



(12) **DEMANDE DE BREVET CANADIEN**
CANADIAN PATENT APPLICATION
(13) **A1**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2016/09/22
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2017/03/30
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2018/03/16
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2016/072582
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2017/050917
(30) Priorité/Priority: 2015/09/25 (FR1559072)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 1/12* (2006.01),
A23L 33/00 (2016.01), *A23L 5/46* (2016.01),
C12P 23/00 (2006.01)
(71) Demandeur/Applicant:
FERMENTALG, FR
(72) Inventeurs/Inventors:
CAGNAC, OLIVIER, FR;
RICHARD, LANNIG, FR;
LABRO, JULIE, FR
(74) Agent: BCF LLP

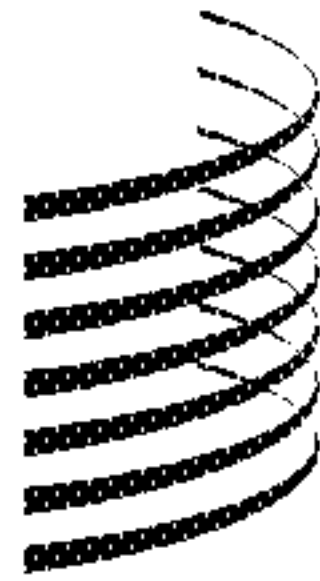
(54) Titre : NOUVEAU PROCEDE DE CULTURE D'ALGUES ROUGES UNICELLULAIRES
(54) Title: NOVEL METHOD FOR THE CULTURE OF UNICELLULAR RED ALGAE

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente demande concerne le domaine de la culture des algues, particulièrement des algues rouges unicellulaires (ARUs). L'invention s'adresse particulièrement à un procédé de culture d'algues rouges unicellulaires caractérisé en ce que les conditions particulières de la culture en termes d'éclairage et de nutriments permettent d'obtenir une biomasse, riche en protéines, pouvant présenter une quantité en ARUs améliorée, et apte à produire outre des pigments, particulièrement de la phycocyanine et les caroténoïdes: du β -carotène et de la zéaxanthine, L'invention s'adresse également à la biomasse susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention, aux utilisations de ladite biomasse et aux produits pouvant comprendre de ladite biomasse.

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale
WO 2017/050917 A1

(43) Date de la publication internationale
30 mars 2017 (30.03.2017)

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/12 (2006.01) A23L 33/00 (2016.01)
C12P 23/00 (2006.01) A23L 5/46 (2016.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2016/072582

(22) Date de dépôt international :
22 septembre 2016 (22.09.2016)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1559072 25 septembre 2015 (25.09.2015) FR

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

(72) Inventeurs : CAGNAC, Olivier; 60 Boulevard Beausé-
jour, 33500 Libourne (FR). RICHARD, Lannig; 7 rue
René Dumont, 33130 Begles (FR). LABRO, Julie; 9 Im-
passe d'Agen, 33800 Bordeaux (FR).

(74) Mandataire : TETAZ, Franck; 9 rue Paul Chevrel, 69370
Saint Didier Au Mont D'or (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

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

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

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

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

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : NOVEL METHOD FOR THE CULTURE OF UNICELLULAR RED ALGAE

(54) Titre : NOUVEAU PROCEDE DE CULTURE D'ALGUES ROUGES UNICELLULAIRES

(57) Abstract : The invention relates to the field of algaculture, particularly the culture of unicellular red algae (URA). In particular, the invention relates to a method for the culture of unicellular red algae, characterised in that the specific culture conditions, in terms of lighting and nutrients, allow the production of a protein-rich biomass that can contain an increased amount of URA and produce, in addition to pigments, particularly phycocyanin and carotenoids: β -carotene and zeaxanthin. The invention also relates to the bio-mass that can be produced using the method of the invention, to the uses of the biomass and to products that can contain said bio-mass.

(57) Abrégé : La présente demande concerne le domaine de la culture des algues, particulièrement des algues rouges unicellulaires (ARUs). L'invention s'adresse particulièrement à un procédé de culture d'algues rouges unicellulaires caractérisé en ce que les conditions particulières de la culture en termes d'éclairage et de nutriments permettent d'obtenir une biomasse, riche en protéines, pouvant présenter une quantité en ARUs améliorée, et apte à produire outre des pigments, particulièrement de la phycocyanine et les caroté-noïdes: du β -carotène et de la zéaxanthine, L'invention s'adresse également à la biomasse susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention, aux utilisations de ladite biomasse et aux produits pouvant comprendre de ladite biomasse.



WO 2017/050917 A1

NOUVEAU PROCEDE DE CULTURE D'ALGUES ROUGES UNICELLULAIRES

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne le domaine de la culture des algues rouges unicellulaires (ARUs).

L'invention s'adresse particulièrement à un procédé de culture d'ARUs, caractérisé en ce que les conditions particulières de la culture en termes d'éclairage et d'apports de nutriments peuvent permettre d'obtenir une biomasse constituée d'ARUs en quantité supérieure par rapport aux quantités pouvant être obtenues dans des conditions de culture classiques, ladite biomasse pouvant présenter au moins une quantité en phycobiliprotéines, particulièrement en phycocyanine élevée et en outre une quantité en agents antioxydants élevée.

L'invention s'adresse également à la biomasse susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention, aux utilisations de ladite biomasse et aux produits pouvant comprendre de ladite biomasse.

ETAT DE LA TECHNIQUE

Certaines algues rouges unicellulaires (ARUs) peuvent être intéressantes comme source additionnelle de nourriture, car elles peuvent être source de protéines, particulièrement des phycobiliprotéines, de fibres, de lipides, ou encore d'agents antioxydants particulièrement des caroténoïdes. Elles peuvent être utilisées natives, avantageusement séchées, mais aussi transformées, par exemple réduites sous forme de farines.

Elles peuvent être utilisées dans l'alimentation humaine ou animale, comme supplément nutritionnel ou incorporées en petite quantité dans des aliments.

Les algues rouges, ou Rhodophytes (division des Rhodophyta), sont un grand taxon d'algues pour la plupart marines et pour la plupart multicellulaires. Elles sont caractérisées par une composition pigmentaire avec un seul type de chlorophylle, la chlorophylle "a", des caroténoïdes et des pigments caractéristiques, les phycobiliprotéines.

Parmi les Rhodophytes il existe une sous-division, les Cyanidiophytina, qui sont des ARUs qui vivent dans des sources chaudes acides.

La sous-division des Cyanidiophytina renferme la classe des Cyanidiophyceae, qui elle-même renferme l'ordre des Cyanidiales, lui-même englobant les familles des Cyanidiaceae ou des Galdieriaceae, elles-mêmes subdivisées en les genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*, auxquelles appartiennent les espèces *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Cyanidioschyzon merolae* DBV201, *Cyanidium caldarium*,

Cyanidium daedalum, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita* ou encore *Galdieria sulphuraria*.

Les phycobiliprotéines sont des pigments hydrosolubles que l'on retrouve dans le phycobilisome, complexe photosynthétique présent notamment chez les cyanobactéries et certaines microalgues. Il existe quatre types de phycobiliprotéines : la phycocyanine, la phycoérythrine, l'allophycocyanine. La phycocyanine présente un pic d'absorption situé entre 610 nm et 655 nm, la phycoérythrine présente un pic d'absorption situé entre 400 nm et 600 nm, la phycoérythrocyanine présentant des pics d'absorption à environ 450, 525 et 570 nm et l'allophycocyanine un pic d'absorption essentiellement centré à 650nm.

La production de phycobiliprotéines mondiale est essentiellement obtenue par culture de spiruline en bassin ouvert (raceway) et représente à peu près 15 000 tonnes par an.

