

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

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

**2 696 475**

②1 N° d'enregistrement national :

**92 11877**

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : C 12 N 1/12

①2

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 07.10.92.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 08.04.94 Bulletin 94/14.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET MÉTIERS — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Dupré Catherine, Grizeau Dominique et Guary Jean-Claude.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf Warcoin Ahner.

⑤4 Procédé de production de micro-algues.

⑤7 La présente invention concerne un procédé de production de microalgues produisant des métabolites, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer les étapes suivantes:

- de cultiver les microalgues,
- de les concentrer,
- de provoquer l'accumulation de métabolites, et
- de récolter la biomasse et/ou le milieu enrichi.

Elle concerne également un procédé de forçage physiologique de microalgues pour la suraccumulation de métabolite, caractérisé en ce que le forçage est effectué dans des volumes de cultures inférieurs à 1/5 des volumes usuels de production de biomasse alguale.

**FR 2 696 475 - A1**



La présente invention concerne un procédé de production de microalgues produisant, en particulier, des métabolites d'intérêt économique.

5 Le principal intérêt de la culture de microalgues réside d'une part dans la production de biomasse en grande quantité, exploitée ultérieurement, notamment dans l'industrie agro-alimentaire, les cosmétiques ou pour l'agriculture, et d'autre part dans la production de métabolites d'intérêt économique.

10 Par métabolites d'intérêt économique, on entend en particulier des molécules à haute valeur ajoutée produites naturellement et dont la synthèse est délicate du fait de leur complexité.

Entrera également dans cette catégorie, tout produit dont la production naturelle sera considérée en terme de bilan économique industriel, plus rentable que sa production par voie de synthèse.

15 Parmi les métabolites d'intérêt économique, on trouvera, par exemples, des pigments tels que phycoérythrine, phycocyanine et béta-carotène, des lipides tels que l'acide éicosapentaénoïque, des phospho- et sulfo-lipides, des acides aminés tels que la proline, et des molécules à activité thérapeutique tels que certains dérivés de stérols.

20 Toutefois, l'exploitation des microalgues implique pour être rentable la maîtrise des conditions de culture et de récolte, tout en préservant la qualité biochimique de la matière algale. Les cultures de microalgues peuvent être obtenues en mode soit extensif, soit intensif. Les biomasses obtenues en fin de culture vont de 0,1 à quelques kg/m<sup>3</sup> de matière sèche, valeurs relativement faibles par comparaison avec d'autres cultures de microorganismes tels que bactéries et champignons hétérotrophes.

30 Classiquement, les microalgues sont récoltées selon divers procédés impliquant des opérations de floculation/décantation, floculation/flottation et/ou centrifugation, etc. Les procédés connus et les installations pour les mettre en oeuvre se distinguent par leurs rentabilités économiques respectives. Lorsqu'il s'agit de cultures cellulaires photoautotrophes, donc relativement diluées, les séparations solides/liquides par voie mécanique impliquent la mise en oeuvre de matériel surdimensionné, réduisant d'autant la rentabilité de ce type de production.

35

Selon l'art antérieur, l'accumulation de molécules à forte valeur ajoutée, est pratiquée durant la culture des microalgues en jouant sur les facteurs environnementaux. Les méthodes utilisées diffèrent selon les molécules recherchées et les souches cultivées. La maîtrise des conditions optimales pour ces biosynthèses est loin d'être assurée dès qu'il s'agit de volumes de cultures supérieurs à quelques m<sup>3</sup>. En effet à ces échelles de production apparaissent des limitations liées à des problèmes de transfert de matière et/ou de lumière. Dans ces conditions, la maîtrise des facteurs environnementaux permettant l'accumulation des métabolites recherchés implique, de manière générale des coûts de production très élevés.

L'objet de cette invention est donc d'optimiser la mise en oeuvre des conditions provoquant l'accumulation de molécules d'intérêts économiques tout en optimisant la récolte des microalgues.

