



HAL
open science

Utilisation d'un coproduit issu d'un procédé d'extraction du lysozyme à partir de blanc d'oeuf, pour l'obtention d'au moins une protéine basique de blanc d'oeuf

Francoise Nau, Catherine Guérin-Dubiard, Thomas Croguennec, Maryvonne Pasco

► To cite this version:

Francoise Nau, Catherine Guérin-Dubiard, Thomas Croguennec, Maryvonne Pasco. Utilisation d'un coproduit issu d'un procédé d'extraction du lysozyme à partir de blanc d'oeuf, pour l'obtention d'au moins une protéine basique de blanc d'oeuf. France, N° de brevet: WO2011004129 (A1) FR2947818 (A1) EP 2451825 (A1). 2011. hal-01454230

HAL Id: hal-01454230

<https://hal.science/hal-01454230>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 947 818**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **09 54778**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 07 K 1/16** (2006.01), C 07 K 14/465, C 12 N 9/36

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 09.07.09.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 14.01.11 Bulletin 11/02.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, AGROALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE (AGRO CAMPUS OUEST) — FR.

⑦2 Inventeur(s) : NAU FRANCOISE, GUERIN-DUBIARD CATHERINE, CROGUENEC THOMAS et PASCO MARYVONNE.

⑦3 Titulaire(s) : INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, AGROALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE (AGRO CAMPUS OUEST).

⑦4 Mandataire(s) : CABINET HARLE ET PHELIP.

⑤4 UTILISATION D'UN COPRODUIT ISSU D'UN PROCÉDE D'EXTRACTION DU LYSOZYME A PARTIR DE BLANC D'OEUF, POUR L'OBTENTION D'AU MOINS UNE PROTEINE BASIQUE DE BLANC D'OEUF.

⑤7 La présente invention concerne l'utilisation d'un coproduit issu d'un procédé d'extraction du lysozyme à partir de blanc d'oeuf, pour l'obtention d'au moins une protéine basique de blanc d'oeuf. Ce coproduit est une solution obtenue à l'issue d'une étape d'extraction du lysozyme préalablement cristallisé à pH basique à partir d'un éluat contenant la fraction protéique de blanc d'oeuf retenue sur un support de chromatographie échangeur de cations.

La présente invention concerne également un procédé pour la purification d'au moins une protéine basique de blanc d'oeuf, comprenant une opération d'extraction et de purification de ladite protéine basique à partir dudit coproduit issu d'un procédé d'extraction du lysozyme à partir de blanc d'oeuf.

FR 2 947 818 - A1



DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine de l'obtention de protéines, et en particulier de l'extraction et de la purification de protéines.

L'invention concerne plus précisément l'utilisation d'un produit dérivé
5 du blanc d'œuf, pour l'obtention, avantageusement par extraction et par purification, des protéines basiques de blanc d'œuf, en particulier l'avidine.

ART ANTERIEUR

Le blanc d'œuf, ou albumen, est un mélange d'origine naturel qui
10 comprend généralement environ 88 % en poids d'eau et une teneur en matière sèche d'environ 12 % en poids. La matière sèche est constituée majoritairement de protéines (plus de 90 % en poids, par rapport au poids total de matière sèche).

Certaines protéines de blanc d'œuf sont couramment employées en
15 raison de leur activité biologique.

C'est notamment le cas des protéines de blanc d'œuf dites « basiques », présentant un point isoélectrique (ou « pl ») supérieur à 7.

On peut citer en particulier le lysozyme (dont le pl est de l'ordre de 10,7) et l'avidine (dont le pl est de l'ordre de 10), qui font l'objet de
20 nombreuses études et d'une exploitation à l'échelle industrielle.

A titre indicatif, le blanc d'œuf présente une teneur en avidine proche de 0,05 g par litre, et une teneur en lysozyme proche de 3,5 et 4 g par litre. Le rapport massique de l'ensemble « lysozyme plus avidine », par rapport aux protéines totales de blanc d'œuf, est d'environ 0,04.

Le lysozyme est une enzyme naturelle qui a été découverte et caractérisée dans les années 1920.

Le lysozyme est utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour son activité antibactérienne contre les bactéries gram-positives. Il altère la paroi cellulaire des bactéries gram-positives, ce qui entraîne la lyse et la mort des
30 cellules. Le lysozyme est efficace contre un certain nombre de bactéries responsables d'infections de l'organisme humain.

Les activités anti-bactériennes du lysozyme sont également utilisées pour réduire ou bloquer la détérioration de certains aliments. L'une des applications commerciales les plus importantes du lysozyme concerne
35 l'affinage de certains fromages, par exemple les fromages de type pâte

pressée cuite. Le lysozyme inhibe la croissance de *Clostridium tyrobutyricum*, une bactérie qui peut contaminer le lait. La présence de cette bactérie dans le fromage en formation se traduit notamment par, d'une part, la production d'acide butyrique, qui provoque une flaveur anormale, et
5 d'autre part, la génération d'une concentration excessive d'hydrogène et de dioxyde de carbone, qui entraîne des pressions de gaz dans la masse de la pâte de fromage provoquant des fissures et des fendillements dans ladite masse.

On utilise aujourd'hui le lysozyme également pour remplacer les
10 sulfites dans les procédés de vinification. Le lysozyme inhibe les bactéries lactiques et permet de contrôler la fermentation malo-lactique. Il améliore les propriétés organoleptiques (couleur et goût) du vin final. De plus, le vin final qui est exempt de sulfite est mieux toléré par les consommateurs.

L'avidine, qui est également retrouvée dans le blanc d'œuf, est connue
15 principalement pour sa capacité à former un complexe avec la biotine. Ce complexe avidine-biotine a été largement utilisé dans des applications de biotechnologie, notamment pour le diagnostic médical.

Il résulte de ce qui précède que les industriels dans le domaine
20 pharmaceutique et alimentaire ont des besoins croissants en protéines basiques de blanc d'œuf, notamment le lysozyme et l'avidine.

L'accessibilité et la composition du blanc d'œuf, et en particulier celui issu d'œuf de poule, en font une matière première de choix pour la préparation et l'obtention de telles protéines basiques.

Cependant, l'extraction de telles protéines basiques directement à
25 partir du blanc d'œuf présente certaines limites et inconvénients.

C'est en particulier le cas des procédés pour l'extraction et la purification de l'avidine à partir de blanc d'œuf. En effet, cette approche ne permet pas aujourd'hui une production de cette protéine en quantité, qualité ou prix de revient suffisants, pour satisfaire la demande des industriels.

30 Plus généralement, en partant de blanc d'œuf comme matière première, les procédés de purification d'avidine sont souvent complexes et onéreux à mettre en œuvre, et génèrent des volumes importants de déchets.

A titre d'exemple, on connaît des procédés de purification d'avidine basés sur des techniques de chromatographie d'échange de cations, pour
35 l'extraction et la purification d'avidine à partir de blanc d'œuf.

Le document de brevet canadien n° CA-1 283 072 décrit un procédé pour l'isolement et la séparation, par chromatographie, de lysozyme et d'avidine à partir de blanc d'œuf. Ce procédé consiste à répéter jusqu'à vingt fois un cycle comprenant les étapes de (i) mise en contact du blanc d'œuf avec une résine échangeur de cations faiblement acide, de sorte que le lysozyme et l'avidine soient adsorbés sur ladite résine, puis (ii) de mise en contact de la résine avec un tampon d'élution à faible force ionique, ce qui provoque l'élution du lysozyme à partir de la résine, tandis que l'avidine reste adsorbée. Ce procédé se termine par la mise en contact de la résine comportant l'avidine, avec un tampon d'élution à forte force ionique provoquant l'élution de cette avidine accumulée par adsorption.

L'un des inconvénients du procédé ci-dessus est qu'il nécessite le traitement d'un volume important de blanc d'œuf, et qu'il comprend la mise en œuvre d'un grand nombre d'étapes (correspondant à la répétition des cycles de chargement du blanc d'œuf sur la résine), pour l'obtention d'une quantité significative de protéines d'intérêt.

De plus, le degré de pureté de l'avidine ainsi produite n'est pas très élevé.

Le document de brevet n° CA-2 431 773 décrit également un procédé pour la préparation d'avidine à partir de blanc d'œuf. Ce procédé comprend (i) une étape de lyophilisation d'un blanc d'œuf homogénéisé avec un tampon, suivie (ii) d'une étape de solubilisation du blanc d'œuf lyophilisé dans un tampon, suivie (iii) d'une étape d'incubation du produit lyophilisé re-solubilisé avec un matériau de résine échangeur de cations, puis (iv) une étape de filtration pour séparer le matériau de résine du milieu d'incubation, puis (v) une étape d'élution sélective de l'avidine en utilisant une molécule colorée pour laquelle l'avidine présente une forte affinité.