La phycocyanine extraite de spiruline est également vendue comme complément alimentaire sous forme liquide, ou sous forme de poudre pour être utilisée comme pigment bleu dans l'alimentaire. La phycocyanine est le seul pigment bleu naturel approuvé par l'US-FDA (FR Doc No: 2013-19550).

Les cultures de spiruline se font majoritairement à ciel ouvert dans des zones géographiques chaudes, la température optimale de culture étant de 37°C. Ces cultures sont donc dépendantes des fluctuations saisonnières (température, lumière). La spiruline présente l'inconvénient d'une faible productivité en biomasse (g biomasse sèche/L/h) et/ou phycocyanine (g phycocyanine/L/h) qui ne permet pas le passage à une culture en fermenteur nécessaire à une industrialisation de la production de phycocyanine.

De plus ces cultures sont également sensibles à des contaminations par des formes de cyanobactéries, proches de la spiruline, connues pour produire des toxines telles que les microcystines [Rellán, S, et coll. ; Food and Chemical Toxicology 47 (2009) 2189–2195]. Les microcystines peuvent provoquer des troubles intestinaux, et une exposition à long terme à ces toxines peut provoquer des cancers du foie. En outre, certaines souches de spiruline, comme par exemple *Arthrospira platensis*, sont elles-mêmes productrices de toxines [Rellán, S, et coll., *opus cit.*].

Des essais de cultures axéniques de spiruline en bioréacteurs fermés ont été rapportés dans la littérature en utilisant une souche d'*Arthrospira platensis* [Chen, Feng, and Yiming Zhang ; Enzyme and Microbial Technology 20, no. 3 (February 15, 1997): 221–24]. Toutefois, à la connaissance de la Demanderesse aucune production de spiruline en bioréacteurs à échelle industrielle n'a été rapportée.

On comprend donc qu'outre une faible productivité en biomasse et/ou phycocyanine, la garantie de la sécurité sanitaire des productions destinées à l'utilisation

directe de biomasses de spiruline en alimentation humaine ou animale n'est pas évidente et nécessite un contrôle qualité extrêmement précis.

Les ARUs sont connues pour produire des phycocyanines, et l'effet de la lumière sur la culture des ARUs et leurs compositions en pigments a fait l'objet de nombreuses études de laboratoire [Sloth JK & al., Enzyme and Microbial Technology, Vol.28, n° 1-2, Janvier 2006, 168-175 ; Graverholt OS & al., Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 77, n° 1, 5 septembre 2007, 69-75]. Nichols K & al. [Botanical Gazette, Vol. 124, n° 2, 1^{er} décembre 1962, 85-93] ont étudié les photorécepteurs cellulaires susceptibles d'être associés à la synthèse des phycocyanines dans des ARUs mutants, en faisant varier les longueurs d'ondes employées pour éclairer les cultures. Steinmuler K & al. [Plant Physiology, Vol. 76, n° 4, 1^{er} décembre 1984, 935-939] ont étudié la culture des ARUs dans des conditions de mixotrophie et constaté que l'ajout de glucose pouvait inhiber la synthèse des phycobilliprotéines.

Il existe donc un besoin en une nouvelle source de phycobilliprotéines, particulièrement de phycocyanine, dont les méthodes de culture pourraient permettre de contourner les inconvénients connus des cultures de spiruline.

Il serait intéressant de disposer d'un procédé de culture d'ARUs qui permettrait d'obtenir une biomasse desdites algues présentant une quantité d'algues augmentée par rapport aux quantités généralement obtenues par les procédés de culture desdites algues connus dans l'art antérieur, qui plus est avantageusement riche en métabolites d'intérêt particulièrement en phycobilliprotéines, particulièrement en phycocyanine, et/ou en agent antioxydants comme par exemple les caroténoïdes.

La présente invention vise à fournir un tel procédé de culture d'algues rouges unicellulaires (ARUs) enrichies en phycobilliprotéines et caroténoïdes.

EXPOSE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un procédé de culture d'algues rouges unicellulaires (ARUs) de la classe des *Cyanidiophyceae*, dans un milieu comprenant au moins une source de carbone, ledit procédé comprenant au moins une étape d'éclairage sous la forme d'un rayonnement présentant un spectre étroit de longueur d'onde comprise entre 400 et 550 nm.

L'invention concerne aussi une biomasse susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention qui présente une teneur en phycobilliprotéines (phycocyanine et allophycocyanine) comprise entre 29 et 250 mg/g de matière sèche et avantageusement une densité en ARUs comprise entre 20 et 200 g/L de matière sèche, préférentiellement entre 90 et 150 g/L de matière sèche.

L'invention concerne également l'utilisation de la biomasse selon l'invention pour la préparation de phycocyanine et/ou de caroténoïdes.

L'invention concerne également une phycocyanine susceptible d'être obtenue à partir de la biomasse selon l'invention.

5 L'invention concerne aussi l'utilisation de la biomasse selon l'invention ou la phycocyanine selon l'invention pour l'alimentation humaine ou animale, la cosmétique et/ou comme colorant.

L'invention concerne également un produit comprenant au moins de la biomasse ou une phycocyanine selon l'invention.

10

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Par la suite dans le présent texte, par commodité et sous réserve de précision, l'emploi de "ARU" doit s'entendre comme signifiant "*Rhodophytes*, de la sous-division des *Cyanidiophytina*, de la classe des *Cyanidiophyceae* de l'ordre des *Cyanidiales* des
15 familles des *Cyanidiaceae* ou des *Galdieriaceae*, des genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*, des espèces *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Cyanidioschyzon merolae* DBV201, *Cyanidium caldarium*, *Cyanidium daedalum*, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita* ou encore *Galdieria sulphuraria*".

20 De même l'emploi du terme "*Cyanidiophyceae*" doit être compris, sous réserve de précision, comme signifiant "*Cyanidiophyceae*, de l'ordre des *Cyanidiales*, des familles des *Cyanidiaceae* ou des *Galdieriaceae*, des genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*, des espèces *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Cyanidioschyzon merolae* DBV201, *Cyanidium caldarium*, *Cyanidium daedalum*, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium*
25 *partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita* ou encore *Galdieria sulphuraria*" ; l'emploi du terme "*Cyanidiales*" doit être compris, sous réserve de précision, comme signifiant "*Cyanidiales*, des familles des *Cyanidiaceae* ou des *Galdieriaceae*, des genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*, des espèces *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Cyanidioschyzon merolae* DBV201, *Cyanidium caldarium*,
30 *Cyanidium daedalum*, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita* ou encore *Galdieria sulphuraria*" ; l'emploi de l'expression "*Cyanidiaceae* ou des *Galdieriaceae*" doit être compris, sous réserve de précision, comme signifiant "*Cyanidiaceae* ou des *Galdieriaceae*, des genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*, des espèces *Cyanidioschyzon merolae* 10D,
35 *Cyanidioschyzon merolae* DBV201, *Cyanidium caldarium*, *Cyanidium daedalum*, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*,

Galdieria maxima, *Galdieria partita* ou encore *Galdieria sulphuraria*" ; l'emploi de l'expression " *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria* ", doit être compris, sous réserve de précision, comme signifiant " *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*, des espèces *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Cyanidioschyzon merolae* DBV201, *Cyanidium caldarium*,
 5 *Cyanidium daedalum*, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita* ou encore *Galdieria sulphuraria*".

Il faut aussi noter que, telles qu'elles peuvent être utilisées dans la description et les revendications, les formes singulières "un", "une", "le" et "la" englobent les références à leurs pluriels, sauf si le contexte en convient clairement autrement.

