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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
13 août 2020 (13.08.2020)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/161280 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 14/405 (2006.01) *C12P 17/18* (2006.01)
C12N 1/06 (2006.01) *A23L 33/195* (2016.01)
C12N 1/12 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2020/053081

(22) Date de dépôt international :
07 février 2020 (07.02.2020)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1901259 08 février 2019 (08.02.2019) FR

(71) Déposant : **FERMENTALG** [FR/FR] ; 4 rue Rivière, 33500 LIBOURNE (FR).

(72) Inventeurs : **CAGNAC, Olivier** ; 60 boulevard Beausé-jour, 33500 LIBOURNE (FR). **ATHANE, Axel** ; 4 rue Pas-teur, 33560 CARBON BLANC (FR). **DEMOL, Julien** ; 57 route de Paris, 33500 LES BILLAUX (FR). **BROSSET-VINCENT, Sandra** ; 11 Clairière du Raillon, 33640 CAS-TRES-GIRONDE (FR).

(74) Mandataire : **BE IP** ; CABINET LTL SAS CS 52132, 56 boulevard Niels Bohr, 69603 VILLEURBANNE Cedex (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :
— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17(iv))*

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

WO 2020/161280 A1

(54) **Title:** OPTIMIZED METHOD FOR INDUSTRIAL EXPLOITATION OF UNICELLULAR RED ALGAE

(54) **Titre :** PROCÉDÉ OPTIMISÉ D'EXPLOITATION INDUSTRIELLE D'ALGUES ROUGES UNICELLULAIRES

(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for culturing unicellular red algae (URA) optimized for the valorization of culture products, both the biomass obtained and the phycocyanins which are extracted or the other culture products such as porphyrins or protein extracts.

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne un procédé de culture d'algues rouges unicellulaires (ARUs) optimisé pour la valorisation des produits de culture, tant la biomasse obtenue, que les phycocyanines qui en sont extraites ou les autres produits de culture comme des porphyrines ou des extraits protéiques.

PROCÉDÉ OPTIMISÉ D'EXPLOITATION INDUSTRIELLE D'ALGUES ROUGES UNICELLULAIRES

DOMAINE DE L'INVENTION.

La présente invention concerne un procédé de culture d'algues rouges unicellulaires (ARUs) optimisé pour la valorisation des produits de culture, tant la biomasse obtenue, que les phycocyanines qui en sont extraites ou les autres produits de culture comme des porphyrines ou des extraits protéiques.

ETAT DE LA TECHNIQUE.

On connaît différents moyens de cultiver des microalgues, en particulier des algues rouges unicellulaires (ARUs) pour la fabrication de différents produits pour des usages industriels ou alimentaires.

On citera notamment les procédés de culture et de transformation des spirulines pour la fabrication de compléments alimentaires riches en protéines ou encore pour la fabrication de phycocyanines utiles comme colorant alimentaires.

On citera également les procédés de cultures et de transformation d'ARUs pour l'obtention de produits similaires et en particulier les procédés de culture et de transformation de *Galdieria sulphuraria* décrits dans les demandes de brevets WO 2017/050917, WO 2017/093345 et WO 2018/178334.

Un procédé industriel de culture et de transformation des ARUs comme *Galdieria sulphuraria* est représenté sur la figure 1.

On notera toutefois que ces différents procédés peuvent encore être améliorés à chaque étape de la production et de la transformation des ARUs. En particulier ces procédés peuvent être améliorés au regard du fait que les ARUs comme *Galdieria sulphuraria* accumulent d'importantes quantités de glycogène lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions usuelles de culture, quantités de glycogène qui impactent en particulier les conditions de traitement de la biomasse, lyse cellulaire notamment, les conditions d'isolation des produits à partir de la biomasse et la qualité de ces produits isolés, en particulier les phycocyanines.

En particulier, il est important de pouvoir optimiser ces différentes étapes pour mieux valoriser les produits obtenus.

EXPOSE DE L'INVENTION.

L'invention concerne un procédé optimisé de culture et de valorisation des ARUs, en particulier de *Galdieria sulphuraria*, comprenant des étapes (a) de culture par fermentation des ARUs, (b) de séparation de la biomasse du jus de fermentation, le cas échéant (c) de lyse cellulaire et le cas échéant une étape (d) d'extraction de produits valorisables à partir de la biomasse lysée, qui comprend au moins l'une des étapes suivantes de :

(c1) de lyse par broyage avec maintien de la biomasse pendant le broyage à une température inférieure à 50°C et/ou

(a1) culture par fermentation avec une phase de maturation avec limitation de l'apport en source de carbone dans le milieu de culture, et/ou

(b1) extraction de porphyrines à partir du jus de fermentation, et/ou

(d1) d'extraction des phycocyanines de la biomasse lysée par au moins 2 lavages successifs dans des quantités d'eau représentant au total moins de 4 fois le volume total de biomasse lysée.

L'invention concerne également les produits obtenus par le procédé, en particulier les porphyrines extraites du jus de fermentation, la biomasse, la biomasse lysée, les protéines et/ou les phycocyanines isolées.

DESCRIPTION DES FIGURES.

La Figure 1 représente un schéma simplifié du procédé de fabrication de différents produits à partir de la culture de *Galdieria sulphuraria*.

La Figure 2 représente la croissance de la souche de *Galdieria sulphuraria* en mode « FedBatch » sur glycérol avec phase de maturation.

La Figure 3 représente le suivi de la composition de la biomasse au cours de la culture en mode « FedBatch » sur glycérol avec phase de maturation.

La Figure 4 représente la croissance de la souche de *Galdieria sulphuraria* en mode « Fed-Batch » sur perméat de lait avec phase de maturation.

La Figure 5 représente le suivi de la composition de la biomasse au cours de la culture sur perméat de lait en mode « FedBatch » avec phase de maturation.

La Figure 6 représente le suivi de croissance d'une souche de *Galdieria sulphuraria* cultivée en continu sur glycérol sans production de porphyrines.

La Figure 7 représente le suivi de la composition de la biomasse au cours de la culture de *Galdieria sulphuraria* cultivée en continu sur glycérol.

La Figure 8 représente le suivi de croissance d'une souche de *Galdieria sulphuraria* en mode continu sur glucose.

La Figure 9 représente le suivi de la composition de la biomasse au cours de la culture de *Galdieria sulphuraria* cultivée en continu sur glucose.

La Figure 10 représente le suivi de croissance d'une souche de *Galdieria sulphuraria* en mode continu sur perméat de lait.

La Figure 11 représente le suivi de la composition de la biomasse au cours de la culture de *Galdieria sulphuraria* cultivée en continu sur perméat de lait.

La Figure 12 représente les données de broyage HHP Bertoli (1200bars) sans refroidissement.

La Figure 13 représente les données de broyage HHP Bertoli (1200bars) avec

refroidissement.

La Figure 14 représente la résistance de la Phycocyanine à 50°C sur des lysats ajustés à différents pH.

La Figure 15 représente l'effet du diamètre des billes sur le taux de lyse cellulaire par broyeur à billes.

La Figure 16 représente les quantités de phycocyanines extraites avec des lavages en série par comparaison à des lavages en une seule fois pour différents volumes d'eau.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION.

Les différentes étapes du procédé selon l'invention sont décrites plus en détail ci-après et dans les exemples.

Par « valorisation », on entend selon l'invention les étapes techniques qui permettent d'isoler des produits utiles pour une utilisation dans l'industrie,

En particulier, le procédé selon l'invention comprend les étapes successives suivantes :

(a1) de culture par fermentation avec une phase de maturation qui comprend la limitation de l'apport en source de carbone dans le milieu de culture,

(b1) le cas échéant d'extraction de porphyrines à partir du jus de fermentation,

(c1) le cas échéant de lyse par broyage avec maintien de la biomasse pendant le broyage à une température inférieure à 50°C et,

(d1) le cas échéant d'extraction des phycocyanines de la biomasse lysée par au moins 2 lavages successifs dans des quantités d'eau représentant au total moins de 4 fois le volume total de biomasse lysée.

Plus particulièrement le procédé selon l'invention comprend les étapes successives suivantes :

(a1) de culture par fermentation avec une phase de maturation qui comprend la limitation de l'apport en source de carbone dans le milieu de culture,

(b1) d'extraction de porphyrines à partir du jus de fermentation,

(c1) de lyse par broyage avec maintien de la biomasse pendant le broyage à une température inférieure à 50°C et,

(d1) d'extraction des phycocyanines de la biomasse lysée par des lavages successifs dans des quantités d'eau représentant au total moins de 3 fois le volume total de biomasse lysée.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé comprend au moins les étapes suivantes :

(a1) de culture par fermentation avec une phase de maturation par limitation de l'apport en source de carbone dans le milieu de culture, et

(b1) d'extraction de porphyrines à partir du jus de fermentation.

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé comprend au

moins les étapes suivantes :

(c1) de lyse par broyage avec maintien de la biomasse pendant le broyage à une température inférieure à 50°C et, le cas échéant

(d1) d'extraction des phycocyanines de la biomasse lysée par des lavages successifs dans des quantités d'eau représentant au total moins de 3 fois le volume total de biomasse lysée.

Les ARUs sont bien connues de l'homme du métier, en particulier les ARUs susceptibles d'être cultivées de manière industrielle pour la production de biomasse et de ses produits dérivés, protéines ou phycocyanines. On citera en particulier les algues (ou microalgues) des ordres des Cyanidiales. L'ordre des Cyanidiales, englobe les familles des Cyanidiaceae ou des Galdieriaceae, elles-mêmes subdivisées en les genres Cyanidioschyzon, Cyanidium ou Galdieria, auxquelles appartiennent entre autres les espèces *Cyanidioschyzon merolae 10D*, *Cyanidioschyzon merolae DBV201*, *Cyanidium caldarum*, *Cyanidium daedalum*, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita* ou encore *Galdieria sulphuraria*. On citera en particulier la souche *Galdieria sulphuraria* (aussi appelée *Cyanidium caldarium* (UTEX 2919).

On citera aussi des producteurs connus de phycocyanines comme les cyanobactéries filamenteuses du genre *Arthrospira*, cultivées industriellement sous le nom commun de spiruline.

Les microorganismes qui produisent de la phycocyanine avec une teneur élevée en glycogènes sont plus particulièrement identifiés parmi les microorganismes cités précédemment, en particulier les espèces des genres Arthrospira, Spirulina, Synechococcus, Cyanidioschyzon, Cyanidium ou Galdieria, plus particulièrement *Galdieria sulphuraria*.

L'invention concerne également les produits obtenus par le procédé, en particulier la biomasse, les porphyrines isolées du jus de fermentation, la biomasse lysée, les protéines et les phycocyanines isolées de la biomasse lysée.

Les phycocyanines (PC) produites par les microorganismes comprennent les c-phycocyanines (C-PC) et les allophycocyanines. Selon l'invention on entend par phycocyanines les C-PC et les allophycocyanines, isolées ou leurs mélanges en toutes proportions, en particulier les C-PC.

La culture des ARUs (a1).

La culture en fermenteur d'ARUs et en particulier de *Galdieria sulphuraria* a largement été décrite dans la littérature scientifique que ce soit en hétérotrophie ou en mixotrophie, en « Fed-batch » ou en continu.

La biomasse produite comprend non seulement des phycocyanines et des protéines, mais également des sucres de réserve comme le glycogène. Les teneurs en glycogène dans

la biomasse sont de l'ordre de 20 à 50% en masses par rapport à la masse totale de matière sèche. Or plus la teneur en glycogène est importante dans la biomasse finale et plus la concentration en phycocyanine (PC) et en protéine est faible. Le glycogène produit par les ARUs en en particulier chez *Galdieria* est soluble à l'eau froide et se retrouve donc dans la phase aqueuse lors de l'extraction de la PC, ce qui pose des problèmes techniques lors de la filtration comme une augmentation de la viscosité, le colmatage des membranes de filtration, des montés en pression, une accumulation de glycogène dans la fraction contenant la phycocyanine et donc l'obtention d'une phycocyanine moins pure. L'invention permet, par un « pilotage » de fermentation, de réduire les taux de glycogène à des valeurs inférieures à 20 % en masse/MS.

L'invention concerne donc un procédé de production de biomasse de selon l'invention qui comprend la culture par fermentation d'ARUs telles que définies précédemment avec une phase de maturation qui comprend la limitation de l'apport en source de carbone dans le milieu de culture,

Les cultures par fermentation se font sur un milieu de culture comprenant différents éléments nutritifs permettant la croissance cellulaire. Ces milieux de culture bien connus de l'homme du métier comprennent notamment une source de carbone, une source d'azote, une source de phosphore, des macroéléments, des microéléments, dans des concentrations appropriées pour permettre la croissance cellulaire.

L'étape de maturation est en particulier mise en œuvre dans des modes de cultures en « FedBatch » ou en continu.

La source de carbone peut être toute source de carbone connue de l'homme du métier et pouvant être employée pour la culture des ARUs et en particulier de *Galdieria sulphuraria*, comme les polyols, en particulier le glycérol, les sucres, comme le glucose ou le saccharose ou encre le lactose ou des milieux complexes comprenant du lactose comme les perméats lactés, comme le perméat de lait, le perméat de sérum, le babeurre et leurs mélanges et en particulier le perméat de lait.

Il est connu que certains substrats carbonés comme le glucose inhibent fortement la synthèse de PC alors que d'autres moins. Toutefois, pour la viabilité d'un procédé industriel de production de PC, de nombreux paramètres économiques sont à prendre en considération, et notamment le coût des matières premières. Ainsi, l'emploi d'une source de carbone comme le perméat de lait comprenant du lactose ne permet pas d'obtenir des rendements en PC aussi élevés qu'avec le glycérol mais l'économie globale du procédé avec l'emploi du perméat de lait reste avantageuse du fait qu'il s'agit d'un sous-produit de l'industrie laitière difficile à recycler. Elle est d'autant plus avantageuse que la mise en œuvre du procédé selon l'invention permet d'obtenir une forte densité cellulaire avec une faible teneur en glycogène, ce qui facilite l'extraction de la PC en fin de procédé.

La biomasse obtenue après maturation a la composition suivante :

Biomasse maturée	Composition en % de la matière sèche		
	Protéines	glycogène	C-PC
Biomasse cible	> 45%	< 20%	> 1,5%
Biomasse préférée	55% à 70%	5% à 20%	5 à 10%

Les conditions particulières de mise en œuvre de la phase de maturation par limitation de la source de carbone pour ces deux modes de culture sont précisées ci-après.

Culture en Batch/Fed Batch.

Sur une culture en mode « Fedbatch », le procédé de culture par fermentation selon l'invention comprend une première phase de croissance cellulaire sur un milieu de culture comprenant une source de carbone telle que définie précédemment, de manière à obtenir une densité cellulaire dans le milieu de culture d'au moins 30 g/L de MS. L'homme du métier saura définir la composition des milieux de culture appropriés pour obtenir une telle densité cellulaire et en particulier la teneur en source de carbone, notamment au regard des procédés de l'état de la technique décrits notamment dans les demandes de brevets WO 2017/050917, WO 2017/093345 et WO 2018/178334.