Pour l'obtention d'une préparation finale d'avidine purifiée, le procédé ci-dessus, qui comprend un grand nombre d'étapes, requiert la mise en œuvre d'une étape finale d'élimination du colorant ajouté pour la réalisation de l'étape d'élution.

Une alternative consiste en l'extraction de l'avidine par chromatographie d'affinité à partir du blanc d'œuf (Heney et Orr, Anal Biochem, 114 :92-96, 1981 ; Airenne et al., Gene, 144 : 75-80, 1997 ; Kusanadi et al., Biotechnol Prog, 14 : 149-155, 1998 ; Hood et al., Adv Exp Med Biol, 464 : 127-147, 1999).

Mais l'extraction d'avidine à grande échelle nécessiterait l'utilisation de grands volumes de support de chromatographie d'affinité ; or ces supports ont un coût très élevé, et cette technique est plutôt utilisée à l'échelle du laboratoire.

5 Les procédés connus requièrent l'utilisation d'un volume important de blanc d'œuf pour obtenir les quantités désirées de protéines d'intérêt. De plus, l'utilisation de blanc d'œuf génère des volumes importants de déchets dérivés du blanc d'œuf, qu'il serait économiquement important de valoriser.

10 Ainsi, avec les procédés connus, l'emploi de blanc d'œuf comme matière de départ pour l'obtention de certaines protéines basiques comme l'avidine, entraîne la mise en œuvre d'étapes nombreuses, complexes et/ou onéreuses.

15 Il existe ainsi un besoin pour de nouveaux procédés d'obtention, notamment par extraction et par purification, de certaines protéines de blanc d'œuf, notamment de protéines basiques comme l'avidine, qui soient alternatifs ou améliorés par rapport aux procédés connus, avantageusement avec un coût de revient plus faible qu'avec les procédés connus.

RESUME DE L'INVENTION

20 Il est fourni selon l'invention de nouveaux procédés d'obtention de protéines de blanc d'œuf purifiées, y compris de protéines basiques de blanc d'œuf purifiées, telles que l'avidine purifiée, qui sont avantageux par rapport aux procédés connus.

25 La présente invention a notamment pour objet l'utilisation d'un coproduit d'extraction de lysozyme du blanc d'œuf, pour l'obtention (de préférence encore pour l'extraction et la purification) des protéines basiques de blanc d'œuf, lequel coproduit est une solution (avantageusement sous forme d'une saumure) obtenue à l'issue d'une étape d'extraction du lysozyme préalablement cristallisé à pH basique à partir d'un éluat contenant
30 la fraction protéique de blanc d'œuf retenue sur un support de chromatographie échangeur de cations.

De préférence, ce coproduit consiste en un filtrat obtenu à l'issue d'une étape de filtration de l'éluat contenant la fraction protéique de blanc d'œuf retenue sur support de chromatographie échangeur de cations, ladite

étape de filtration étant adaptée pour purifier, dans le rétentat de filtration, le lysozyme préalablement cristallisé à pH basique.

La présente invention concerne aussi l'utilisation du coproduit sous une forme concentrée et dessalée/déminéralisée, qui vérifie les caractéristiques suivantes :

5

- une conductivité inférieure à 50 mS/cm,
- une concentration d'avidine supérieure à 1g/L,
- un rapport massique (lysozyme + avidine)/protéines totales, supérieure à 0,1 et

10

- un rapport massique avidine/lysozyme supérieur à 0,1.

Un autre objet de la présente invention concerne le procédé pour la purification d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf, comprenant une opération d'extraction et de purification de ladite protéine basique à partir d'un coproduit issu d'un procédé d'extraction du lysozyme à partir de blanc d'œuf, lequel coproduit est une solution obtenue à l'issue d'une étape d'extraction du lysozyme préalablement cristallisé à pH basique à partir d'un éluat contenant la fraction protéique de blanc d'œuf retenue sur un support de chromatographie échangeur de cations.

15

Le coproduit est avantageusement un filtrat obtenu à l'issue d'une étape de filtration d'un éluat contenant la fraction protéique de blanc d'œuf retenue sur un support de chromatographie échangeur de cations, ladite étape de filtration étant adaptée pour purifier le lysozyme préalablement cristallisé à pH basique dans le rétentat de filtration.

20

Ce coproduit, employé dans le procédé, est obtenu avantageusement par la succession d'étapes suivantes :

25

(a) passage du blanc d'œuf sur un support de chromatographie échangeur de cations, pour la rétention d'une fraction protéique de blanc d'œuf contenant le lysozyme,

(b) élution de la fraction protéique enrichie en lysozyme retenue sur ledit support de chromatographie au cours de l'étape (a), au moyen d'une solution de saumure,

30

(c) récupération de l'éluat enrichie en lysozyme, issu de l'étape (b),

(d) cristallisation à pH basique du lysozyme contenu dans ledit éluat obtenu à l'étape (c),

35

(e) filtration dudit éluat pour purifier dans le rétentat le lysozyme cristallisé, et

(f) récupération du filtrat issu de l'étape (e), formant le coproduit d'intérêt.

De préférence encore, ce coproduit possède les caractéristiques suivantes :

- une conductivité comprise entre 60 et 100 mS/cm,
- 5 - une concentration en avidine comprise entre 0,05 et 0,8g/L,
- un rapport massique (lysozyme+avidine)/protéines totales, supérieur à 0,1 et
- un rapport massique avidine/lysozyme, supérieur à 0,1.

10 Encore de préférence, le coproduit utilisé dans le procédé se présente sous une forme concentrée et dessalée/déminéralisée.

Dans ce cas, le coproduit concentré et déminéralisé vérifie avantageusement les caractéristiques suivantes :

- une conductivité inférieure à 50 mS/cm,
- une concentration en avidine supérieure à 1g/L,
- 15 - un rapport massique (lysozyme+avidine)/protéines totales, supérieur à 0,1 et
- un rapport massique avidine/lysozyme, supérieur à 0,1.

La présente invention fournit également une composition pour l'extraction et la purification d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf, consistant en un coproduit issu d'un procédé d'extraction de lysozyme se présentant sous une forme concentrée et dessalée, lequel coproduit est un filtrat obtenu à l'issue d'un procédé d'extraction du lysozyme, sous une forme concentrée et dessalée, lequel coproduit est une solution obtenue à l'issue d'une étape d'extraction du lysozyme préalablement cristallisé à pH basique à partir d'un éluat contenant la fraction protéique de blanc d'œuf retenue sur un support de chromatographie échangeur de cations. Ce coproduit consiste avantageusement en un filtrat obtenu à l'issue d'une étape de filtration d'un éluat contenant la fraction protéique de blanc d'œuf retenue sur un support de chromatographie échangeur de cations, ladite étape de filtration étant adaptée pour purifier le lysozyme préalablement cristallisé à pH basique dans le rétentat de filtration.

La présente invention concerne également un procédé pour la purification d'avidine, comprenant une opération d'extraction et de purification de l'avidine à partir d'une composition contenant notamment de l'avidine et du lysozyme (avantageusement du blanc d'œuf ou un produit

dérivé de blanc d'œuf), laquelle opération d'extraction et de purification de l'avidine comprenant les étapes suivantes :

- 5 (a) un premier passage sur un support de chromatographie échangeur de cations avec ladite composition, le chargement dudit support s'effectuant au-delà de ses capacités de fixation de sorte, d'une part, à retenir le lysozyme (avantageusement tout ou au moins approximativement tout le lysozyme), et d'autre part, à récupérer la fraction exclue enrichie en avidine et dépourvue de lysozyme,
- 10 (b) un second passage sur un support de chromatographie échangeur de cations avec ladite fraction exclue obtenue à la fin de l'étape (a), le chargement dudit support s'effectuant de telle sorte que ses sites de fixation soient occupés par l'avidine (avantageusement tous ces sites),
- (c) l'élution et la collecte de la fraction d'éluat contenant l'avidine purifiée, retenue sur ledit support au cours de l'étape (b).

15

DESCRIPTION DES FIGURES

La figure 1 montre le profil HPLC gel filtration (chromatogramme avec valeur de la densité optique à 280nm fonction du temps en minutes), pour évaluer le degré de pureté de l'avidine extrait par le procédé selon l'invention.

20

La figure 2 montre des profils électrophorétiques répartis sur cinq pistes, pour évaluer le degré de pureté de l'avidine extrait par le procédé selon l'invention : (1) coproduit issu d'un procédé d'extraction de lysozyme se présentant sous une forme concentrée et dessalée, (2) lysozyme étalon, (3) 25 avidine purifiée par le procédé selon l'invention, (4) avidine étalon, (5) lysozyme étalon. Les bandes désignées par les repères A à D correspondent respectivement à : (A) ovotransferrine, (B) ovalbumine, (C) avidine et (D) lysozyme.

