

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

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2024/218300 A1**

(43) Date de la publication internationale  
24 octobre 2024 (24.10.2024)

WIPO | PCT

(51) Classification internationale des brevets :

A23J 1/00 (2006.01) A23J 3/34 (2006.01)  
A23J 3/20 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01)  
A23J 3/30 (2006.01)

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- en noir et blanc ; la demande internationale telle que déposée était en couleur ou en échelle de gris et est disponible sur PATENTSCOPE pour téléchargement.

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2024/060721

(22) Date de dépôt international :

19 avril 2024 (19.04.2024)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

FR2303894 19 avril 2023 (19.04.2023) FR

(71) Déposant : FERMENTALG [FR/FR] ; 4 RUE RIVIÈRE,  
33500 LIBOURNE (FR).

(72) Inventeurs : CAGNAC, Olivier ; 14 lieu dit Terrien, 33910  
St Martin du Bois (FR). ATHANE, Axel ; 4 Rue Pasteur,  
33560 Carbon Blanc (FR). COURBALAY, Matthieu ; 29  
hameau d'Ile de France, 72700 ALLONNES (FR).

(74) Mandataire : ICOSA ; 83 avenue Denfert-Rochereau,  
75014 Paris (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,  
HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,  
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,  
MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS,  
ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, CV, GH,  
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,  
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: METHOD FOR DEGRADING GLYCOGEN PRESENT IN A BIOMASS OF GALDIERIA

(54) Titre : PROCEDE DE DEGRADATION DU GLYCOGENE PRESENT DANS UNE BIOMASSE DE GALDIERIA

(57) Abstract: The present invention relates to a treatment method for the degradation of the glycogen present in a biomass of unicellular red algae (ARU), particularly of the genus Galdieria, and to the product thus obtained.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de traitement pour la dégradation du glycogène d'une biomasse d'algues rouges unicellulaires (ARU), particulièrement du genre Galdieria, et le produit ainsi obtenu.



WO 2024/218300 A1

## PROCEDE DE DEGRADATION DU GLYCOGENE PRESENT DANS UNE BIOMASSE DE *GALDIERIA*

### DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un procédé de traitement pour la dégradation du  
5 glycoène d'une biomasse d'algues rouges unicellulaires (ARU), particulièrement du  
genre *Galdieria*, et le produit aqueux ainsi obtenu.

### ETAT DE LA TECHNIQUE

Les algues rouges unicellulaires (ARU), ou Rhodophytes, se caractérisent par la  
présence de pigments au sein de leurs cellules. En plus de la chlorophylle et des  
10 caroténoïdes, les algues rouges unicellulaires produisent des phycobiliprotéines. Ces  
pigments naturels issus de la photosynthèse sont divisés en quatre types : les  
allophycocyanines, les C-phycocyanines, les phycoérythrine et les  
phycoérythrocyanines.

Les phycocyanines présentent des propriétés bénéfiques pour la santé humaine  
15 et animale, et sont aujourd'hui utilisées dans de nombreux domaines comme l'industrie  
pharmaceutique, la cosmétique ou encore l'agroalimentaire.

Les microalgues appartenant à la classe des Cyanidiphyceae, et plus  
précisément aux genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* et *Galdieria*, sont particulièrement  
intéressantes pour la production de phycocyanines. La production des biomasses  
20 d'algues rouges unicellulaires est bien connue de l'homme du métier notamment pour la  
production de molécules d'intérêt, notamment la production de protéines comme les  
phycocyanines. Des procédés de production et d'extraction des dites phycocyanines sont  
décrits dans la littérature (WO2017/093345, WO2019/228947, WO2018/178334,  
WO2020/161280).

25 Cependant, les microalgues de cette classe, notamment du genre *Galdieria*, sont  
aussi connues pour avoir le glycoène comme sucre majeur de réserve. Ce glycoène  
est un polymère de glucoses  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  ramifié par des liaisons  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ . Le glycoène  
de microalgues du genre *Galdieria* a la particularité de posséder une grande proportion  
de ces ramifications, à savoir environ de 7 à 18% de glucoses ramifiés distribués  
30 aléatoirement le long de la molécule. Cette structure moléculaire confère au glycoène  
une conformation globulaire le rendant soluble dans l'eau (Martinez-Garcia *et al.*, Int J  
Biol Macromol. (2016) 89:12-8). De surcroît, si les microalgues du genre *Galdieria*

possèdent les enzymes pour la synthèse de glycogène hautement ramifiés, elles possèdent également les enzymes pour le dégrader (Martinez-Garcia *et al.*, Int J Biol Macromol. (2016) 89:12-18). Ces enzymes sont des enzymes intracellulaires. Or, le milieu intracellulaire des microalgues de cette classe a un pH compris entre 6,3 et 7,1 (Miyagishima *et al.*, Plant Cell Physiol. 62(6): 926–941 (2021)). Ainsi, ces enzymes sont connues pour avoir une activité dans cette gamme de pH précise.

Pour la préparation d'extraits aqueux de microalgues, tels que d'extraits de phycocyanines de *Galdieria sulphuraria*, des étapes de filtration peuvent être nécessaires. Le glycogène étant facilement soluble dans l'eau froide, il se retrouve dans la fraction aqueuse avec les composés hydrophiles d'intérêt, comme les phycocyanines. Les filtres utilisés pour la purification des phycocyanines retiennent tout ou partie du glycogène, et augmentent alors la viscosité du rétentat. Cela engendre des contraintes techniques au niveau du procédé, comme des problèmes de montée en pression, de baisse de flux et de colmatage, en particulier avec des membranes de filtration tangentielle. Par ailleurs, si le glycogène n'est pas éliminé, l'extrait préparé comprend beaucoup de glycogène, il est alors visqueux et peu concentré en phycocyanines.

Le glycogène est connu pour être résistant à certaines enzymes. Malgré tout, un procédé impliquant l'ajout d'enzymes exogènes adaptées pour sa dégradation a déjà été mis au point (WO2020/144330).

Si elle ne peut pas être totalement éliminée et/ou inactivée, une enzyme ajoutée pour la préparation d'un produit alimentaire doit être listée dans sa composition. Une telle substance non éliminable correspond à un additif ou un auxiliaire technologique qui peut poser des difficultés de commercialisation et/ou de formulation.

D'autres méthodes de préparation d'extrait aqueux de biomasses d'algues rouges unicellulaires notamment du genre *Galdieria* ont été décrites dans la littérature (Moon *et al.*, Korean J. Chem. Engl. 2016, 31, 3, pages 490-495). Cependant, ces méthodes restent difficilement applicables à l'échelle industrielle puisqu'elles requièrent soit l'ajout de grandes quantités de sulfate d'ammonium aboutissant à des effluents riches en polluants non souhaitables pour des raisons écologiques et économiques, soit l'utilisation d'instruments très coûteux comme des chromatographies, soit un enchainement d'étapes difficile à mettre en œuvre à plus grande échelle que le laboratoire. En outre, aucune de ces méthodes ne permet d'éliminer sélectivement le glycogène présent dans la biomasse ou dans les extraits aqueux de microalgues.

Il existe donc un besoin de fournir un procédé permettant de dégrader le glycogène

présent dans une biomasse d'algues rouges unicellulaires dont le sucre de réserve principal est le glycogène, en particulier dans une biomasse de microalgues du genre *Galdieria*, tout en surmontant les problèmes de l'art antérieur, et notamment ceux énoncés précédemment.

## 5 EXPOSE DE L'INVENTION

Selon un premier aspect de l'invention, les inventeurs ont développé un procédé de traitement d'une biomasse d'algues rouges unicellulaires (ARU) du genre *Galdieria*, ledit procédé de traitement de biomasse d'ARU comprenant les étapes de :

- 10 a) récolte de la biomasse par séparation du milieu de culture pour l'obtention d'une biomasse brute d'ARU,
- b) lyse cellulaire de la biomasse brute de l'étape (a) pour obtenir un lysat,
- c) optionnellement dilution du lysat de l'étape (b) pour obtenir un solubilisât, et
- d) séparation des insolubles en suspension dans le lysat de l'étape (b) ou le solubilisât de l'étape (c) pour obtenir un clarifiât,

15 le procédé comprenant une étape de dégradation du glycogène par maintien au repos pendant au moins 3 heures de la biomasse brute et/ou du lysat et/ou du solubilisât durant laquelle le milieu liquide comprenant le glycogène est à pH acide.

De façon surprenante, la dégradation du glycogène par les enzymes endogènes du microorganisme est effective sur une large gamme de pH non limitée au pH intracellulaire dudit microorganisme avec un optimum pour des pH plus acides  
20 notamment compris entre 2 et 5. Toujours étonnamment, la dégradation enzymatique fonctionne à l'intérieur de la cellule dans une biomasse traitée telle qu'une biomasse brute, une biomasse brute décongelée ou encore une biomasse brute séchée mais également dans un lysat et un solubilisât. La présente invention concerne aussi un  
25 produit susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention.

Avantageusement, le procédé selon la présente invention permet de diminuer voir même de supprimer l'ajout d'enzymes exogènes adaptées pour la dégradation du glycogène d'ARU donc de diminuer l'ajout de substances devant être qualifiées d'additifs et/ou d'auxiliaires technologiques.

30 Également, le procédé selon l'invention s'applique avec des conditions de durée, température et pH des plus douces au plus drastiques et peut ainsi s'adapter à la stabilité des molécules d'intérêt à extraire.

## DESCRIPTION DES FIGURES

La **figure 1** représente les concentrations en glucose libre dans des lysats de biomasse de *Galdieria sulphuraria* au cours du temps à pH 3,75 et à pH 6, à 37 °C sans ajout d'enzymes exogènes (SE : Sans Enzyme) et avec 1% d'enzymes exogènes dans le lysat (E : Enzyme).

La **figure 2** représente les concentrations en glucose libre dans des lysats de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à température ambiante (« amb », i.e. 20°C) en absence d'enzymes exogènes et à différents pH en fonction du temps.

La **figure 3** représente les concentrations de glucose libre dans des lysats de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à pH 3,75 à différentes températures, en présence ou en absence d'enzymes exogènes, en fonction du temps (SE : Sans Enzyme ; E : Enzyme).

La **figure 4** représente les concentrations de glucose libre dans des lysats de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à pH 3,75 à différentes températures, en absence d'enzymes exogènes, en fonction du temps.

La **figure 5** représente les concentrations de glucose libre en fonction du temps dans un lysat et un solubilisât de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à pH 3,75 à une température de 20°C en l'absence d'enzymes exogènes, et dans un lysat de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à pH 3,75 en présence d'enzymes exogènes (SE : Sans Enzyme ; E : Enzyme).

La **figure 6** représente le pourcentage de digestion du glycogène en fonction du temps dans un clarifiât de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à pH 4 à une température de 20°C en l'absence ou en présence d'enzymes exogènes.

La **figure 7** représente le pourcentage de digestion du glycogène en fonction du temps dans un lysat, un solubilisât et un clarifiât de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à pH 4 à une température de 20°C en l'absence d'enzymes exogènes (SE : Sans Enzyme).

## DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

### Définitions

Dans le cadre de la présente invention, le terme « **biomasse** » désigne un ensemble de cellules de microalgues, préférentiellement produites par fermentation dans un réacteur biologique. Ladite biomasse peut être vue comme une masse

d'organismes unicellulaires.

La biomasse peut subir différents traitements et être une biomasse brute, une biomasse lysée, une biomasse brute décongelée et/ou une biomasse brute séchée.

Il est entendu dans le cadre de la présente demande que les propriétés de la biomasse correspondent à la moyenne des propriétés de l'ensemble des cellules  
5 constituant ladite biomasse, autrement dit, une biomasse lysée est une biomasse comprenant au moins 50% de cellules lysées par rapport au nombre total de cellules et une biomasse brute peut comprendre des cellules lysées en raison de l'étape de récolte sans être considérée comme une biomasse lysée tant que le nombre de cellules lysées  
10 sur le nombre de cellules non lysées reste minoritaire, i.e. inférieur à 50%.

L'expression « **biomasse brute** » désigne une biomasse obtenue après la récolte, i.e. après la récupération du moût de fermentation puis séparation des cellules d'au moins une partie du milieu de culture, éventuellement décongelée et/ou séchée.

L'expression « **biomasse lysée** » ou « lysat » fait référence à une biomasse de  
15 microalgues dans laquelle au moins 50% des cellules sont lysées, préférentiellement au moins 70%, plus préférentiellement dans laquelle au moins 80%, 85%, 90%, 95%, jusqu'à 100% des cellules sont lysées.

L'expression « **biomasse brute décongelée** » fait référence à une biomasse brute qui a été congelée, possiblement pour des questions de stockage et/ou de transport puis  
20 décongelée pour atteindre une température adéquate pour son traitement selon l'invention, notamment une température adaptée à l'étape de dégradation du glycogène de la biomasse selon l'invention.