La présente invention concerne donc un procédé de récolte de microalgues permettant de dissocier les conditions optimales de production de biomasse de celles relatives à la production des métabolites recherchés.

Le procédé selon la présente invention se caractérise par les étapes suivantes :

- a) cultiver les microalgues en milieu liquide dans des conditions appropriées assurant essentiellement la formation d'une biomasse importante,
- b) concentrer la biomasse obtenue,
- c) placer cette biomasse concentrée dans des conditions assurant essentiellement l'accumulation de métabolite, et
- d) récolter la biomasse contenant le métabolite et/ou le milieu contenant le métabolite.

L'étape a) de production de biomasse met en oeuvre l'ensemble des techniques connues et développées dans l'art antérieur pour la production optimale de biomasse algale.

Ainsi, la culture des microalgues pourra être réalisée en mode continu ou discontinu. Le milieu de culture classiquement utilisé pour la production de biomasse algale, en conditions de photoautotrophie, pourra être enrichi à l'aide de formulations d'engrais solides ou liquides, commercialisées pour des usages horticoles, à condition d'être utilisées aux doses optimales.

D'une manière avantageuse, la biomasse concentrée obtenue dans l'étape b) représente moins de 1/5 du volume de la culture dans l'étape a).

Préférentiellement, cette biomasse concentrée représente entre 1/10 et 1/20 du volume de la culture dans l'étape a).

5 Selon la présente invention, la concentration opérée dans l'étape b) sera effectuée avantageusement par floculation des microalgues.

De préférence, la floculation est effectuée par augmentation de l'alcalinité du milieu de culture de l'étape a).

10 On fait de préférence varier l'alcalinité du milieu après arrêt de la carbonatation durant 2 à 4 heures en période lumineuse.

Cette augmentation de l'alcalinité pourra être obtenue par l'addition de soude et/ou de phosphate de sodium.

15 Une attention particulière devra être apportée à cette étape afin que la floculation par modification de l'alcalinité n'entraîne pas une dégradation des microalgues à des pH trop élevés.

On pourra toutefois employer comme soude ou comme phosphate de sodium des produits destinés à l'usage agricole, particulièrement économiques pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

20 Un autre moyen préférentiel de floculation dans le procédé selon la présente invention consiste à employer des microalgues autofloculantes, et/ou à ajouter des agents floculants chimiques, biologiques et leur mélanges.

25 De tels agents sont connus de l'art antérieur, comme par exemple des polysaccharides tels que le chitosan ou des sels métalliques tels que le perchlorure de fer.

Bien entendu, l'homme du métier saura optimiser les conditions de floculation, en particulier par combinaison des différents moyens décrits ci-dessus.

30 Suivant le procédé selon la présente invention, les algues floculées sont ensuite concentrées par des moyens appropriés de décantation statique ou mécanique ou par des moyens appropriés de flottation.

D'une manière préférentielle, on emploiera un décanteur cylindro-conique à flux vertical dont la pente de la partie conique est

comprise entre 50° et 70° pour une vitesse ascensionnelle moyenne comprise entre 1,5 et 2,5 m/h.

D'une manière avantageuse, l'accumulation de métabolites dans l'étape c) est obtenue par forçage physiologique.

5 En fonction du métabolite recherché, le forçage physiologique sera induit par différents paramètres, notamment la température de culture, l'exposition à la lumière, ou l'enrichissement du milieu de culture en différents composés inducteurs. Par composé inducteur, on entend tout composé chimique ou biologique qui, lorsqu'additionné au milieu de culture  
10 modifie le métabolisme des microalgues favorisant la production de métabolites. Les composés inducteurs sont, par exemples des sources azotées telles que nitrate, ammonium ou urée, des sources d'oligoéléments tel le molybdate de sodium, des sources d'hormones telles que certaines auxines ou des sources d'acides et/ou de bases pour réguler le pH à une  
15 valeur optimale.