30

DESCRIPTION DE L'INVENTION

La demanderesse s'est attachée à la recherche de nouveaux procédés d'obtention de protéines basiques de blanc d'œuf, avantageusement purifiées, dont le coût de revient est modéré.

Dans ce contexte, la demanderesse a montré qu'un produit dérivé du blanc d'œuf, qui est susceptible d'être obtenu en tant que coproduit dépourvu

35

de valeur marchande et qui est généré au cours de procédés de purification protéique à partir de blanc d'œuf, peut être employé dans des procédés industriels pour l'obtention, et notamment l'extraction et la purification, de protéines basiques de blanc d'œuf.

5 La demanderesse a en effet montré qu'un des coproduits ou sous-produits issu d'un procédé d'extraction du lysozyme à partir de blanc d'œuf, peut constituer un produit de départ utilisable pour l'obtention (avantageusement par extraction et purification) des protéines basiques de blanc d'œuf, principalement l'avidine ou un mélange avidine / lysozyme.

10 On a ainsi identifié selon l'invention un produit de départ ayant un grand intérêt pour l'obtention (avantageusement l'obtention par extraction et purification) d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf, principalement l'avidine ou un mélange avidine / lysozyme.

15 Seront successivement détaillés ci-dessous (i) le procédé d'obtention du coproduit d'extraction du lysozyme qui est utilisé comme produit de départ pour l'obtention de protéines de blanc d'œuf, puis (ii) le procédé d'obtention de protéines de blanc d'œuf, en particulier l'avidine, dans lequel on utilise le coproduit ci-dessus comme produit de départ.

20 ***Procédé d'obtention du coproduit utilisé comme produit de départ***

Ce produit de départ d'intérêt consiste en un sous-produit ou un coproduit qui est généré lors de la mise en œuvre d'un procédé d'extraction du lysozyme à partir de blanc d'œuf liquide, ledit procédé d'extraction du lysozyme comprenant :

- 25 (i) l'utilisation de blanc d'œuf qui est soumis à une étape de chromatographie d'échange de cations au cours de laquelle une fraction protéique enrichie en lysozyme est retenue sur le support chromatographique,
- (ii) une étape d'élution (avantageusement au moyen d'une solution de saumure) et de récupération de la fraction protéique enrichie en
- 30 lysozyme, et
- (iii) une étape d'extraction du lysozyme par cristallisation à pH basique, entraînant en parallèle la production d'un sous-produit ou coproduit appauvri en lysozyme,

ledit sous-produit ou coproduit correspondant au produit d'intérêt qui a été identifié selon l'invention comme produit de départ pour l'obtention d'une protéine basique, avantageusement purifiée, de blanc d'œuf.

Le coproduit d'intérêt, qui est utilisé selon l'invention comme produit de départ dans un procédé d'obtention d'une protéine basique provenant de blanc d'œuf, se présente sous la forme d'une solution obtenue à l'issue de l'étape (iii) ci-dessus d'extraction du lysozyme cristallisé à pH basique à partir d'un éluat contenant la fraction protéique de blanc d'œuf retenue sur un support de chromatographie échangeur de cations.

Le coproduit d'intérêt consiste avantageusement en une solution de saumure (une solution aqueuse d'un sel) présentant un pH basique, dont la composition protéique est différente de celle du blanc d'œuf : il s'agit d'une solution enrichie en protéines basiques, autre que le lysozyme, retenues sur support chromatographique échangeur de cations.

La demanderesse a constaté que ce coproduit, aujourd'hui non valorisé et considéré comme un déchet, est particulièrement riche en certaines protéines basiques de blanc d'œuf, et tout particulièrement en avidine. On a montré selon l'invention que ce coproduit constitue une matière première de départ très intéressante pour l'extraction et la purification de ces protéines d'intérêt.

Plus précisément, le coproduit d'intérêt, qui est utilisé selon l'invention comme produit de départ pour l'obtention (et en particulier la purification) de protéines basiques de blanc d'œuf, est susceptible d'être obtenu par un procédé d'extraction de lysozyme comprenant la succession d'étapes suivantes :

(a) passage du blanc d'œuf liquide sur un support de chromatographie échangeur de cations, pour la rétention d'une fraction protéique de blanc d'œuf contenant le lysozyme (et aussi l'avidine),

(b) élution de la fraction protéique enrichie en lysozyme retenue sur ledit support de chromatographie au cours de l'étape (a), au moyen d'une solution de saumure,

(c) récupération de l'éluat enrichi en lysozyme, issu de l'étape (b),

(d) cristallisation à pH basique du lysozyme contenu dans ledit éluat obtenu à l'étape (c),

(e) extraction du lysozyme cristallisé à partir dudit éluat, et

(f) récupération de la solution issue de l'étape (e), formant le coproduit d'intérêt.

On a constaté selon l'invention que la fraction protéique enrichie en lysozyme qui est récupérée dans l'éluat à l'étape (c) comprend aussi d'autres protéines de blanc d'œuf, et notamment de l'avidine. On a aussi montré que le coproduit d'intérêt récupéré à l'étape (f), qui est appauvri en lysozyme, n'a pas été simultanément appauvri en autres protéines de blanc d'œuf. En particulier, ledit coproduit d'intérêt n'a pas été simultanément appauvri en

Le produit de départ du procédé d'extraction du lysozyme décrit ci-dessus est le blanc d'œuf, encore couramment dénommé albumen.

Le blanc d'œuf provient préférentiellement d'un œuf d'oiseau, avantageusement d'un œuf d'oiseau choisi parmi la poule, la dinde, la pintade, l'oie, la cane, la caille, la faisane, le pigeon et l'autruche.

Le blanc d'œuf utilisé comme produit de départ du procédé ci-dessus est de préférence issu d'un œuf de poule.

Pour la mise en œuvre du procédé d'extraction du lysozyme ci-dessus, le support de chromatographie échangeur de cations est choisi parmi un support échangeur de cations du type acide faible et un support échangeur de cations de type acide fort.

Selon un mode de réalisation préféré, on effectue l'étape d'échange de cations sur un support chromatographique constitué d'un gel rigide, ou semi-rigide, à base de polymères hydrophiles, tels qu'un gel d'agarose réticulé ou non réticulé, un gel de polymère vinylique hydrophile, ou un gel de silice enrobée avec un polymère hydrophile, ou un support polystyrène divinyl benzène, sur le(s)quel(s) polymère(s) hydrophile(s) sont greffés des groupements lui(leur) conférant des propriétés d'échangeur(s) de cations.

Parmi les groupements fonctionnels susceptibles d'être utilisés pour le greffage du(des) polymère(s), on peut citer (i) les groupements carboxyméthyl du type CM-polyoside pour un revêtement échangeur de cations faible, et (ii) les groupements sulfonate ou méthyl sulfonate (S) ou sulfopropyl (SP) du type SP-polyoside pour un revêtement échangeur de cations fort, qui est apte à adsorber des molécules faiblement ionisées.

Le support de chromatographie d'échange de cations utilisé dans le procédé d'extraction de lysozyme ci-dessus est avantageusement

conditionné dans un conteneur équipé d'au moins un moyen d'alimentation en blanc d'œuf de départ, d'au moins un moyen d'évacuation des liquides et d'au moins un moyen pour agiter les particules de support chromatographique dans le liquide à traiter. Il s'agit d'un conditionnement
5 « par lot » (« batch ») du support chromatographique. Le conteneur dans lequel est disposé le support de chromatographie d'échange de cations peut aussi être équipé d'un ou plusieurs moyen(s) d'alimentation en solution tampon, en solution de lavage, ou bien encore en solution pour régénérer le support chromatographique.

10 De façon préférentielle, préalablement à l'étape (a) de passage sur support de chromatographie, le blanc d'œuf liquide est ajusté à une valeur de pH comprise entre 7 et 10, et de préférence de l'ordre de 8,5.

Le support de chromatographie d'échange de cations est
15 avantageusement équilibré à une valeur de pH identique, ou approximativement identique, à la valeur ajustée de pH du blanc d'œuf.

A l'étape (a), le lysozyme contenu dans le blanc d'œuf liquide départ est retenu sur le support de chromatographie d'échange de cations, et la fraction exclue (non retenue sur le support) qui est appauvrie en lysozyme est évacuée du conteneur ou de la colonne de chromatographie.

20 Après l'étape (a), et préalablement à l'étape (b) d'élution, le support de chromatographie d'échange de cations est soumis à une ou plusieurs étapes de lavage, préférentiellement avec de l'eau déminéralisée, afin d'éliminer les composants protéiques ou non protéiques de blanc d'œuf non retenus spécifiquement sur le support chromatographique.

25 La solution de saumure utilisée à l'étape (b) consiste avantageusement en une solution d'élution contenant au moins un contre-ion choisi parmi les cations monovalents suivants Na ou NH_4 , et/ou les cations bivalents suivants Mg ou Ca.