Une fois la densité cellulaire recherchée obtenue on effectue une phase de «maturation» qui consiste à sevrer la souche en substrat carboné organique.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la phase de maturation est déclenchée une fois que la culture en phase de croissance atteint au moins 30 g/L de MS, de préférence au moins 80 g/L de MS, plus préférentiellement au moins 100 g/L de matière sèche.

Durant la phase Fed-batch on alimente la culture avec un milieu d'alimentation comprenant au moins 100 g/l de substrat carboné, de préférence au moins 200 g/l de substrat carboné, plus préférentiellement au moins 500 g/l de substrat carboné. Afin de limiter l'accumulation de glycogène pendant la phase Fed-batch. L'homme de métier saura définir les débits d'alimentation permettant d'avoir des teneurs en substrat carboné dans le moût de fermentation inférieures 5 g/L, de préférence inférieures à 1 g/L, plus préférentiellement inférieures à 0,1 g/L.

La phase de croissance est suivie par une phase de maturation. Durant cette phase de maturation on peut observer surtout une baisse de la masse sèche par litre de moût liée à la consommation des sucres de réserve accumulés pendant la croissance, en particulier le glycogène. De façon concomitante on peut observer une augmentation de la quantité de phycocyanine par gramme de matière sèche. Il en est de même pour la teneur en protéines. Ce procédé de maturation permet d'obtenir une biomasse à teneur faible en glycogène.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention on alimente la culture avec un

milieu d'alimentation de maturation ne comprend pas de source de carbone. Il est entendu que l'absence de source de carbone est observée également dans le cas où le milieu d'alimentation de maturation comprendrait des traces détectables de source de carbone.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le sevrage est total, c'est à dire que l'on arrête d'alimenter la culture des cellules en milieu de culture, les cellules engageant leur maturation en se nourrissant des éléments résiduels du mout de fermentation et de leurs réserves cellulaires.

De manière avantageuse, la biomasse obtenue comprend moins de 20% de glycogène en masse par rapport à la masse de matière sèche (% de la MS), de préférence moins de 15% de la MS, plus préférentiellement de moins de 10% de la MS.

Le temps de maturation peut-être plus ou moins long en fonction de la température de culture. Plus la température se rapprochera de celle de l'optimum de croissance plus la phase de maturation sera courte.

Il est possible de réaliser également des cultures en mode « FedBatch » en réalisant de manière concomitante les phases de croissance et de maturation en imposant par l'alimentation en source de carbone un taux de croissance plus faible, limitant ainsi l'accumulation de glycogène dans la souche. Le taux de croissance pour effectuer cette maturation est déterminé en fonction du taux de croissance maximal de la souche que l'homme du métier saura déterminer. Ce taux de croissance devra être inférieur à 80 % du taux de croissance maximal de la souche, préférentiellement inférieur à 70% du taux de croissance maximal de la souche, plus préférentiellement inférieur à 50% du taux de croissance maximal de la souche.

Le procédé selon l'invention en mode « FedBatch » permet d'obtenir des moûts de fermentation comprenant au moins 70 g/L de MS (figure 4), et une biomasse avec une teneur en PC, en particulier en C-PC, d'au moins 10 mg/g de MS (figure 5) et une teneur en protéines d'au moins 40% de la MS (figure 5).

Culture en continu.

La croissance en continu avec une limitation en substrat a déjà été décrite par Sloth et al., 2006 avec des niveaux de détection inférieurs à 0,05 g/l, ce que les auteurs estiment être la limite de détection analytique. Dans ce cas de figure le milieu d'alimentation est apporté en continu dans la culture mais est consommé presque instantanément par les cellules et donc n'est pas quantifiable. Le but des auteurs dans cet article est de limiter l'inhibition de la synthèse de PC lié à une concentration en glucose significative dans le milieu, le glucose étant connu pour réprimer la synthèse de PC. Les teneurs en PC dans ces conditions sont très faibles environ 28 mg/g de matière sèche, avec une teneur en biomasse de l'ordre de 5g/l de matière sèche.

L'objet de l'invention est de réaliser une culture en continu pour augmenter la

productivité en biomasse et en PC par rapport à une culture en Fed-Batch. Il est possible, par le procédé selon l'invention, d'atteindre une masse sèche de 65 -70 g/l, voir plus, et un contenu en PC compris entre 25 et 90 mg/g de MS, voire plus.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la phase de maturation est mise en œuvre par transfert d'une partie du moût de la culture en continu dans une cuve sans apport nutritif. Comme pour le mode de culture en « FedBatch » décrit précédemment, il y a de manière concomitante une diminution de la teneur en glycogène et une augmentation de la teneur en phycocyanines et en protéines.

L'homme du métier saura déterminer le temps nécessaire à la maturation en fonction de paramètres connus comme la *température à laquelle la biomasse est maintenue sans alimentation et en fonction de l'objectif recherché. Ce temps de maturation sera d'au moins 12h, préférentiellement au moins 48h, plus préférentiellement au moins 72h.*

On peut aussi mettre en œuvre simultanément les étapes de croissance et de maturation en imposant un taux de croissance réduit via le débit du milieu d'alimentation. De manière avantageuse, le taux de croissance est inférieur à 0,06 h-1, préférentiellement inférieur à 0,03 h-1, plus préférentiellement inférieur à 0,015h-1.

De manière avantageuse, le taux de croissance est inférieur à 80% du taux de croissance maximal de la souche, préférentiellement inférieur à 60% du taux de croissance maximal de la souche, plus préférentiellement inférieur à 40% du taux de croissance maximal de la souche. Dans la figure 7, après 400h de culture, le taux de croissance a été réduit à une valeur inférieure à 80% du taux de maximal de croissance, ce qui a permis d'augmenter la teneur en PC et en protéines dans la biomasse et de réduire la teneur en glycogène, par rapport au taux de croissance initialement imposé.

La teneur en source de carbone assure l'obtention d'une teneur en matière sèche d'au moins 65 g/L, voire d'au moins 70 g/L, plus particulièrement d'au moins 80 g/L.

La biomasse ainsi obtenue avec maturation séparée ou simultanée à un contenu en glycogène inférieur à 20%, avantageusement de moins de 15% voire de moins de 10%. La biomasse obtenue a une teneur en protéines d'au moins 45% de la MS, avantageusement d'au moins 50%.

La teneur en phycocyanine, en particulier en C-PC sera d'au moins 20 mg/g de MS, avantageusement de 25 à 50 mg/g de MS. Avec certaines sources de carbone, comme les polyols, on peut atteindre des teneurs en C-PC supérieures à 50 mg/g de MS.

Production de Porphyrine dans le moût de fermentation (b.1).

Plusieurs études ont démontré que plusieurs étapes clés de la voie de synthèse de la phycocyanine et de la chlorophylle sont induites par la lumière et d'autres réprimées en présence de substrat organique dans le milieu (Foley *et al.,* 1982 ; Brown *et al.,* 1982 ; Troxler *et al.,* 1989 ; Rhie and Beale, 1994 ; Stadnichuck *et al.,* 1998). D'après la littérature la

culture en hétérotrophie conduit à l'excrétion de coproporphyrine dans le milieu de croissance et provoque une réduction des teneurs en pigment dans la cellule (phycocyanobiline et chlorophylle) lors du passage du coproporphyrinogène III au protoporphyrinogène IX. En condition mixotrophe, la lumière induit à la fois la biosynthèse de pigments photosynthétiques et l'excrétion de porphyrines dans le milieu. Le passage d'une forme de porphyrine à une autre se faisant parfois par réaction spontanée, il est donc possible de retrouver plusieurs formes de porphyrines dans le milieu de croissance (Brown *et al.,* 1982 ; Stadnichuck *et al.,* 1998).

Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, la mise en œuvre du procédé selon l'invention n'entraine pas d'excrétion de porphyrine tant qu'une source de carbone organique, notamment glucose, glycérol, lactose, ou saccharose, est présente dans le milieu. Les porphyrines ne sont détectées que pendant la phase de maturation (sans carbone organique dans le milieu) que ce soit pour une culture en Fed-batch ou en continu. Lors d'ajout de substrat organique dans le milieu après une phase de maturation on peut observer une re-consommation des porphyrines par les cellules et un retour à des niveaux non détectables de ces porphyrines dans le jus de fermentation.

Après une phase de maturation selon l'invention, on obtient un moût de fermentation comprenant une biomasse avec une teneur faible en glycogène, riche en protéines et en PC, telle que définie plus haut, et un jus contenant des porphyrines.

Ces porphyrines produites par les ARUs, en particulier par *Galdieria sulphuraria* sont des chélatants naturels qui peuvent être utilisés par exemple pour des traitements contre des nématodes (US 2006/0206946). Certaines molécules comme la Protoporphyrine IX pourraient également avoir un intérêt dans le domaine médical pour des traitements de cancers par photothérapie (Huang *et al.,* 2015)

L'invention concerne donc un procédé qui comprend une étape de récupération du jus de fermentation et d'extraction des porphyrines à partir de ce jus.

Le jus de fermentation est récupéré par toutes méthodes usuelles de séparation de la biomasse, en particulier par centrifugation (centrifugeuse à assiettes ou sedicanteur), bien connues de l'homme du métier, ou par filtration (filtre plaque, filtre presse, filtration tangentielle céramique ou organique).

Les porphyrines peuvent être extraites par des méthodes usuelles, comme la chromatographie (Chromatographie d'affinité ou d'exclusion de taille).

Les porphyrines extraites peuvent être purifiées puis conditionnées pour leur usage ultérieur, en particulier en thérapie.

Broyage de la biomasse (c.1).

Pour extraire les phycocyanines et/ou les protéines de la biomasse, il est nécessaire d'effectuer une lyse cellulaire qui libérera les produits recherchés. Les ARUs et en particulier

Galdieria sulphuraria ont une paroi cellulaire très résistante qui rend difficile la lyse par des méthodes usuelles à moins de se mettre dans des conditions opératoires qui vont dégrader les phycocyanines recherchées.

Or le rendement de produit récupéré, phycocyanines et/ou protéines, ne dépend pas que de la teneur en produit dans la biomasse, mais aussi de la capacité à en extraire le maximum de cette biomasse. Cette capacité d'extraction dépendra d'une part de l'efficacité de la lyse cellulaire, mais aussi de sa mise en œuvre dans des conditions qui n'entrainent pas de dégradation substantielle des phycocyanines.

Le broyage s'axe autour de deux problématiques majeures, à savoir : le taux de broyage, et la chaleur générée par la friction mécanique. Dans le cas de la phycocyanine, cette maitrise de la chaleur est d'autant plus importante car il s'agit d'une molécule thermosensible. Des essais ont été réalisés avec un homogénéisateur à haute pression de type Bertoli dans les conditions décrites dans l'exemple 7. Le broyage par homogénéisateur haute pression nécessite d'effectuer plusieurs passages pour obtenir un taux de lyse conséquent. Le passage d'une biomasse de *Galdieria sulphuraria* n'a pas permis d'obtenir un taux de lyse supérieur à 40 % malgré 3 passages successifs. A chacun des passages une hausse de la température a pu être observée jusqu'à atteindre une biomasse ayant une température aux alentours de 70°C ayant une couleur verte marron où la majorité de phycocyanine a été dégradée.

L'invention concerne donc un procédé de lyse des cellules d'ARUs, en particulier de *Galdieria sulphuraria* caractérisé en ce que la lyse est faite par broyage avec un broyeur à billes en maintenant la biomasse d'ARUs pendant le broyage à une température inférieure à 50°C.

L'invention consiste à réguler la température de la biomasse pendant le broyage, à l'intérieur de la chambre de broyage, pour que celle-ci n'excède pas les 50°C, préférentiellement 47°C, plus préférentiellement 40°C et moins. Cette régulation de température peut se faire par un système de refroidissement par eau de la double enveloppe du broyeur ou bien par injection dans le broyeur d'une biomasse préalablement refroidie à des températures inférieures à 20°C.

Le procédé de broyage selon l'invention s'applique pour une biomasse indépendamment de son mode d'obtention (mode de fermentation et isolation). Il est particulièrement adapté et de manière préférentielle pour une biomasse obtenue par le procédé de culture selon l'invention décrit plus haut avec une teneur diminuée en glycogène.

L'invention concerne aussi la biomasse lysée ainsi obtenue.

Les inventeurs ont pu constater que la biomasse broyée selon l'invention permettait une meilleure digestibilité des protéines que la biomasse non broyée. Cette amélioration de la digestibilité est montrée par des tests de digestibilité *in vitro* (Boisen and Fernandez,

1995).

Echantillons	Digestibilité	Protéines totales
Spiruline	79,3 (± 2) %	68,2 (± 2) %
G. sulphuraria (broyée)	92,2 (± 2) %	63,4 (± 1,9) %
G. sulphuraria (non broyée)	66 (± 2) %	63,9 (± 1,9) %

L'invention concerne donc une biomasse d'ARUs broyée et en particulier une biomasse de *Galdieria sulphuraria* susceptible d'être obtenue par le procédé de broyage selon l'invention.

L'invention concerne en particulier une la biomasse broyée de *Galdieria sulphuraria* de composition décrite ci-dessous.

Facteurs Nutritionnels	
Valeur Energétique	394 (± 22) kcal/100 g
Protéines	64.8 (± 9.3) g/100 g
Lipides	6.15 (± 0.5) g/100 g
Fibres	7.65 (± 5.16) g/100 g
Carbohydrates	16.1 (± 2.2) g/100g
Cendres	4.1 (± 0.6) g/100 g
Humidité	4.1 (± 0.6) g/100 g
Phycocyanine	7 (± 0.3) g/100 g

La composition en acides aminés est donnée dans le Tableau suivant.

g/100g	**Spiruline**	***Galdieiria sulphuraria***
Tryptophan	0,84	0,76
Threonine	2,78	3,06
Aspartic acid	5,47	4,73
Serine	2,74	3,54
Lysine	2,7	3,45
Valine	3,48	3,15
Proline	2,04	2,17
Alanine	4,11	3,44
Phénylalanine +Tyrosine	5	5,55
Isoleucine	3,17	2,6
Glycine	2,85	2,30
Arginine	3,6	3,14

Leucine	5,02	4,1
Histidine	1,09	0,86
Acide Glutamique	8,02	7,41
Méthionine + cystéine	2,19	1,88

La composition Lipidique est la suivante :

Acides gras	% lipids totaux	g/100g
C14:0 Ac. myristique	**2,6**	**0,16**
C16:0 Ac. palmitique	**27,9**	**1,7**
C18:0 Ac. stéarique	**8,8**	**0,54**
C18:1 (n-9c) Ac. oléique	**33,5**	**2,1**
C18:2 (n-6c) Ac. linoléique (LA) ω6	**19,3**	**1,18**
C18:3 (n-3) Ac. α-linolénique (ALA) ω3	**1,8**	**0,1**
Ratio ω6 / ω3	**10,32**	

L'invention concerne aussi l'utilisation de cette biomasse broyée comme complément alimentaire ou comme aliment pour l'alimentation humaine ou animale.

Extraction de la phycocyanine (d1).