Selon l'invention, l'expression « **biomasse brute séchée** » désigne une biomasse brute de microalgues qui a été séchée selon des méthodes connues de l'homme du  
25 métier et dont la teneur en eau par rapport au poids total de la biomasse est inférieure à 10%, préférentiellement inférieur à 7%, plus préférentiellement comprise entre 5% et 1% d'eau. Parmi les méthodes de séchage connues peuvent être citées le séchage naturel à l'air, le séchage par atomisation, le séchage par lit d'air fluidisé, le séchage à l'aide d'un sécheur à rouleaux et la lyophilisation.

30 Le terme « **solubilisât** » fait référence à une biomasse lysée ou lysat qui a subi une étape de dilution avec une solution aqueuse de pH neutre, acide ou basique.

Le terme « **clarifiât** » correspond à un extrait aqueux obtenu après séparation des insolubles en suspension dans un lysat ou un solubilisât.

Le terme « **repos** » fait référence à une étape pendant laquelle il n'y a pas de

modification des propriétés chimiques de la biomasse brute préférentiellement séchée ou congelée, du lysat et/ou du solubilisât, par ajout ou extraction d'un ou plusieurs composant(s). Le repos n'exclut pas le fait que la biomasse brute, le lysat, le solubilisât et/ou le clarifiât puissent être mélangé(s), i.e. brassé(s), dans des conditions non destructives qui n'affectent pas les propriétés chimiques de la biomasse brute, du lysat et/ou du solubilisât.

L'expression « **milieu liquide comprenant le glycogène** » décrit le milieu intracellulaire des cellules constituant la biomasse brute et/ou la phase liquide du lysat, du solubilisât et/ou du clarifiât le cas échéant.

L'expression « **traitement d'une biomasse** » fait référence à tout procédé appliqué à une biomasse notamment pour en modifier les propriétés physico-chimiques, en extraire des molécules d'intérêt et/ou les purifier.

A noter que les intervalles numériques donnés visent à inclure tous les nombres intermédiaires (par exemple, un intervalle de 1 à 5 comprend notamment 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 4,32 et 5).

A noter que toutes les valeurs numériques données se réfèrent à la valeur réelle donnée ainsi qu'aux approximations de cette valeur estimées à partir de la convention générale selon laquelle le dernier chiffre indiqué correspond à la précision de la mesure. En l'absence de limites d'erreur précises, l'erreur maximale pour le dernier chiffre spécifié doit être estimée selon la convention de l'arrondi.

### **Procédé de traitement selon l'invention**

Le procédé selon l'invention est un procédé de traitement d'une biomasse d'algues rouges unicellulaires (ARU) du genre *Galdieria*, ledit procédé de traitement de biomasse d'ARU comprenant les étapes de :

- a) récolte de la biomasse par séparation du milieu de culture pour l'obtention d'une biomasse brute d'ARU,
- b) lyse cellulaire de la biomasse brute de l'étape (a) pour obtenir un lysat,
- c) optionnellement, dilution du lysat de l'étape (b) pour obtenir un solubilisât, et
- d) séparation des insolubles en suspension dans le lysat de l'étape (b) ou le solubilisât de l'étape (c) pour obtenir un clarifiât,

le procédé comprenant une étape de dégradation du glycogène par maintien au repos pendant au moins 3 heures de la biomasse brute et/ou du lysat et/ou du solubilisât, durant laquelle le milieu liquide comprenant le glycogène est à pH acide.

Idéalement, tout au long du procédé, les conditions de température, durée et de

pH sont particulièrement adaptées pour ne pas dégrader les composés d'intérêt dans l'extrait aqueux, par exemple les phycocyanines, tout en favorisant la dégradation du glycogène lors de l'étape de repos.

5 Selon un mode de réalisation, l'étape de dégradation du glycogène se fait sur la biomasse brute. Ce mode de réalisation comprend alors dans l'ordre les étapes de :

a) récolte de la biomasse par séparation du milieu de culture pour l'obtention d'une biomasse brute d'ARU,

repos pendant au moins 3 heures de la biomasse brute durant lequel le milieu liquide comprenant le glycogène est à pH acide,

10 b) lyse cellulaire de la biomasse brute de l'étape (a) pour obtenir un lysat,

c) optionnellement, dilution du lysat de l'étape (b) pour obtenir un solubilisât,

d) séparation des insolubles en suspension dans le lysat de l'étape (b) ou le solubilisât de l'étape (c) pour obtenir un clarifiât, et

optionnellement, une étape d'ajustement du pH de la biomasse brute.

15 Dans ce mode de réalisation, le glycogène est dans le milieu intracellulaire des cellules constituant la biomasse, lequel milieu liquide est à un pH acide, et la biomasse brute est préférentiellement une biomasse brute séchée ou une biomasse brute décongelée. Dans les deux modes de réalisation suivants, après lyse cellulaire, le glycogène se retrouve dans la phase liquide du lysat, puis le cas échéant du solubilisât.

20 Selon un mode de réalisation préféré, l'étape de dégradation du glycogène se fait sur le lysat. Ce mode de réalisation comprend alors dans l'ordre les étapes de :

a) récolte de la biomasse par séparation du milieu de culture pour l'obtention d'une biomasse brute d'ARU,

b) lyse cellulaire de la biomasse brute de l'étape (a) pour obtenir un lysat,

25 repos pendant au moins 3 heures du lysat durant lequel le milieu liquide comprenant le glycogène est à pH acide,

c) optionnellement, dilution du lysat de l'étape (b) pour obtenir un solubilisât,

d) séparation des insolubles en suspension dans le lysat de l'étape (b) ou le solubilisât de l'étape (c) pour obtenir un clarifiât, et

30 optionnellement, une étape d'ajustement du pH de la biomasse brute ou du lysat.

Il peut être nécessaire, en tant que besoin, d'ajuster le pH du milieu liquide de la biomasse brute et/ou du lysat pour obtenir le pH acide recherché pour l'étape de repos sur le lysat.



Selon un autre mode de réalisation, l'étape de dégradation du glycogène se fait sur le solubilisât. Ce mode de réalisation comprend alors dans l'ordre les étapes de :

- a) récolte de la biomasse par séparation du milieu de culture pour l'obtention d'une biomasse brute d'ARU,
- 5 b) lyse cellulaire de la biomasse brute de l'étape (a) pour obtenir un lysat,
- c) dilution du lysat de l'étape (b) pour obtenir un solubilisât, repos pendant au moins 3 heures du solubilisât durant lequel le milieu liquide comprenant le glycogène est à pH acide,
- d) 10 séparation des insolubles en suspension dans le solubilisât de l'étape (c) pour obtenir un clarifiât, et optionnellement, une étape d'ajustement du pH de la biomasse brute, du lysat ou du solubilisât.

Il peut être nécessaire, en tant que besoin, d'ajuster le pH du milieu liquide de la biomasse brute, du lysat et/ou du solubilisât pour obtenir le pH acide recherché pour 15 l'étape de repos sur le solubilisât.

#### a) Récolte de la biomasse

La biomasse selon l'invention est une biomasse d'algues rouges unicellulaires (ARU), plus particulièrement une biomasse de microalgues productrices de phyco cyanines ayant une teneur élevée en glycogène.

20 Ces microalgues appartiennent à la classe des Cyanidiophyceae incluant les genres *Galdieria*, *Cyanidium* et *Cyanidioschyzon*. Préférentiellement, les microalgues sont du genre *Galdieria*.

Parmi les microalgues du genre *Galdieria*, on peut notamment citer les espèces *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita*, *Galdieria sulphuraria*, *Galdieria phlegrea*, *Galdieria javensis*, *Galdieria yellowstonensis*, *Galdieria sp* Préférentiellement, la 25 biomasse selon l'invention est une biomasse de *Galdieria sulphuraria*.

Les procédés de production de biomasse d'algues rouges unicellulaires (ARUs), et en particulier du genre *Galdieria*, sont bien connus de l'homme du métier. Dans le cadre de la présente invention, la culture des microalgues peut être réalisée par toute 30 technique de culture connue, dans des contenants adaptés à la croissance des microorganismes aussi appelés réacteurs biologiques, bioréacteurs ou fermenteurs.

Selon l'invention, la biomasse d'algues rouges unicellulaires est obtenue à partir de microalgues cultivées de manière industrielle dans un réacteur de grande capacité,

de préférence à obtenir des moûts de fermentation comprenant de grandes densités de microorganismes. Dans le cadre de la présente demande, on entend par « **grandes densités** » une quantité correspondant à plus de 50 g de matière sèche par litre de moût de fermentation, préférentiellement plus de 100 g par litre. Des exemples de cultures d'algues rouges unicellulaires sont décrits dans les demandes de brevet (WO2017/050917, WO2017/050918, WO2017/093345 et WO2019/228947). Il est entendu que l'homme du métier saura déterminer les paramètres et les conditions optimales pour la culture des microorganismes, telles que les conditions de température, éclairage, durée de culture ou encore nature et quantité des nutriments à apporter. Le procédé selon l'invention comprend une étape a) de récolte de la biomasse.

Après culture des microorganismes et obtention d'une biomasse, celle-ci est récoltée pour obtenir une biomasse brute. La récolte des algues rouges unicellulaires peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier, notamment par filtration, éventuellement gravimétrique ou sous pression réduite, décantation, précipitation suivie d'une filtration gravimétrique ou encore centrifugation.

Le procédé selon l'invention comprend une étape a) de récolte de la biomasse correspondant donc à la récupération du moût de fermentation suivie de la séparation des cellules de la biomasse d'au moins une partie du milieu de culture.

Cette étape permet l'obtention d'une biomasse brute. La biomasse brute ainsi récoltée peut en outre subir une étape de lavage, de préférence avec de l'eau, afin d'éliminer certaines impuretés solubles.

La biomasse brute obtenue après récolte et optionnellement après un ou plusieurs lavage(s) comprend au moins 70% d'eau, et jusqu'à 90% d'eau, préférentiellement elle comprend de 75 à 88% d'eau.

Préférentiellement, la biomasse brute selon l'invention présente une teneur en matière sèche de 5 à 30% en poids par rapport au poids total de la biomasse brute, généralement encore préférentiellement de 10 à 25% en poids, plus préférentiellement de 10 à 20% en poids.

Aussi préférentiellement, la biomasse brute selon l'invention présente une concentration en C-phycoyanine comprise entre 3 et 12 %.

### **b) Lyse cellulaire**

Le procédé de traitement d'une biomasse d'algues rouge unicellulaires selon l'invention comprend une étape b) de lyse cellulaire de la biomasse brute de l'étape a) pour obtenir un lysat.

Préférentiellement, l'étape b) de lyse cellulaire est mise en œuvre sur une biomasse brute dont la teneur en matière sèche est de 5 à 30% en poids par rapport au poids total de la biomasse brute, préférentiellement de 10 à 25% en poids, plus préférentiellement de 10 à 20% en poids

5 Aussi préférentiellement, l'étape b) de lyse cellulaire est mise en œuvre sur une biomasse brute selon l'invention avec une concentration en C-phycoyanine comprise entre 3 et 12 %.

La lyse cellulaire peut se faire par tous moyens de lyse connus de l'homme du métier notamment par des moyens enzymatiques, mécaniques et/ou chimiques.

10 Dans le cadre de l'invention, préalablement à cette étape b) de lyse, la biomasse brute peut avoir subi une étape de lavage, de congélation, de décongélation, de séchage et/ou de réhydratation. Autrement dit, dans le cadre de la présente invention, la biomasse brute peut être notamment une biomasse décongelée et/ou séchée.

Dans le cas préféré d'une lyse mécanique, parmi les moyens mécaniques pouvant  
15 être employés selon l'invention on citera notamment les broyeurs à billes, les mélangeurs-disperseurs les homogénéisateurs à haute pression, les broyeurs à poche, broyeurs à impact, les ultrasons, ou encore les champs électriques pulsés. Comme dispositifs pour la mise en œuvre de ces méthodes, on fera référence pour le broyeur à billes : Discus-100 de chez Netzsch ou ECM-AP60 de chez WAB, pour  
20 l'homogénéisateur à haute pression : Ariete de chez GEA, pour le mélangeur-disperseur : 700-X de chez Silverson, pour le broyeur à broche : Contraplex de chez Hosakawa et pour le broyeur à impact : Condux de chez Netzsch.

Préférentiellement, la lyse cellulaire est faite par lyse mécanique, préférentiellement par broyage et encore préférentiellement avec un broyeur à billes.

25 Préférentiellement, le lysat obtenu présente une teneur en matière sèche de 5 à 30% en poids par rapport au poids total du lysat, préférentiellement de 10 à 25% en poids, plus préférentiellement de 10 à 20% en poids

Aussi préférentiellement, le lysat obtenu présente une concentration en C-phycoyanine de 3% à 12% par rapport au poids total de la matière sèche.

30 Cette étape de lyse b) peut être réalisée avant ou après l'étape de dégradation du glycoène, i.e. avant ou après l'étape de repos, préférentiellement avant.