10 Certaines ARUs sont des êtres mixotrophes, capable à la fois d'hétérotrophie (consommation de substrat organique carboné apporté par le milieu de culture) et d'autotrophie (utilisation de la lumière pour capter le CO₂ via la photosynthèse). La mixotrophie est également appelée photo-hétérotrophie. La notion de mixotrophie est étendue à l'utilisation de la lumière non seulement pour la photosynthèse mais également
 15 comme signal lumineux pouvant induire une réponse du métabolisme : par exemple la synthèse de pigments.

La mixotrophie à dominante hétérotrophe permet de produire des molécules d'origine algale en couplant à la fois les avantages de l'autotrophie et de l'hétérotrophie. Elle consiste à introduire une composante lumineuse pouvant être de faible intensité et/ou
 20 de courte durée, avec un milieu de culture pouvant contenir une ou plusieurs sources organiques de carbone. Comme en hétérotrophie, les ARUs consomment un substrat organique, ce qui permet d'atteindre une productivité (exprimée en gramme de biomasse sèche/L/h) et/ou une concentration en biomasse (exprimée en gramme de biomasse sèche/L) importante, le chloroplaste et les autres structures sensibles à la lumière de la
 25 cellule étant alors activés.

Ces capteurs d'énergie lumineuse peuvent être des organites ou structures spécifiques au sein de la cellule tels que le chloroplaste, le stigma, le chromoplaste, le
 30 phytochromes, les cryptochromes ou les auréochromes.

Ces photorécepteurs permettent d'augmenter la productivité de la cellule ainsi que de permettre la synthèse de toutes les molécules pouvant être métabolisées par une ARU. Les molécules d'intérêt, produites par lesdites ARUs, peuvent présenter un intérêt
 35 industriel majeur particulièrement dans les domaines de la nutrition, de la cosmétique, de la chimie verte et de l'énergie.

Ces molécules d'intérêt sont variées telles que par exemple des carbohydrates, des protéines, des acides aminés, avantageusement des acides aminés essentiels et des pigments, particulièrement des pigments photosynthétiques, dont les principaux sont les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines.

5 Le terme de caroténoïde regroupe les carotènes (α , β , ϵ , γ , δ ou ζ -carotène, lycopène et phytoène) et les xanthophylles (astaxanthine, anthéroxanthine, citranaxanthine, cryptoxanthine, canthaxanthine, diadinoxanthine, diatoxanthine, flavoxanthine, fucoxanthine, lutéine, néoxanthine, rhodoxanthine, rubixanthine, siphonaxanthine, violaxanthine, zéaxanthine). Les caroténoïdes sont des pigments plutôt
10 orange et jaune, liposolubles. Ils sont synthétisés par toutes les algues, toutes les plantes vertes et par de nombreux champignons et bactéries (dont les cyanobactéries). Ils sont absorbés par les animaux et les êtres humains dans leur nourriture. Les caroténoïdes ont deux principaux pics d'absorption situés autour de 440 et 475 nm.

Les caroténoïdes jouent un rôle important dans la nutrition et la santé, car plusieurs
15 sont des provitamines A, et certains présentent aussi des activités anti-cancer et antioxydantes. Ils stimulent en outre la synthèse d'anticorps. Certains d'entre eux sont largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour leurs propriétés colorantes, et également dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques pour leurs propriétés antioxydantes et leur capacité de photoprotection.

20 Certains caroténoïdes présentent un grand intérêt, comme la lutéine, la zéaxanthine, et l'astaxanthine, cette dernière particulièrement pour son important pouvoir antioxydant.

La Demanderesse a montré, de manière surprenante et après de longues recherches, qu'une culture d'ARUs dans un milieu pouvant comprendre au moins une
25 source de carbone et une source de phosphore et pouvant comprendre en outre au moins une étape d'éclairage, avantageusement un éclairage par une lumière présentant un spectre étroit centré sur une longueur d'onde donnée, particulièrement un spectre centré à 455 nm, peut permettre d'obtenir une biomasse dont la quantité en ARUs peut être nettement améliorée par rapport aux cultures habituellement réalisées et qui plus est
30 pouvant contenir une quantité de molécules d'intérêt, particulièrement de la phycocyanine, de l'allophycocyanine, de la zéaxanthine et des β -carotènes, éventuellement supérieure à celle pouvant être obtenue dans les cultures décrites dans l'art antérieur.

Les ARUs au sens de l'invention, sont des organismes extrémophiles capables de supporter des pH très acides (0,05–5), ainsi que des températures très élevées (25–
35 56°C). On trouve ces organismes souvent près des volcans ou des sources d'eaux chaudes. Généralement ces organismes mixotrophiques sont capables d'utiliser un

nombre important de métabolites carbonés (glucose, glycérol, pentose...) [Wolfgang Gross and Claus Schnarrenberger. "*Heterotrophic Growth of Two Strains of the Acido-Thermophilic Red Alga Galdieria Sulphuraria*." Plant and Cell Physiology 36, no. 4 (June 1, 1995): 633–38].

5 Un autre avantage du procédé mis au point par la Demanderesse est qu'il peut être conduit en bioréacteur, qui plus est avantageusement à l'échelle industrielle.

A la connaissance de la demanderesse aucune production industrielle (en bioréacteur) d'ARUs en autotrophie, mixotrophie ou hétérotrophie n'est connue.

10 La Demanderesse a particulièrement montré qu'une culture d'ARUs, au sens de l'invention, utilisant un milieu de culture comprenant au moins une source de carbone et au moins une source assimilable de phosphore, ledit procédé comprenant au moins une étape d'éclairage, peut permettre d'obtenir une productivité et/ou une concentration en biomasse nettement améliorée par rapport aux cultures habituellement réalisées, biomasse qui en outre peut être riche en phycocyanine et/ou en caroténoïdes.

15 Par "riche en phycocyanine et/ou en caroténoïdes" on entend dans le présent texte que la concentration en phycobiliprotéines et/ou de caroténoïdes dans la biomasse pouvant être produite après culture dans les conditions selon l'invention est plus importante que la concentration de phycobiliprotéines et/ou de caroténoïdes pouvant être produite par une biomasse des mêmes algues obtenue après culture dans les conditions
20 décrites dans l'art antérieur.

Un avantage non négligeable de la culture de Cyanidiophyceae en fermenteur en conditions de mixotrophie est qu'elle permet de réaliser des cultures de souche pure (ou axénique) ne contenant qu'un seul type cellulaire inoculé dans un milieu de culture stérile, évitant ainsi les problèmes de contamination par des souches toxiques comme cela peut-
25 être observé pour des cultures de *Spirulina platensis* en raceway ou open ponds. Hormis une productivité et/ou une concentration en biomasse plus élevée, le mode de culture en fermenteur offre également plus de garanties d'un point de vue sanitaire.

Ainsi l'invention a pour objet premier un procédé de culture d'algues rouges unicellulaires (ARUs) de la classe des Cyanidiophyceae, avantageusement de l'ordre des
30 Cyanidiales, très avantageusement des familles des Cyanidiaceae ou des Galdieriaceae, particulièrement des genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*, très particulièrement des espèces *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Cyanidioschyzon merolae* DBV201, *Cyanidium caldarium*, *Cyanidium daedalum*, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita* ou
35 encore *Galdieria sulphuraria*, préférentiellement de l'espèce *Galdieria sulphuraria*, utilisant

un milieu comprenant au moins une source de carbone, et au moins une source de phosphore, ledit procédé comprenant au moins une étape d'éclairage.