L'invention concerne aussi un procédé d'extraction de la phycocyanine à partir d'une biomasse de cellules lysées d'ARUs, en particulier de *Galdieria sulphuraria*, caractérisé en ce qu'il comprend des lavages successifs dans des quantités d'eau représentant au total moins de 4 fois, de préférence de 2 à 3 fois, plus préférentiellement environ 3 fois le volume total de biomasse lysée.

Cette biomasse lysée comprend une suspension de résidus cellulaires insolubles dans une solution aqueuse comprenant différents extraits cellulaires solubilisés suite à la lyse cellulaire, dont les phycocyanines. La biomasse lysée comprend avantageusement une matière sèche d'au moins 2%, préférentiellement d'au moins 5%, plus préférentiellement d'au moins 7%.

Le volume total d'eau (Ve) nécessaire à l'extraction est calculé en fonction du volume de la biomasse lysée à traiter (Vb) et représentera jusqu'à 4 fois ce volume (Ve/Vb est inférieur ou égal à 4). On peut bien entendu mettre en œuvre l'invention avec un volume total d'eau plus important, mais l'économie du procédé reste alors moins intéressante du fait des volumes d'eau à traiter par la suite pour récupérer la phycocyanine.

Ce volume total d'eau est ensuite scindé en plusieurs fractions qui serviront à extraire la phycocyanine par des passages successifs sur la biomasse, le nombre de fractions (n) étant d'au moins 2, de préférence au moins 3. L'homme du métier peut prévoir d'effectuer

l'extraction avec plus de 3 fractions d'eau, tout en devant prendre en considération l'ensemble des paramètres économiques de la mise en œuvre du procédé, comme le prix de revient de l'immobilisation du matériel et de la répétition des manipulations de la biomasse. De manière préférée, le nombre de fraction est de 3.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, les fractions ont des volumes respectifs différents les uns des autres. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, toutes les fractions ont le même volume égal à Ve/n.

L'homme du métier saura déterminer le nombre de fractions et le volume respectif de chaque fraction de manière à optimiser le procédé de préparation de phycocyanine qu'il mettra en œuvre.

Des lavages successifs des éléments insolubles culotés sont nécessaires pour extraire une quantité appropriée de la phycocyanine de la biomasse. Après plusieurs lavages, on constate que les proportions de C-PC et d'APC dans le culot sont inversées. On voit bien sur la figure 16 qu'il est préférable d'extraire la phycocyanine avec de petits volumes successifs d'eau plutôt qu'avec un grand volume équivalent d'eau (figure 16).

On trouve en ordonnée et en partant de la gauche du diagramme trois blocs S1, S2 et S3 qui correspondent à 3 extractions successives faites avec 3 fractions d'eau de volume égal, le volume total d'eau Ve étant de 1 fois le volume de biomasse Vb pour le premier bloc (dilution 1/2 en série), de 2 fois pour le deuxième bloc (dilution 1/3 en série) et de 3 fois pour le troisième bloc (dilution 1/4 en série). La barre S1 donne la valeur de PC extraite par la première extraction. La barre S2 donne la valeur cumulée de PC extraite par la première et la deuxième extraction. La barre S3 donne la valeur cumulée pour les 3 fractions employées de manière successive. On trouve ensuite 5 essais d'extraction en une seule fois avec différents volumes d'eau, de 5X à 12X.

D'après la figure 16, on peut voir qu'un volume d'eau initial plus important, lors de la première extraction, donne de meilleurs résultats jusqu'à une certaine limite (5X à 12X). En utilisant la méthode des extractions en série, nous pouvons constater un gain réel en termes d'efficacité d'extraction et de réduction d'utilisation d'eau. Par exemple, 3 séries d'extractions donnent de meilleurs résultats qu'une seule extraction et réduisent la quantité totale d'eau utilisée d'au moins un facteur 2.

Les eaux de lavages récupérées pour chaque extraction successive comprenant la phycocyanine peuvent être traitées séparément pour récupérer la phycocyanine ou bien assemblées avant cette récupération.

Le procédé d'extraction selon l'invention est adapté pour toute biomasse d'ARUs, en particulier de *Galdieria sulphuraria*, lysée, quel que soit la méthode de culture employée pour la production de la biomasse et la méthode employée pour la lyse cellulaire. De manière préférentielle, la méthode d'extraction selon l'invention est particulièrement adaptée pour une

biomasse avec de faibles teneurs en glycogène obtenues par le procédé selon l'invention décrit plus haut et/ou pour la biomasse lysée par la méthode de broyage selon l'invention définie plus haut.

La solution de phycocyanine obtenue est généralement traitée de manière à en isoler la phycocyanine. Les méthodes pour récupérer la phycocyanine d'une solution aqueuse sont bien connues de l'homme du métier. On citera en particulier la précipitation acide décrite dans la demande de brevet WO 2018/178334.

Elle peut également être isolée par précipitation sélective qui consiste à ajuster le pH de la solution initiale à une valeur choisie dans une plage de valeurs de pH dans laquelle la phycocyanine est moins soluble (également appelée plage d'instabilité) et à concentrer la phycocyanine dans la solution pour favoriser sa précipitation, puis à récupérer la phycocyanine précipitée. Cette plage d'instabilité va en particulier de pH 4,4 à 5,5 pour des phycocyanines résistantes aux pH acides produites par *Galdieria sulphuraria*. Bien entendu, l'homme du métier saura déterminer une telle plage d'instabilité pour d'autres phycocyanines produites par d'autres ARUs par simple expérimentation. Une telle méthode est décrite en particulier dans la demande de brevet FR 1900278 déposée le 11 janvier 2019.

On peut également, avant récupération de la phycocyanine, traiter la solution aqueuse pour baisser sa teneur en glycogène, par une dégradation enzymatique du glycogène. Les traces de ces polysaccharides susceptibles d'être entrainés avec la précipitation des phycocyanines, déjà faibles, sont encore plus réduites lorsque les polysaccharides sont lysés en polyosides de faibles poids moléculaires encore plus solubles. Au surplus, lorsque l'étape de concentration est réalisée par filtration tangentielle, les polyosides de faibles poids moléculaires sont éliminés avec les autres petites molécules en solution, ce qui favorise l'obtention de solution en phycocyanines à plus grande teneur encore. En particulier, la lyse enzymatique du glycogène est mise en œuvre à un pH inférieur ou égal à 5, de préférence d'environ 4,5, à température ambiante. Ces conditions de température et de pH sont particulièrement adaptées pour préserver la phycocyanine au cours de la réaction enzymatique. Les enzymes actives en condition de pH acide et à température ambiante sont choisies parmi des enzymes connues pour une activité glucuronidase α1-4 , glucosidase α1-4 (ou alpha-glucosidase). On citera en particulier des pectinases connues pour dégrader la pectine et en particulier des pectinases extraites de champignons filamenteux comme *Aspergillus*, plus particulièrement de pectinases extraites d'*Aspegillus aculeatus*, comme les enzymes commercialisées sous la dénomination Pectinex® par la société Novozymes. La lyse enzymatique du glycogène pourra également être réalisée avec une glucosidase α1-6 en plus de la glucuronidase α1-4 ou glucosidase α1-4. Des glucosidases α1-6 actives dans les conditions de pH et de température exposées ci-dessus sont également connues de l'homme du métier. Il s'agit en particulier des pullulanases

connues pour hydrolyser les liaisons glucosidiques α1-6 de la pullulane, notamment connues pour supprimer les ramifications de l'amidon. Il s'agit généralement d'enzymes extraites de bactéries, notamment des genres *Bacillus*. US 6,074,854, US 5,817,498 et WO 2009/075682 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 » (Novozymes), « Novozym 26062 » (Novozymes) et « Optimax L 1000 » (DuPont-Genencor). On notera que des mélanges pullulanases/alpha-amylases sont décrits dans l'état de la technique, mais en particulier pour produire du sirop de glucose à partir de l'amidon (US 2017/159090). L'homme du métier saura déterminer les conditions réactionnelles appropriées pour réduire au mieux les quantités de glycogène en fonction de la teneur initiale en glycogène dans la solution à traiter, la quantité d'enzymes employée et la pureté recherchée pour la phycocyanine produite. Une telle méthode est décrite en particulier dans la demande de brevet FR 1900278 déposée le 11 janvier 2019.

La phycocyanine récupérée peut ensuite être purifiée par des méthodes connues de l'homme du métier, comme la diafiltration.

La phycocyanine obtenue par le procédé d'extraction selon l'invention a un indice de pureté d'au moins 2, de préférence d'au moins 3, voire supérieur à 4. Cet indice de pureté est mesuré par mesure d'absorbance avec la méthode décrite par Moon & al. (2014).

De manière avantageuse, la phycocyanine obtenue est une phycocyanine qui a un rapport glycogène/phycocyanines (en poids sec) inférieur à 6, avantageusement inférieur à 4, de préférence inférieur à 3, plus préférentiellement inférieur à 2,5, encore plus préférentiellement inférieur à 1.

L'invention concerne également l'utilisation des phycocyanines obtenues comme colorants, en particulier comme colorants alimentaires. Elle concerne aussi des aliments, solides ou liquides, en particulier des boissons qui comprennent une phycocyanine obtenue par le procédé d'extraction selon l'invention.

Les résidus solides restant après lavage sont également récupérés. Il s'agit d'un résidu de biomasse enrichi en protéines qui peut également être employé pour la préparation de compléments alimentaires ou d'aliments pour l'alimentation humaine ou animale.

Selon un mode particulier de réalisation, le lavage de la biomasse lysée comprend une acidification de la suspension de biomasse à un pH inférieur ou égal à 5. La biomasse résiduelle obtenue après extraction de la phycocyanine comprend au moins 60% de protéines par rapport à la matière sèche, et au moins une teneur en sucres totaux inférieure à 20% par rapport à la matière sèche et/ou une teneur en glycogène inférieure à 10% par rapport à la matière sèche et/ou teneur en matières grasses d'au moins 5% par rapport à la matière sèche. Une telle méthode de récupération d'une biomasse enrichie en protéines est

notamment décrite dans la demande de brevet FR 1857950 déposée le 5 septembre 2018.

EXEMPLES.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Souche.

Galdieria sulphuraria UTEX#2919, également appelée *Cyanidium caldarium*.

Conditions de culture en mode « FedBatch ».

Les cultures sont réalisées dans des bioréacteurs de 1 à 2 L de volume utile avec automates dédiés et supervision par station informatique. Le pH de la culture est régulé via l'ajout de base (solution d'ammoniaque 14% NH3 w/w) et/ou d'acide (solution d'acide sulfurique 4N). La température de culture est fixée à 37°C. L'agitation est réalisée grâce à 2 mobiles d'agitation : 1 turbine Rushton à 6 pâles droites positionnées à l'extrémité inférieure de l'arbre d'agitation au-dessus du "sparger" et 1 hélice tripâle HTPG2 placé sur l'arbre d'agitation. La pression en oxygène dissout dans la phase liquide est régulée dans le milieu tout au long de la culture par la vitesse de rotation de l'arbre d'agitation (250-1800 t/min), le débit de ventilation par l'air et/ou d'oxygène. Les paramètres de régulation, intégrés dans l'automate de supervision, permettent de maintenir une pression partielle en oxygène dissout dans la phase liquide comprise entre 5 et 30 % de la valeur de saturation par l'air dans des conditions identiques de température, de pression et de composition du milieu. Le temps de culture a été compris entre 50 et 300 heures.

Conditions de culture en mode continu.

Les cultures sont réalisées dans des réacteurs de 1 à 2 L de volume utile avec automates dédiés et supervision par station informatique. Le pH de la culture est régulé via l'ajout de base (solution d'ammoniaque 14% (w NH3/w) et/ou d'acide (solution d'acide sulfurique 4N). La température de culture est fixée à 37°C. L'agitation est réalisée grâce à 2 mobiles d'agitation : 1 turbine Rushton à 6 pâles droites positionnée à l'extrémité inférieure de l'arbre d'agitation au-dessus du "sparger" et 1 hélice tripâle HTPG2 placée sur l'arbre d'agitation. La pression en oxygène dissout dans la phase liquide est régulée dans le milieu tout au long de la culture, par la vitesse de rotation de l'arbre d'agitation (250-1800 t/min), le débit de ventilation par l'air et/ou d'oxygène. Les paramètres de régulation, intégrés dans l'automate de supervision, permettent de maintenir une pression partielle en oxygène dissout dans la phase liquide comprise entre 5 et 30 % de la valeur de saturation par l'air dans des conditions identiques de température, de pression et de composition du milieu. Le temps de culture a été compris entre 50 et 300 heures. Le débit d'alimentation du fermenteur en continu est ajusté pour qu'à aucun moment la source de carbone ne soit détectée dans le milieu de culture.

Milieu d'alimentation.

Pour le milieu d'alimentation en mode « Fed-batch » ou en continu, la quantité de source de carbone est ajustée en fonction de la masse sèche cible de fin de « FedBatch » ou de 100g/L de masse sèche pour la culture en continu. Tous les autres éléments du milieu sont ajoutés en respectant les proportions utilisées pour le milieu pied de cuve défini dans les exemples.

Suivi des cultures.

Le suivi de croissance se fait par mesure de la masse sèche (filtration sur filtre GF/F, Whatman, puis séchage en étuve, à 105°C, pendant 24 h minimum avant pesée).

Dosage des porphyrines.

Le dosage des acides organiques a été réalisé par HPLC (Shimatsu) en mode isocratique H_2SO_4 (5 mM) et détection RI (Refractive Index).

Dosage de PC.

L'estimation de la teneur en phycocyanine par gramme de matière sèche a été réalisée à différents temps de culture grâce à la méthode décrite par Moon et collaborateur [Moon *et al.*, Korean J. Chem. Eng., 2014, 1-6]

Dosage du glycogène.

L'estimation de la teneur en glycogène par gramme de matière sèche a été réalisée à différents temps de culture grâce à la méthode d'extraction décrite par Martinez-Garcia et collaborateur [Martinez-Garcia *et al.*, Int J Biol Macromol. 2016 ; 89:12-8].

Exemple 1 : Fermentation en mode Fed-batch avec phase de maturation sur glycérol.

Milieu de culture.

Pied de cuve : 30 g/L glycérol, 8 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 250mg/L KH2PO4, 716mg/L $MgSO_4$, 44mg/L $CaCl_2$, $2H_2O$, 0.2843849 g/L K_2SO_4, 0.07 g/L $FeSO_4$, $7H_2O$, 0.01236 g/L Na_2EDTA, 0.00657 g/L $ZnSO_4$,7H2O, 0.0004385 g/L $CoCl_2$,$6H_2O$, 0.00728 g/L $MnCl_2$,$4H_2O$, 0.005976 g/L $(NH_4)6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$, 0.005976 g/L $CuSO_4$,$5H_2O$, 0.00016 g/L $NaVO_3$, 0.01144 g/L H_3BO_3, 0.00068 g/L Na_2SeO_3.

Les résultats sont présentés dans les figures 2 et 3.

Exemple 2 : Fermentation en mode « Fed-batch » sur glucose avec phase de maturation.

Milieu de culture.