La concentration en sel de cette solution de saumure est
30 avantageusement ajustée de sorte à obtenir une conductivité comprise entre 70 et 80 mS/cm ; elle est par exemple ajustée à 5 % en NaCl.

A l'étape (d), la cristallisation du lysozyme est sélective. Elle peut être réalisée par ajout de soude (NaOH), sous agitation, jusqu'à ajustement à une valeur de pH comprise entre 8 et 11, et de préférence de l'ordre de 10.

Cette étape peut être mise en œuvre dans un réacteur ou « tank » de cristallisation, bien connu de l'homme du métier.

Selon un mode de réalisation préférentiel des étapes (e) et (f), la séparation entre (i) le lysozyme cristallisé et (ii) le coproduit d'intérêt, est réalisée par filtration de l'éluat issu de l'étape (c) : le lysozyme cristallisé est retrouvé dans le rétentat (dénommé encore « pâte de lysozyme »), et le filtrat issu de l'étape (e) constitue le coproduit d'intérêt appauvri en lysozyme et enrichi en avidine (aussi désigné « saumure sortie de filtre » dans la présente description).

L'opération de filtration ci-dessus, pour la réalisation des étapes (e) et (f) du procédé d'extraction de lysozyme ci-dessus, est par exemple mise en œuvre au moyen d'un filtre presse.

Préférentiellement, le filtre-presse consiste en un filtre presse à bande pressante dont la membrane est avantageusement une membrane de microfiltration avec une taille des pores comprise entre 0,1 et 10 μm .

D'autres méthodes et techniques connues de l'homme du métier, peuvent encore être envisagées pour réaliser la séparation entre le lysozyme cristallisé et les autres composants de l'éluat obtenu à l'issue de l'étape (c) du procédé ci-dessus.

On peut par exemple citer une méthode classique de séparation par centrifugation. Dans ce mode de réalisation des étapes (e) et (f) du procédé ci-dessus, le coproduit d'intérêt constitue le surnageant ou centrifugat ; le lysozyme cristallisé est collecté dans le culot de centrifugation.

A l'étape (f) du procédé ci-dessus, on obtient le coproduit d'extraction du lysozyme, utile pour les procédés d'obtention (avantageusement d'extraction et de purification) de protéines basiques de blanc d'œuf selon l'invention, ledit coproduit d'intérêt possédant avantageusement les caractéristiques suivantes :

- une conductivité comprise entre 60 et 100 mS/cm,
- une concentration d'avidine comprise entre 0,05 et 0,8 g/L (cette concentration en avidine dépend principalement du nombre de recyclages de la solution de saumure au niveau de l'étape (b) d'élution du lysozyme),
- un rapport massique (lysozyme + avidine)/protéines totales, supérieur à 0,1, (généralement entre 0,1 et 2), et

- un rapport massique avidine/lysozyme supérieur à 0,1 (généralement entre 2 et 25).

Procédé d'obtention d'une protéine basique provenant de blanc d'œuf

5 En utilisant ledit coproduit, qui est enrichi en particulier en avidine, comme matière première de départ, on peut obtenir (et avantageusement extraire et purifier) au moins une protéine basique de blanc d'œuf par un procédé adapté, qui peut aussi être désigné « procédé d'obtention (avantageusement de purification) d'une protéine basique de blanc d'œuf »,
10 est détaillé ci-après dans la présente description.

Les protéines basiques de blanc d'œuf, qui sont obtenues en réalisant ledit procédé d'obtention d'une protéine basique de blanc d'œuf décrit ci-après, peuvent être utilisées en tant que telles dans toutes applications industrielles appropriées.

15 Par « obtention d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf », on désigne principalement un procédé de purification, et encore principalement :
(i) la séparation entre un mélange de lysozyme et d'avidine, et les autres constituants protéiques dudit coproduit d'intérêt ;
(ii) la séparation entre l'avidine et les autres constituants protéiques dudit
20 coproduit d'intérêt ;
(iii) la séparation entre le lysozyme et les autres constituants protéiques dudit coproduit d'intérêt ; et
(iv) la séparation entre une protéine basique de blanc d'œuf, autre que l'avidine ou le lysozyme, et les autres constituants protéiques dudit
25 coproduit d'intérêt.

La purification d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf peut englober, outre la séparation entre la protéine basique d'intérêt et les autres constituants protéiques dudit coproduit d'intérêt, également la séparation entre la protéine basique d'intérêt et des constituants non protéiques dudit
30 coproduit, tels que des sucres, des sels minéraux, des acides aminés, des vitamines, etc.

La purification d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf est dite « sélective » parce qu'on récupère avantageusement (i) soit un mélange purifié d'une ou plusieurs protéines basiques de blanc d'œuf d'intérêt, (ii) soit
35 une protéine basique de blanc d'œuf d'intérêt sous forme purifiée. Dans la

pratique, on récupère « sélectivement » de préférence soit l'avidine purifiée, soit le lysozyme purifié, soit un mélange purifié d'avidine et de lysozyme.

Par « obtention d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf », on désigne encore notamment un procédé dit « d'enrichissement » pour
5 l'obtention d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf sous une forme enrichie. Ce procédé vise en particulier à modifier le ratio d'au moins une protéine basique d'intérêt contenue dans ledit coproduit d'intérêt, par rapport à ses autres constituants.

Dans ce cas, on désigne principalement :

- 10 (i) l'enrichissement en lysozyme et en avidine, par rapport aux autres constituants protéiques dudit coproduit d'intérêt ;
(ii) l'enrichissement en avidine, par rapport aux autres constituants protéiques dudit coproduit d'intérêt ;
(iii) l'enrichissement en une protéine basique de blanc d'œuf, autre que
15 l'avidine ou le lysozyme, par rapport aux autres constituants protéiques dudit coproduit d'intérêt.

L'enrichissement en au moins une protéine basique de blanc d'œuf permet en particulier de récupérer le coproduit enrichi en une ou plusieurs protéines basiques, en comparaison audit coproduit avant enrichissement.

20 Tout protocole adapté peut être utilisé à cet effet, selon des méthodes employées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement par précipitation et/ou filtration, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, etc.

25 Pour l'obtention des protéines basiques de blanc d'œuf, et en particulier pour l'extraction et la purification, le coproduit d'extraction du lysozyme est avantageusement utilisé sous une forme concentrée et dessalée/déminéralisée, pour obtenir un produit enrichi en protéines basiques d'intérêt.

30 Ce coproduit concentré et dessalé est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- (a) éventuelle débactérisation préalable du coproduit d'extraction du lysozyme, avantageusement par microfiltration,
(b) ajustement du pH dudit coproduit, au moyen d'un acide minéral ou
35 organique,

(c) concentration du coproduit acidifié à l'étape (b), de préférence par filtration (par exemple par ultrafiltration, nanofiltration ou osmose inverse), jusqu'à obtenir un coproduit concentré contenant avantageusement au moins 1 g/L d'avidine,

5 (d) déminéralisation/dessalage du coproduit concentré issu de l'étape (c), de façon à obtenir un coproduit concentré dont la teneur en sel est réduite à une conductivité préférentiellement inférieure à 50 mS/cm.

A l'étape (b), le pH est ajusté à une valeur inférieure à 7,5, de préférence à une valeur allant de 7,5 à 2,5.

10 Dans certains modes de réalisation, la valeur du pH est avantageusement ajustée à l'étape (b), de sorte à atteindre une valeur proche de la neutralité (de préférence encore entre 6,5 et 7,5), avant d'être concentré par l'étape de filtration (c).

La demanderesse a par ailleurs montré que l'ajustement à pH acide du coproduit d'extraction du lysozyme, à l'étape (b) du procédé, de préférence à une valeur de pH allant de 2,5 à 4,5 (avantageusement de l'ordre de 3), permet d'optimiser significativement l'efficacité de l'étape (c) de concentration en avidine dans le coproduit concentré, en particulier dans le cas d'une technique de filtration, et de préférence encore dans le cadre d'une technique d'ultrafiltration ; et cela permet d'obtenir des niveaux de concentration élevés en avidine.

Ainsi, dans certains modes de réalisation, la valeur du pH est avantageusement ajustée à l'étape (b), à une valeur de pH allant de 2,5 à 4,5 (avantageusement de l'ordre de 3), avant d'être concentré par l'étape de filtration (c).

A l'étape (c) lorsque la concentration du coproduit acidifié est réalisée par ultrafiltration, la membrane d'ultrafiltration possède préférentiellement un seuil de coupure supérieur à 10 000 Da.

La demanderesse a découvert qu'une membrane dont le seuil de coupure est de 100 000 Da, permet d'augmenter d'un facteur 10 à 50 le ratio avidine/lysozyme de la fraction rétentat.

Comme cela est décrit ci-après, l'ajustement du rapport avidine/lysozyme dépend avantageusement de la protéine d'intérêt à obtenir ensuite.