De telles conditions de culture peuvent permettre d'atteindre une productivité en biomasse et/ou une concentration en biomasse plus importante des ARUs que la productivité en biomasse et/ou la concentration obtenue(s) dans les cultures décrites dans l'art antérieur, peuvent permettre d'obtenir une quantité de ladite biomasse plus grandes qu'une quantité de biomasse obtenue dans les cultures décrites dans l'art antérieur et peuvent favoriser une production de protéines par ladite biomasse pouvant atteindre jusqu'à 51% de la matière sèche voire plus.

Selon l'invention, l'étape d'éclairage du procédé peut être réalisée à l'aide d'une lumière blanche ou, avantageusement, d'une lumière bleue. En effet, la Demanderesse a mis en évidence le fait que la culture des ARUs, au sens de l'invention, en lumière bleue favorise la production de phycocyanine par rapport à la même culture mais en lumière blanche. Ainsi selon une variante de l'invention l'étape d'éclairage du procédé peut être réalisée à l'aide d'une lumière bleue.

Selon l'invention, par lumière bleue on entend un rayonnement présentant un spectre étroit de longueur d'onde comprise entre 400 et 550 nm, préférentiellement entre 420 nm et 500 nm. Un tel rayonnement peut permettre d'obtenir une biomasse riche en phycocyanine et en agents antioxydants, particulièrement en caroténoïdes. Selon une variante de l'invention ledit spectre peut être centré à 455 nm et ne pas s'étendre au-delà de 25 nm de chaque côté. De préférence selon l'invention, la longueur d'onde choisie sera comprise entre 430 et 480 nm, très préférentiellement la longueur d'onde choisie sera de 455 nm.

Selon l'invention, l'éclairage peut être produit par tout moyen connu de l'homme du métier, notamment une ou plusieurs lampes, un ou plusieurs tubes, une ou plusieurs diodes électroluminescentes (DELs).

La Demanderesse a démontré que le procédé est encore plus efficace lorsque l'éclairage est réalisé par une ou plusieurs diode(s) électroluminescente(s) (DEL).

Ainsi, selon une variante de l'invention, l'éclairage peut être réalisé par une ou plusieurs DELs. Les DELs sont de préférence des DELs du commerce.

A titre d'exemple on citera les DEL provenant de chez Seoul Optodevice Co., LTD (Corée du Sud), de chez Nichia Corporation (Japon), ou encore de chez SunLED Corporation (Etats-Unis).

Selon le procédé de l'invention la culture peut être soumise au rayonnement lumineux pendant un temps suffisant correspondant au moins au temps nécessaire pour que les critères de taux de croissance, de phycocyanine et/ou de caroténoïdes désirés

soient remplis. L'homme du métier saura sans expérimentation excessive juger de ce temps nécessaire. Il saura adapter ce temps grâce à ses connaissances du domaine.

Plus particulièrement, les conditions de mixotrophie peuvent être obtenues dans des conditions d'éclairage discontinu et/ou variable au cours du temps.

5 Par éclairage discontinu, il faut entendre un éclairage ponctué par des périodes d'obscurité. L'éclairage peut être notamment sous forme de flashes. Un flash, au sens de l'invention, est un éclairage lumineux de durée donnée.

Selon l'invention, 3 notions sont à considérer à propos de l'éclairage: la fréquence ou le nombre de flashes par unité de temps, la durée du flash et l'intensité de la lumière
10 émise.

En termes de fréquence selon l'invention, on définit, selon le nombre de flashes par unité de temps utilisé dans le procédé selon l'invention deux types d'éclairage :

- un éclairage à basse fréquence dont le nombre de flashes peut être compris entre environ 2 et $3,6 \cdot 10^4$ par heure ($5,4 \cdot 10^{-4}$ Hz à 10 Hz), préférentiellement entre 3 et $3,6 \cdot 10^3$
15 par heure ($8,3 \cdot 10^{-4}$ Hz à 1 Hz). On entend bien ici que le nombre de flashes par heure peut prendre toutes les valeurs comprises entre 2 et 36000 sans qu'il soit nécessaire de toutes les citer (2, 3, 4,..., 35598, 35599, 36000) ;

- un éclairage à haute fréquence dont le nombre de flashes peut être compris entre environ $3,6 \cdot 10^4$ et $5,4 \cdot 10^9$ (10 Hz à $1,5 \cdot 10^6$ Hz) par heure, préférentiellement entre
20 $3,6 \cdot 10^5$ et $5,4 \cdot 10^9$ (100 Hz à $1,5 \cdot 10^6$ Hz). On entend bien ici que le nombre de flashes par heure peut prendre toutes les valeurs comprises entre $3,6 \cdot 10^5$ et $5,4 \cdot 10^9$ sans qu'il soit nécessaire de toutes les citer (36000, 36001, 36002,..., 5399999998, 5399999999, 5400000000).

En termes de durée selon l'invention, quelle que soit la fréquence d'éclairage
25 choisie, la durée du flash peut être comprise entre 1/150000 de seconde et 1799 secondes (29 minutes et 59 secondes).

Bien évidemment lorsque l'on utilise un éclairage à haute fréquence la durée du flash pourra être préférentiellement comprise entre 1/150000 de seconde et 1/10 de seconde.

Et lorsque l'on utilise un éclairage à basse fréquence la durée du flash pourra être
30 préférentiellement comprise entre 1/10 de seconde et 1799 secondes (29 minutes et 59 sec).

En termes d'intensité lumineuse selon l'invention, l'intensité de la lumière apportée sous forme de flashes peut être comprise entre 5 et $5000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, de préférence entre 5 et $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, ou 50 et $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, et plus préférentiellement entre

150 et 300 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ (1 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ correspond à 1 $\mu\text{E m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ (Einstein), unité souvent utilisée dans la littérature).

Selon l'invention le nombre de flashes par heure peut être choisi en fonction de l'intensité et de la durée des flashes (voir ci-dessus).

5 Selon l'invention les notions de fréquence, de durée et d'intensité lumineuse s'appliquent à l'éclairage tel que le prévoit l'invention, c'est-à-dire à l'éclairage produit par la source lumineuse choisie, avantageusement par une DEL, émettant un rayonnement lumineux de spectre étroit compris entre 400 et 550 nm de préférence 420 et 500 nm, encore plus préférentiellement comprise entre 430 et 480 nm, très préférentiellement
10 centré à 455 nm et pendant les temps considérés selon l'invention.

Une forme préférée de l'invention pourra être un procédé selon l'invention dans lequel l'apport d'éclairage peut être réalisé sous la forme d'une lumière discontinue sous forme de flashes, obtenue avec des DELs émettant un rayonnement présentant un spectre étroit de longueur d'onde comprise entre 400 nm et 550 nm, préférentiellement entre 420
15 nm et 500 nm, encore plus préférentiellement comprise entre 430 et 480 nm, très préférentiellement de longueur d'onde de 455nm.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'éclairage peut être variable, ce qui signifie que l'éclairage n'est pas interrompu par des phases d'obscurité, mais que l'intensité lumineuse varie au cours du temps. Cette variation de l'intensité de lumière
20 peut être régulière ou non, et peut être périodique ou cyclique. Selon l'invention, on peut aussi procéder à un apport lumineux alliant des phases d'éclairage continues et des phases d'éclairage discontinues.

Par éclairage variable, on entend que l'intensité de la lumière varie de manière régulière au moins deux fois par heure. Un exemple des conditions d'éclairage adaptées
25 à la méthode de l'invention est décrit dans la demande WO 2012/035262.

L'éclairage peut présenter, de préférence, des variations d'intensité dont l'amplitude peut être généralement comprise entre 5 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ et 2000 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, de préférence entre 50 et 1500 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, plus préférentiellement entre 50 et 200 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$.

30 Selon un mode de réalisation préféré, l'éclairage peut présenter des variations d'intensité dont l'amplitude peut être comprise entre 5 et 1000 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, de préférence entre 5 et 400 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, ces variations pouvant avoir lieu entre 2 et 3600 fois par heure, de préférence entre 2 et 200 fois par heure.