La durée du forçage physiologique, fonction de la nature des métabolites recherchés et de l'espèce de microalgue cultivée, est de préférence comprise entre 2 et 15 heures.

20 Enfin, après avoir assuré l'accumulation de métabolites, la biomasse et/ou le milieu contenant les métabolites seront récoltés par centrifugation et/ou filtration.

Dans ce dernier cas, on emploiera préférentiellement une filtration de type filtration tangentielle.

25 On constatera donc que le procédé selon la présente invention s'applique aussi bien à la production de métabolites secrétés dans les microalgues qu'à celle de métabolites excrétés dans le milieu de culture.

La pâte alguale obtenue comprend alors entre 20 et 25% de matière sèche.

30 Après sa récolte, la biomasse enrichie peut éventuellement être conditionnée, en particulier par congélation, cette dernière pouvant être effectuée sous vide ou sous atmosphère contrôlée.

Le procédé selon la présente invention s'applique indifféremment aux microalgues d'origine marine, d'eau douce ou terrestre, procaryotes ou  
35 eucaryotes.

Les exemples ci-après décrivent des modes de réalisation préférentiels du procédé selon la présente invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

5 **Exemple 1 : Production de phycoérythrine par culture de *Porphyridium cruetum*, *Rhodosorus marinus* ou *Rhodella violacea*.**

Les algues sont cultivées de manière classique et pré-récoltées par floculation/décantation. Elles sont transférées dans un bac de forçage physiologique permettant des transferts optimaux de matière et de lumière.  
10 L'induction de la synthèse de phycoérythrine est favorisée par un éclaircissement de l'ordre de  $50 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$  et un enrichissement en nitrate ( $2\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) et heptamolybdate de sodium ( $25 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) pour des biomasses de quelques  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (poids secs). La récolte finale a lieu après 3 heures d'incubation.

15

**Exemple 2 : Production de  $\beta$ -carotène par culture de *Dunallella salina*.**

La production de biomasse de cette algue est optimale à une salinité de 60‰. Les algues sont pré-récoltées par floculation (en  
20 accroissant l'alcalinité du milieu) et décantation. Elles sont transférées dans un bac de forçage physiologique permettant des transferts optimaux de matière et de lumière.

La carotenogénèse est induite par augmentation de la salinité du milieu (100‰) et un éclaircissement supérieur à  $2000 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Après  
25 heures d'incubation les algues sont récoltées et congelées sous vide avant extraction.

**Exemple 3 : Production d'acide eicosapentaénoïque par culture de *Phaeodactylum tricornutum*.**

30

Les algues sont cultivées dans un milieu de culture constitué d'eau de mer enrichie, en particulier, en silice. Les diatomées sont pré-récoltées par floculation (induite par accroissement de l'alcalinité du

35

milieu) et décantation. Elles sont transférées dans un bac de forçage physiologique où elles sont soumises à une température inférieure de 10°C à celle des cultures initiales. Après 6 heures d'incubation sous agitation, les microalgues sont récoltées sous forme de pâte alguale.

5 En comparaison avec la technique antérieure, la présente invention permet de produire des microalgues en conditions semi-contrôlées tout en assurant, à moindre frais, leur qualité biochimique. D'une part, la mise en oeuvre d'un procédé de récolte impliquant une concentration par floculation-décantation, floculation-flottation ou floculation-filtration  
10 permet de réduire les coûts liés à cette opération, en réduisant d'un facteur 10 à 20 les volumes à traiter, donc la dimension et la durée de fonctionnement des appareils. D'autre part, la pratique du forçage physiologique sur des volumes réduits de cultures concentrées et pour des durées plus courtes permet également de réduire les coûts de sa mise en oeuvre.

15 La présente invention concerne donc également un procédé de forçage physiologique de microalgues pour la suraccumulation de métabolites, caractérisé en ce que le forçage est effectuée à un volume de culture inférieur à 1/5, de préférence compris entre 1/10 et 1/20 du volume usuel de culture des microalgues.