Pied de cuve : 30 g/L glucose, 8 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 250mg/L KH2PO4, 716mg/L $MgSO_4$, 44mg/L $CaCl_2$, $2H_2O$, 0.2843849 g/L K_2SO_4, 0.07 g/L $FeSO_4$, $7H_2O$, 0.01236 g/L Na_2EDTA, 0.00657 g/L $ZnSO_4$,7H2O, 0.0004385 g/L $CoCl_2$,$6H_2O$, 0.00728 g/L $MnCl_2$,$4H_2O$, 0.005976 g/L $(NH_4)6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$, 0.005976 g/L $CuSO_4$,$5H_2O$, 0.00016 g/L $NaVO_3$, 0.01144 g/L H_3BO_3, 0.00068 g/L Na_2SeO_3.

Les résultats sont présentés sur les figures 4 et 5.

Exemple 3 : Fermentation en mode « Fed-Batch » sur saccharose avec phase de maturation

Milieu de culture

Pied de cuve : 30 g/L saccharose, 8 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 250mg/L KH2PO4, 716mg/L $MgSO_4$, 44mg/L $CaCl_2$, $2H_2O$, 0.2843849 g/L K_2SO_4, 0.07 g/L $FeSO_4$, $7H_2O$, 0.01236 g/L Na_2EDTA, 0.00657 g/L $ZnSO_4$,7H2O, 0.0004385 g/L $CoCl_2$,$6H_2O$, 0.00728 g/L $MnCl_2$,$4H_2O$, 0.005976 g/L $(NH_4)6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$, 0.005976 g/L $CuSO_4$,$5H_2O$, 0.00016 g/L $NaVO_3$, 0.01144 g/L H_3BO_3, 0.00068 g/L Na_2SeO_3.

Les résultats sont présentés sur les figures 6 et 7.

Exemple 4 : Fermentation en mode « Fed-Batch » sur Perméat de lait avec phase de maturation.

Milieu de culture.

Pied de cuve : 30 g/L perméat de lait, 8 g/L (NH4)2SO4, 716mg/L $MgSO_4$, 0.07 g/L $FeSO_4$, $7H_20$, 0.01236 g/L Na_2EDTA, 0.00657 g/L $ZnSO_4$,$7H_2O$, 0.0004385 g/L $CoCl_2$,$6H_2O$, 0.00728 g/L $MnCl_2$,$4H_2O$, 0.005976 g/L $(NH_4)6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$, 0.005976 g/L $CuSO_4$,$5H_2O$, 0.00016 g/L $NaVO_3$, 0.01144 g/L H_3BO_3, 0.00068 g/L Na_2SeO_3.

Les résultats sont présentés sur les figures 8 et 9.

Exemple 5 : Culture en Continu d'une souche de *Galdieria* sur glycérol.

Milieu de culture.

Pied de cuve : Pied de cuve : 30 g/L glycérol, 8 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 250mg/L KH2PO4, 716mg/L $MgSO_4$, 44mg/L $CaCl_2$, 2H2O, 0.2843849 g/L K_2SO4, 0.07 g/L FeSO4, 7H20, 0.01236 g/L Na2EDTA, 0.00657 g/L ZnSO4,7H2O, 0.0004385 g/L CoCl2,6H2O, 0.00728 g/L MnCl2,4H2O, 0.005976 g/L (NH4)6Mo7O24, 4H2O, 0.005976 g/L CuSO4,5H2O, 0.00016 g/L NaVO3, 0.01144 g/L H3BO3, 0.00068 g/L Na2SeO3.

Les résultats sont présentés sur les figures 10 et 11.

Exemple 6 : Culture en Continu d'une souche de *Galdieria* sur perméat de lait.

Milieu de culture.

Pied de cuve : Pied de cuve : 30 g/L perméat de lait, 8 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 716mg/L $MgSO_4$, 0.2843849 g/L K_2SO_4, 0.07 g/L $FeSO_4$, $7H_2O$, 0.01236 g/L Na_2EDTA, 0.00657 g/L $ZnSO_4$,$7H_2O$, 0.0004385 g/L $CoCl_2$,$6H_2O$, 0.00728 g/L $MnCl_2$,$4H_2O$, 0.005976 g/L (NH4)6Mo7O_{24}, $4H_2O$, 0.005976 g/L $CuSO_4$,$5H_2O$, 0.00016 g/L $NaVO_3$, 0.01144 g/L H_3BO_3, 0.00068 g/L Na_2SeO_3.

Les résultats sont représentés sur les figures 12 et 13.

Exemple 7 : Broyage par HHP sans refroidissement de biomasse.

Mode opératoire.

Une biomasse issue d'une culture selon un mode continu est lavée par centrifugations successives puis concentrée jusqu'à une concentration de $1.4.10^{10}$ cellules/mL. Un volume

de 1L de biomasse est alors refroidi à 16°C avant de subir 3 homogénéisations successives à 1200 bars sur homogénéisateur Bertoli Atomo, sans refroidissement entre chaque série. Pour chacune d'elle est suivi, la température de la biomasse, la lyse cellulaire par dénombrement avec cellules de Malassez et la concentration en phycocyanine dans la biomasse.

Les températures de broyage mesurées pour les 3 homogénéisations successives sont respectivement de 46,7°C, 57,6 °C et 67 °C.

Les pourcentages de cellules non lysées et les teneurs en phycocyanine sont donnés sur la figure 12.

Exemple 8 : Broyage par HHP avec refroidissement de biomasse.

Mode opératoire.

Une biomasse issue d'une culture selon un mode continu est lavée par centrifugations successives puis concentrée jusqu'à une concentration de 2.10^{10} cellules/mL. Un volume de 1L de biomasse est alors refroidi à 16°C avant de subir 3 homogénéisations successives à 1200 bar sur homogénéisateur Bertoli Atomo. Entre chaque homogénéisation la température de la biomasse est ramenée à 16°C. De la même façon sont suivies, la température de la biomasse, la lyse cellulaire par dénombrement avec cellules de Malassez et la concentration en phycocyanine dans la biomasse.

Les températures de la biomasse mesurées en début et fin de broyage sont les suivantes.

T° début de broyage	16°C	16,1°C	15,4°C	14,4°C
T° fin de broyage	42°C	45,2°C	47,7°C	46°C

Les pourcentages de cellules non lysées et les teneurs en phycocyanine sont donnés sur la figure 13.

Il est apparu également que plus le pH de la biomasse broyée est acide et plus la phycocyanine est sensible à la dégradation par la chaleur. Il est donc préférable d'ajuster le pH des cellules entre 5 et 7 avant de les broyer, et ce qu'elle que soit la méthode de broyage si celle-ci s'accompagne d'un dégagement de chaleur.

Exemple 9 : Thermosensibilité de la phycocyanine dans la biomasse.

Mode opératoire.

Une biomasse issue d'une culture selon un mode continu est lavée par centrifugations successives puis concentrée à une matière sèche de 150 mg/g avant d'être broyée par broyeur à billes (WAB, multilab) dans des conditions permettant la préservation du pigment et un taux de lyse de 90%. Des échantillons de lysat sont ajustés à des pH de 2.4 à 6 et une cinétique de 0 à 120 minutes est réalisée sur différentes températures allant de 50 à 70°C. Pour chaque temps une quantification de la phycocyanine est réalisée.

Les résultats sont présentés sur la figure 14.

Exemple 10 : Effet de la taille des billes sur le broyage et le contrôle de la température.

Mode opératoire.

Des cellules de *Galdieria sulphuraria* sont centrifugées 5 min à 20 000g puis re-suspendues dans un tampon Tris-Cl 10 mM pH 7. Un aliquot de cellules 1/3 du volume d'un tube Eppendorf de 2 ml Safelock est rempli avec cette suspension, un autre 1/3 avec des billes céramiques du diamètre testé (Netzsch 0,8 mm ; 0,6 mm ; 0,3 mm ; Plus 0,2 mm ; Nano 0,2 mm ; Plus 0,1 mm ; et 0,05 mm). Les tubes sont placés dans un appareil de type TissueLyser II (Qiagen) et agités 2 min à 30Hz. Le taux de lyse se calcule par dénombrement à la cellule de Malassez comparativement au tube témoin ne contenant pas de billes.

Les résultats sont représentés sur la figure 15.

On voit que le diamètre des billes affecte grandement l'efficacité du broyage. Plus le diamètre de bille diminue plus le taux de lyse augmente jusqu'à atteindre un optimum pour des billes de 0,2 mm de diamètre. En dessous de ce diamètre l'efficacité de lyse diminue de nouveau jusqu'à atteindre le taux le plus faible pour les billes de 0,05 mm de diamètre.

Des taux de broyage proche de 100% peuvent être atteint avec des billes plus grosses si le temps de broyage est augmenté. Toutefois, l'augmentation du temps de broyage se traduit par une élévation de la température dans la chambre de broyage avec le débit d'alimentation du broyeur à billes imposé. Cette élévation de température se fait au détriment de la teneur en phycocyanine de la biomasse lysée.

Exemple 11 : Effet du taux de remplissage de la chambre sur le taux de broyage.

Mode opératoire.

Les cellules sont broyées dans un broyeur à billes de modèle Multilab de chez WAB. La chambre de broyage est remplit avec des billes en céramique avec de 0,8 mm de diamètre a 50% et 65%. Le taux de remplissage à 65% étant le taux maximal de remplissage. La vitesse de module de broyage et le débit sont identiques dans les deux cas. Le taux de lyse en sortie de broyage se calcule par dénombrement à la cellule de Malassez comparativement à la biomasse d'entrée non broyée.

On constate que le meilleur taux de lyse est obtenu lorsque la chambre est à son taux de remplissage maximum recommandé par le fabriquant soit 65%. Lorsque le taux de remplissage est inférieur à 65% le taux de lyse diminue.

Exemple 12 : Effet de la concentration en cellules sur le taux de broyage et le contrôle de la température.

Mode opératoire.

Les cellules sont broyées dans un broyeur à billes de modèle Multilab de chez WAB.

La chambre de broyage est remplit avec des billes en céramique de diamètre 0,8 mm de diamètre à un taux 65%. La vitesse de module de broyage et le débit sont identiques dans tous les cas. Le taux de lyse en sortie de broyage se calcule par dénombrement à la cellule de Malassez comparativement à la biomasse d'entrée non broyée.

On voit que pour les mêmes paramètres de broyage (vitesse de module de broyage, débit d'alimentation, taux de remplissage de la chambre, diamètre de bille) le taux de lyse obtenu était équivalent quelque soit la concentration en cellules dans le produit à broyer (biomasse à 10%, 20% ou 30% de matière sèche). Toutefois, il faut noter que plus la masse sèche du produit d'entrée est élevée plus la température du lysat en sortie de broyeur est élevée également. Pour augmenter la productivité de l'étape de broyage en augmentant la masse sèche d'entrée il faut prévoir également des capacités de refroidissement adaptées au maintien d'une température de lysat inférieure à 45°C.

Exemple 13 : Estimation des débits sur un broyeur à billes de type industriel.

Matériel et méthodes.

Souche : *Galdieria sulphuraria (aussi appelée Cyanidium caldarium) UTEX#2919*

Mode opératoire.

Les cellules sont broyées dans un broyeur à billes de modèle Multilab de chez WAB. La chambre de broyage (600 ml) est remplit avec des billes en céramique de diamètre 0,8 mm à un taux de 65%. La vitesse de module de broyage et le débit d'alimentation sont identiques dans les deux cas. Le taux de lyse en sortie de broyage se calcule par dénombrement à la cellule de Malassez comparativement à la biomasse d'entrée non broyée. Pour un taux de broyage de 95 -100% le débit appliqué dans ces conditions est compris entre 1 et 2 litres par heure. Une extrapolation de ces débits a été faite en utilisant les résultats obtenus dans l'Exemple 10.

	Multilab (0,6 mL)	**AP60 (60L)**
Taille de billes	**Alimentation L/h**	**Alimentation L/h**
0,8 mm	1 à 2	100 à 200
0,6 mm	1,4 à 2,8	140 à 280
0,3 mm	1,7 à 3,4	170 à 340
0,2 mm	2,3 à 4,6	230 à 460

RÉFÉRENCES.

- Bailey, RW., and Staehelin LA. The chemical composition of solated cell walls of Cyanidium caldarium. Microbiology 54, 2 (1968): 269–276.
- Boisen, S. and J. A. Fernandez. 1995. Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by in vitro analyses.

Anim. Feed Sci. Technol. 51:29-43.

- Li SY, Shabtai Y, and Arad S. Floridoside as a carbon precursor for the synthesis of cell-wall polysaccharide in the red microalga Porphyridium sp.(Rhodophyta). Journal of phycology 38, no 5 (2002): 931–938.
- Marquardt, J, and Rhiel E. The membrane-intrinsic light-harvesting complex of the red alga Galdieria sulphuraria (formerly Cyanidium caldarium): biochemical and immunochemical characterization. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1320, 2 (1997): 153 64.
- Martinez-Garcia M, Stuart MC, van der Maarel MJ. Characterization of the highly branched glycogen from the thermoacidophilic red microalga Galdieria sulphuraria and comparison with other glycogens. Int J Biol Macromol. 2016 Aug;89:12-8.
- Martinez-Garcia M, Kormpa A, van der Maarel MJEC. The glycogen of Galdieria sulphuraria as alternative to starch for the production of slowly digestible and resistant glucose polymers. Carbohydr Polym. 2017 Aug 1;169:75-82
- Moon M, Mishra S.K, Kim C.W, Suh W.I, Park M.S, and Yang J-W. Isolation and Characterization of Thermostable Phycocyanin from Galdieria Sulphuraria. 2014. 31:1–6.
- Sloth J.K, Wiebe M.G, Eriksen N.T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga Galdieria sulphuraria. Enzyme and Microbial Technology 38 (2006) 168–175
- Huang H, Song W, Rieffel J, and Lovell J.F. Emerging applications of porphyrins in photomedicine. Frontiers in physics (2015) 3 – 23.
- Eriksen, NT.Production of Phycocyanin—a Pigment with Applications in Biology, Biotechnology, Foods and Medicine. Applied Microbiology and Biotechnology 80, 1 (2008): 1 14.
- Cruz de Jesús, Verónica, Gabriel Alfonso Gutiérrez-Rebolledo, Marcela Hernández-Ortega, Lourdes Valadez-Carmona, Angélica Mojica-Villegas, Gabriela Gutiérrez-Salmeán, et German Chamorro-Cevallos. « Methods for Extraction, Isolation and Purification of C-Phycocyanin: 50 Years of Research in Review » 3, no 1 (2016).
- Montalescot V, Rinaldi T, Touchard R, Jubeau S, Frappart M, Jaouen P, Bourseau P, et Marchal L. Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to Porphyridium cruentum and Nannochloropsis oculata. Bioresource Technology 196 (2015): 339 46.