L'étape (d) de déminéralisation/dessalage peut être effectuée par toute technique connue de l'homme de l'art, par exemple par nanofiltration

ou ultrafiltration avec diafiltration, en utilisant des membranes de nanofiltration ou ultrafiltration. L'étape (d) de déminéralisation/dessalage peut encore être effectuée par électrodialyse ou par passage sur une résine échangeuse d'ions.

5 De manière à optimiser les opérations suivantes d'extraction et de purification, le coproduit concentré et déminéralisé/dessalé qui est obtenu à l'étape (d) vérifie avantageusement les caractéristiques suivantes :

- une conductivité inférieure à 50 mS/cm (et de préférence 2 à 15 mS/cm),
- 10 - une concentration d'avidine supérieure à 1 g/L (et de préférence de 3 à 15 g/L),
- un rapport massique (lysozyme + avidine)/protéines totales supérieur à 0,1 (et de préférence supérieur à 1), et
- un rapport massique avidine/lysozyme supérieur à 0,1 (et de préférence
- 15 supérieur à 2).

La valeur de conductivité est mesurée préférentiellement à l'aide d'un conductimètre.

La concentration en avidine est de préférence déterminée par la méthode colorimétrique au HABA (4-Hydroxyazobenzene-2-Carboxylic Acid) selon Green et al (Biochem J, 94: 23-24, 1965) modifiée par Durance et al (J

20 Food Sci, 56(3): 707-709, 1991).

L'avidine est détectée avantageusement soit par le test HABA, soit par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Le lysozyme est par exemple détecté soit par HPLC en gel de filtration selon la méthode de Thapon et al (Sci Alim 2 : 251-260, 1982), soit par

25 électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

La concentration en lysozyme est déterminée par exemple par mesure de son activité lytique sur des cellules de *Micrococcus lysodeikticus* selon la méthode de Litwack (Proc Soc Exp Biol & Med, 89 : 104, 1955) et Prockop et

30 al (New Eng J Med, 240 : 269,1964).

La concentration en protéines totales est déterminée, à titre d'exemple, par la méthode de Kjeldhal.

Le rapport massique (lysozyme + avidine)/protéines totales est calculé à partir des données analytiques décrites ci-dessus.

L'utilisation ultérieure du coproduit concentré et dessalé/déminéralisé obtenu à la fin de l'étape (d) dépend avantagement de son ratio avidine/lysozyme.

5 En pratique, les fractions dont le ratio massique avidine/lysozyme est élevé (c'est-à-dire de préférence supérieure à 5), seront privilégiées pour la purification et l'extraction ultérieure de l'avidine.

10 A l'inverse, les fractions dont le ratio massique avidine/lysozyme est plus faible (c'est-à-dire avantagement inférieur à 5), seront avantagement utilisées en vue de l'exploitation ultérieure des propriétés du mélange enrichi en avidine / lysozyme.

Le produit concentré et dessalé obtenu à la fin de l'étape (d) peut aussi être traité de manière à permettre sa conservation dans le temps.

15 Le traitement de conservation, connu de l'homme du métier, peut être du type séchage, lyophilisation ou conditionnement et stabilisation par réfrigération (température allant entre -5°C et +4°C) ou congélation (température inférieure à -5°C, mieux inférieure à -20°C, avantagement inférieure à -80°C).

20 La présente invention concerne aussi un procédé pour la purification d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf, qui est particulièrement adapté à l'utilisation du coproduit d'extraction de lysozyme décrit ci-dessus comme produit de départ, ledit coproduit d'extraction de lysozyme étant avantagement sous forme concentrée et déminéralisée.

25 La demanderesse a en particulier mis au point un procédé d'extraction d'une protéine basique provenant de blanc d'œuf dans lequel on a recours à une technique de chromatographie dite en mode « frontal ».

Par chromatographie en mode « frontal », on entend une méthode de séparation d'un composé d'intérêt par chromatographie selon laquelle :

30 (i) on fournit un support de chromatographie conditionné dans une colonne comprenant (i) au moins un moyen d'alimentation en continu de ladite colonne en solution de départ contenant ledit composé d'intérêt, destiné à être mis en contact avec ledit support de chromatographie et (ii) au moins un moyen d'évacuation du liquide ayant été mis en contact avec ledit support de chromatographie,

35 (ii) on alimente ladite colonne de chromatographie avec un flux continu d'une solution contenant un composé d'intérêt à extraire ou purifier, afin

que ladite solution soit mise en contact en continu avec le support de chromatographie conditionné dans la colonne, la partie de ladite solution ayant été en contact avec le support de chromatographie étant évacuée de la colonne également en continu, et l'alimentation de la colonne de chromatographie avec ladite solution étant poursuivie jusqu'à ce que les molécules dudit composé d'intérêt saturent ledit support de chromatographie et que ledit composé d'intérêt soit détecté dans le flux de sortie de la colonne.

En d'autres termes, lorsqu'on réalise une étape de chromatographie en mode « frontal », on poursuit l'alimentation de la colonne de chromatographie avec la solution contenant le composé d'intérêt à extraire ou purifier, jusqu'à dépasser la capacité de fixation dudit support pour ledit composé d'intérêt.

Le support de chromatographie étant saturé et une fois qu'une molécule commence à être éluée du support, elle est présente continuellement dans la fraction exclue. Les molécules ayant peu ou pas d'affinité pour le support de chromatographie sont récupérées dans la fraction exclue avant les molécules ayant une plus grande aptitude à être retenues par le support de chromatographie.

La demanderesse a en particulier mis au point une méthode de chromatographie, en mode frontal, permettant d'atteindre des niveaux de pureté en avidine très élevés (avantageusement supérieurs à 99 %) en seulement deux étapes, et avec des rendements satisfaisants (avantageusement 30 à 60 % de l'avidine présente dans le coproduit concentré/déminéralisé, fonction en particulier de son ratio massique avidine/lysozyme : plus le ratio avidine/lysozyme est élevé, plus le rendement d'extraction est élevé).

Le procédé d'extraction ou de purification d'une protéine basique provenant du blanc d'œuf selon l'invention consiste en un procédé à trois étapes dans lequel on réalise deux étapes successives de chromatographie, ledit procédé d'extraction comprenant les étapes suivantes :

(a) dans une première étape, charger un support chromatographique au-delà de ses capacités de fixation (ou d'adsorption) avec un flux continu de coproduit d'extraction de lysozyme décrit précédemment, de telle sorte que le lysozyme retenu sur ledit support empêche la rétention de

l'avidine, ce qui permet d'obtenir une fraction exclue appauvrie, voir dépourvue, en lysozyme (« délysozymée ») et contenant une grande partie ou la totalité de l'avidine initialement présente dans le volume de coproduit mis en contact avec le support chromatographique, et

5 (b) dans une seconde étape, charger un support chromatographique avec la fraction exclue délysozymée obtenue à l'étape (a), le cas échéant au-delà de la capacité de fixation (ou adsorption) dudit support chromatographique, de telle sorte que les sites de fixation (ou adsorption) soient occupés par l'avidine,

10 (c) éluer l'avidine retenue sur le support chromatographique à l'étape (b).

On a montré dans les exemples que le procédé d'extraction ci-dessus, qui a été mis au point par la demanderesse, permet l'obtention d'une avidine très pure, et avec un rendement important.

15 Selon un mode préféré de réalisation du procédé d'extraction ou de purification d'une protéine basique de blanc d'œuf de l'invention, les étapes suivantes peuvent être mises en œuvre :

(a) un premier passage sur un support de chromatographie échangeur de cations avec le coproduit d'extraction de lysozyme sous forme concentrée et dessalée, le chargement dudit support s'effectuant au-delà de ses capacités de fixation de sorte, d'une part, à retenir le lysozyme, et d'autre part, à récupérer la partie de la fraction exclue enrichie en avidine et dépourvue de lysozyme,

20 (b) un second passage sur un support de chromatographie échangeur de cations avec ladite partie de fraction exclue obtenue à la fin de l'étape (a), le chargement dudit support s'effectuant de telle sorte que ses sites de fixation (le cas échéant tous ses sites) soient occupés par l'avidine,

25 (c) l'élution et la collecte de la fraction d'éluat contenant l'avidine purifiée retenue sur ledit support au cours de l'étape (b).

30 Le support chromatographique échangeur de cations utilisé à l'étape (a) et à l'étape (b) est choisi parmi un support chromatographique échangeur de cations du type faible ou un support chromatographique échangeur de cations du type fort.

35 Selon un mode de réalisation préféré, on effectue l'étape d'échange cationique sur un support chromatographique constitué d'un gel rigide, ou semi-rigide, à base de polymères hydrophiles, tels qu'un gel agarose

éventuellement réticulé, un gel de polymère vinylique hydrophile, ou un gel de silice enrobée avec un polymère hydrophile, ou un support polystyrène divinyl benzène, sur lequel polymère hydrophile sont greffés des groupements conférant audit polymère et audit gel des propriétés d'échangeur de cations.