### **c) Dilution optionnelle du lysat**

Selon l'invention, la biomasse lysée ou lysat peut optionnellement subir une étape de dilution.

Dans le cadre de la présente invention, l'étape de dilution fait référence à l'ajout d'une solution à la biomasse lysée ou lysat pour en diminuer la concentration en matière sèche.

La biomasse lysée diluée est alors définie comme un « solubilisât ».

5 Avantageusement, l'étape de dilution se fait via l'ajout d'une solution aqueuse.

Dans un mode de réalisation, la solution aqueuse est de l'eau.

Préférentiellement, l'étape c) de dilution est mise en œuvre sur le lysat dont la teneur en matière sèche est de 5 à 30% en poids par rapport au poids total du lysat, préférentiellement de 12 à 25% en poids.

10 Aussi préférentiellement, l'étape c) de dilution est mise en œuvre sur le lysat dont la concentration en C-phycocyanine est de 3% à 12% par rapport au poids total de la matière sèche.

La solution aqueuse peut comprendre en plus un ou plusieurs composés ajusteurs de pH. On entend par « **composés ajusteurs de pH** », tout composé organique ou  
15 minéral permettant de modifier le pH (agents correcteurs d'acidité, acides, bases, agents neutralisants ou agents tampons). Des exemples de tels composés sont l'acide sulfurique, l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide phosphorique, le citrate de sodium, le lactate de potassium, le malate de potassium, le chlorure de sodium, le phosphate disodique et le phosphate potassique. La solution aqueuse présente un pH acide ou  
20 basique selon le ou les composés ajusteurs de pH présents dans la solution.

Préférentiellement, l'étape c) de dilution de la biomasse lysée ou lysat se fait avec une solution aqueuse de pH inférieur ou égal à 8, notamment compris entre 0 et 6, préférentiellement entre 1 et 6, plus préférentiellement entre 2 et 5. Le pH de la solution aqueuse à ajouter à la biomasse lysée ou lysat peut être d'environ 2, environ 3, environ  
25 4 ou environ 5. Des exemples de solutions acides pouvant être ajoutées à la biomasse lysée sont des solutions comprenant des acides tels que ceux décrits au paragraphe précédent.

Selon le cas, le solubilisât présente un pH proche de la neutralité avec un pH compris entre 6 et 8, un pH compris entre 1 et 6 ou encore un pH compris entre 8 et 14.

30 Préférentiellement, le solubilisât présente un pH inférieur à 7, notamment compris entre 1 et 6, plus préférentiellement compris entre 2 et 5, encore plus préférentiellement compris entre 3 et 4.

Préférentiellement, le solubilisât obtenu présente une teneur en matière sèche de 1 à 15% en poids par rapport au poids total du solubilisât, préférentiellement de 3 à 12%

en poids, plus préférentiellement de 4 à 8% en poids.

Aussi préférentiellement, le solubilisât obtenue selon l'invention présente une concentration en C-phycocyanine de 0,1 à 12 %, préférentiellement 0,5 à 8 %, plus préférentiellement 1 à 7 %.

5 Cette étape c) de dilution peut être réalisée avant ou après l'étape de dégradation du glycogène, i.e. avant ou après l'étape de repos.

Préférentiellement, l'étape c) de dilution est effectuée après l'étape de repos.

Le procédé selon l'invention comprend ainsi, selon ce mode préféré, dans l'ordre les étapes successives de :

10 a) récolte de la biomasse par séparation du milieu de culture pour l'obtention d'une biomasse brute d'ARU,

b) lyse cellulaire de la biomasse brute de l'étape (a) pour obtenir un lysat, repos à pH acide pendant au moins 3 heures du lysat,

c) dilution du lysat pour obtenir un solubilisât, et

15 d) séparation des insolubles en suspension dans le solubilisât de l'étape (c) pour obtenir un clarifiât.

#### **d) Séparation des insolubles**

Dans le cadre du procédé selon l'invention, le lysat ou le solubilisât subit une étape d) de séparation des insolubles en suspension pour obtenir un clarifiât.

20 Cette étape d) de séparation des insolubles est réalisée après l'étape de dégradation du glycogène, i.e. après l'étape de repos.

L'étape de séparation des insolubles d) du lysat ou solubilisât peut-être réalisée par toutes les méthodes connues de l'homme du métier. On citera en particulier les méthodes de filtration frontale et la centrifugation.

25 Selon l'invention, l'étape d) de séparation des insolubles est mise en œuvre sur un lysat dont la teneur en matière de 5 à 30% en poids par rapport au poids total du lysat, préférentiellement de 10 à 25% en poids, plus préférentiellement 15 à 20% en poids ; ou plus préférentiellement sur un solubilisât dont la teneur en matière sèche est de 1 à 15% en poids par rapport au poids total du solubilisât, préférentiellement de 3 à 12% en poids,  
30 plus préférentiellement de 4 à 8% en poids.

Préférentiellement, selon l'invention, l'étape d) de séparation des insolubles est mise en œuvre sur un lysat ou un solubilisât de pH inférieur à 7, préférentiellement compris entre 1 et 6, encore préférentiellement compris entre 2 et 5 toujours encore préférentiellement entre 3 et 4.

Le clarifiât selon l'invention présente préférentiellement une teneur en matière sèche de 0,1% à 5% en poids par rapport au poids total du clarifiât, préférentiellement de 0,5% à 4% en poids, plus préférentiellement de 1% à 3% en poids.

Le clarifiât selon l'invention présente préférentiellement une concentration en C-phyco cyanine de 0,1 à 20 g/L. Dans le cas particulier où le procédé selon l'invention ne comprend pas d'étape c), le clarifiât selon l'invention présente plus préférentiellement une concentration en C-phyco cyanine de 7 à 19 g/L, encore plus préférentiellement 12 à 18 g/L. Dans le cas contraire, où le procédé selon l'invention comprend une étape c), le clarifiât selon l'invention présente une concentration en C-phyco cyanine de 0,1 à 12 g/L, préférentiellement 0,5 à 8 g/L, plus préférentiellement 1 à 7 g/L.

### **Dégradation du glycogène**

Le procédé selon l'invention est caractérisé par une étape de dégradation du glycogène grâce aux enzymes endogènes du microorganisme, par un maintien au repos (étape de repos), pendant au moins 3 heures de la biomasse brute et/ou du lysat et/ou du solubilisât, , durant laquelle le milieu liquide comprenant le glycogène est à pH acide.

Afin que la dégradation du glycogène par les enzymes endogènes du microorganisme soit effective lors de l'étape de maintien au repos, les enzymes endogènes doivent être actives et ne doivent donc pas avoir été inactivées par exemple par une étape de chauffage avant ladite étape de repos.

#### Moment de l'étape de repos

Le maintien au repos pendant au moins 3 heures se fait à pH acide, sur la biomasse brute, le lysat, le solubilisât. En particulier, selon l'invention le maintien au repos peut s'effectuer avant ou après l'étape b) de lyse cellulaire, autrement dit sur la biomasse brute, le lysat et/ou solubilisât.

Selon l'invention, l'étape de repos peut se faire avantageusement sous agitation de la biomasse brute et/ou du lysat et/ou du solubilisât.

Préférentiellement, l'étape de repos se fait uniquement sur la biomasse brute qui est préférentiellement séchée ou décongelée, le lysat ou le solubilisât. Dans le cas du lysat et/ou du solubilisât, l'étape de repos est faite si nécessaire après ajustement du pH pour obtenir le pH acide recherché pour l'étape de repos.

Préférentiellement, selon l'invention le maintien au repos s'effectue après l'étape b) de lyse cellulaire, autrement dit, préférentiellement sur le lysat et/ou solubilisât et encore préférentiellement sur le lysat.

Préférentiellement, l'étape de repos s'effectue sur un milieu comprenant des cellules lysées, c'est-à-dire sur le lysat de l'étape b) et/ou, le cas échéant, sur le solubilisât de l'étape c).

Conditions de l'étape de repos

5 Selon l'invention, l'étape de repos peut se faire sur de la biomasse brute, du lysat et/ou du solubilisât plongé(e) dans l'obscurité ou exposé(e) à une lumière naturelle ou artificielle. Préférentiellement, l'étape de repos s'effectue sur de la biomasse brute, du lysat, du solubilisât plongé(e) dans l'obscurité.

10 Selon l'invention, l'étape de repos se fait sur de la biomasse brute, du lysat, du solubilisât avec ou sans aération.

Le « **pH acide** » du milieu comprenant le glycogène pendant l'étape de repos est défini comme un pH inférieur à 7, notamment compris entre 1 et 6, préférentiellement compris entre 2 et 5, encore préférentiellement compris entre 3 et 4.

15 Pour la biomasse brute, le glycogène est dans le milieu intracellulaire des cellules constituant la biomasse, lequel milieu liquide est à un pH acide.

Optionnellement, le procédé selon l'invention comprend en outre une étape d'ajustement du pH de la biomasse brute, du lysat et/ou du solubilisât au pH acide de l'étape de repos.

20 Dans ce cas, le pH de la biomasse brute, du lysat et/ou du solubilisât est ajusté à un pH inférieur à 7, notamment compris entre 1 et 6, encore préférentiellement compris entre 2 et 5, et toujours préférentiellement entre 3 et 4.

25 Les réactifs pour ajuster le pH, i.e. acidifier ou basifier la biomasse brute, le lysat, le solubilisât peuvent être ajoutés sous une forme solide ou sous la forme d'une solution. Avantagement, le pH de la biomasse brute, du lysat, du solubilisât est ajusté par l'ajout d'une solution acide ou basique, de préférence sous la forme d'une solution aqueuse.

30 Des exemples de composés ajusteurs de pH sont donnés ci-dessus dans la description de l'étape c) : l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique, l'acide phosphorique, l'acide acétique, l'hydroxyde de sodium, le carbonate de sodium ou le bicarbonate de sodium.

Il est entendu que l'homme du métier saura déterminer si un composé, ou une solution, acide ou basique, doit être ajouté à la biomasse brute, au lysat et/ou au solubilisât afin d'ajuster le pH à la valeur désirée.

Lorsqu'elle est présente, cette étape d'ajustement du pH s'effectue en amont de

l'étape de repos, sur la biomasse brute préférentiellement décongelée et/ou séchée, sur le lysat, sur le solubilisât.

Avantageusement, lorsqu'elle est présente cette étape d'ajustement du pH s'effectue sur le lysat préalablement à l'étape de repos et préalablement aux étapes c) et d) de dilution et séparation.

L'étape d'ajustement du pH peut sinon être concomitante à l'étape c) de dilution lorsqu'elle est présente. En particulier, si cette étape c) est présente, l'étape d'ajustement du pH peut s'effectuer sur le lysat concomitamment à cette étape c) de dilution préalablement à l'étape de repos. Dans ce cas, après dilution du lysat, le solubilisât obtenu présente un pH inférieur à 7, notamment compris entre 1 et 6, préférentiellement compris entre 2 et 5, encore préférentiellement compris entre 3 et 4.

L'étape de repos peut durer jusqu'à une semaine ou 7 jours. Préférentiellement, l'étape de repos dure entre 3 heures et une semaine encore préférentiellement, de 3 heures à 48 heures, encore préférentiellement de 6 à 36 heures et toujours préférentiellement de 10 à 24 heures.

Selon le mode de réalisation, la phase de repos a une durée de plusieurs heures à plusieurs jours, notamment d'environ 3 heures, 6 heures, 8 heures, 10 heures, 12 heures, 24 heures, 36 heures, entre 48 et 72 heures, entre 2 et 7 jours, entre 3 et 7 jours, 4 jours, 5 jours ou encore 6 jours.

Selon un mode de réalisation, la température de la biomasse brute et/ou du lysat et/ou du solubilisât pendant la phase de repos est maintenue à une température comprise entre 15°C et 70°C en particulier entre 15 et 50°C, préférentiellement entre 15 et 40°C, encore préférentiellement entre 15 et 30°C.

Avantageusement, la température de la biomasse brute et/ou du lysat et/ou du solubilisât pendant cette phase de repos est maintenue à une température constante, en particulier à une température comprise entre 15°C et 70°C, en particulier comprise entre 15°C et 50°C, préférentiellement entre 15 et 40°C, encore préférentiellement entre 15 et 30°C.

Selon un autre mode de réalisation, la température de la biomasse brute et/ou du lysat et/ou du solubilisât pendant la phase de repos est maintenue à une température inférieure à 15°C, préférentiellement comprise entre 4°C et 15°C.

Avantageusement, selon cet autre mode de réalisation, la température de la biomasse brute et/ou du lysat et/ou du solubilisât pendant cette phase de repos est maintenue à une température constante, en particulier à une température comprise entre



4°C et 15°C. A noter que pour l'étape de repos, plus l'on se rapproche du couple température et pH optimum, plus le temps nécessaire pour la dégradation du glycogène sera court, à titre d'exemple, pour une étape de repos à un pH compris entre 3 et 4 et une température entre 15 et 30°C, la durée pourra être comprise entre 2 et 10h alors que  
5 pour une étape de repos à un pH d'environ 6 et une température d'environ 10°C, la durée devra être comprise entre au moins 6 jours et 7 jours.