REVENDICATIONS

1. Procédé optimisé de culture et de valorisation d'algues rouges unicellulaires (ARUs) comprenant des étapes (a) de culture par fermentation des ARUs, (b) de récupération de la biomasse et (c) de lyse cellulaire et le cas échéant une étape (d) d'extraction de produits valorisables à partir de la biomasse lysée, caractérisé en ce qu'il comprend une étape (c1) de lyse par broyage avec maintien de la biomasse pendant le broyage à une température inférieure à 50°C.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend également une étape (d1) d'extraction des phycocyanines de la biomasse lysée par des lavages successifs dans des quantités d'eau représentant au total moins de 3 fois le volume total de biomasse lysée.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend également l'une des étapes suivantes

(a1) de culture par fermentation avec une phase de maturation avec limitation de l'apport en source de carbone dans le milieu de culture, et/ou

(b1) d'extraction de porphyrines à partir du jus de fermentation.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les ARUs appartiennent aux Genres Cyanidioschyzon, Cyanidium ou Galdieria.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que les ARUs appartiennent au Genre *Galdieria et à l'Espèce sulphuraria*.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les ARUs sont cultivées par fermentation en mode « FedBatch » ou en mode continu.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la température de broyage n'excède pas 47°C.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la température de broyage n'excède pas 40°C.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la température est maintenue par un système de refroidissement par eau de la double enveloppe du broyeur.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la température est maintenue par injection dans le broyeur d'une biomasse préalablement refroidie à des températures inférieures à 20°C.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la phycocyanine est récupérée à partir de la solution de lavage de la biomasse lysée.

12. Procédé optimisé de culture et de valorisation d'algues rouges unicellulaires (ARUs) comprenant des étapes (a) de culture par fermentation des ARUs, (b) de récupération de la biomasse et (c) de lyse cellulaire et le cas échéant une étape (d)

d'extraction de produits valorisables à partir de la biomasse lysée, caractérisé en ce qu'il comprend qu'il comprend une étape

(a1) de culture par fermentation avec une phase de maturation qui comprend la limitation de l'apport en source de carbone dans le milieu de culture,

et le cas échéant une étape

(b1) d'extraction de porphyrines à partir du jus de fermentation, et/ou

(c1) de lyse par broyage avec maintien de la biomasse pendant le broyage à une température inférieure à 50°C, et/ou

(d1) le cas échéant d'extraction des phycocyanines de la biomasse lysée par au moins 2 lavages successifs dans des quantités d'eau représentant au total moins de 4 fois le volume total de biomasse lysée.

13. Procédé optimisé de culture et de valorisation d'algues rouges unicellulaires (ARUs) comprenant des étapes (a) de culture par fermentation des ARUs, (b) de récupération de la biomasse et (c) de lyse cellulaire et le cas échéant une étape (d) d'extraction de produits valorisables à partir de la biomasse lysée, caractérisé en ce qu'il comprend une étape

(b1) d'extraction de porphyrines à partir du jus de fermentation,

Et le cas échéant une étape

(a1) de culture par fermentation avec une phase de maturation qui comprend la limitation de l'apport en source de carbone dans le milieu de culture, et/ou

(c1) de lyse par broyage avec maintien de la biomasse pendant le broyage à une température inférieure à 50°C, et/ou

(d1) d'extraction des phycocyanines de la biomasse lysée par au moins 2 lavages successifs dans des quantités d'eau représentant au total moins de 4 fois le volume total de biomasse lysée.

14. Procédé optimisé de culture et de valorisation d'algues rouges unicellulaires (ARUs) comprenant des étapes (a) de culture par fermentation des ARUs, (b) de récupération de la biomasse et (c) de lyse cellulaire et le cas échéant une étape (d) d'extraction de produits valorisables à partir de la biomasse lysée, caractérisé en ce qu'il comprend une étape

(d1) d'extraction des phycocyanines de la biomasse lysée par au moins 2 lavages successifs dans des quantités d'eau représentant au total moins de 4 fois le volume total de biomasse lysée,

et le cas échéant, une étape

(a1) de culture par fermentation avec une phase de maturation qui comprend la limitation de l'apport en source de carbone dans le milieu de culture, et/ou

(b1) d'extraction de porphyrines à partir du jus de fermentation, et/ou

(c1) de lyse par broyage avec maintien de la biomasse pendant le broyage à une température inférieure à 50°C.

15. Procédé selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que les ARUs appartiennent aux Genres Cyanidioschyzon, Cyanidium ou Galdieria.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que les ARUs appartiennent au Genre *Galdieria et à l'Espèce sulphuraria*.

17. Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que les ARUs sont cultivées par fermentation en mode « FedBatch » ou en mode continu.

18. Procédé selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce que la phycocyanine est récupérée à partir de la solution de lavage de la biomasse lysée.

19. Biomasse lysée obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 18.

20. Porphyrines obtenues par le procédé selon l'une des revendications 3 à 18.

21. Phycocyanine obtenue par le procédé selon l'une des revendications 2 à 18.

22. Aliment ou complément alimentaire caractérisé en ce qu'il comprend une biomasse lysée selon la revendication 19 ou une phycocyanine selon la revendication 21.

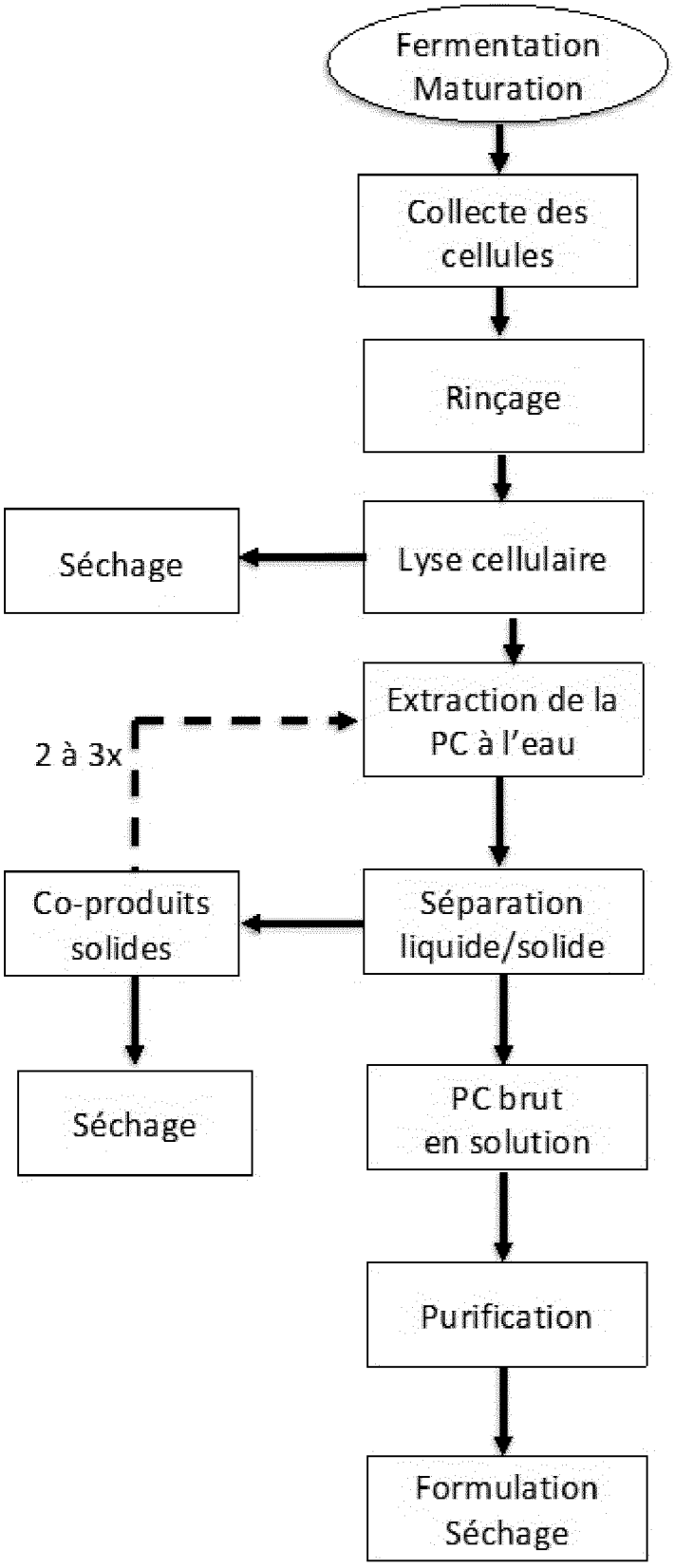

Fermentation
Maturation
Collecte des cellules
Rinçage
Lyse cellulaire
Séchage
Extraction de la PC à l'eau
2 à 3x
Séparation liquide/solide
Co-produits solides
Séchage
PC brut en solution
Purification
Formulation
Séchage

Fig. 1

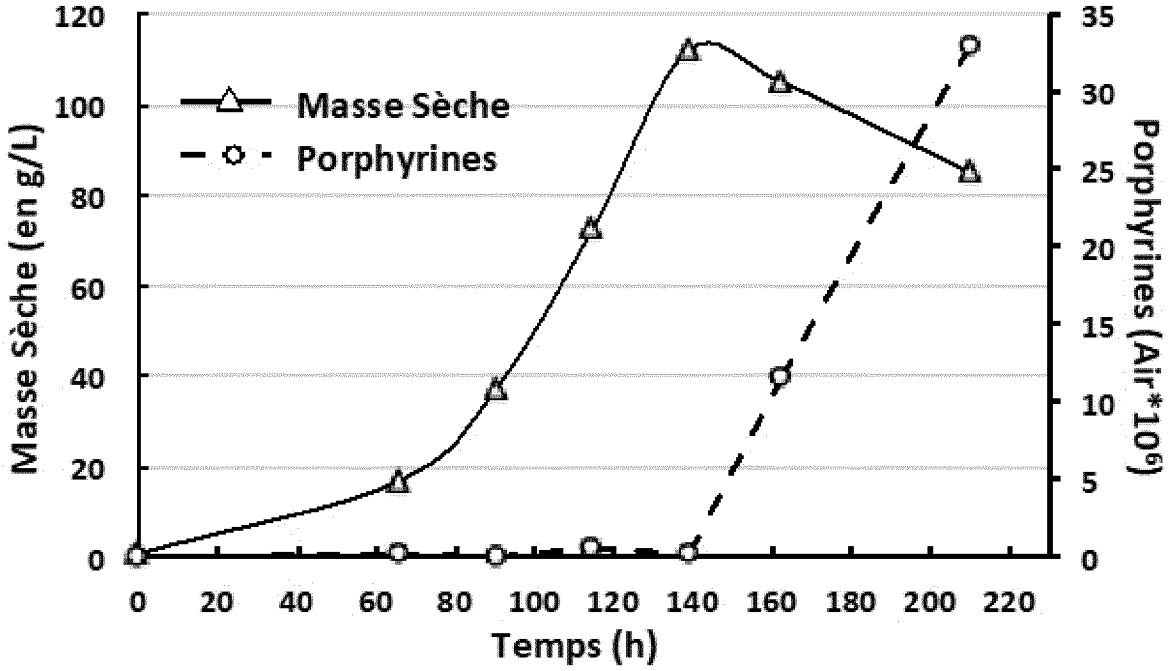

Masse Sèche
Porphyrines
Masse Sèche (en g/L)
Porphyrines (Air*10⁶)
Temps (h)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
0
5
10
15
20
25
30
35

Fig. 2

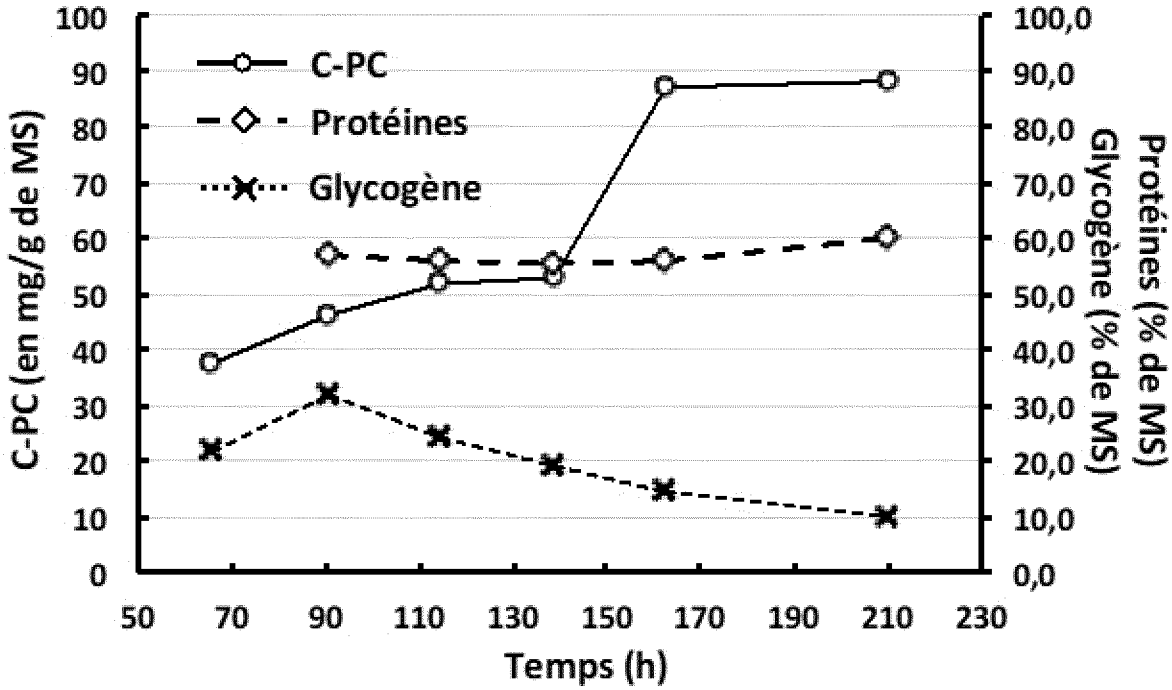

C-PC
Protéines
Glycogène
C-PC (en mg/g de MS)
Glycogène (% de MS)
Protéines (% de MS)
Temps (h)
50
70
90
110
130
150
170
190
210
230
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
70,0
80,0
90,0
100,0

Fig. 3

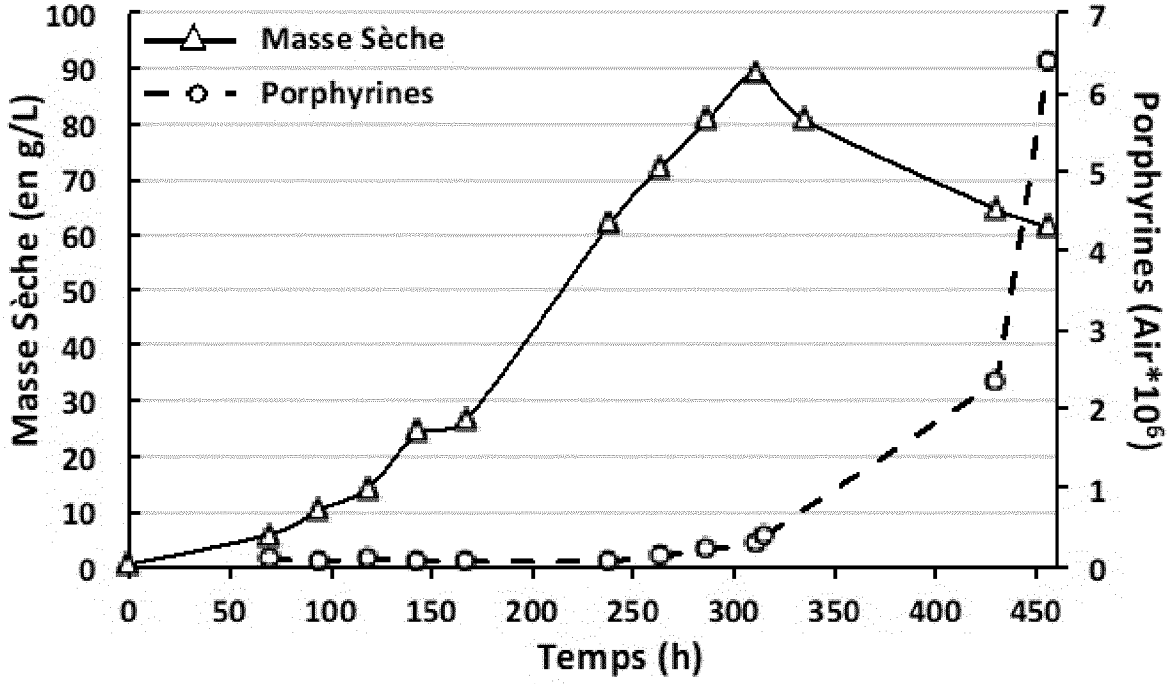

Masse Sèche
Porphyrines
Masse Sèche (en g/L)
Porphyrines (Air*10⁶)
Temps (h)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
1
2
3
4
5
6
7
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450