5

Parmi les groupements fonctionnels susceptibles d'être utilisés pour le greffage du(des) polymère(s), on peut citer (i) les groupements carboxyméthyl du type CM-polyoside pour un revêtement échangeur de cations faible, et (ii) les groupements sulfonate ou méthyl sulfonate (S) ou sulfopropyl (SP) du type SP-polyoside pour un revêtement échangeur de cations fort, qui est apte à adsorber des molécules faiblement ionisées.

10

Par exemple, le support chromatographique échangeur de cations est sélectionné parmi le groupe suivant : S Hyper DF, S Ceramic Hyper DF, SP Spherodex LS, Streamline SPXL, CM Hyper DF, CM Sepharose, Biorex 70, Duolite C464, Amberlite IRC 50, CG-50, DP-1, IRC-72 et 64, Rexyn 102, Merck IV, Zeocarb 226, Diaion WK 10 et WK 11, IMAC Z-5, CP-3050, et Wofafit CP300.

15

Selon un mode préférentiel de réalisation, le support de chromatographie échangeur de cations utilisé à l'étape (a) est identique à celui utilisé à l'étape (b) ; il suffit par exemple de régénérer le support entre les étapes (a) et (b).

20

De façon préférentielle, préalablement à l'étape (a), le coproduit concentré et dessalé est ajusté, d'une part, à une valeur de conductivité comprise entre 5 et 60 mS/cm, de préférence entre 5 et 10 mS/cm, et d'autre part, à une valeur de pH comprise entre 7 et 10, et de préférence encore de l'ordre de 8,5. Cette opération permet de maximiser la capacité de fixation du support et de privilégier l'adsorption des protéines basiques, et notamment le lysozyme, et d'exclure les autres protéines contenues dans le coproduit concentré et dessalé.

25

De préférence, le support de chromatographie est équilibré à des valeurs de conductivité et de pH identiques, ou au moins proches, aux valeurs de conductivité et de pH du produit appliqué.

30

A la suite de cette étape d'ajustement de la conductivité et du pH, le coproduit concentré et dessalé est avantageusement soumis à une étape de décantation, centrifugation ou filtration, afin d'éliminer les éventuels

35

constituants insolubles pouvant gêner les étapes de chromatographie suivantes.

L'avidine et/ou le lysozyme sont détectés et/ou quantifiés dans le fluide de sortie de chromatographie.

5 Cette opération peut être mise en œuvre par toute technique connue de l'homme du métier, et citée précédemment.

Au cours du premier passage selon l'étape (a), l'avidine et le lysozyme sont détectés et/ou quantifiés dans le fluide de sortie de chromatographie (selon par exemple une technique décrite ci-dessus, directement ou dans
10 une fraction exclue), de sorte à récupérer exclusivement la fraction exclue contenant l'avidine (et éventuellement d'autres protéines basiques de blanc d'œuf) et dépourvue de lysozyme (tenant compte de la sensibilité du test de détection / quantification).

De préférence, les fractions exclues récupérées sont celles ne
15 contenant aucune trace de lysozyme détectable.

Ces fractions exclues récupérées sont regroupées pour former la fraction exclue enrichie en avidine et dépourvue de lysozyme.

Selon d'autres modes de réalisation préférentiels de réalisation du procédé d'extraction, préalablement à l'étape (b), la fraction exclue et collectée à la fin de l'étape (a), qui est enrichie en avidine, est ajustée à une
20 valeur de pH comprise entre 7 et 10, et de préférence de l'ordre de 8,5. Cette opération permet de maximiser la capacité de fixation du support et de privilégier l'adsorption de l'avidine, et de favoriser l'exclusion des autres protéines contenues dans le milieu.

25 Préférentiellement, préalablement à l'étape (b) dudit procédé, le support de chromatographie est équilibré à des valeurs de conductivité et de pH identiques, ou au moins proches, de celles du produit appliqué.

Au cours de l'étape (b), l'avidine est avantageusement détectée et/ou quantifiée dans le fluide de sortie de chromatographie (directement ou dans
30 une fraction exclue), de sorte à interrompre ou arrêter le passage dès qu'une certaine concentration d'avidine est détectée (correspondant à la saturation des sites de fixation du support de chromatographie par l'avidine).

De préférence encore, on procède à l'arrêt du passage de la fraction exclue à l'étape (b), lorsque de l'avidine est détectée en sortie de colonne
35 chromatographique.

Avant l'étape (c) d'élution et de collecte de la fraction d'éluat comprenant l'avidine purifiée, le support de chromatographie peut être rincé, par exemple au moyen d'eau ou d'un tampon (par exemple un tampon acétate).

5 L'étape (c) d'élution et de collecte de la fraction d'éluat comprenant l'avidine purifiée est mise en œuvre selon une technique connue de l'homme du métier, avantageusement **en** augmentant le pH vers des valeurs proches de 10 avec un tampon glycine-NaOH ou carbonate-bicarbonate par exemple, ou en augmentant la force ionique du tampon d'élution avec une solution
10 saline (par exemple 0,5 M en NaCl).

Lorsque l'étape (c) d'élution est réalisée par augmentation de la force ionique, la solution utilisée consiste avantageusement en une solution d'élution contenant au moins un contre-ion choisi parmi les cations monovalents suivants Na ou NH₄, et/ou les cations bivalents suivants Mg ou
15 Ca.

Par exemple, la solution utilisée pour l'élution peut consister en une solution à 0,5 M d'un sel de NaCl ou KCl.

L'utilisation du coproduit d'extraction du lysozyme identifié par la demanderesse (et décrit avec son procédé d'obtention précédemment dans
20 la présente description), comme matière première de départ dans le présent procédé d'extraction en mode frontal selon la présente invention, s'avère en pratique d'un très grand intérêt industriel, du fait qu'il permet l'obtention d'une grande quantité d'avidine, de haute pureté (avantageusement supérieure à 99 % de pureté, selon une technique de chromatographie de gel filtration). Le
25 rendement global du procédé d'extraction d'avidine ci-dessus et la perte matière ne constituent pas un aspect critique du procédé, puisque le coproduit d'extraction du lysozyme qui est employé comme matière première de départ était dépourvu, jusqu'à la présente invention, de valeur marchande.

30 Plus généralement, la conduite de l'étape (a) de chromatographie en mode « frontal », et le cas échéant aussi de l'étape (b), permet également d'éviter les problèmes de changement d'échelle qui sont classiquement rencontrés pour les procédés chromatographiques, puisqu'il n'y a pas ici de gradient d'élution qu'il serait nécessaire d'optimiser. On peut donc très
35 simplement passer d'un support chromatographique de quelques millilitres, à

un support chromatographique de plusieurs litres, selon les quantités d'avidine à purifier, sans adaptation ou modification substantielle des caractéristiques générales du procédé.

5 La réalisation de l'étape (a), et le cas échéant aussi de l'étape (b), selon une technique de chromatographie en mode « frontal », permet également de travailler avec des volumes réduits de support de chromatographie. A titre indicatif, on peut obtenir jusqu'à environ 25 à 30 g d'avidine purifiée, en utilisant un litre de support de chromatographie.

10 On ajoute que le procédé chromatographique frontal en deux étapes peut également être mis en œuvre pour extraire et purifier le lysozyme résiduel contenu dans le coproduit d'extraction du lysozyme concentré et dessalé.

Pour purifier le lysozyme résiduel, on met en œuvre un procédé comprenant les étapes suivantes :

- 15 (a) chargement d'un support de chromatographie échangeur de cations avec un coproduit d'extraction de lysozyme sous forme concentrée et dessalée, le chargement dudit support s'effectuant au-delà de ses capacités de fixation de sorte, d'une part, à retenir le lysozyme, et d'autre part, à récupérer la fraction exclue enrichie en avidine et dépourvue de
- 20 lysozyme,
- (b) lavage du support de chromatographie sur lequel est retenu le lysozyme, avec une solution de lavage appropriée, telle qu'un tampon de phosphate de sodium 20 mM à pH 8,5,
- (c) élution du lysozyme retenu sur le support de chromatographie au
- 25 moyen d'une solution d'élution adaptée, par exemple par modification du pH (par exemple par fixation du pH à une valeur comprise entre 10 et 11) ou modification de la force ionique (par exemple au moyen d'une solution de NaCl 1M), et
- (d) collecte de la fraction d'éluat contenant le lysozyme purifié, retenu sur
- 30 ledit support au cours du premier passage selon l'étape (a) du coproduit d'extraction du lysozyme concentré et dessalé.