Dans le cadre de la présente invention, l'étape de maintien au repos s'effectue avec un milieu liquide comprenant le glycogène dépourvu de contamination microbiologique significative. Une telle contamination peut être évitée par l'ajout de  
10 conservateurs dans le milieu liquide comprenant le glycogène. Ces conservateurs sont bien connus de l'homme du métier et sont notamment sélectionnés parmi le benzoate de sodium, le benzoate de potassium, le benzoate de calcium, l'acide benzoïque, le diacétate de sodium, le propionate de calcium, le propionate de sodium, le nitrate de sodium, le sorbate de potassium, le sorbate de sodium, le gallate de méthyle, le gallate  
15 de propyle, l'éthylènediamine-tétraacétate de sodium, le parabène de méthyle, la natamycine, le parabène de propyle et les mélanges de ceux-ci.

#### Ajout optionnel d'enzymes exogènes

Le procédé peut aussi comprendre une étape d'ajout d'enzymes exogènes en  
20 complément de l'étape de repos. Cet ajout d'enzymes exogènes permet, en tant que besoin, de compléter la dégradation du glycogène, notamment si le niveau de dégradation recherché n'est pas atteint. Il reste entendu que ce « complément » signifie que l'essentiel, i.e. au moins 50%, de la dégradation du glycogène est le résultat de la mise en œuvre de l'étape de repos indépendamment de cet éventuel ajout.

25 On entend par « **enzymes** » des protéines permettant l'activation ou l'accélération de réactions chimiques ou biologiques. Dans le cadre de la présente invention le terme « **enzymes exogènes** » fait référence à des enzymes qui ne sont pas produites naturellement par les cellules ou microorganismes de la biomasse d'algues rouges unicellulaires (ARU) traitée. En particulier, lesdites enzymes exogènes sont  
30 sélectionnées notamment parmi les enzymes extraites d'*Aspergillus*, *Bacillus* ou encore *Trichoderma*.

Les enzymes exogènes selon l'invention ont une activité de dégradation du glycogène. Ces enzymes sont bien connues de l'homme du métier et sont notamment choisies parmi les enzymes ayant une activité glucuronidase  $\alpha$ 1-4, une activité

glucosidase  $\alpha$ 1-4, une activité glucosidase  $\alpha$ 1-6, une activité amylase. A noter qu'il est possible d'utiliser l'une de ces enzymes ou un mélange de ces enzymes. Il a été constaté que ces enzymes diminuent la taille des chaînes glucosidiques du glycogène présent dans le milieu qui peut alors être éliminés ultérieurement de même que ses sous-produits de dégradations.

5 Parmi les enzymes ayant une activité glucuronidase  $\alpha$ 1-4 et/ou glucosidase  $\alpha$ 1-4, on citera les pectinases connues pour dégrader la pectine, et en particulier les pectinases extraites de champignons filamenteux comme *Aspergillus*, et plus particulièrement les pectinases extraites d'*Aspergillus aculeatus*, comme les enzymes commercialisées sous la dénomination Pectinex® par la société Novozymes.

10 Des exemples d'enzymes ayant une activité glucosidase  $\alpha$ 1-6 sont les pullulanases connues pour hydrolyser les liaisons glucosidiques  $\alpha$ 1-6 de la pullulane, notamment connues aussi pour supprimer les ramifications de l'amidon. Il s'agit généralement d'enzymes extraites de bactéries, notamment des genres *Bacillus*. Les brevets US 6,074,854 et US 5,817,498 ainsi que la demande WO2009/075682 décrivent de telles pullulanases extraites de *Bacillus deramificans* ou de *Bacillus acidopullulyticus*. On connaît aussi des pullulanases disponibles dans le commerce, notamment sous les dénominations Promozyme D2 et Novozym 26062 de chez Novozymes, ou Optimax L1000 de chez DuPont-Genencor.

20 Parmi les enzymes ayant une activité amylase connues pour dégrader l'amidon, de nombreuses sont connues de l'état de la technique et sont décrites dans la littérature et notamment des demandes de brevet comme WO 2019/036721. On connaît des amylases disponibles dans le commerce, notamment sous les dénominations « Amylase AG XXL » (de Novozymes) ou « Panzym® AG XXL » (d'Eaton).

25 Les enzymes peuvent être utilisées sous leur forme pure ou enrichie, et éventuellement en tant que mélange avec un ou plusieurs excipients. Les enzymes employées dans le procédé de l'invention sont sous la forme de poudre ou de solution. Dans ce dernier cas, les enzymes sont préférentiellement en solution dans l'eau.

30 Les conditions préférées de mise en œuvre des enzymes exogènes sont un pH inférieur à 7 et une température de réaction inférieure à 60 °C, de préférence inférieure à 50 °C, et même inférieure à 30 °C. En particulier, la température de la solution à laquelle les enzymes exogènes sont ajoutées et à laquelle la réaction enzymatique se produit est comprise entre 4 et 60 °C, préférentiellement entre 20 et 42°C et le pH de la solution est inférieur ou égal à 5, de préférence d'environ 4.5. Les enzymes exogènes

peuvent être ajoutées dans le milieu soit sous forme libre soit immobilisées sur un support.

Les enzymes exogènes peuvent être ajoutées au lysat dans ce cas la réaction enzymatique par les enzymes exogènes se tient sur le lysat et l'étape de repos se tient  
5 quant à elle préalablement sur la biomasse brute et/ou préalablement sur le lysat et/ou concomitamment sur le lysat.

Selon un mode de réalisation préférentiel, les enzymes exogènes sont ajoutées après l'étape de repos. Dans ce cas :

Lorsque l'étape de repos est mise en œuvre sur la biomasse brute, on peut ajouter  
10 des enzymes exogènes dans le lysat et/ou dans le solubilisât et/ou dans le clarifiât pour compléter la dégradation du glycogène résultant du repos de la biomasse brute.

- lorsque l'étape de repos est mise en œuvre sur le lysat, on peut ajouter des enzymes exogènes dans le lysat après l'étape de repos, ou dans le solubilisât et/ou dans le clarifiât pour compléter la dégradation du glycogène résultant du  
15 repos du lysat ;
- lorsque l'étape de de repos est mise en œuvre sur le solubilisât, on peut ajouter des enzymes exogènes dans le solubilisât après l'étape de repos et/ou dans le clarifiât, pour compléter la dégradation du glycogène résultant du repos du solubilisât ;

20 Selon un mode de réalisation encore plus préférentiel, l'étape de repos est mise en œuvre sur le lysat et de préférence, l'ajout éventuel d'enzymes exogènes se fait sur le clarifiât ou le solubilisât.

Cette combinaison de repos et d'ajout d'enzymes exogènes permet de diminuer les quantités d'enzymes exogènes employées par rapport aux méthodes de l'art  
25 antérieur.

Les enzymes exogènes sont ainsi ajoutées dans une teneur inférieure à 0,01% en poids par rapport au poids total de la biomasse brute ou du lysat ou du solubilisât ou du clarifiât à traiter, pour une enzyme avec une activité enzymatique équivalente à celle de l'enzyme Pectinex Ultra SP-L d'activité déclarée par le fabricant de 3300 PGNU/g.

30 Selon un mode de réalisation, la teneur en enzymes exogènes ajoutée est inférieure ou égale à 0,005%, en poids, préférentiellement inférieure ou égale à 0,0025%, plus préférentiellement inférieure ou égale à 0,0001% en poids. A noter que, au besoin, la concentration en enzymes exogènes est ajustée en fonction de l'activité de l'enzyme exogène sélectionnée pour avoir une activité dans le milieu de réaction

équivalente à celle d'une concentration selon l'invention de Pectinex Ultra SP-L à 3300 PGNU/g.

L'homme du métier saura aussi adapter les quantités d'enzymes à ajouter au cours du procédé afin d'augmenter la dégradation du glycogène présent dans le lysat,  
5 solubilisé et/ou clarifié.

L'étape de dégradation du glycogène avec ou sans ajout d'enzymes exogènes est considérée comme suffisante, notamment pour améliorer la ou les étape(s) de filtration ultérieure(s), lorsque au moins 10% préférentiellement au moins 50% de la teneur initiale  
10 en glycogène dans la biomasse brute a été dégradée, encore préférentiellement de 50% à 80% de la teneur initiale.

#### **e) Concentration**

Le procédé selon l'invention, peut comprendre en outre une étape e) de concentration du clarifié selon des méthodes usuelles d'élimination de l'eau pour obtenir  
15 un extrait aqueux concentré.

Les méthodes usuelles d'élimination de l'eau sont connues de l'homme du métier et incluent notamment la filtration ainsi que l'évaporation à pression atmosphérique ou sous vide, l'atomisation, le séchage par infrarouge, le séchage par fenêtre de réfraction, la lyophilisation.

20 Préférentiellement, l'étape e) du procédé selon l'invention permet la concentration des molécules d'intérêts tout en préservant les constituants essentiels du clarifié.

Selon le mode de concentration choisi, l'étape e) de concentration permet d'éliminer tout ou partie des impuretés comme les résidus solides, le glycogène résiduel, les oligomères et sucres résultant de la dégradation du glycogène, présentes dans le  
25 clarifié, en particulier la concentration par filtration.

Encore préférentiellement, le procédé de traitement de biomasse selon l'invention comprend une étape e) de concentration du clarifié par filtration, en particulier par filtration tangentielle comme l'ultrafiltration.

Préférentiellement, le procédé de traitement de biomasse selon l'invention  
30 comprend une étape e) de concentration pendant laquelle le clarifié est concentré entre 2 et 1000 fois, encore préférentiellement entre 20 et 60 fois.

Préférentiellement, l'étape e) de concentration est mise à un pH inférieur à 7, préférentiellement compris entre 1 et 6, encore préférentiellement compris entre 2 et 5 toujours encore préférentiellement entre 3 et 4.

Outre le complément de dégradation par ajout d'enzyme et/ou la concentration du clarifiât, le procédé selon l'invention peut comprendre des étapes consécutives de purification du clarifiât et/ou de l'extrait aqueux concentré, notamment pour purifier les protéines en solution.

## 5 **Produit selon l'invention**

Le produit selon l'invention comprend différentes matières organiques selon le procédé de traitement appliqué, dont des protéines hydrosolubles parmi lesquelles se trouvent les phycocyanines, des sucres parmi lesquels se trouvent des sous-produits de dégradation du glycogène (oligomères de glucose) et éventuellement du glycogène résiduel non digéré et des insolubles.

Lorsqu'elles sont présentes, les phycocyanines peuvent comprendre des phycocyanines résistantes aux pH acides. Par phycocyanines résistantes aux pH acides, on entend des phycocyanines stables aux pH acides, i.e. qui ne précipitent pas et qui ne perdent pas leur coloration à pH acide. La résistance ou stabilité aux pH acides peut être mesurée comme une perte de coloration inférieure à 10%, après un minimum de 10 minutes d'exposition à un pH acide, i.e. un pH inférieur à 7, en particulier un pH compris entre 2 et 5. La stabilité aux pH acides peut aussi être mesurée par d'autres méthodes tel que le suivi de la structure de la protéine.

La présence des phycocyanines résistantes aux pH acides vient de la mise en œuvre des étapes d) et le cas échéant e) à un pH inférieur à 7, conformément au procédé d'extraction décrit dans WO2018/178334, préférentiellement à un pH compris entre 1 et 6, encore préférentiellement entre 2 et 5 et encore plus préférentiellement entre 3 et 4.

Selon un mode préféré, le produit selon l'invention comprend des phycocyanines résistantes à un pH acide.

Un extrait aqueux concentré est obtenu par le procédé selon l'invention comprenant une étape e) de concentration du clarifiât telle que décrite ci-dessus. A l'inverse, un clarifiât est obtenu par le procédé selon l'invention ne comprenant pas une étape e) de concentration du clarifiât telle que décrite ci-dessus.

Préférentiellement, le produit selon l'invention ne comprend pas d'enzymes exogènes ou comprend une concentration en enzymes exogènes indétectable par des méthodes de dosage usuelles notamment après précipitation des protéines avec de l'acétonitrile, digestion à la trypsine puis analyse par spectrométrie de masse (LC-MS-MS).

En particulier, préférentiellement, le produit selon l'invention ne comprend pas

d'enzymes exogènes choisies parmi les pectinases, les amylases et les pullulanases ou en comprend une concentration indétectable par des méthodes de dosage usuelles notamment par spectrométrie de masse.

Si besoin, le produit selon l'invention est préparé de façon à éliminer toutes  
5 impuretés qui le rendraient impropre à une consommation, en particulier une consommation humaine.