Ces conditions de culture permettent d'apporter une quantité définie de lumière. Cet apport lumineux peut comporter des phases d'éclairage discontinu et/ou variable, avec des variations d'intensité pouvant avoir des amplitudes identiques ou différentes.

5 Selon l'invention, les conditions de culture des souches d'ARUs pourront être les conditions connues et utilisées dans l'art antérieur pour cultiver les souches retenues, conditions auxquelles une étape d'éclairage aura été ajoutée. Avantageusement, on utilisera les conditions qui permettront d'obtenir la meilleure productivité en biomasse /et/ou la meilleure concentration en biomasse.

10 L'homme du métier saura intégrer l'étape d'éclairage selon l'invention dans un procédé connu, afin une biomasse qui réponde aux critères selon l'invention en taux de croissance et en taux de métabolites d'intérêt, particulièrement en taux de caroténoïdes et/ou de phycobiliprotéines, recherchés. A cet égard, on pourra citer les procédés décrits par Wolfgang Gross and Claus Schnarrenberger (*opus cit.*).

15 Les procédés permettant d'obtenir une productivité en biomasse ou une concentration en biomasse important pourront être privilégiés. Comme exemple de procédé on pourra citer celui décrit par exemple par Graverholt et coll., [Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007) 77:69-75].

Plus particulièrement cette étape pourra être intégrée dans les procédés décrits par la demanderesse dans la demande WO2012/035262.

20 Selon l'invention, la culture peut être réalisée par toute technique de culture connue, par exemple en fioles ou en réacteur, mais aussi en fermenteurs ou encore dans tout contenant apte à la croissance de ARUs comme par exemple des bassins de type "raceway/openpond", à condition que ladite technique permette de mettre en contact les ARUs avec au moins la source carbonée, et en outre soit équipée d'au moins une source
25 de lumière émettant dans les longueurs d'onde présentant un spectre étroit comprise entre 400 nm et 550 nm, de préférence comprise entre 430 et 480 nm, très préférentiellement centrée à 455 nm, dont l'action sur la culture pourra conduire à la composition macroscopique de biomasse désirée c'est-à-dire une biomasse riche en phycobiliprotéines (phycocyanine et allophycocyanine) avec des teneurs intracellulaires
30 comprises entre 29 et 250 mg/g de matière sèche, préférentiellement entre 35 et 150 mg/g de matière sèche et éventuellement riche en agents antioxydants en particulier en caroténoïdes, avantageusement de la zéaxanthine et du β -carotène, en teneurs comprises entre 0,1 et 10 mg/g, avantageusement entre 0,250 et 1 mg/g. Ces performances de productivité en biomasse sèche/ou en concentration en biomasse sèche
35 et de teneur intracellulaire en phycobiliprotéines et en caroténoïdes peuvent être

également atteintes en bioréacteurs de 1 m³, 4 m³, 10 m³ et 200 m³, qui sont des volumes couramment utilisés en production industrielle.

La Demanderesse a en outre pu montrer que dans le cas d'une culture discontinue lorsque les concentrations du carbone (C) et du phosphore (P) dans le milieu de culture initial sont telles que le rapport P/C de ces concentrations (exprimé en mole de phosphore/mole de carbone) est inférieur à 0.01898, avantageusement inférieur à 0,01503, plus avantageusement inférieur à 0,01054, encore plus avantageusement inférieur à 0,00527, préférentiellement inférieur à 0,00263, très préférentiellement inférieur à 0,00131, alors la teneur intracellulaire en phycocyanine de la biomasse est augmentée par rapport à la teneur intracellulaire en phycocyanine d'une biomasse obtenue dans les conditions standard de l'art antérieur.

De même en culture alimentée de type discontinue ou continue, la Demanderesse a pu montrer que lorsque les quantités consommées de phosphore et de carbone sont telles que le rapport P/C de ces quantités consommées (exprimé en mole de phosphore/mole de carbone) de ces quantités consommées est inférieur à 0,01898, avantageusement inférieur à 0,01503, plus avantageusement inférieur à 0,01054, encore plus avantageusement inférieur à 0,00527, préférentiellement inférieur à 0,002637, très préférentiellement inférieur à 0,00131, alors la teneur de phycocyanine de la biomasse est augmentée.

Selon l'invention, les sources de phosphore peuvent être choisies parmi les espèces suivantes : l'acide phosphorique, les sels de phosphore, avantageusement de l'hydrogénophosphore de sodium (Na₂HPO₄), ou du dihydrogénophosphore de sodium (NaH₂PO₄), ou du dihydrogénophosphore de potassium (KH₂PO₄), ou de l'hydrogénophosphore de potassium (K₂HPO₄), ou tout mélange, en toute proportion d'au moins deux de ces sources.

Selon l'invention, les sources de carbone peuvent être choisies parmi les espèces suivantes : glucose, glycérol, acétate, saccharose ou tout mélange en toute proportion d'au moins deux de ces sources.

Ainsi l'invention a aussi pour objet un procédé de culture d'ARUs de la classe des Cyanidiophyceae, avantageusement de l'ordre des Cyanidiales, très avantageusement des familles des Cyanidiaceae ou des Galdieriaceae, particulièrement des genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*, très particulièrement des espèces *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Cyanidioschyzon merolae* DBV201, *Cyanidium caldarium*, *Cyanidium daedalum*, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita* ou encore *Galdieria sulphuraria*, préférentiellement de l'espèce *Galdieria sulphuraria*, dans un milieu comprenant au moins

une source de carbone, et au moins une source de phosphore, ledit procédé comprenant au moins une étape d'éclairage.

Selon une première variante du procédé selon l'invention, dans le cas d'une culture discontinue, les concentrations en carbone et en phosphore dans le milieu de culture initial peuvent être telles que le rapport P/C de ces concentrations (exprimé en mole de phosphore/mole de carbone) peut être inférieur à 0,01898, avantageusement inférieur à 0,01503, plus avantageusement inférieur à 0,01054, encore plus avantageusement inférieur à 0,00527, préférentiellement inférieur à 0,00263, très préférentiellement inférieur à 0,00131.

Selon une deuxième variante du procédé selon l'invention, dans le cas d'une culture alimentée de type discontinue ou continue, les quantités consommées en carbone et phosphore au cours de la culture peuvent être telles que le rapport P/C de ces quantités consommées (exprimé en mole de phosphore/mole de carbone) peut être inférieur à 0,01898, avantageusement inférieur à 0,01503, plus avantageusement inférieur à 0,01054, encore plus avantageusement inférieur à 0,00527, préférentiellement inférieur à 0,00263, très préférentiellement inférieur à 0,00131.

Selon des variantes préférées du procédé selon l'invention, celui-ci peut être réalisé selon les variantes décrites ci-dessus mais comprenant en outre au moins une étape d'éclairage réalisée à l'aide d'une lumière bleue.

Ainsi selon encore une autre variante préférée du procédé selon l'invention, dans le cas d'une culture discontinue, ledit procédé comprenant au moins une étape d'éclairage réalisée à l'aide d'une lumière bleue, les concentrations en carbone et en phosphore dans le milieu de culture initial peuvent être telles que le rapport P/C de ces concentrations (exprimé en mole de phosphore/mole de carbone) peut être inférieur à 0,01898, avantageusement inférieur à 0,01503, plus avantageusement inférieur à 0,01054, encore plus avantageusement inférieur à 0,00527, préférentiellement inférieur à 0,00263, très préférentiellement inférieur à 0,00131.