20

25

30

35

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de production de microalgues produisant en particulier des métabolites, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer les étapes  
5 suivantes :
- a) cultiver les microalgues en milieu liquide dans des conditions appropriées assurant essentiellement la formation d'une biomasse importante,
  - b) concentrer la biomasse obtenue,
  - c) placer cette biomasse concentrée dans des conditions assurant  
10 essentiellement l'accumulation de métabolites, et
  - d) récolter la biomasse contenant le métabolite et/ou le milieu contenant le métabolite.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que dans  
15 l'étape b), la biomasse concentrée obtenue représente moins de 1/5 du volume de la culture dans l'étape a).
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la biomasse concentrée représente entre 1/10 et 1/20 du volume de la culture dans l'étape a)
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce  
20 que la concentration est effectuée par floculation.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la floculation est effectuée par augmentation de l'alcalinité du milieu de culture de l'étape a).
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on  
25 fait varier l'alcalinité du milieu après arrêt de la carbonatation durant 2 à 4 heures en période lumineuse.
7. Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que l'on augmente l'alcalinité du milieu par l'addition de soude et/ou de phosphatre de sodium.
- 30 8. Procédé selon l'une des revendications 4 à 7, caractérisé en ce que la floculation est obtenue en employant des microalgues naturellement floculantes, et/ou en ajoutant des agents floculants chimiques, biologiques ou leurs mélanges.



9. Procédé selon l'une des revendications 4 à 8, caractérisé en ce que les algues floculées sont concentrées par des moyens appropriés de décantation statique ou mécanique ou par des moyens appropriés de flottation.

5 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le moyen approprié de décantation est un décanteur cylindro-conique à flux vertical, dont la partie conique est comprise entre 50° et 70°, pour une vitesse ascensionnelle comprise entre 1,5 et 2,5 m/h.

10 11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'accumulation de métabolites dans l'étape c) est obtenue par forçage physiologique.

15 12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le forçage physiologique est induit par la température de culture et/ou l'exposition à la lumière et/ou l'enrichissement du milieu de culture en composés inducteurs.

13. Procédé selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que la durée du forçage physiologique est comprise entre 2 et 15 heures.

20 14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la biomasse et/ou le milieu contenant le métabolite est récolté par centrifugation et/ou filtration.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que les microalgues sont d'origine marine, d'eau douce ou terrestre, procaryotes ou eucaryotes.

25 16. Procédé de forçage physiologique de microalgues pour la suraccumulation de métabolite, caractérisé en ce que le forçage est effectuée à un volume de culture inférieur à 1/5, de préférence compris entre 1/10 et 1/20 du volume usuel de culture des microalgues.

30

35

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	US-A-4 087 936 (J.G. SAVINS & M.L. ANDERSON) 9 Mai 1978 ---	1
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 88, no. 19, Mai 1978, Columbus, Ohio, US; abstract no. 134883r, S. ICHIMURA & Y. WATANABE 'Method and apparatus for concentrated culture of Chlorella.' page 394 ;colonne 1 ; & jp7750268 (23-12-77) ---	1
A	US-A-4 115 949 (M. AVRON & A. BEN-AMOTZ) 26 Septembre 1978 ---	
A	US-A-4 236 349 (J.S. RAMUS) 2 Décembre 1980 ---	
A	ADVANCES IN BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES vol. 6, 1986, ALAN R. LISS, INC. pages 73 - 110 C. GUDIN & C. THEPENIER 'Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae.' * page 91, alinéa 2 - page 94, alinéa 1 * -----	1-10, 14
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12N A01G
Date d'achèvement de la recherche 23 JUIN 1993		Examineur BEVAN S.R.
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul                      Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie                      A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général                      O : divulgation non-écrite                      P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention                      E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.                      D : cité dans la demande                      L : cité pour d'autres raisons                      .....                      &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1