Le produit selon l'invention peut également être formulé par des moyens connus de l'homme du métier pour éviter la dégradation de ses constituants lors de son stockage ou son utilisation ultérieure.

10 Enfin, le produit selon l'invention, éventuellement formulé, peut être conditionné pour sa conservation et son usage, soit dans des containers de grand volume, soit dans des récipients plus petits, par exemple avec des volumes correspondant à un usage unique, dit unidose, pour une consommation humaine. Dans ce cas, le contenant peut être rigide, comme une ampoule de verre, ou souple, comme une gélule propre à la  
15 consommation.

Les teneurs en sucres, en particulier glucose, mannose et galactose (respectivement dits « **glucose hydrolysé** », « **galactose hydrolysé** » et « **mannose hydrolysé** ») d'un produit selon l'invention sont mesurées, après hydrolyse acide de l'échantillon, par chromatographie liquide à haute performance via une colonne Hi-Plex  
20 H+ type « ion exclusion / ligand exchange column » et une détection par réfractométrie (ci-après « dosage des sucres hydrolysés par HPLC-RID »). Pour cela, 1,5 mL du surnageant d'un échantillon homogénéisé au vortex sont hydrolysés avec 1,5mL d'acide sulfurique 2N, à 110°C pendant 2 heures. L'échantillon est ensuite filtré (0.22 µm) et analysé.

25 A noter que la teneur en glucose hydrolysé ainsi mesurée comprend à la fois le glucose du glycogène résiduel non digéré et le glucose libre présents dans le produit.

Selon l'invention, la teneur en glucose libre est déterminée par analyse biochimique, notamment à l'aide d'un analyseur biochimique YSI® en suivant les préconisations du fabricant.

30 Ainsi, pour estimer la teneur en glycogène résiduel non digéré dans un produit selon l'invention, il suffit de soustraire la teneur en glucose libre à la teneur en glucose hydrolysé.

Le pourcentage de dégradation du glycogène est quant à lui calculé comme suit : (concentration de glucose libre de l'échantillon selon l'invention étudié / concentration

maximale de glucose libre dans un échantillon équivalent traité avec 1% d'enzymes exogènes du volume de solution enzymatique par rapport au volume total de l'échantillon) x 100.

Selon l'invention, la teneur en protéines d'un produit selon l'invention est  
5 déterminée par la méthode DUMAS. L'échantillon est soumis à une combustion à haute température dans un flux d'oxygène pur, les oxydes d'azote produits sont réduits par le cuivre. Après séparation des sous-produits de la réaction, l'azote est dosé avec un détecteur à conductivité thermique, le résultat est exprimé en quantité N (%). Ce pourcentage d'azote est ensuite ramené à une quantité de protéines en appliquant la  
10 formule :  $N \times 6,25$  (%) (ISO/TS 16634-2 :2009).

Enfin, pour déterminer la teneur en C-phyco cyanine d'un échantillon selon l'invention, 500µl d'échantillon sont mélangés avec un tampon Tris-Cl 100 mM pH 7,5 (1,5 ml) et les absorbances à 652 et 620 nm mesurées via un spectrophotomètre Metler Toledo. La concentration C-phyco cyanine est alors calculée en appliquant la formule  
15 suivante :

$$[\text{Phycocyanine}] \text{ en mg/mL} = (0,162 \times A_{620\text{nm}} - 0,098 \times A_{652\text{nm}}) \times \text{Dilution}$$

Selon l'invention, une dégradation du glycogène inférieure à 10% en poids par rapport au glycogène total n'est pas considérée comme une dégradation suffisante. De plus, une dégradation inférieure à 10% ne permet pas d'améliorer la filtration de l'extrait.  
20 Il est alors considéré que la dégradation du glycogène ne fonctionne pas.

Selon un mode de réalisation, le clarifiât obtenu selon l'invention a un rapport glycogène résiduel non digéré estimé (g/L) / C-phyco cyanine (g/L) inférieur à 6, avantageusement inférieur à 4, de préférence inférieur à 3, plus préférentiellement inférieur à 2,5, ou encore plus préférentiellement inférieur à 1.

25 Le clarifiât selon l'invention présente une concentration en sucre totaux mesurée par dosage des sucres hydrolysés par HPLC-RID inférieure ou égale à 40 g/L, notamment comprise entre 0,1 et 40 g/L, préférentiellement comprise entre 1 et 20 g/L, plus préférentiellement comprise entre 3 et 11 g/L,

et/ou une concentration en glucose hydrolysé inférieure ou égale à 20 g/L,  
30 préférentiellement comprise entre 0,1 et 20 g/L, préférentiellement comprise entre 1 et 10 g/L, encore préférentiellement comprise entre 2 et 5 g/L

et/ou une concentration en galactose hydrolysé inférieure ou égale à 10 g/L, notamment comprise entre 0,01 et 10 g/L, préférentiellement comprise entre 0,1 et 5 g/L, plus préférentiellement comprise entre 0,5 et 3 g/L,

et/ou une concentration en mannose hydrolysé inférieure ou égale à 10 g/L, notamment comprise entre 0,01 et 10 g/L, préférentiellement comprise entre 0,1 et 5 g/L, plus préférentiellement comprise entre 0,5 et 3 g/L,

et/ou une concentration en glucose libre inférieure ou égale à 10 g/L notamment  
5 comprise entre 0,01 et 10 g/L, préférentiellement comprise entre 0,1 et 5 g/L, encore préférentiellement comprise entre 0,2 et 2 g/L.

Les teneurs en C-phycocyanine de le clarifiât vont avantageusement de 0,1 à 12 g/L, préférentiellement 0,5 à 8 g/L, plus préférentiellement 1 à 7 g/L.

De préférence, le clarifiât présente un rapport (C-phycocyanines (g/L) /sucres  
10 totaux mesurés par dosage des sucres hydrolysés par HPLC-RID (g/L)) d'au moins 0,001, préférentiellement de 0,005 à 120, plus préférentiellement 0,05 à 12, encore plus préférentiellement 0,1 à 3.

Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, le clarifiât comprend de  
15 la C-phycocyanine et des sucres totaux dans un rapport (C-phycocyanine (g/L) / sucres totaux mesurés par dosage des sucres hydrolysés par HPLC-RID (g/L)) de 0,005 à 120, en particulier de 0,05 à 12, plus préférentiellement de 0,1 à 3.

Dans un mode de réalisation particulier où l'extrait aqueux concentré a une grande concentration en C-phycocyanine, le rapport (C- phycocyanine (g/L) / sucres totaux (g/L)) est d'au moins 90, et peut dépasser 120.

20 De préférence, le clarifiât présente un rapport (C-phycocyanines (g/L) / mannose hydrolysé (g/L)) d'au moins 0,01, préférentiellement de 0,01 à 1200, plus préférentiellement 0,1 à 80, encore plus préférentiellement 0,1 à 12.

De préférence, le clarifiât présente un rapport (C-phycocyanines (g/L) /galactose hydrolysé (g/L)) d'au moins 0,01, préférentiellement de 0,01 à 1200, plus  
25 préférentiellement 0,1 à 80, encore plus préférentiellement 0,1 à 12.

Le rapport (C-phycocyanine (g/L) / glucose hydrolysé (g/L)) de le clarifiât est préférentiellement inférieur à 120 et préférentiellement va de 0,005 à 120. Préférentiellement, ce ratio est compris entre 0,05 et 12, plus préférentiellement 0,1 et 10.

30 Préférentiellement, l'extrait aqueux concentré selon l'invention présente une teneur en matière sèche de 2 à 1000 fois plus élevée que celle du clarifiât, dont il est issu, encore préférentiellement de 20 à 60 fois plus élevée.

Les teneurs en C-phycocyanine de l'extrait aqueux concentré vont avantageusement de 7 à 120 g/L, préférentiellement 20 à 100 g/L, plus



préférentiellement 40 à 80 g/L.

L'extrait aqueux concentré selon l'invention présente une concentration en sucre totaux mesurée par dosage des sucres hydrolysés par HPLC-RID inférieure ou égale à 50 g/L, notamment comprise entre 1 et 50 g/L, préférentiellement comprise entre 5 et 40  
5 g/L, plus préférentiellement comprise entre 10 et 30 g/L,

et/ou une concentration en glucose hydrolysé inférieure ou égale à 20 g/L, préférentiellement comprise entre 0,1 et 20 g/L, préférentiellement comprise entre 1 et 10 g/L, encore préférentiellement comprise entre 2 et 5 g/L

et/ou une concentration en galactose hydrolysé inférieure ou égale à 15 g/L,  
10 notamment comprise entre 0,5 et 15 g/L, préférentiellement comprise entre 1 et 13 g/L, plus préférentiellement comprise entre 3 et 8 g/L,

et/ou une concentration en mannose hydrolysé inférieure ou égale à 15 g/L, notamment comprise entre 0,5 et 15 g/L, préférentiellement comprise entre 1 et 13 g/L, plus préférentiellement comprise entre 3 et 8 g/L,

15 et/ou une concentration en glucose libre inférieure ou égale à 15 g/L notamment comprise entre 0,01 et 15 g/L, préférentiellement comprise entre 0,5 et 8 g/L, encore préférentiellement comprise entre 1 et 4 g/L.

Le ratio en poids (C-phycocyanine (g/L) / glucose hydrolysé (g/L)) de l'extrait aqueux concentré va de 2 à 80. Préférentiellement, ce ratio est compris entre 10 et 70,  
20 plus préférentiellement 15 et 60.

De préférence, l'extrait aqueux concentré présente un rapport (C-phycocyanine (g/L) / mannose hydrolysé (g/L)) d'au moins 0,01, préférentiellement de 0,01 à 1200, plus préférentiellement 0,1 à 80, encore plus préférentiellement 0,3 à 12.

De préférence, l'extrait aqueux concentré présente un rapport (C-phycocyanine  
25 (g/L) /galactose hydrolysé (g/L)) d'au moins 0,01, préférentiellement de 0,01 à 1200, plus préférentiellement 0,1 à 80, encore plus préférentiellement 0,3 à 12.

De préférence, l'extrait aqueux concentré présente un rapport (protéines (%) / glycogène résiduel non digéré estimé (g/L)) de 0,2 à 6,0, plus préférentiellement 0,5 à 5,0, encore plus préférentiellement 1,0 à 4,5.

30 De préférence, l'extrait aqueux concentré présente une teneur estimée en glycogène résiduel non digéré (teneur en glucose hydrolysé (g/L) – teneur en glucose libre (g/L)) de 0,1 à 10 g/L, plus préférentiellement de 0,2 à 7 g/L, encore plus préférentiellement 0,3 à 5 g/L.

De préférence, l'extrait aqueux concentré présente un rapport (protéines (%))

/sucres totaux mesurés par dosage des sucres hydrolysés par HPLC-RID (g/L)) inférieur à 1%, préférentiellement compris entre 1 et 0,01%, plus préférentiellement entre 0,8 et 0,05%, encore plus préférentiellement entre 0,6 et 0,1%.

5 La présente invention concerne enfin un procédé de préparation d'un extrait aqueux concentré d'une biomasse d'ARU de microalgues productrices de phycocyanines ayant une teneur élevée en glycogène, ledit procédé comprenant un procédé de traitement avec une étape de dégradation du glycogène, et une étape de concentration comme défini précédemment.

### Utilisation

10 L'invention concerne également l'utilisation de tout ou partie d'un produit obtenu à partir d'un procédé selon l'invention en tant que produit pour la préparation de compositions pharmaceutiques ou alimentaires, y compris des aliments ou des compositions pharmaceutiques, nutraceutiques, alimentaires, cosmétiques ou industrielles. Il s'agit notamment de l'utilisation d'un produit obtenu selon un procédé de  
15 l'invention comprenant des phycocyanines pour la préparation de compositions pharmaceutiques ou alimentaires.

Selon un mode de réalisation, une composition selon l'invention comprend tout ou partie d'un produit obtenu avec le procédé selon l'invention et un ou plusieurs excipients.

20 Selon un mode de réalisation préféré, la composition selon l'invention est une composition acide dont le pH est inférieur ou égal à 6, préférentiellement inférieur ou égal à 5, voire inférieur ou égal à 4 et en particulier compris entre 2 et 4.

Selon l'invention, on entend par composition acide toute composition comprenant tout ou partie d'un produit obtenu avec un procédé selon l'invention ainsi qu'un acide minéral ou organique.

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

30 Les compositions acides selon l'invention peuvent en outre comprendre un véhicule pouvant comprendre des constituants structurels associés 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.

Concernant les compositions autres que les compositions alimentaires, elles

peuvent être pharmaceutiques, vétérinaires ou cosmétiques et comprendre en outre un ou plusieurs additifs et/ou actifs connus et utilisés dans ce type d'indication.

Les compositions selon l'invention peuvent se présenter sous toute forme usuelle connues de l'homme du métier. On citera notamment les formes solides, liquides, fluides, 5 pâteuses ou visqueuses et plus particulièrement les crèmes, les gels, les mousses, les pâtes. Les compositions selon l'invention peuvent aussi se présenter sous la forme d'aliments secs à cuire, de poudres à diluer, des compositions gélatineuses pour les compositions alimentaires.

