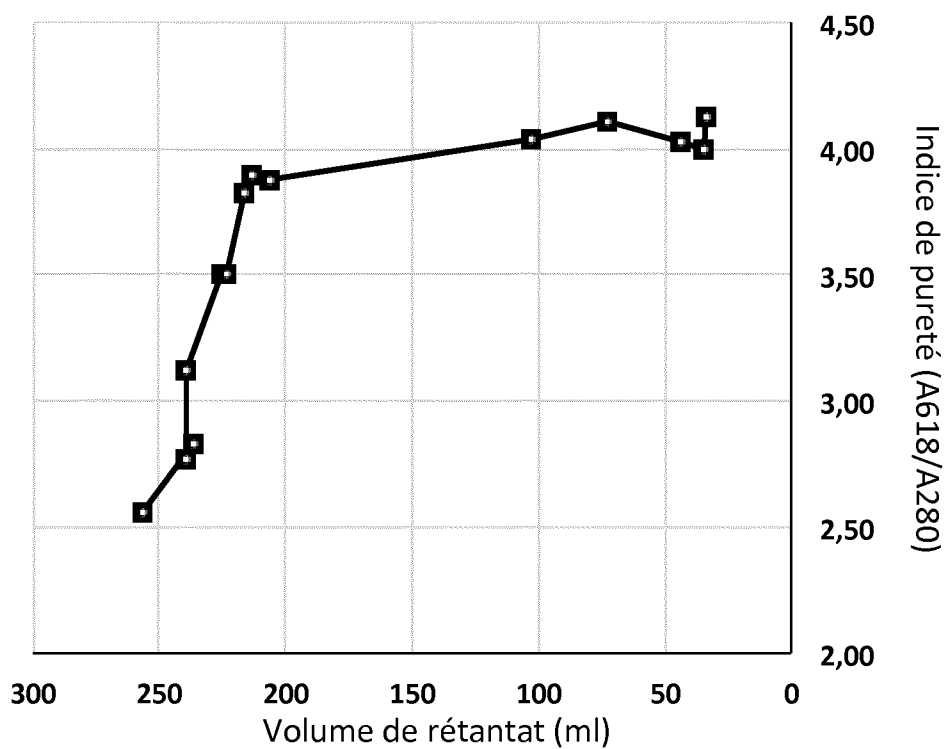


Fig. 6

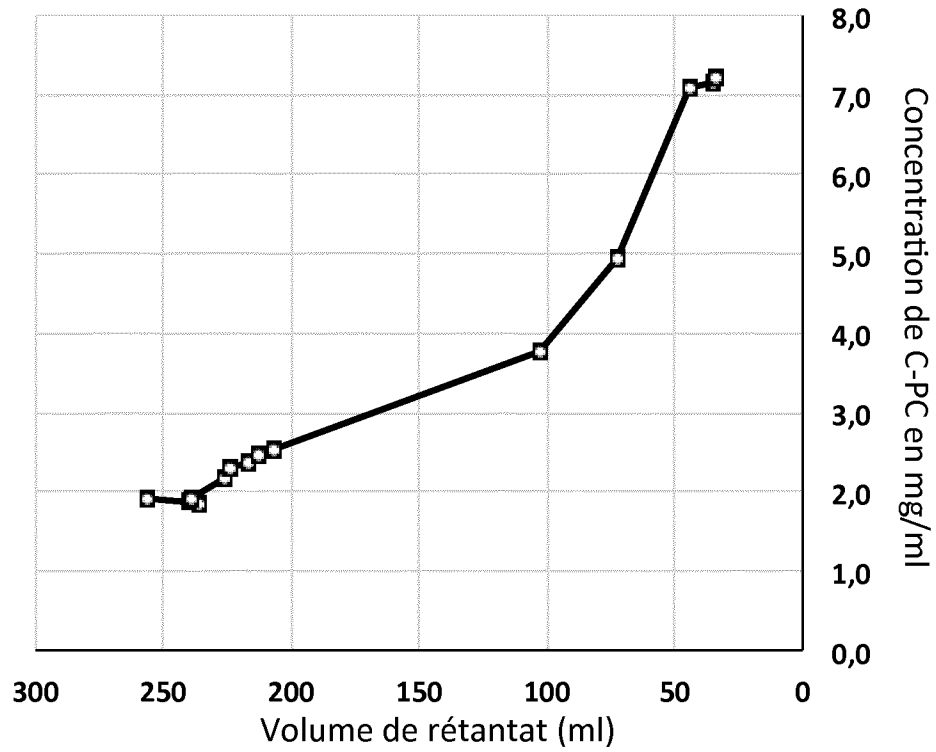


Fig. 7