Fig. 4

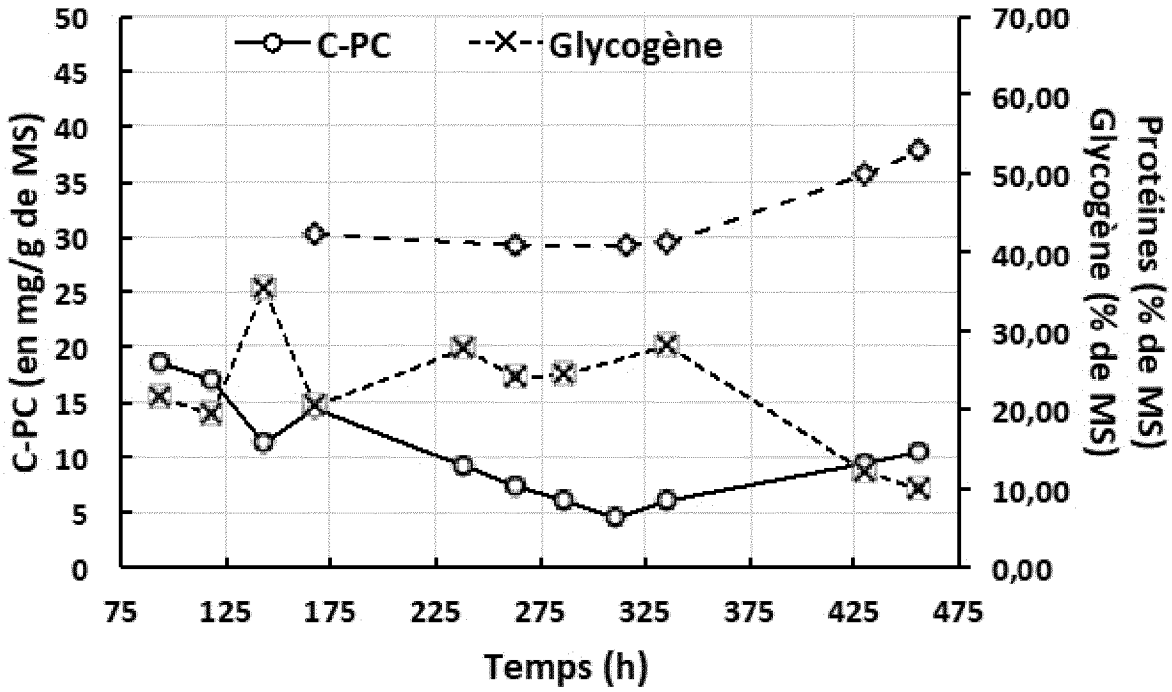

C-PC
Glycogène
C-PC (en mg/g de MS)
Glycogène (% de MS)
Protéines (% de MS)
Temps (h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0,00
10,00
20,00
30,00
40,00
50,00
60,00
70,00
75
125
175
225
275
325
375
425
475

Fig. 5

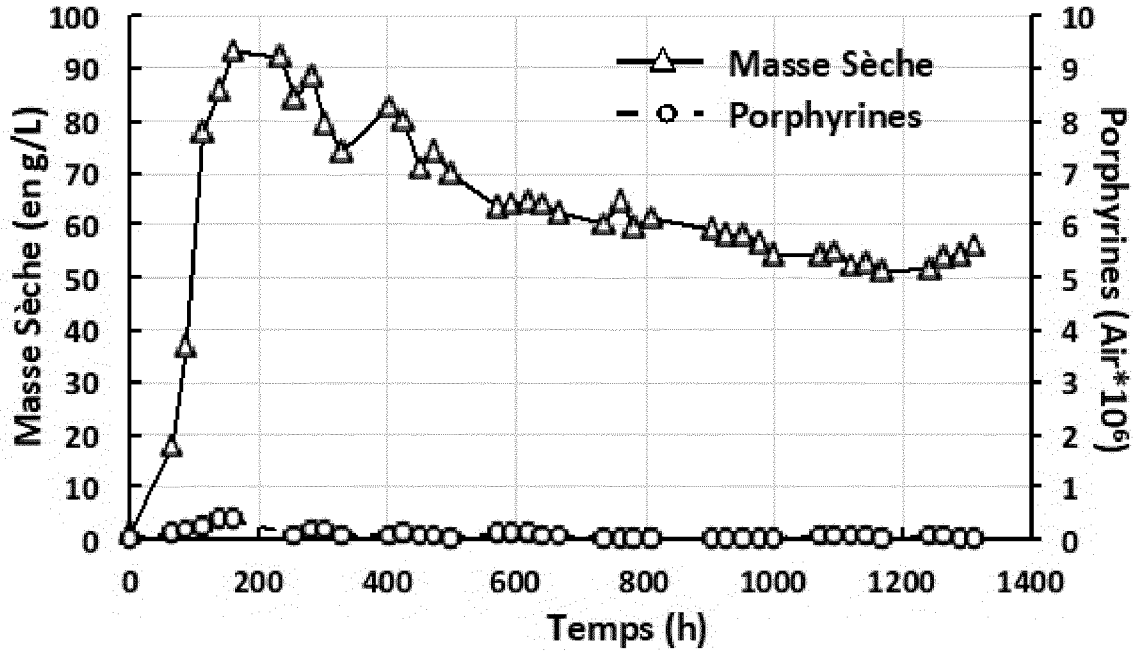

Masse Sèche
Porphyrines
Masse Sèche (en g/L)
Porphyrines (Air*10⁶)
Temps (h)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0
200
400
600
800
1000
1200
1400

Fig. 6

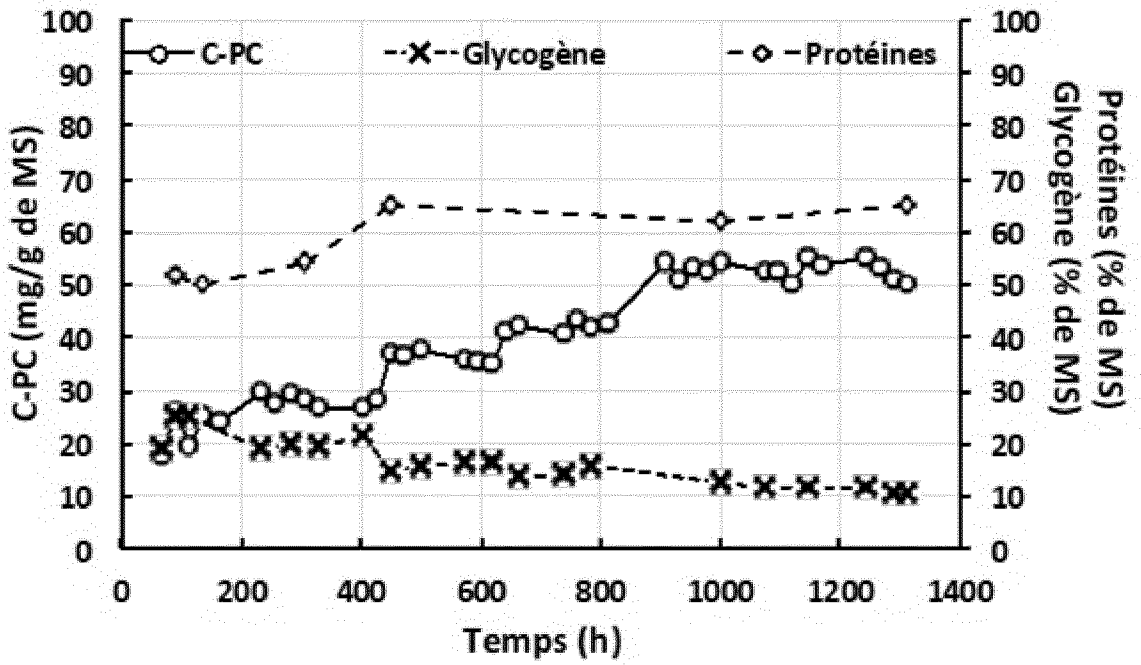

C-PC
Glycogène
Protéines
C-PC (mg/g de MS)
Glycogène (% de MS)
Protéines (% de MS)
Temps (h)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
200
400
600
800
1000
1200
1400

Fig. 7

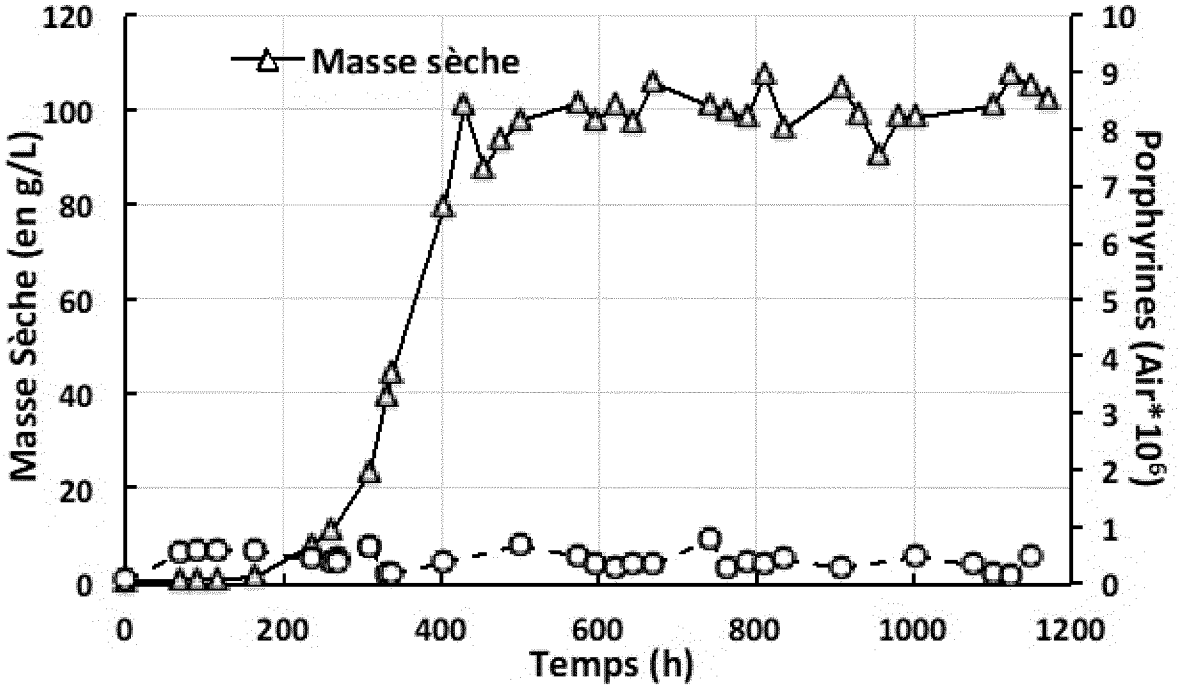

Masse sèche
Masse Sèche (en g/L)
Porphyrines (Air*10⁶)
Temps (h)
0
20
40
60
80
100
120
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0
200
400
600
800
1000
1200

Fig. 8

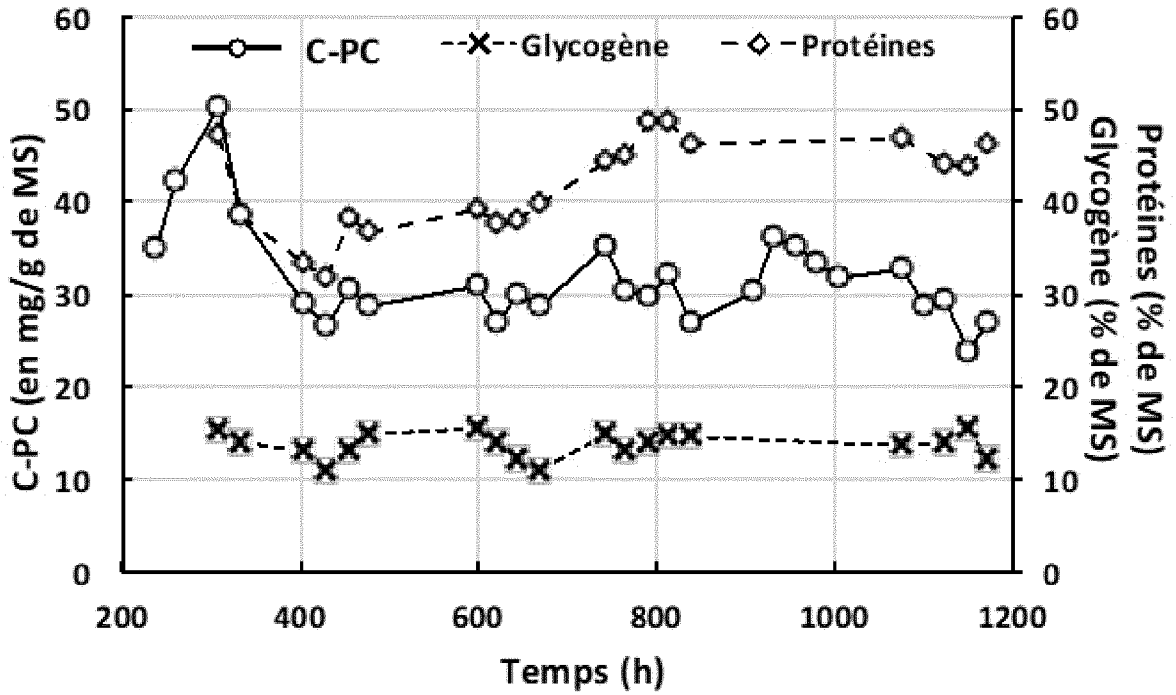

C-PC
Glycogène
Protéines
C-PC (en mg/g de MS)
Glycogène (% de MS)
Protéines (% de MS)
Temps (h)
0
10
20
30
40
50
60
200
400
600
800
1000
1200