Dans ces compositions solides, tout ou partie de l'extrait obtenu selon l'invention 10 est préférentiellement ajouté sous la forme de poudre. Auquel cas, le produit obtenu à partir d'un procédé selon l'invention est préalablement séchée pour prendre la forme d'une poudre.

Les compositions liquides sont avantageusement des compositions aqueuses dans lesquelles tout ou partie de l'extrait obtenu selon l'invention est dissout.

15 Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la composition liquide peut être une composition alimentaire et plus spécifiquement 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 comprendre, notamment, des sucres, des 20 sels minéraux, des additifs alimentaires ou du gaz dissout. Une boisson acide selon l'invention peut être une boisson acide de l'art antérieur dans laquelle le colorant habituellement employé a été remplacé en totalité ou en partie par un produit comprenant des phycocyanines résistantes à pH acide selon l'invention.

La teneur en phycocyanines dans les compositions selon l'invention sera conforme 25 aux concentrations usuellement appliquées dans le domaine d'application visé.

## EXEMPLES

### **Exemple 1 : Étude de la dégradation du glycogène avec et sans ajout d'enzymes exogènes à différents pH**

30 La quantité de glucose libre dans le temps dans des lysats de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à pH 3.75, sans ajout d'enzyme, à pH 6 sans ajout d'enzyme et à pH 6 avec ajout d'enzymes (1% du volume de solution enzymatique par rapport au volume total de lysat, « Amylase AG XXL » de Novozymes), à 37 °C, a été mesurée en

fonction du temps (YSI® 2950).

Cette cinétique est présentée en Figure 1.

L'acidification du lysat est réalisée par l'ajout d'une quantité suffisante d'acide citrique, pour passer d'un pH 6 à 3.75.

5 Les résultats montrent qu'à pH acide, 3.75, une quantité de glucose plus importante qu'à pH 6 est libérée. Après 24 heures d'incubation à pH 3.75 sans ajout d'enzyme, le glucose libre dans l'échantillon atteint même un niveau identique que dans l'échantillon dans lequel une quantité d'enzymes exogènes a été ajoutée.

10 Il est à noter que la libération de glucose se fait également à pH 6 en l'absence d'ajout d'enzymes exogènes ; la cinétique est seulement plus lente (pente plus faible).

### **Exemple 2 : Étude de la dégradation du glycogène sans ajout d'enzymes exogènes à différents pH**

15 La quantité de glucose libre dans le temps dans des lysats de biomasse de *Galdieria sulphuraria* (20% en poids de matière sèche (MS) par rapport au poids total du lysat) à des pH compris entre 3 et 7 sans ajout d'enzyme et à température ambiante (20°C) a été mesurée au cours du temps (YSI® 2950).

Cette cinétique est présentée en **Figure 2**.

L'acidification et la basification du lysat sont réalisées respectivement par l'ajout d'une quantité suffisante d'acide citrique ou de soude.

20 Les résultats montrent que dans un temps donné, plus le pH augmente, moins le glycogène est dégradé. La réalisation de digestion du glycogène sans ajout d'enzymes exogènes sur du lysat montre une activité principalement dans les conditions les plus acides. Il est observé ici que cette activité est importante à pH 3 mais légèrement plus faible à pH 4. L'activité pour les pH de 5 à 7 est identique mais plus lente que pour des  
25 pH inférieurs.

### **Exemple 3 : Étude de la dégradation du glycogène à différentes températures avec et sans ajout d'enzymes exogènes**

30 La quantité de glucose libre dans le temps dans des lysats de biomasse de *Galdieria sulphuraria* (20% en poids de matière sèche (MS) par rapport au poids total du lysat) à pH 3.75 est étudiée pour différentes températures (4 °C, 20 °C et 37 °C) sans et avec une enzyme (1% « Amylase AG XXL » de Novozymes) à pH 3.75 et à une température de 37°C (YSI® 2950).

Les résultats sont présentés en **Figure 3**. Ils montrent une digestion du glycogène

en glucose libre y compris en l'absence d'ajout d'enzyme. Notamment, après 24 heures à 37 °C, la quantité de glucose libre est la même avec et sans ajout d'enzyme.

**Exemple 4 : Étude de la dégradation du glycogène à différentes températures sans ajout d'enzymes exogènes**

5 La quantité de glucose libre dans le temps dans des lysats de biomasse de *Galdieria sulphuraria* (20% en poids de matière sèche (MS) par rapport au poids total du lysat) à pH 4 est étudiée pour différentes températures (4 °C, 15 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C et 50 °C) sans ajout d'enzymes exogènes (YSI® 2950).

10 Les résultats sont présentés en **Figure 4**. Ils montrent que, dans un temps donné, plus la température augmente, plus une quantité importante de glycogène est digérée lors d'une étape de repos selon l'invention.

**Exemple 5 : Étude de la dégradation du glycogène à différents stades d'un procédé d'extraction**

15 La quantité de glucose libre, à température ambiante (20°C), dans du lysat (20% en poids de matière sèche (MS) par rapport au poids total du lysat) et du solubilisât de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à (7,5 % de MS par rapport au poids total du solubilisât) à pH 3.75, sans ajout d'enzymes exogènes est étudiée (YSI® 2950). Dans ce contexte, la cinétique de libération de glucose à température ambiante (20°C), dans du lysat de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à pH 3.75 avec ajout d'enzymes exogènes  
20 (1% du volume de solution enzymatique par rapport au volume total de lysat « Amylase AG XXL », Novozymes) est prise comme témoin.

Ces cinétiques sont présentées en **Figure 5**.

25 D'après les résultats obtenus et par extrapolation, il est possible de conclure que, y compris sans ajout d'enzyme, dans le cas du lysat, après 24 heures, tout le glycogène digestible sera dégradé et libéré sous forme de glucose libre. En revanche, pour le solubilisât, la réaction semble plus lente et n'est toujours pas complète au bout de 24 heures.

30 A noter que les échantillons étudiés présentent tous une dégradation du glycogène de plus de 10% et ainsi une bonne filtrabilité après digestion du glycogène qu'ils aient été préparés avec ou sans ajout d'enzymes exogènes.

**Exemple 6 : Etude de la dégradation du glycogène dans l'art antérieur**

Dans le brevet WO2020/144330, l'exemple 2 présente la dégradation du

glycogène dans une solution brute de phycocyanines en présence et en absence d'enzymes exogènes.

Pour cela, une biomasse de *Galdieria sulphuraria* est produite puis récupérée/récoltée. Les cellules sont ensuite lysées puis diluées afin d'obtenir un extrait aqueux, un solubilisât. Un clarifiât est ensuite obtenu à partir de cet extrait aqueux en  
5 séparant les solides par filtration sur filtre 0.22µm.

La quantité de glucose libre, à température ambiante (20°C), dans du clarifiât de biomasse de *Galdieria sulphuraria* (7,5% en poids de MS par rapport au poids total du clarifiât) à pH 4, sans et avec une étape d'ajout d'enzymes exogènes (0.1% du volume  
10 de solution enzymatique par rapport au volume total de clarifiât « Amylase AG XXL » de Novozymes, « Pectinex Ultra SP-L » de Novozymes ou « BAN 480 L » de Novozymes) est étudiée (YSI 2700 Biochemistry Analyzer).

Les résultats sont présentés en **Figure 6**.

D'après les résultats obtenus, il est possible de conclure que sans ajout d'enzymes  
15 exogènes, avec un maintien au repos du clarifiât de 95 heures, le glycogène n'est toujours pas assez digéré (moins de 10% de dégradation). En revanche, avec l'ajout d'une enzyme, après 95h, la totalité du glycogène est digérée.

#### **Exemple 7 : Étude de la dégradation du glycogène à tous les stades d'un procédé d'extraction**

20 La quantité de glucose libre, à température ambiante (20°C), dans du lysat (20% en poids de MS par rapport au poids total du lysat), du solubilisât et du clarifiât de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à (7,5 % en poids de MS par rapport au poids total du solubilisât ou du clarifiât) à pH 4 sans ajout d'enzymes exogènes est étudiée (YSI® 2950). Le clarifiât est obtenu après filtration du solubilisât sur filtre 0.22µm.

25 Dans ce contexte, les cinétiques de libération de glucose à température ambiante (20°C), dans du lysat, du solubilisât et clarifiât de biomasse de *Galdieria sulphuraria* à pH 4 avec ajout d'enzymes exogènes (1% du volume de solution enzymatique par rapport au volume total de lysat « Amylase AG XXL », Novozymes) sont utilisées pour connaître la concentration maximale de glucose libre de l'échantillon.

30 Ces données ont permis de calculer les pourcentages de dégradation (digestion) du glycogène qui sont présentés en **Figure 7**.

D'après les résultats obtenus, nous voyons que, sans ajout d'enzymes exogènes, après 48 heures, plus de 10% du glycogène est digéré lors d'un maintien au repos du lysat et du solubilisât mais pas du clarifiât.

**Exemple 8 : Caractérisation d'un extrait préparé selon l'invention**

Un lysat de biomasse de *Galdieria sulphuraria* (20% en poids de MS par rapport au poids total de lysat) est maintenu à pH acide de 3,7 pendant 12 heures, à 25 °C.

Un extrait est préparé à partir de ce lysat. Pour cela, le lysat est lavé avec une  
 5 quantité d'eau représentant au total moins de 4 fois le volume total de biomasse lysée. Ce volume d'eau est scindé en 3 fractions pour réaliser 3 lavages successifs de la biomasse lysée. Les eaux de lavage sont récupérées, conformément à l'enseignement de la demande de brevet WO2020/161280. Le produit obtenu est ensuite filtré sur une  
 10 membrane fibre creuse ayant une porosité de 70kDa (clarifiât) avec une étape finale de diafiltration et le filtrat est récupéré, conformément à l'enseignement de la demande de brevet WO2020/144330 (extrait aqueux concentré).

L'extrait aqueux concentré et le clarifiât ainsi obtenus sont analysés pour connaître la teneur en sucres totaux, mannose hydrolysé, galactose hydrolysé et glucose hydrolysé par HPLC-RID, la teneur en glucose libre à l'YSI® 2950, la teneur en  
 15 phycocyanine ainsi que la teneur en protéines.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 1** ci-dessous.

Tableau 1

	Clarifiât	Extrait aqueux concentré
Glucose libre (g/L)	ND	0,04
Glucose hydrolysé (g/L)	3,40	1,5
Galactose hydrolysé (g/L)	0,90	7,00
Mannose hydrolysé (g/L)	0,95	8,00
C-phycocyanine (g/L)	6,88	78,00
Ratio protéines (%) : glycogène résiduel non digéré estimé (g/L)	ND	4,3
Ratio protéines (%) : sucres totaux (g/L)	ND	0,4

## REVENDICATIONS

1. Procédé de traitement d'une biomasse d'algues rouges unicellulaires (ARU) du genre *Galdieria*, ledit procédé de traitement de biomasse d'ARU comprenant les étapes de :
  - 5 a) récolte de la biomasse par séparation du milieu de culture pour l'obtention d'une biomasse brute d'ARU,
  - b) lyse cellulaire de la biomasse brute de l'étape (a) pour obtenir un lysat,
  - c) optionnellement dilution du lysat de l'étape (b) pour obtenir un solubilisât, et
  - 10 d) séparation des insolubles en suspension dans le lysat de l'étape (b) ou le solubilisât de l'étape (c) pour obtenir un clarifiât, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de dégradation du glycogène par maintien au repos (étape de repos) pendant au moins 3 heures de la biomasse brute et/ou du lysat et/ou le cas échéant du solubilisât, durant laquelle
  - 15 le milieu liquide comprenant le glycogène est à pH acide.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape de repos dure entre 3 heures et une semaine.
- 20 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'étape de repos se fait à une température comprise entre 15°C et 70 °C.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'étape de repos est mise en œuvre sur le lysat et/ou le solubilisât le cas échéant,
- 25 préférentiellement sur le lysat.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend, préalablement à l'étape de repos, une étape d'ajustement du pH de la biomasse brute, du lysat et/ou le cas échéant du solubilisât à un pH inférieur à 7, en
- 30 particulier entre 1 et 6, préférentiellement entre 2 et 5, plus préférentiellement entre 3 et 4.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le procédé comprend en outre une étape e) concentration du clarifiât pour obtenir un extrait



aqueux concentré.