Plus généralement, ce procédé de chromatographie frontal en deux étapes peut être mis en œuvre à partir de toute autre solution contenant un mélange d'avidine et de lysozyme, à savoir en particulier du blanc d'œuf ou

tout autre produit dérivé de blanc d'œuf. Cette solution contient avantageusement un rapport avidine/lysozyme supérieur à 1,5.

On englobe aussi comme produit de départ du procédé d'extraction d'avidine selon l'invention toute solution d'origine recombinante issue d'un système bactérien ou eucaryote.

EXEMPLES

Exemple 1 : procédé de concentration et de déminéralisation d'un coproduit d'extraction du lysozyme à partir de blanc d'œuf

Matériau de départ

129,8 kg d'un coproduit d'extraction de lysozyme fourni par la société OVONOR (62232 ANNEZIN, France), présentant les caractéristiques suivantes :

- une conductivité de l'ordre de 67 mS/cm,
- une concentration d'avidine de 0,296 g/L,
- un rapport massique (lysozyme + avidine)/protéines totales, de l'ordre de 0,1,
- un rapport massique avidine/lysozyme de l'ordre de 2,
- une valeur de pH de l'ordre de 10.

Ce coproduit a été obtenu par la succession d'étapes suivantes :

- ajustement d'un blanc d'œuf de poule à une valeur de pH de 8,5,
- passage de ce blanc d'œuf de poule acidifié sur un support de chromatographie d'échange de cations Purolite C106 EP (support acrylique greffé au divinyl benzène et aux groupements fonctionnels COOH), en batch,
- rinçage du support chromatographique avec de l'eau déminéralisée,
- élution au moyen d'une solution de NaCl à 5%,
- cristallisation du lysozyme contenu dans la solution d'élution, au moyen d'une solution de NaOH avec ajustement du pH à une valeur de 10,
- filtration de la solution saline de lysozyme cristallisé sur un filtre presse, utilisant une membrane de microfiltration.

Concentration et déminéralisation du matériau de départ

Le coproduit obtenu est tout d'abord acidifié au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 5 M, jusqu'à ajuster son pH à une valeur de l'ordre de 3,15.

5 Le coproduit acidifié est ensuite concentré par ultrafiltration, au moyen d'une membrane dont le seuil de coupure est de 10 kDa (« Molecular Weight Cut Off » ou « MWCO » 10 kDa), et la surface est de 2,5 m².

10 Cette opération d'ultrafiltration est effectuée avec un débit de rétentat de 965 L/h, une pression d'entrée de 1,85 bar et un débit moyen de perméat de 20 L/h.

Le coproduit acidifié et concentré est ensuite soumis à une opération de diafiltration sur membrane d'ultrafiltration, avec un débit moyen de perméat de l'ordre de 40 L/h.

15 Le rétentat obtenu, enrichi en protéines basiques, présente un poids de 11,84 kg, et comporte les caractéristiques suivantes :

- une conductivité de 7,5 mS/cm,
- une concentration en avidine de 3,24 g/L,
- un rapport massique (lysozyme + avidine)/protéines totales, de l'ordre de 0,1, et
- 20 - un rapport massique avidine/lysozyme, de l'ordre de 2.

Exemple 2 : Extraction de l'avidine à partir du coproduit concentré et déminéralisé d'extraction du lysozyme

Matériau de départ

25 Le coproduit d'extraction utilisé présente les caractéristiques suivantes :

- un pH initial de 6,55
- une conductivité de 2,54 mS/cm,
- une concentration d'avidine de 7,48 g/L,
- 30 - un ratio avidine /lysozyme de 3,
- un rapport massique (lysozyme + avidine)/protéines totales, de l'ordre de 1.

Procédé d'extraction et de purification de l'avidine

35 La première chromatographie a été réalisée sur 200 mL d'une colonne de résine S Ceramic Hyper DF équilibré à pH 8,43.

Un volume de 2009 mL de coproduit concentré et dessalé (soit 15,02 g d'avidine) est chargé sur cette colonne de chromatographie.

Les résultats des dosages en avidine et lysozyme sur les fractions exclues, en sortie de colonne, sont représentés dans le tableau 1 ci-dessous.

5

Tableau 1 : Concentration d'avidine et détection du lysozyme, dans la fraction exclue

Volume des fractions regroupées	Fractions sortie colonne	Concentration en avidine (mg/L)	Absence (-) ou présence (+) de lysozyme détectée par gel filtration
Fractions 1 à 35 (1075 mL) conservée en vue de la 2ème étape chromatographique	F5	28	-
	F10	93	-
	F15	1881	-
	F20	5869	-
	F25	7375	-
	F30	9267	-
	F35	9577	-
Fractions 40 à 85 (1510 mL) non conservée en vue de la 2ème étape chromatographique	F40	8792	+
	F45	8475	+
	F50	8005	+
	F55	7060	+
	F60	8162	+
	F65	7375	+
	F70	1461	+
	F75	1098	+
	F80	704	+
F85	555	+	

10

En sortie de support, un volume de 1075 mL de la fraction exclue est récupéré, contenant les protéines du coproduit concentré-dessalé, notamment l'avidine, à l'exception du lysozyme.

Cette fraction exclue contient 4,38 g/L d'avidine, soit 4,71 g d'avidine au total. Le rendement d'extraction en avidine de cette première chromatographie est de 32 %.

5 Cette fraction enrichie en avidine est ensuite encore chargée sur 200 mL de résine S Ceramic Hyper DF, équilibrée maintenant à pH 8.

Après le chargement du support, la résine est rincée avec un tampon acétate 20 mM de pH 5.

L'avidine retenue sur le support de chromatographie est ensuite éluée au moyen d'une solution de NaCl 0,5 M.

10 Le volume de la fraction éluée enrichie en avidine est de 473 mL. Sa concentration d'avidine est de 9,1 g/L, soit 4,31 g d'avidine au total. Le rendement de cette deuxième chromatographie est de 91,6 %.

Le rendement global d'extraction du procédé est de 28,7 %.

15 Evaluation du degré de pureté de l'avidine

Le degré de pureté de l'avidine extraite est évalué par gel filtration HPLC (Colonne TSK SW XL G3000, tampon phosphate 50 mM + 200 mM de NaCl, pH 7, débit 0,7 mL/min, détection 280 nm). Le degré de pureté mesuré est de 100 % (figure 1).

20 La pureté de l'avidine ainsi produite est également estimée par électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS. On observe alors une unique bande (figure 2, piste 3).

REVENDEICATIONS

1.- Utilisation d'un coproduit issu d'un procédé d'extraction du lysozyme à partir de blanc d'œuf, pour l'obtention d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf, lequel coproduit est une solution obtenue à l'issue d'une étape d'extraction du lysozyme préalablement cristallisé à pH basique
5 à partir d'un éluat contenant la fraction protéique de blanc d'œuf retenue sur un support de chromatographie échangeur de cations.

2.- Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit coproduit est obtenu par la succession d'étapes suivantes :

(a) passage du blanc d'œuf sur un support de chromatographie échangeur de cations, pour la rétention d'une fraction protéique de blanc d'œuf contenant le lysozyme,
10

(b) élution de la fraction protéique enrichie en lysozyme retenue sur ledit support de chromatographie au cours de l'étape (a), au moyen d'une solution de saumure,

(c) récupération de l'éluat enrichie en lysozyme, issu de l'étape (b),
15

(d) cristallisation à pH basique du lysozyme contenu dans ledit éluat obtenu à l'étape (c),

(e) filtration dudit éluat pour purifier dans le rétentat le lysozyme cristallisé, et

(f) récupération du filtrat issu de l'étape (e), formant le coproduit d'intérêt.
20

3.- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit coproduit possède les caractéristiques suivantes :

- une conductivité comprise entre 60 et 100 mS/cm,

- une concentration en avidine comprise entre 0,05 et 0,8g/L,

- un rapport massique (lysozyme+avidine)/protéines totales, supérieur à 0,1
25 et

- un rapport massique avidine/lysozyme, supérieur à 0,1.

4.- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le coproduit est utilisé sous une forme concentrée et dessalée/déminéralisée.
30

5.- Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que le coproduit concentré et déminéralisé vérifie les caractéristiques suivantes :

- une conductivité inférieure à 50 mS/cm,

- une concentration en avidine supérieure à 1g/L,
- un rapport massique (lysozyme+avidine)/protéines totales, supérieur à 0,1 et
- un rapport massique avidine/lysozyme, supérieur à 0,1.

5 6.- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le coproduit est utilisé pour l'obtention d'avidine purifiée.

10 7.- Procédé pour la purification d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf, comprenant une opération d'extraction et de purification de ladite protéine basique à partir d'un coproduit issu d'un procédé d'extraction du lysozyme à partir de blanc d'œuf, lequel coproduit est une solution obtenue à l'issue d'une étape d'extraction du lysozyme préalablement cristallisé à pH basique à partir d'un éluat contenant la fraction protéique de blanc d'œuf retenue sur un support de chromatographie échangeur de
15 cations.