Et selon encore une autre variante préférée du procédé selon l'invention, dans le cas d'une culture alimentée de type discontinue ou continue, ledit procédé comprenant au moins une étape d'éclairage réalisée à l'aide d'une lumière bleue, les quantités consommées en carbone et phosphore au cours de la culture peuvent être telles que le rapport P/C de ces quantités consommées (exprimé en mole de phosphore/mole de carbone) peut être inférieur à 0,01898, avantageusement inférieur à 0,01503, plus avantageusement inférieur à 0,01054, encore plus avantageusement inférieur à 0,00527, préférentiellement inférieur à 0,00263, très préférentiellement inférieur à 0,00131.

Selon ces variantes les conditions d'éclairage par la lumière bleue peuvent être celles décrites précédemment.

Avantageusement selon l'invention le procédé peut comprendre, simultanément ou indépendamment, toute autre étape nécessaire à la croissance de la biomasse ou à la
5 production des molécules d'intérêt (phycocyanine et caroténoïdes) comme par exemple sans être limitatif une ou plusieurs étape(s) de culture sans lumière ou encore une ou plusieurs étape(s) de récupération de la biomasse.

D'une manière générale selon l'invention, la culture selon le procédé pourra s'effectuer à une température comprise entre 15°C et 47°C, avantageusement entre 22°C
10 et 42°C.

Selon l'invention le procédé de culture peut être utilisé pour cultiver une seule souche d'ARUs d'un genre donné, plusieurs souches d'un seul genre donné, ou plusieurs souches de genres différents donnés (au moins 2 espèces de 2 genres différents).

Selon l'invention la source carbonée peut être choisie parmi toute source carbonée
15 connue et utilisable selon la souche choisie. L'homme du métier saura sans difficulté choisir la source carbonée la mieux adaptée à la souche à cultiver. A titre d'exemple on peut citer entre autre comme source carbonée utilisable le glucose, le saccharose, l'acétate ou encore le glycérol [Wolfgang Gross and Claus Schnarrenberger, *opus cit.*].

Le substrat carboné organique contenu dans le milieu de culture peut consister en
20 des molécules complexes ou en un mélange de substrats. Les produits issus de la biotransformation de l'amidon, par exemple à partir de maïs, de blé ou de pomme de terre, notamment les hydrolysats de l'amidon, qui sont constitués de molécules de petite taille, constituent, par exemple, des substrats carbonés organiques adaptés à la culture en mixotrophie des cellules selon l'invention.

25 Les quantités de sources carbonées utilisées selon le procédé dépendront bien évidemment de la souche choisie. L'homme du métier saura là encore sans difficulté adapter les quantités de source carbonée à la souche à cultiver sous forme pure ou en mélange.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le substrat carboné organique pourra
30 avoir une concentration comprise entre 5 mM et 1,5 M, de préférence 50 mM et 800 mM.

Le procédé selon l'invention peut en outre comprendre une étape de récupération des ARUs. Ladite récupération des ARUs peut être réalisée par toute technique permettant la récupération de la biomasse, notamment les méthodes de filtration, gravimétrique ou sous pression réduite, de décantation, ou bien encore des méthodes de
35 précipitation suivie d'une filtration gravimétrique.

L'invention concerne également la biomasse susceptible d'être obtenue par l'une quelconque des variantes du procédé selon l'invention.

Selon l'invention ladite biomasse peut présenter une densité en ARUs d'au moins 20 g/L et jusqu'à environ 200 g/L de matière sèche, préférentiellement d'au moins 50 g/L de matière sèche, plus préférentiellement d'au moins 90 g/L de matière sèche et jusqu'à environ 150 g/L de matière sèche.

Selon l'invention ladite biomasse peut présenter une teneur intracellulaire en phycobiliprotéines (phycocyanine et allophycocyanine) avec des teneurs intracellulaires comprises entre 29 et 250 mg/g de matière sèche, préférentiellement entre 35 et 150 mg/g de matière sèche.

Selon l'invention encore ladite biomasse peut présenter une teneur intracellulaire en phycocyanine comprise entre 29 et 200 mg/g de matière sèche, préférentiellement entre 40 et 100 mg/g de matière sèche.

Selon l'invention les phycobiliprotéines, et particulièrement la phycocyanine, produites par ladite biomasse peuvent être extraites pour être utilisées par exemple dans l'alimentation ou encore comme colorant. L'extraction des phycobiliprotéines, et particulièrement de la phycocyanine, à partir de ladite biomasse peut se faire selon toute technique d'extraction connue de l'homme du métier comme par exemple celle décrite par Moon et coll., 2014 (Myoungsoon, Sanjiv K Mishra, Chul Woong Kim, William I Suh, Min S Park, and Ji-Won Yang. "Isolation and Characterization of Thermostable Phycocyanin from *Galdieria Sulphuraria*" 31 (2014): 1–6) ou par Jouen et coll., 1999 (Jaouen, P., B. Lepine, N. Rossignol, R. Royer, and F. Quemeneur. "Clarification and Concentration with Membrane Technology of a Phycocyanin Solution Extracted from *Spirulina Platensis*." *Biotechnology Techniques* 13, no. 12 (December 1999): 877–81. doi:10.1023/A:1008980424219.) ou dans le brevet FR2789399A1.

L'invention concerne donc aussi un procédé de préparation de phycocyanines qui comprend les étapes suivantes :

- a) cultiver des ARUS de la classe des *Cyanidiophyceae*, dans un milieu de culture comprenant au moins une source de carbone avec au moins une étape d'éclairage sous la forme d'un rayonnement présentant un spectre étroit de longueur d'onde comprise entre 400 et 550 nm, pour obtenir un mout de fermentation comprenant lesdites ARUs dans le milieu de culture, à une densité cellulaire d'au moins 20 g/L de matière sèche, tel que défini précédemment et ci-après,
- b) récupérer la biomasse obtenue à partir du mout de fermentation,
- c) récupérer les phycocyanines à partir de la biomasse.

La phycocyanine susceptible d'être obtenue à partir de ladite biomasse présente des propriétés différentes notables par rapport à la phycocyanine susceptible d'être obtenue par culture d'autre organisme, particulièrement par exemple par rapport à la phycocyanine susceptible d'être obtenue par culture de spiruline.

5 Ladite phycocyanine susceptible d'être obtenue à partir de la biomasse obtenue selon l'invention, particulièrement à partir d'une biomasse de *Galdieria sulphuraria*, peut présenter une coloration bleue, pas ou peu altérée dans une solution dont le pH est compris entre 2 et 8, préférentiellement entre 3 et 7, très préférentiellement entre 4 et 5.

10 De plus, la phycocyanine susceptible d'être obtenue à partir de la biomasse obtenue selon l'invention, particulièrement à partir d'une biomasse de *Galdieria sulphuraria*, peut présenter l'avantage de peu ou pas précipiter à pH acide, particulièrement à un pH compris entre 2 et 4, contrairement à la phycocyanine susceptible d'être obtenue à partir d'une biomasse de spiruline. Cette propriété fait de la phycocyanine susceptible d'être
15 biomasse de *Galdieria sulphuraria*, un excellent candidat pour une utilisation dans des boissons acides, gazeuses ou non gazeuses.

20 De plus, la phycocyanine susceptible d'être obtenue à partir de la biomasse obtenue selon l'invention, particulièrement à partir d'une biomasse de *Galdieria sulphuraria*, peut présenter une thermostabilité améliorée par rapport à celle à la phycocyanine extraite de spiruline pour des températures supérieures à 50°C (Moon et al., 2014).

Enfin, la phycocyanine susceptible d'être obtenue à partir de la biomasse obtenue selon l'invention, particulièrement à partir d'une biomasse de *Galdieria sulphuraria*, peut présenter une résistance à l'éthanol améliorée par rapport à la phycocyanine de spiruline.