- 5
7. Produit susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 6.
8. Produit selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend une teneur estimée en glycogène résiduel non digéré de 0,1 à 10 g/L, plus préférentiellement de 0,2 à 7 g/L, encore plus préférentiellement 0,3 à 5 g/L.
- 10
9. Produit selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il comprend une concentration en mannose hydrolysé inférieure ou égale à 15 g/L.
10. Produit selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend une concentration en galactose hydrolysé inférieure ou égale à 15 g/L.
- 15
11. Produit selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend un rapport protéines (%) / glycogène résiduel non digéré estimé mesuré par dosage des sucres hydrolysés par HPLC-RID (g/L) de 0,2 à 6,0, plus préférentiellement 0,5 à 5,0, encore plus préférentiellement 1,0 à 4,5.
- 20
12. Produit selon l'une des revendications 7 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend un rapport protéines (%) / sucres totaux mesurés par dosage des sucres hydrolysés par HPLC-RID (g/L) inférieur à 1%, préférentiellement compris entre 1 et 0,01%, plus préférentiellement entre 0,8 et 0,05%, encore plus préférentiellement entre 0,6 et 0,1%.
- 25
13. Produit selon l'une des revendications 7 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend une teneur en C-phycoyanine comprise entre 0,1 et 20 g/L.
- 30
14. Composition nutraceutique, alimentaire ou cosmétique comprenant d'un produit selon l'une des revendications 7 à 13.
15. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'elle comprend un acide minéral ou organique.