Fig. 9

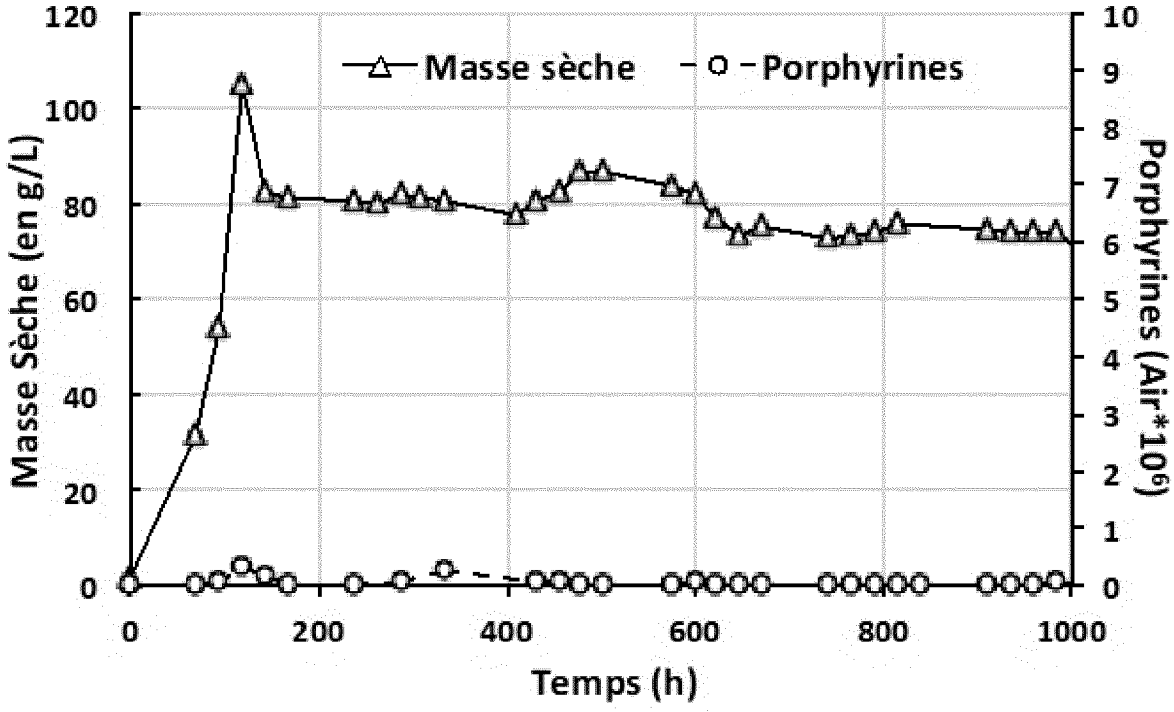

Masse sèche
Porphyrines
Masse Sèche (en g/L)
Porphyrines (Air*10⁶)
Temps (h)
0
20
40
60
80
100
120
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0
200
400
600
800
1000

Fig. 10

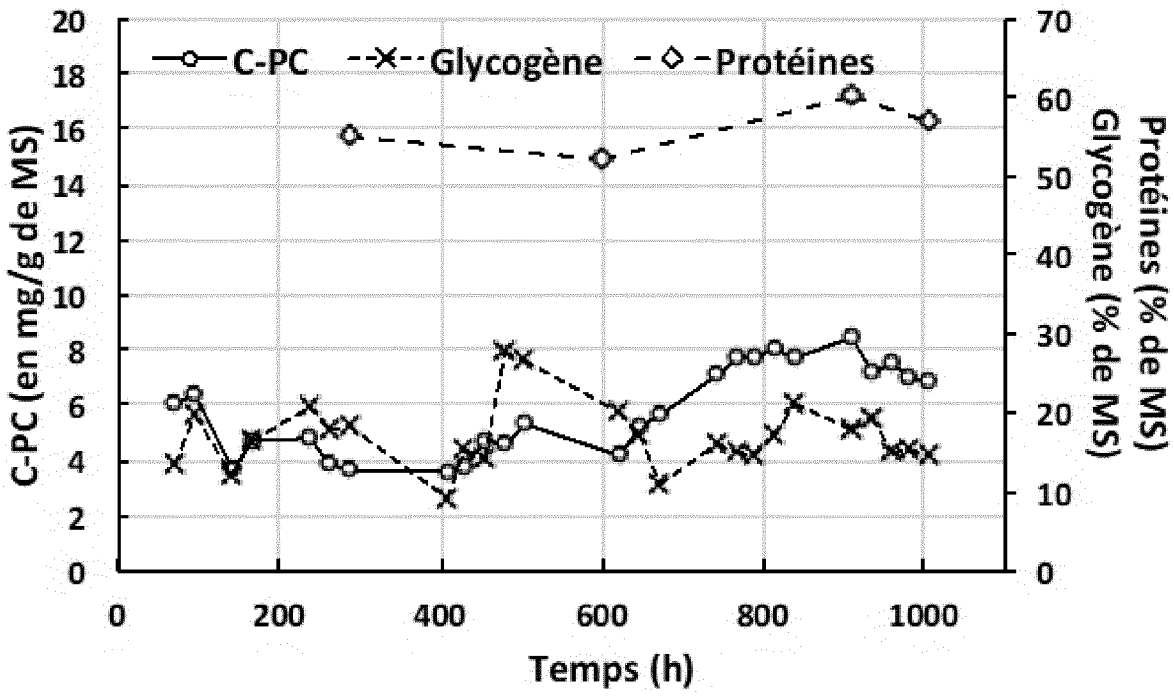

C-PC
Glycogène
Protéines
C-PC (en mg/g de MS)
Glycogène (% de MS)
Protéines (% de MS)
Temps (h)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
0
10
20
30
40
50
60
70
0
200
400
600
800
1000

Fig. 11

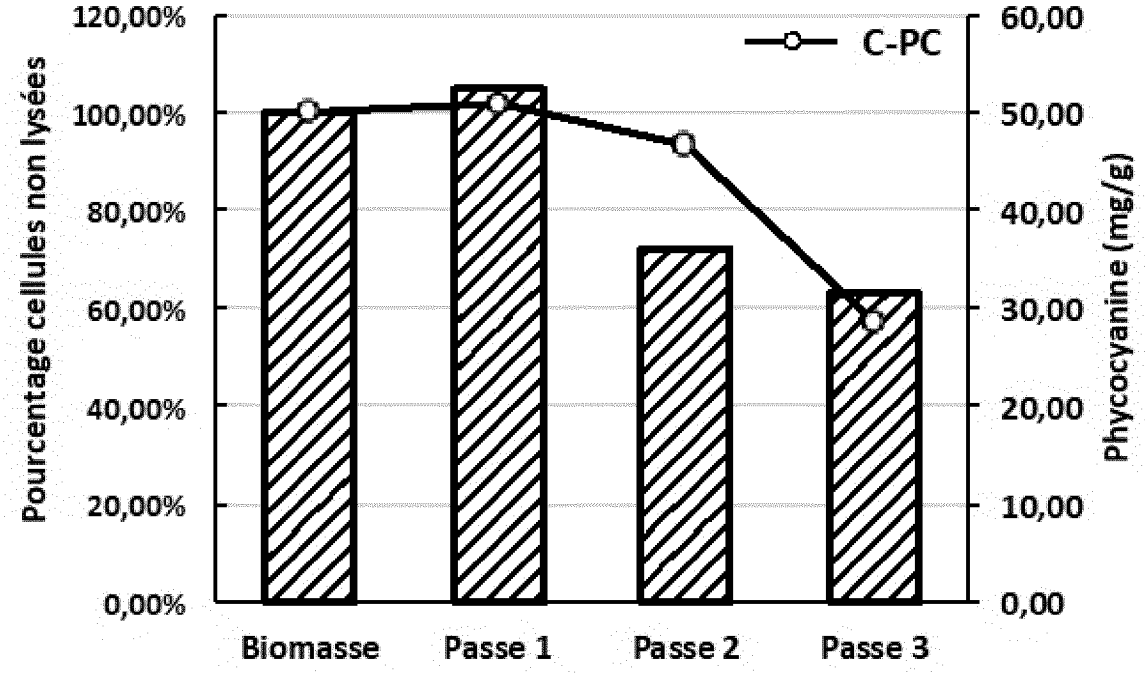

120,00%
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
Pourcentage cellules non lysées
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
Phycocyanine (mg/g)
C-PC
Biomasse
Passe 1
Passe 2
Passe 3

Fig. 12

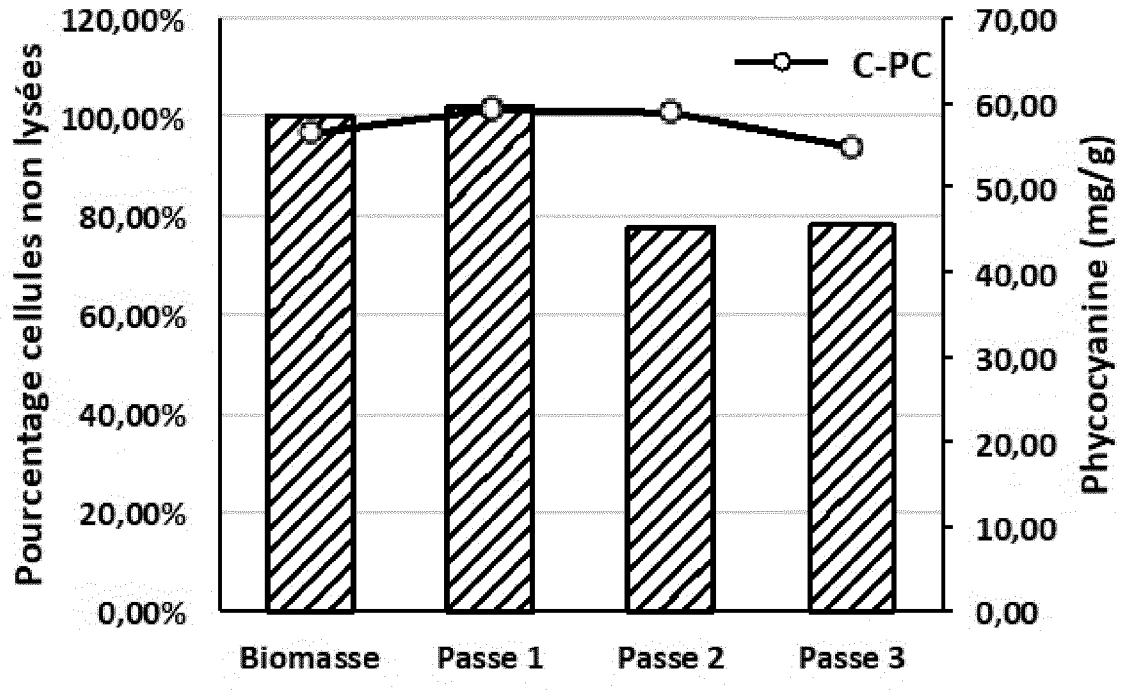

120,00%
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
Pourcentage cellules non lysées
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
Phycocyanine (mg/g)
C-PC
Biomasse
Passe 1
Passe 2
Passe 3

Fig. 13

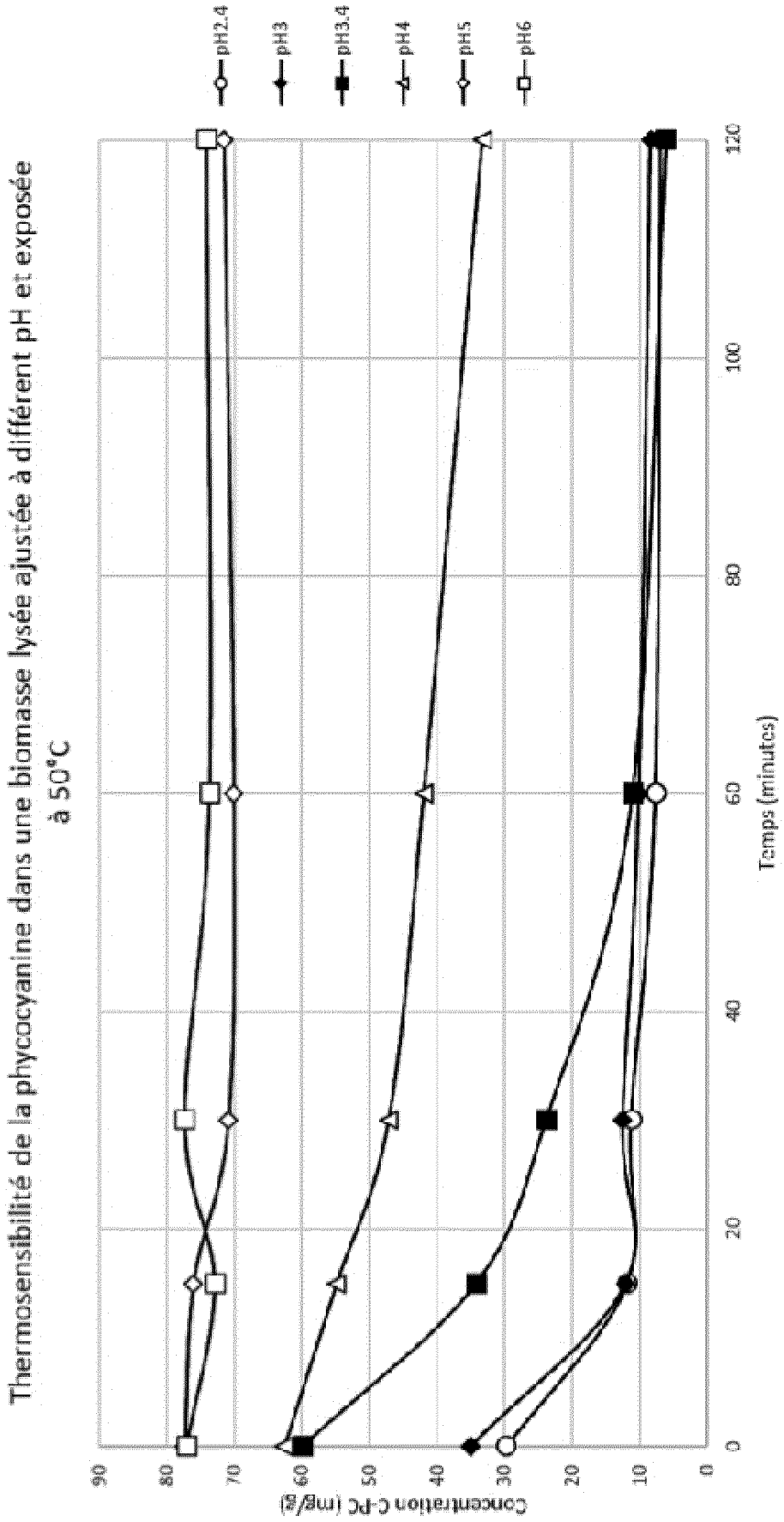

Thermosensibilité de la phycocyanine dans une biomasse lysée ajustée à différent pH et exposée à 50°C
pH2.4
pH3
pH3.4
pH4
pH5
pH6
Concentration C-PC (mg/g)
Temps (minutes)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0
20
40
60
80
100
120