25 Selon l'invention on entend par "résistance de la phycocyanine", (au pH acide, à la température et/ou à l'éthanol) une absence de perte de coloration ou une perte de coloration inférieure à ce qui est décrit pour la phycocyanine extraite de *Spirulina platensis*. La quantification de l'altération de la couleur peut se mesurer au spectrophotomètre en comparant l'absorbance d'une solution aqueuse dans des conditions standard de température et de pH, comme décrit par Moon (2014), puis de
30 comparé ces résultats à ceux obtenues des conditions de température élevée, pH acide ou alcalin, et/ou en cas d'ajout d'éthanol dans la solution par exemple.

Ainsi l'invention concerne également de la phycocyanine susceptible d'être obtenue selon le procédé de l'invention, ladite phycocyanine pouvant être résistante à une température comprise entre 70°C et 0°C, préférentiellement entre 65°C et 25°C, très
35 préférentiellement entre 60°C et 50°C, et/ou résistante à un pH compris entre 8 et 2, préférentiellement compris entre 3 et 7, très préférentiellement compris entre 4 et 5, et/ou

résistante à une concentration en éthanol comprise entre 50% et 1%, préférentiellement de comprise entre 40% et 10%, très préférentiellement comprise entre 20 et 30%

L'invention concerne également l'utilisation de la phycocyanine susceptible d'être obtenue selon le procédé de l'invention, dans l'alimentation, animale ou humaine, comme
5 complément alimentaire, ou encore comme colorant, particulièrement comme colorant alimentaire.

Le tourteau susceptible d'être obtenu après extraction de la phycocyanine à partir de la biomasse d'ARUs susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention peut être utilisé comme complément alimentaire riche en protéines et caroténoïdes, dans
10 l'alimentation humaine ou animale.

Selon l'invention ladite biomasse peut présenter une teneur intracellulaire en caroténoïdes comprise entre 0,1 et 10 mg/g de matière sèche, avantageusement entre 0,250 et 1 mg/g de matière sèche.

Les ARUs présentent un potentiel d'utilisation important dans beaucoup de
15 domaines dont on citera par exemple, l'alimentation humaine ou animale, la cosmétique, la médecine.

Selon l'invention, ladite biomasse d'ARUs susceptible d'être obtenue selon l'invention peut être utilisée après récolte soit directement, éventuellement séchée, soit après transformation. En particulier ladite biomasse peut être utilisée sous la forme de
20 farines entrant dans des compositions alimentaires ou sous forme de compléments alimentaires.

La biomasse d'ARUs susceptible d'être obtenue selon l'invention peut être transformée en farine selon tout procédé connu de l'homme du métier. On peut ainsi envisager par exemple que les ARUs puissent être séparées du milieu de culture, lysées
25 et réduites en particules fines (diamètre moyen de 10 microns), puis séchées.

L'invention concerne également toute utilisation de la biomasse d'ARUs susceptible d'être obtenue selon l'invention dans tout domaine connu d'utilisation des ARUs, particulièrement, l'alimentation humaine ou animale, la cosmétique, la médecine.

La biomasse obtenue après culture de ARUs selon le procédé de l'invention peut
30 permettre d'obtenir en particulier une farine riche en agents antioxydants, en particulier en caroténoïdes (particulièrement zéaxanthine et β -carotènes) en teneurs comprises entre 0,1 et 10 mg/g de matière sèche, avantageusement entre 0,25 et 1 mg/g de matière sèche dont en particulier de la zéaxanthine en une teneur comprise entre 0,05 et 5 mg/g de matière sèche, avantageusement entre 0,1 et 1 mg/g de matière sèche, et/ou du β -
35 carotène en une teneur 0,05 et 5 mg/g de matière sèche, avantageusement entre 0,1 et 1 mg/g de matière sèche, répondant à un besoin en particulièrement dans l'industrie

alimentaire, parce que plus appétentes, ayant meilleur goût, apportant des antioxydants en quantité importante et pouvant être utilisable dans l'alimentation animale ou humaine.

L'invention concerne donc une farine susceptible d'être obtenue après transformation de la biomasse en ARUs susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention.

Quelle que soit la forme d'utilisation du produit susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention (biomasse native ou transformée), ledit produit peut être utilisé pur ou mélangé à d'autres ingrédients classiquement utilisés, particulièrement en alimentation ou en cosmétique.

L'invention concerne également tout produit pouvant comprendre au moins de la biomasse d'algues susceptible d'être obtenue selon l'invention. L'invention concerne aussi tout produit pouvant comprendre au moins de la farine issue de la transformation de la biomasse d'algues susceptible d'être obtenue selon l'invention.

DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 décrit l'optimisation de la croissance de *Galdieria sulphuraria* en Bioréacteur. Elle montre l'évolution de la concentration en biomasse en fonction du temps d'une souche de *Galdieria sulphuraria* selon le mode trophique de culture utilisé. Les résultats montrent que les conditions de mixotrophie (-O-) permettent d'obtenir une croissance de la souche plus rapide et nettement améliorée par rapport à des conditions d'hétérotrophie (-♦-). Cette courbe montre également que la concentration en biomasse sèche est nettement supérieure en fin de culture avec des conditions de mixotrophie qu'avec les conditions d'hétérotrophie.

La Figure 2 montre l'effet de la lumière bleue sur la croissance et la production de pigments.

- La figure 2A montre la teneur intracellulaire en phycocyanine exprimée en mg/g de matière sèche (DW) (■) et la concentration cellulaire de la biomasse estimée par mesure de la densité optique à 800nm (□). L'essai a été réalisé en lumière blanche et en lumière bleue. Les mesures ont été faites à 180h et 250h.

- La figure 2B montre la quantité de chlorophylle (■), de β-carotène (■) et de zéaxanthine (■) dans les mêmes cultures, en lumière blanche et en lumière bleue, à 180h et 250h.

La Figure 3 montre l'effet de l'azote et du phosphore sur la croissance et la production de phycocyanine. Elle montre les résultats obtenus lors de l'essai visant à tester l'influence de la concentration en azote (Figure 3A et 3B), la concentration en phosphore (Figure 3C et 3D) sur les cultures de *Galdieria sulphuraria*.

Les figures 3A et 3C sont la représentation de la croissance de la souche en fonction du temps en présence de 1 (-△-), 2 (-□-), 4 (-○-) et 8 (-◆-) g/L de sulfate d'ammonium (Figure 3A) ou de 250 (-△-), 500 (-□-), 1000 (-○-) et 2000 (-◆-) mg de KH₂PO₄ (Figure 3C).

Les Figures 3B et 3D représentent la teneur intracellulaire en phycocyanine exprimée en mg/g de matière sèche dans les souches des cultures en présence de 1 (■), 2 (■), 4 (■) et 8 (■) g/L (NH₄)₂SO₄, à 250 h (Figure 3B) ou de 250 (■), 500 (■), 1000 (■) et 2000 (■) mg de Phosphore de KH₂PO₄ (Figure 3D).

La Figure 4 montre les effets combinés de la lumière bleue et de la limitation en phosphore sur la production de pigments sur des cultures de *Galdieria sulphuraria*. Elle montre en A la teneur intracellulaire en phycocyanine exprimée en mg/g de matière sèche obtenue dans les différentes conditions testées. La figure 4B montre les teneurs intracellulaires en chlorophylle (■), en β-carotène (■) et en zéaxanthine (■) dans les mêmes cultures.