20 8.- Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que, préalablement à l'opération d'extraction et de purification de la protéine basique d'intérêt, ledit coproduit est soumis à une opération de préparation comprenant une étape de concentration et une étape de dessalage/déminéralisation.

25 9.- Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite étape de concentration est réalisée par ultrafiltration, et en ce que, préalablement à ladite étape de concentration, ledit coproduit est acidifié afin d'ajuster son pH à une valeur inférieure à 7,5, de préférence à une valeur allant de 7,5 à 2,5.

30 10.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que l'opération d'extraction et de purification permet la purification d'avidine.

30 11.- Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que ladite opération d'extraction et de purification de l'avidine comprend les étapes suivantes :

(a) un premier passage sur un support de chromatographie échangeur de cations avec ledit coproduit sous forme concentrée et dessalée, le chargement dudit support s'effectuant au-delà de ses capacités de fixation

de sorte, d'une part, à retenir le lysozyme, et d'autre part, à récupérer la fraction exclue enrichie en avidine et dépourvue de lysozyme,

(b) un second passage sur un support de chromatographie échangeur de cations avec ladite fraction exclue obtenue à la fin de l'étape (a), le chargement dudit support s'effectuant de telle sorte que ses sites de fixation soient occupés par l'avidine,

(c) l'élution et la collecte de la fraction d'éluat contenant l'avidine purifiée retenue sur ledit support au cours de l'étape (b).

12.- Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le support de chromatographie échangeur de cations utilisé à l'étape (a) est identique à celui utilisé à l'étape (b).

13.- Composition pour l'obtention d'au moins une protéine basique de blanc d'œuf, caractérisée en ce qu'elle consiste en un coproduit issu d'un procédé d'extraction du lysozyme, sous une forme concentrée et dessalée, lequel coproduit est une solution obtenue à l'issue d'une étape d'extraction du lysozyme préalablement cristallisé à pH basique à partir d'un éluat contenant la fraction protéique de blanc d'œuf retenue sur un support de chromatographie échangeur de cations.

14.- Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle vérifie les caractéristiques suivantes :

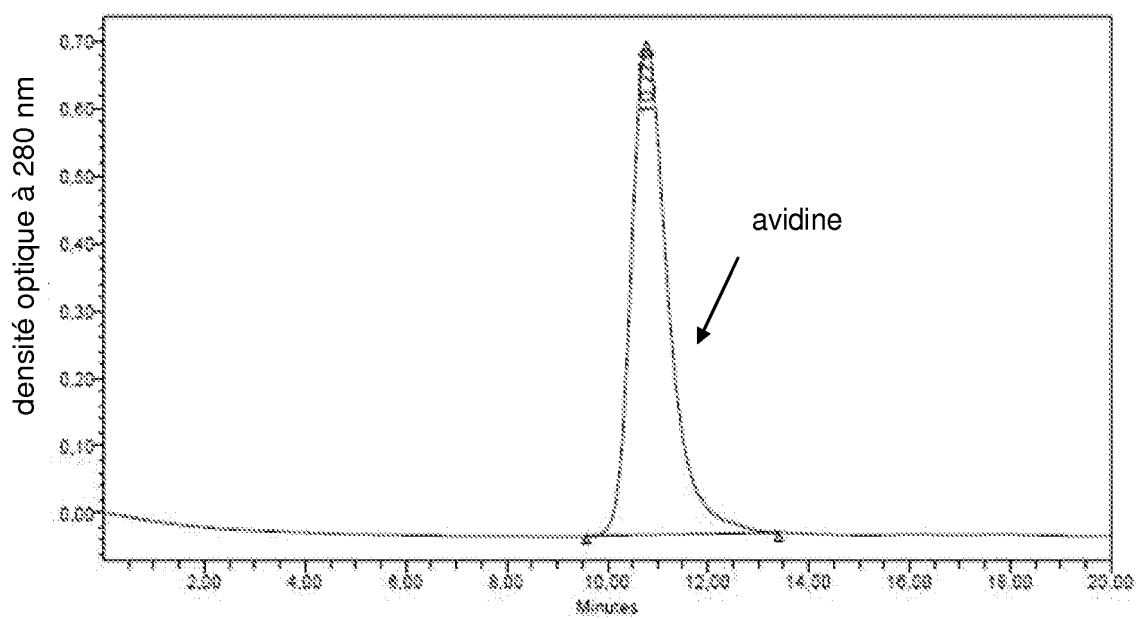
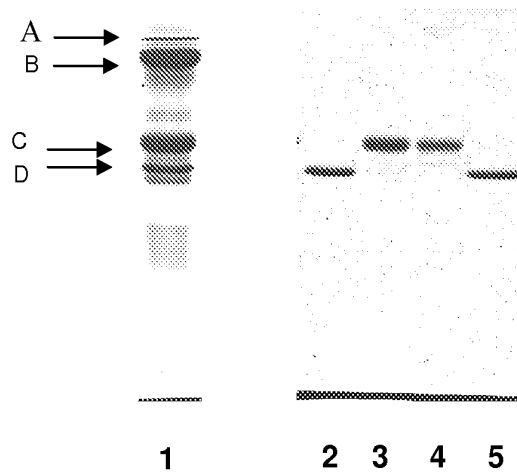
- une conductivité inférieure à 50 mS/cm,
- une concentration en avidine supérieure à 1g/L,
- un rapport massique (lysozyme+avidine)/protéines totales, supérieur à 0,1 et
- un rapport massique avidine/lysozyme, supérieur à 0,1.

15.- Procédé pour la purification d'avidine, comprenant une opération d'extraction et de purification de l'avidine à partir d'une composition contenant de l'avidine et du lysozyme, laquelle opération d'extraction et de purification de l'avidine comprend les étapes suivantes :

(a) un premier passage sur un support de chromatographie échangeur de cations avec ladite composition, le chargement dudit support s'effectuant au-delà de ses capacités de fixation de sorte, d'une part, à retenir le lysozyme, et d'autre part, à récupérer la fraction exclue enrichie en avidine et dépourvue de lysozyme,

- (b) un second passage sur un support de chromatographie échangeur de cations avec ladite fraction exclue obtenue à la fin de l'étape (a), le chargement dudit support s'effectuant de telle sorte que ses sites de fixation soient occupés par l'avidine,
- 5 (c) l'élution et la collecte de la fraction d'éluat contenant l'avidine purifiée retenue sur ledit support au cours de l'étape (b).

1 / 1

**Figure 1****Figure 2**

**RAPPORT DE RECHERCHE
 PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
 national

FA 725265
 FR 0954778

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DURANCE T D ET AL: "SIMULTANEOUS ISOLATION OF AVIDIN AND LYSOZYME FROM EGG ALBUMEN" JOURNAL OF FOOD SCIENCE, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, US, vol. 53, no. 4, 1 janvier 1988 (1988-01-01), pages 1096-1102, XP001119998 ISSN: 0022-1147 * page 1097 *	1-15	C07K1/16 C07K14///465# C12N9/36
X,D	----- US 4 966 851 A (DURANCE TIMOTHY [CA] ET AL) 30 octobre 1990 (1990-10-30) * le document en entier *	1-15	
X,D	----- WO 03/099035 A1 (INDIAN INST TECHNOLOGY [IN]; RAO MUKKAVILLI VENKATA SUBBA [IN]; GUPTA) 4 décembre 2003 (2003-12-04) * revendications; exemples *	1-15	
A	----- EP 0 305 760 A2 (HOECHST AG [DE]) 8 mars 1989 (1989-03-08) * le document en entier *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C07K C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
26 janvier 2010		Bayrak, Sinasi	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention 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. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0954778 FA 725265**

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 26-01-2010

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
US 4966851 A	30-10-1990	CA 1283072 C	16-04-1991
		JP 63233787 A	29-09-1988

WO 03099035 A1	04-12-2003	AU 2002367986 A1	12-12-2003
		EP 1505882 A1	16-02-2005
		JP 2006515559 T	01-06-2006
		JP 2009067812 A	02-04-2009
		US 2004063919 A1	01-04-2004

EP 0305760 A2	08-03-1989	AU 609170 B2	26-04-1991
		AU 2059188 A	16-02-1989
		CA 1340237 C	15-12-1998
		DE 3726655 A1	23-02-1989
		DK 447688 A	12-02-1989
		ES 2047007 T3	16-02-1994
		FI 883708 A	12-02-1989
		HU 47958 A2	28-04-1989
		IE 61557 B1	16-11-1994
		IL 87385 A	18-08-1993
		JP 1086896 A	31-03-1989
		JP 2587867 B2	05-03-1997
		NO 883554 A	13-02-1989
		NZ 225746 A	27-11-1990
		PH 26874 A	16-11-1992
		PT 88230 A	30-06-1989
US 5101013 A	31-03-1992		
ZA 8805871 A	26-04-1989		