Fig. 14

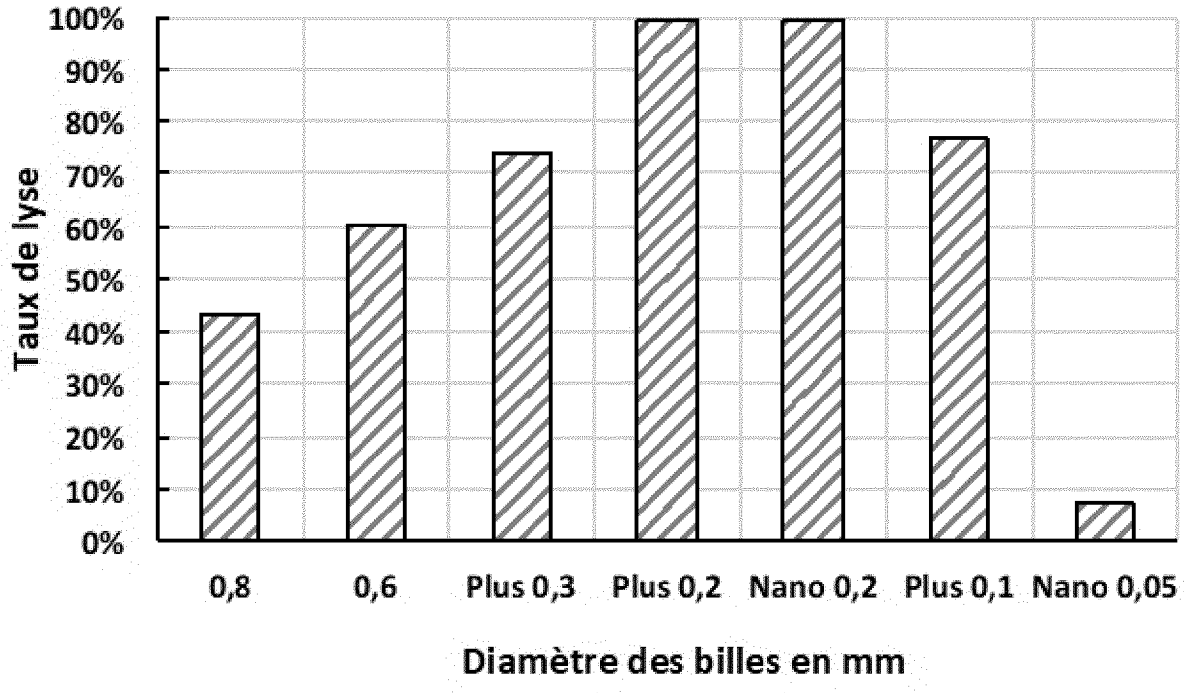

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Taux de lyse
0,8
0,6
Plus 0,3
Plus 0,2
Nano 0,2
Plus 0,1
Nano 0,05
Diamètre des billes en mm

Fig. 15

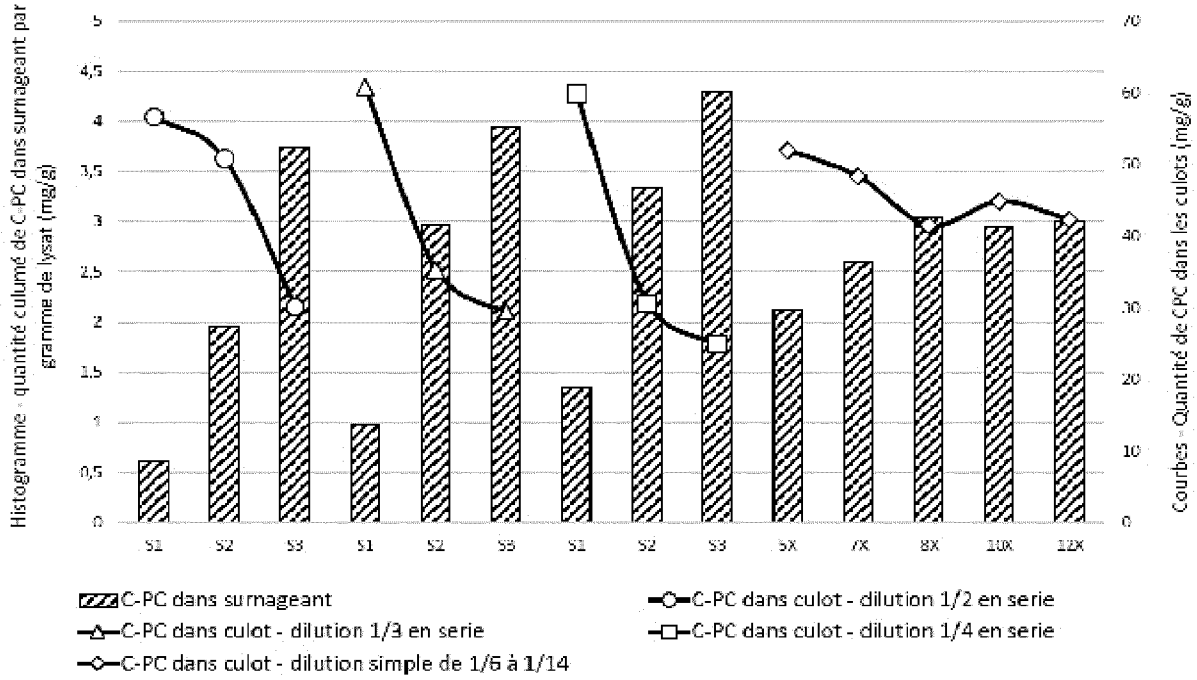

Histogramme - quantité culumé de C-PC dans surnageant par gramme de lysat (mg/g)
Courbes - Quantité de CPC dans les culots (mg/g)
S1
S2
S3
C-PC dans surnageant
C-PC dans culot - dilution 1/2 en serie
C-PC dans culot - dilution 1/3 en serie
C-PC dans culot - dilution 1/4 en serie
C-PC dans culot - dilution simple de 1/6 à 1/14

Fig. 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2020/053081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/405(2006.01)i; ***C12N 1/06***(2006.01)i; ***C12N 1/12***(2006.01)i; ***C12P 17/18***(2006.01)i; ***A23L 33/195***(2016.01)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)

C07K; C12N; C12P; A23L

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, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018178334 A2 (FERMENTALG [FR]) 04 October 2018 (2018-10-04) examples 1, 2	1-11,14-22
X	RIKKE ANKERSTJERNE SCHMIDT ET AL. "Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga Galdieria sulphuraria" *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING,* Vol. 90, No. 1, 05 April 2005 (2005-04-05), pages 77-84 DOI: 10.1002/bit.20417 ISSN: 0006-3592, XP055114003 page 79, right-hand column, paragraph 2	1-11,19-22
X	OLAV SUNE GRAVERHOLT ET AL. "Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of Galdieria sulphuraria and production of phycocyanin" *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE,* Vol. 77, No. 1, 05 September 2007 (2007-09-05), pages 69-75 DOI: 10.1007/S00253-007-1150-2 ISSN: 1432-0614, XP019560681 the whole document	1-11,19-22

☑ 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	Date of mailing of the international search report
05 June 2020	**16 June 2020**
Name and mailing address of the ISA/EP **European Patent Office** **p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk** **Netherlands** Telephone No. **(+31-70)340-2040** Facsimile No. **(+31-70)340-3016**	Authorized officer **Lejeune, Robert** Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2020/053081

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SLOTH J K ET AL. "Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga Galdieria sulphuraria" *ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US,* Vol. 38, No. 1-2, 03 January 2006 (2006-01-03), pages 168-175, [retrieved on 2006-01-03] DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2005.05.010 ISSN: 0141-0229, XP055543343 figure 2	1-11,19-22
A	MYOUNGHOON MOON ET AL. "Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from Galdieria sulphuraria" *KOREAN JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING,* Vol. 31, No. 3, 15 January 2014 (2014-01-15), pages 490-495 DOI: 10.1007/s11814-013-0239-9 ISSN: 0256-1115, XP055146911 the whole document	1-11
T	Anonymous. "Cell disruption - Wikipedia" 02 April 2020 (2020-04-02), Retrieved from the Internet: https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_disruption [retrieved on 2020-04-02] XP055682456 the whole document	1-11
A	EP 3305370 A1 (CHEMISCHES LABORATORIUM DR KURT RICHTER GMBH [DE]) 11 April 2018 (2018-04-11) examples 1, 2	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2020/053081

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-11(in full); 19-22(in part)
A method for the culture and exploitation of single-celled red algae, comprising the steps of: (a) culturing, by fermentation, the single-celled red algae, (b) recovering biomass and (c) carrying out cell lysis, as well as, as required, a step (d) of extracting exploitable products from the lysed biomass, comprising at least one step (c1) of lysis by means of milling while keeping the biomass at a temperature of below 50°C during milling.

2. claims: 12(in full); 15-22(in part)
A method for the culture and exploitation of single-celled red algae, comprising the steps of: (a) culturing, by fermentation, the single-celled red algae, (b) recovering biomass and (c) carrying out cell lysis, as well as, as required, a step (d) of extracting exploitable products from the lysed biomass, comprising at least one step (a1) of culturing by fermentation involving a maturation phase with limitation of the source supply of carbon in the culture medium.

3. claims: 13(in full); 15-22(in part)
A method for the culture and exploitation of single-celled red algae, comprising the steps of: (a) culturing, by fermentation, the single-celled red algae, (b) recovering biomass and (c) carrying out cell lysis, as well as, as required, a step (d) of extracting exploitable products from the lysed biomass, comprising at least one step (b1) of extracting porphyrins from the fermentation broth.

4. claims: 14(in full); 15-22(in part)
A method for the culture and exploitation of single-celled red algae, comprising the steps of: (a) culturing, by fermentation, the single-celled red algae, (b) recovering biomass and (c) carrying out cell lysis, as well as, as required, a step (d) of extracting exploitable products from the lysed biomass, comprising at least one step (d1) of extracting phycocyanins from the lysed biomass by means of washing successively in amounts of water which are, in total, less than 4 times the total volume of the lysed biomass.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☑ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: **1-11, 14(in full); 15-22(in part)**

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☑ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/EP2020/053081

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2018178334 A2	04 October 2018	AU 2018246351 A1	10 October 2019
		CA 3057780 A1	04 October 2018
		CN 110461866 A	15 November 2019
		EP 3601318 A2	05 February 2020
		FR 3064635 A1	05 October 2018
		JP 2020512334 A	23 April 2020
		KR 20190141135 A	23 December 2019
		US 2020115423 A1	16 April 2020
		WO 2018178334 A2	04 October 2018
EP 3305370 A1	11 April 2018	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2020/053081

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C07K14/405 C12N1/06 C12N1/12 C12P17/18 A23L33/195
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C07K C12N C12P A23L

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, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2018/178334 A2 (FERMENTALG [FR]) 4 octobre 2018 (2018-10-04) exemples 1,2 -----	1-11, 14-22
X	RIKKE ANKERSTJERNE SCHMIDT ET AL: "Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga Galdieria sulphuraria", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 90, no. 1, 5 avril 2005 (2005-04-05), pages 77-84, XP055114003, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.20417 page 79, colonne de droite, alinéa 2 ----- -/--	1-11, 19-22

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
5 juin 2020	16/06/2020

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Lejeune, Robert

2

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	OLAV SUNE GRAVERHOLT ET AL: "Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of Galdieria sulphuraria and production of phycocyanin", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 77, no. 1, 5 septembre 2007 (2007-09-05), pages 69-75, XP019560681, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-007-1150-2 le document en entier	1-11, 19-22
X	SLOTH J K ET AL: "Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga Galdieria sulphuraria", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, vol. 38, no. 1-2, 3 janvier 2006 (2006-01-03), pages 168-175, XP055543343, ISSN: 0141-0229, DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2005.05.010 [extrait le 2006-01-03] figure 2	1-11, 19-22
A	MYOUNGHOON MOON ET AL: "Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from Galdieria sulphuraria", KOREAN JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING, vol. 31, no. 3, 15 janvier 2014 (2014-01-15), pages 490-495, XP055146911, ISSN: 0256-1115, DOI: 10.1007/s11814-013-0239-9 le document en entier	1-11
T	Anonymous: "Cell disruption - Wikipedia", , 2 avril 2020 (2020-04-02), XP055682456, Extrait de l'Internet: URL:https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_disruption [extrait le 2020-04-02] le document en entier	1-11
A	EP 3 305 370 A1 (CHEMISCHES LABORATORIUM DR KURT RICHTER GMBH [DE]) 11 avril 2018 (2018-04-11) exemples 1,2	1-11

Demande internationale n°
PCT/EP2020/053081

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Cadre n°. II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. ☐ Les revendications n^{os}
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :

2. ☐ Les revendications n^{os}
parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectueé, en particulier :

3. ☐ Les revendications n^{os}
parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pasrédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n°. III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. ☐ Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.

3. ☒ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}:
1-11, 14(complètement); 15-22(en partie)

4. ☐ Aucunes taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}:

Remarque quant à la réserve

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.

☒ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-11(complètement); 19-22(en partie)

   Procédé de culture et de valorisation d'algues rouges unicellulaires comprenant des étapes (a) de culture par fermentation des ARUs, (b) de récupération de la biomasse et (c) de lyse cellulaire et le cas échéant une étape (d) d'extraction de produits valorisables à partir de la biomasse lysée, qui comprend au moins une étape (c1) de lyse par broyage avec maintient de la biomasse pendant le broyage à une température inférieure à 50°C.

   ---

2. revendications: 12(complètement); 15-22(en partie)

   Procédé de culture et de valorisation d'algues rouges unicellulaires comprenant des étapes (a) de culture par fermentation des ARUs, (b) de récupération de la biomasse et (c) de lyse cellulaire et le cas échéant une étape (d) d'extraction de produits valorisables à partir de la biomasse lysée, qui comprend au moins une étape (a1) de culture par fermentation avec une phase de maturation avec limitation de l'apport en source de carbone dans le milieu de culture.

   ---

3. revendications: 13(complètement); 15-22(en partie)

   Procédé de culture et de valorisation d'algues rouges unicellulaires comprenant des étapes (a) de culture par fermentation des ARUs, (b) de récupération de la biomasse et (c) de lyse cellulaire et le cas échéant une étape (d) d'extraction de produits valorisables à partir de la biomasse lysée, qui comprend au moins une étape (b1) d'extraction de porphyrines à partir du jus de fermentation

   ---

4. revendications: 14(complètement); 15-22(en partie)

   Procédé de culture et de valorisation d'algues rouges unicellulaires comprenant des étapes (a) de culture par fermentation des ARUs, (b) de récupération de la biomasse et (c) de lyse cellulaire et le cas échéant une étape (d) d'extraction de produits valorisables à partir de la biomasse lysée, qui comprend au moins une étape (d1) d'extraction des phycocyanines de la biomasse lysée par des lavages successifs dans des quantités d'eau représentant au total moins de 4 fois le volume total de biomasse lysée.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2020/053081

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2018178334 A2	04-10-2018	AU 2018246351 A1	10-10-2019
		CA 3057780 A1	04-10-2018
		CN 110461866 A	15-11-2019
		EP 3601318 A2	05-02-2020
		FR 3064635 A1	05-10-2018
		JP 2020512334 A	23-04-2020
		KR 20190141135 A	23-12-2019
		US 2020115423 A1	16-04-2020
		WO 2018178334 A2	04-10-2018
EP 3305370 A1	11-04-2018	AUCUN	