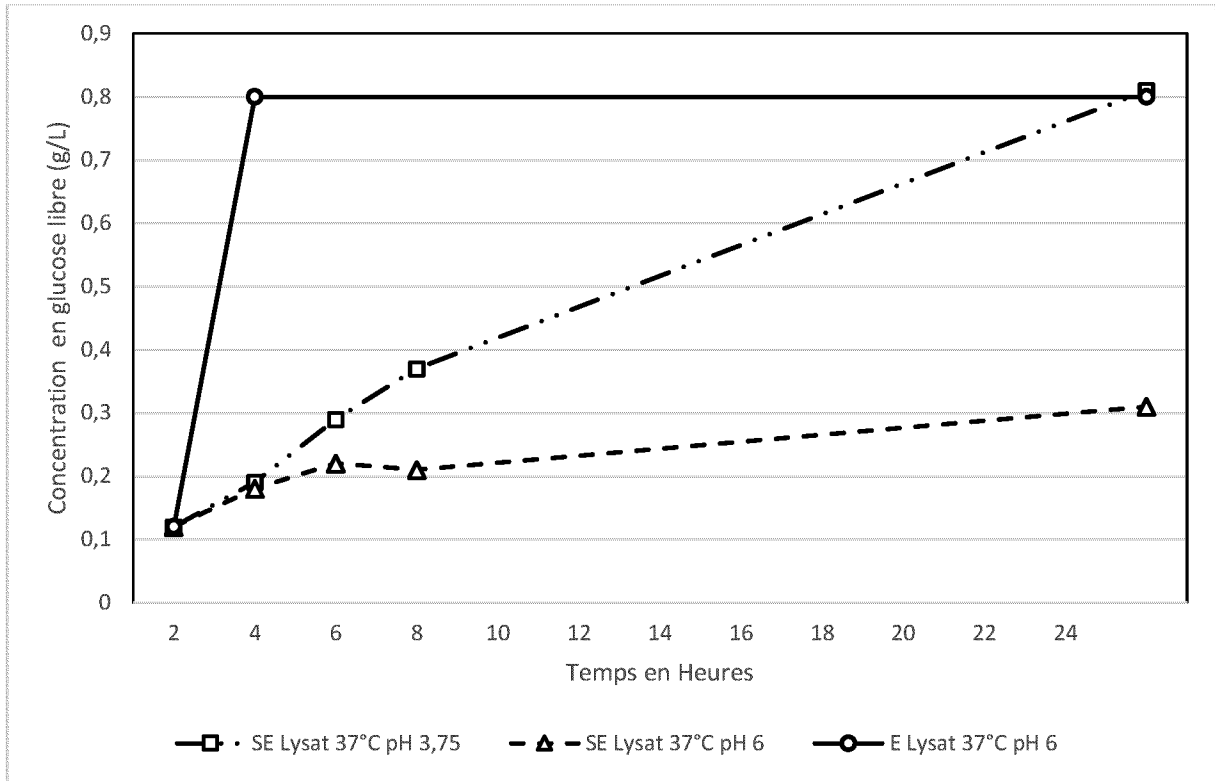


Figure 1

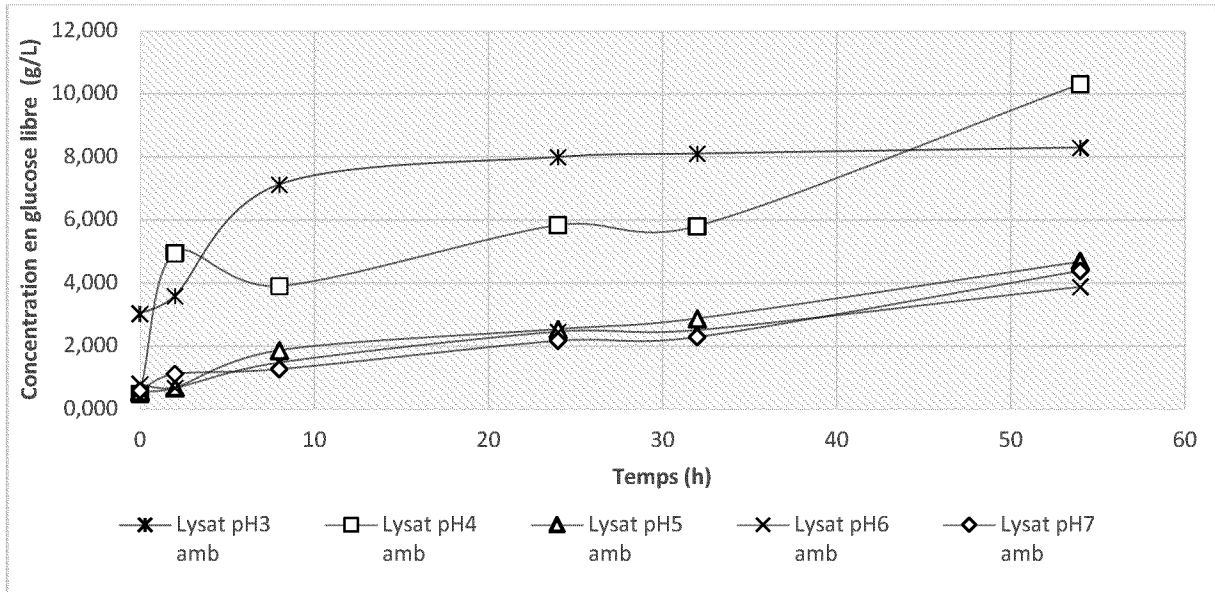


Figure 2

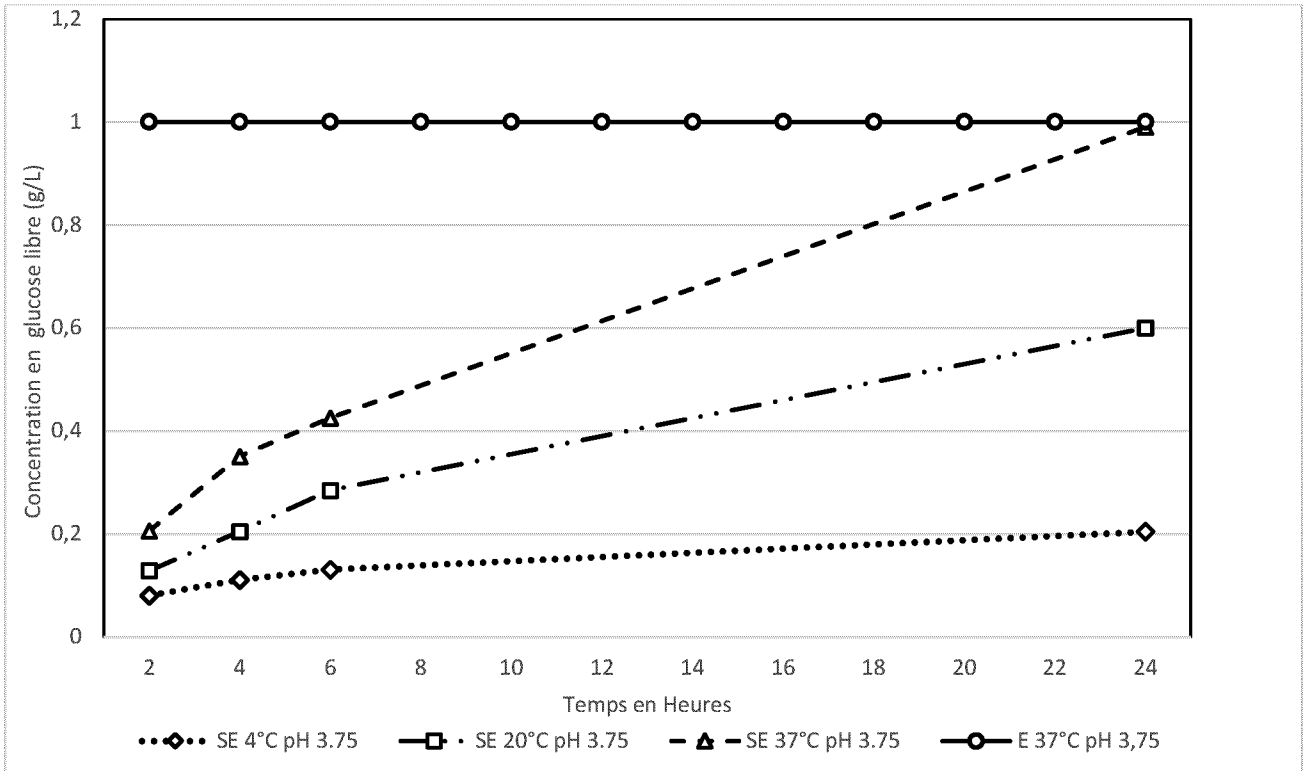


Figure 3

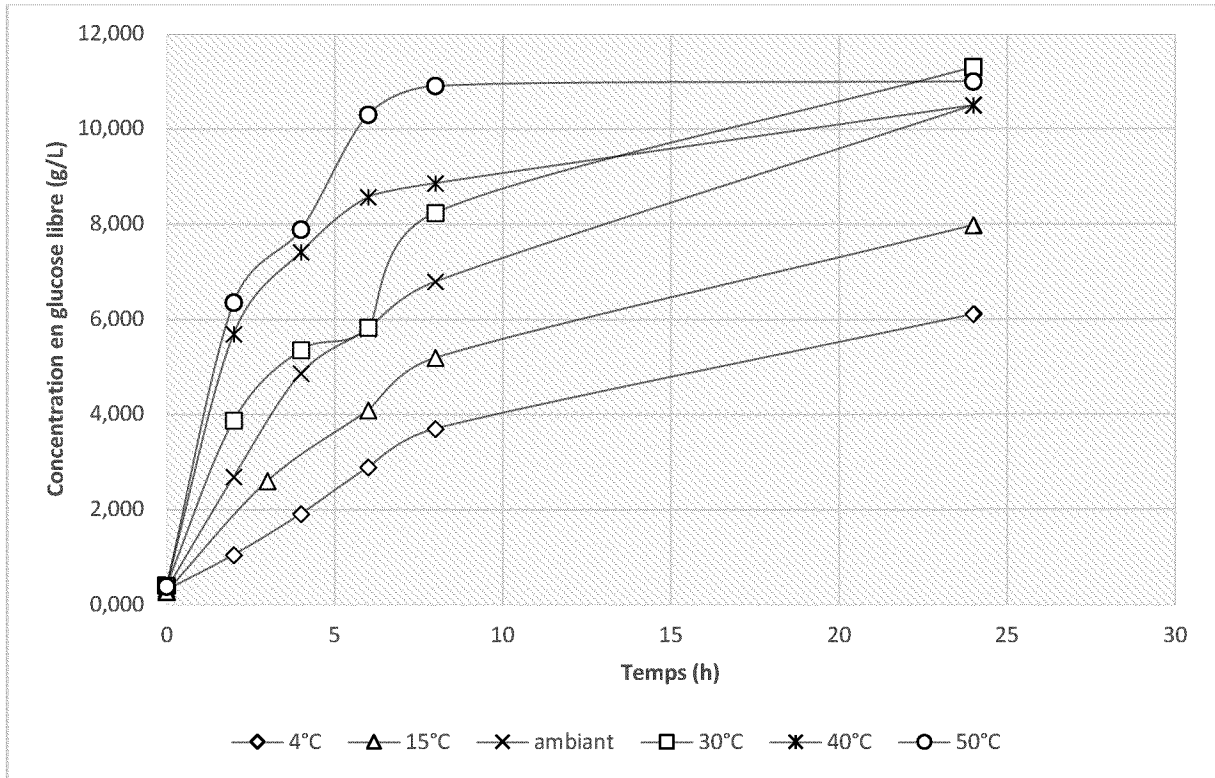


Figure 4

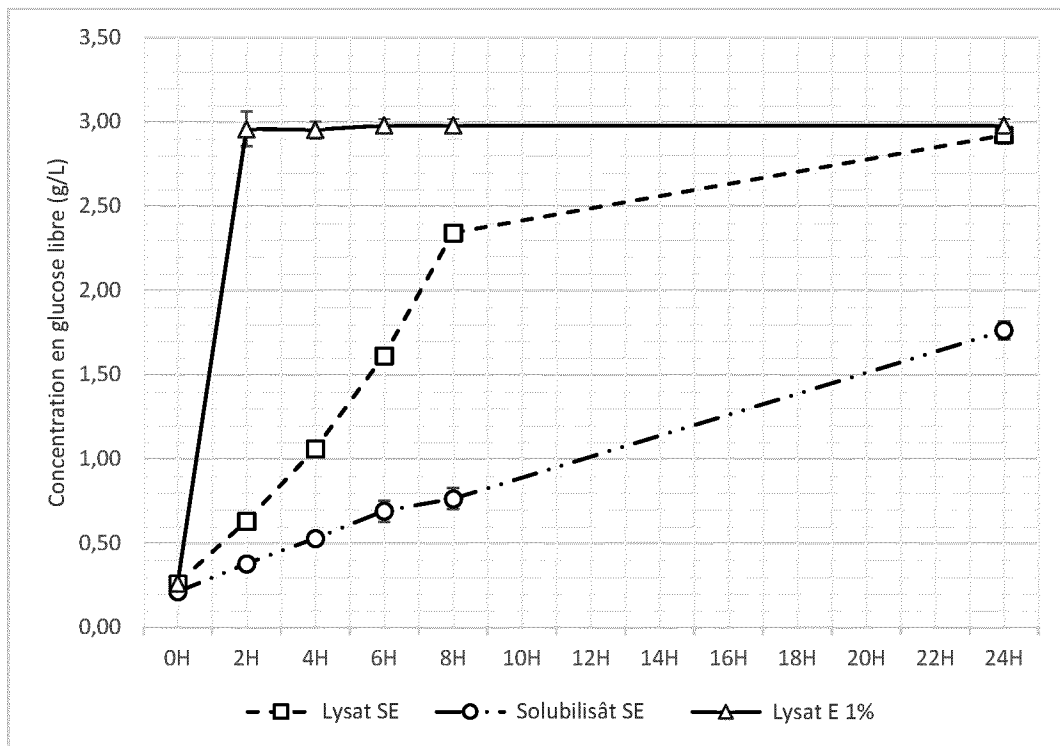


Figure 5

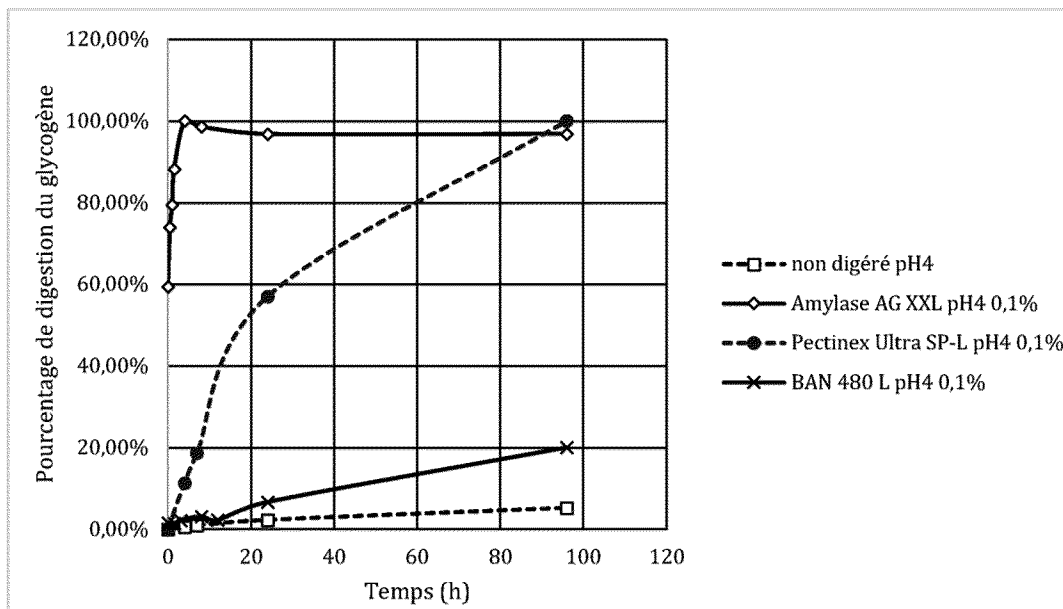


Figure 6

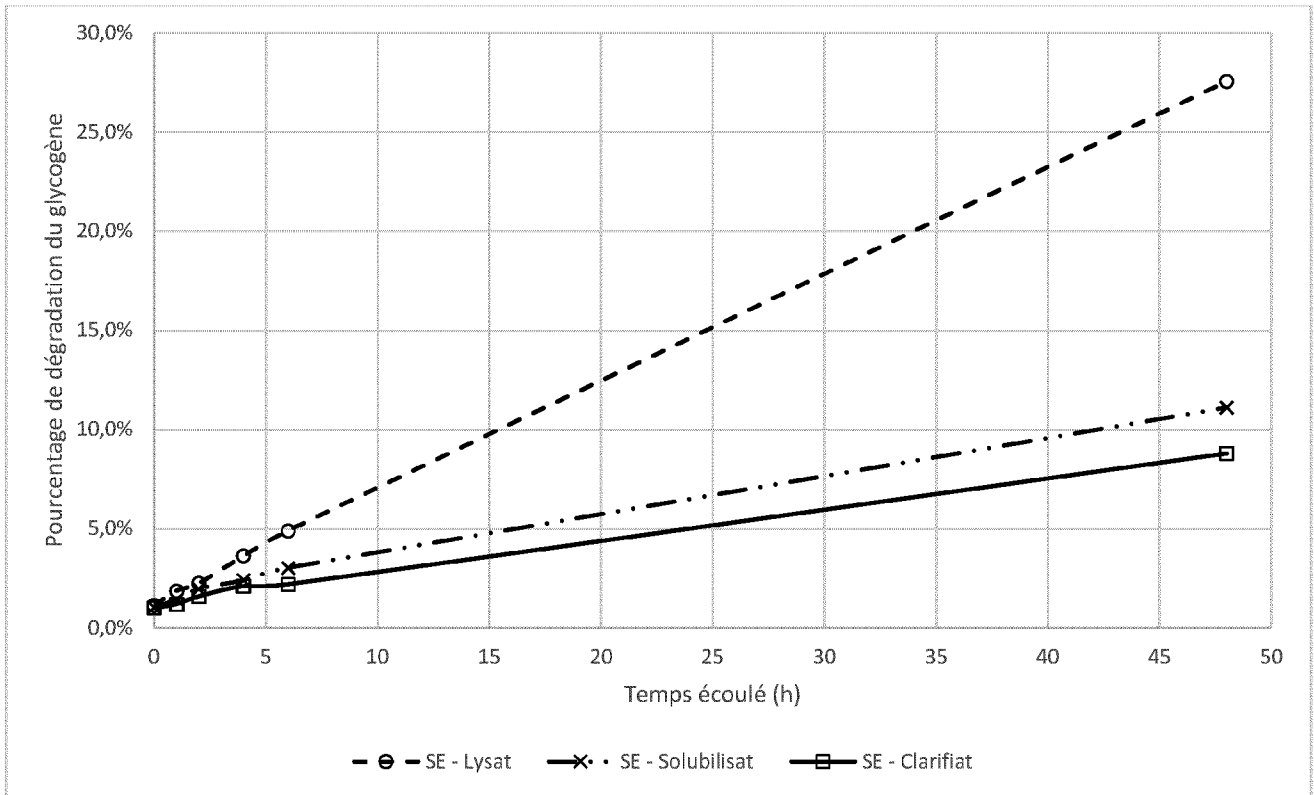


Figure 7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/EP2024/060721****A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A23J 1/00**(2006.01)i; **A23J 3/20**(2006.01)i; **A23J 3/30**(2006.01)i; **A23J 3/34**(2006.01)i; **C12N 1/12**(2006.01)i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23J; C12R; C12N

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

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

EPO-Internal

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2022112235 A1 (CAGNAC OLIVIER [FR] ET AL) 14 April 2022 (2022-04-14) paragraph [0030] - paragraph [0090]; figures 1, 3, 6	1-15
X	US 2022145237 A1 (CAGNAC OLIVIER [FR] ET AL) 12 May 2022 (2022-05-12) paragraph [0108] - paragraph [0175]; figures 1-16	1-15
X	US 2021340490 A1 (CAGNAC OLIVIER [FR] ET AL) 04 November 2021 (2021-11-04) claims 1, 8, 10, 11; example 1	1-15

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**17 June 2024**

Date of mailing of the international search report

**16 July 2024**

Name and mailing address of the ISA/EP

**European Patent Office**  
**p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk**  
**Netherlands (Kingdom of the)**

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

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

Authorized officer

**Merel-Rausch, Eva**

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/EP2024/060721**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2022112235	A1	14 April 2022	AU 2020206521	A1 29 July 2021
				BR 112021013610	A2 14 September 2021
				CA 3125830	A1 16 July 2020
				CN 113518558	A 19 October 2021
				EP 3908121	A1 17 November 2021
				FR 3091640	A1 17 July 2020
				JP 2022516786	A 02 March 2022
				KR 20210137993	A 18 November 2021
				US 2022112235	A1 14 April 2022
				WO 2020144330	A1 16 July 2020
-----					
US	2022145237	A1	12 May 2022	AU 2020219417	A1 12 August 2021
				BR 112021015614	A2 05 October 2021
				CA 3128866	A1 13 August 2020
				CN 113423719	A 21 September 2021
				EP 3921333	A1 15 December 2021
				FR 3092586	A1 14 August 2020
				JP 2022519630	A 24 March 2022
				KR 20210136002	A 16 November 2021
				US 2022145237	A1 12 May 2022
				WO 2020161280	A1 13 August 2020
-----					
US	2021340490	A1	04 November 2021	AU 2019334563	A1 25 March 2021
				BR 112021004196	A2 25 May 2021
				CA 3111673	A1 12 March 2020
				CN 112639072	A 09 April 2021
				EP 3847237	A1 14 July 2021
				FR 3085386	A1 06 March 2020
				JP 2021534805	A 16 December 2021
				US 2021340490	A1 04 November 2021
				WO 2020049095	A1 12 March 2020
				-----	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/EP2024/060721

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b>				
INV. A23J1/00	A23J3/20	A23J3/30		
ADD.	A23J3/34	C12N1/12		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB				
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>				
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A23J C12R C12N				
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche				
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO- Internal				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>				
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
X	US 2022/112235 A1 (CAGNAC OLIVIER [FR] ET AL) 14 avril 2022 (2022-04-14) alinéa [0030] - alinéa [0090]; figures 1, 3, 6 -----	1 - 15		
X	US 2022/145237 A1 (CAGNAC OLIVIER [FR] ET AL) 12 mai 2022 (2022-05-12) alinéa [0108] - alinéa [0175]; figures 1-16 -----	1 - 15		
X	US 2021/340490 A1 (CAGNAC OLIVIER [FR] ET AL) 4 novembre 2021 (2021-11-04) revendications 1, 8, 10, 11; exemple 1 -----	1 - 15		
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <span style="margin-left: 200px;"><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span>				
* Catégories spéciales de documents cités: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>	<p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>
<p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>	<p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale		
17 juin 2024		16/07/2024		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <b>Merel - Rausch, Eva</b>		

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2024/060721

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2022112235 A1	14-04-2022	AU 2020206521 A1	29-07-2021
		BR 112021013610 A2	14-09-2021
		CA 3125830 A1	16-07-2020
		CN 113518558 A	19-10-2021
		EP 3908121 A1	17-11-2021
		FR 3091640 A1	17-07-2020
		JP 2022516786 A	02-03-2022
		KR 20210137993 A	18-11-2021
		US 2022112235 A1	14-04-2022
		WO 2020144330 A1	16-07-2020
US 2022145237 A1	12-05-2022	AU 2020219417 A1	12-08-2021
		BR 112021015614 A2	05-10-2021
		CA 3128866 A1	13-08-2020
		CN 113423719 A	21-09-2021
		EP 3921333 A1	15-12-2021
		FR 3092586 A1	14-08-2020
		JP 2022519630 A	24-03-2022
		KR 20210136002 A	16-11-2021
		US 2022145237 A1	12-05-2022
		WO 2020161280 A1	13-08-2020
US 2021340490 A1	04-11-2021	AU 2019334563 A1	25-03-2021
		BR 112021004196 A2	25-05-2021
		CA 3111673 A1	12-03-2020
		CN 112639072 A	09-04-2021
		EP 3847237 A1	14-07-2021
		FR 3085386 A1	06-03-2020
		JP 2021534805 A	16-12-2021
		US 2021340490 A1	04-11-2021
		WO 2020049095 A1	12-03-2020