La Figure 5 montre le suivi de culture en Fermenteur en mode continu avec contre-pales lumineuses bleues (455 nm)

- En A le suivi de croissance de la souche de *Galdieria sulphuraria* en fermenteur par mesure d'absorbance à 800 nm, et par mesure de masse sèche par litre de moût.
- En B montre la teneur intracellulaire en phycocyanine exprimée en mg/g de matière sèche (MS)

La Figure 6 montre les caractéristiques physicochimiques de la phycocyanine extraite de *Galdieria sulphuraria* comparée à la phycocyanine extraite de *Spirulina platensis*. (A) Test de résistance au pH, (B) Résistance à la température. (C) Résistance à l'éthanol:

- En A que la phycocyanine extraite de *Galdieria sulphuraria* présente une bonne résistance au pH : moins de 20 % de perte de pigmentation jusqu'à pH 2.75, la perte devenant plus importante jusqu'à pH 2.
- En B que la phycocyanine extraite de *Galdieria sulphuraria* présente une bonne résistance à la température : plus de 40% de pigmentation restante après 30 minutes à 70°C.
- En C que la phycocyanine extraite de *Galdieria sulphuraria* présente une bonne résistance à l'éthanol : 40 % de perte de pigmentation à 30 % d'éthanol, environ 70% à 50% d'éthanol.

EXEMPLES

Exemple 1 : Optimisation de la croissance en Fermenteur.

Matériel et méthodes

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

5 Milieu de culture

Hétérotrophie et Mixotrophie : 30 g/L glycérol, 8 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g/L KH_2PO_4 , 716mg/L MgSO_4 , 44mg/L CaCl_2 , 3 mL/L de solution stock Fe-EDTA (FeSO_4 à 6,9g/L et d'EDTA- Na_2 à 9,3g/L) et 4 mL/L de solution de trace métal (3,09g/L EDTA- Na_2 ; 0,080g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2,860g/L H_3BO_3 ; 0,040g/L $\text{NaVO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1,820g/L MnCl_2 ; 10 0,040g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,220g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,017g/L Na_2SeO_3 ; 0,030g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Conditions de culture :

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 15 via l'ajout de base (solution d'ammoniaque 14% (w NH_3 /w) et/ou d'acide (solution d'acide sulfurique 4N). La température de culture est fixée à 42 °C. L'agitation est réalisée grâce à 3 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 2 hélices tripâles HTPG2 placés sur l'arbre d'agitation. La pression en oxygène dissous dans la phase liquide est régulée 20 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 dissous 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 25 composition du milieu. Le temps de culture a été compris entre 50 et 300 heures.

Afin de d'optimiser la croissance des souches d'ARUs différents modes trophiques ont été testés :

- l'hétérotrophie (-♦-) Le substrat glycérol est apporté par une conduite de type discontinue alimentée. Aucun apport de lumière n'est réalisé.
- 30 - la mixotrophie (-○-) : Le substrat glycérol est apporté par une conduite de type discontinue alimentée et un apport de lumière est réalisé.
- **Résultats**

Les performances en fin de croissance des différentes conditions sont résumées dans le tableau 1 suivant

	Mixotrophie	Hétérotrophie
Temps (h)	100	350
Concentration cellulaire (g biomasse sèche/L)	98	68
Rendement (g/ g de substrat carboné)	0,5	0,5
Productivité (g biomasse sèche/L/h)	0,98	0,19

Tableau 1

La culture en Mixotrophie permet d'obtenir plus rapidement une concentration en biomasse supérieure à celles obtenues avec des cultures en mode hétérotrophe ou autotrophe.

5 La productivité de biomasse en mixotrophie est de 0,98 g biomasse/L/h, contre 0,19 g biomasse/L/h en hétérotrophie. On note que dans l'art antérieur Graverholt et collaborateurs. ont obtenu une productivité de 0,286 g/L/h en hétérotrophie [Graverholt et col., opus cit.].

Les résultats sont présentés à la figure 1.

10 En plus d'une croissance plus rapide, la présence de lumière permet de favoriser la production de protéines dans les cellules, celle-ci pouvant atteindre 51,56 % de la matière sèche en mixotrophie contre 29,57 % en hétérotrophie (Tableau 2 : Analyses du contenu en acide aminé de biomasse de *G. sulphuraria* ou de *S. platensis*).

A	Acides Aminés								
<i>Galdieria sulphuraria</i>	ASP	GLU	ALA	ARG	CYS	GLY	HIS	ILE	LEU
%	4,92	8,78	2,96	3,01	0,76	2,46	1,13	2,76	3,86
	LYS	MET	PHE	PRO	SER	THR	TYR	VAL	TOTAL
%	3,81	1,20	2,25	2,96	3,60	3,44	0,00	3,66	51,56
B	Acides Aminés								
<i>Galdieria sulphuraria</i>	ASP	GLU	ALA	ARG	CYS	GLY	HIS	ILE	LEU
%	2,99	5,34	1,62	1,57	0,46	1,33	0,62	1,41	2,07
	LYS	MET	PHE	PRO	SER	THR	TYR	VAL	TOTAL
%	2,14	0,62	1,26	1,77	2,24	2,03	0,00	2,10	29,57
C	Acides Aminés								
<i>Spirulina platensis</i>	ASP	GLU	ALA	ARG	CYS	GLY	HIS	ILE	LEU
%	6,11	8,77	4,85	4,14	0,62	3,20	1,05	3,53	5,42
	LYS	MET	PHE	PRO	SER	THR	TYR	VAL	TOTAL
%	2,86	1,35	2,82	2,20	2,58	3,23	0,00	3,98	56,71

15 Tableau 2 : A) et B) : Contenu en acides aminés de *Galdieria sulphuraria* cultivée en conditions de mixotrophie (A) et d'hétérotrophie (B). Le contenu protéique estimé par la méthode de Kjeldahl a été estimé à 51.5% et 37% respectivement avec un facteur N-6.25x. C) : Contenu en acides aminés d'un échantillon de *Spirulina platensis* commerciale. Le contenu protéique estimé par la méthode de Kjeldahl a été estimé à 65% avec un facteur N-6.25x.

Le contenu élevé en protéines de *Galdieria sulphuraria* en fait un bon candidat pour entrer dans la préparation de compléments alimentaires et ainsi concurrencer la spiruline sur ce marché car son aminoscore est supérieur à celui recommandé par la FAO et ses scores sont supérieurs à ceux de la spiruline pour 4 des 7 acides aminés essentiels pour la nutrition humaine (Tableau. 3) :

	His	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	SSA
Recommandations FAO	16	30	61	48	25	40	23
<i>Galdieria sulphuraria</i>	21,94	53,59	74,95	73,98	66,80	71,07	38,06
<i>Spirulina platensis</i>	16,15	54,31	83,38	44,00	49,69	61,23	30,31

Tableau. 3 : Aminoscores comparant l'apport journalier recommandé par la FAO et les quantités apportés par les souches de cette étude (mg/g de protéines) (adapté de la recommandation 92 nourriture et nutrition de la FAO.

Exemple 2 : Effet de la lumière bleue sur la production de phycocyanine en fioles d'Erlenmeyer sur la souche *Galdieria sulphuraria*.

Matériel et méthodes

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

Milieu de culture :

30 g/L glycérol, 8 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 716mg/L MgSO₄, 44mg/L CaCl₂, 3 mL/L de solution stock Fe-EDTA (FeSO₄ à 6,9g/L et d'EDTA-Na₂ à 9,3g/L) et 4 ml/L de solution de trace métal (3,09g/L EDTA-Na₂ ; 0,080g/L CuSO₄.5H₂O ; 2,860g/L H₃BO₃ ; 0,040g/L NaVO₃. 4H₂O ; 1,820g/L MnCl₂ ; 0,040g/L CoCl₂.6H₂O ; 0,220g/L ZnSO₄.7H₂O ; 0,017g/L Na₂SeO₃ ; 0,030g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄. 4H₂O).

Conditions de culture ;

Dans chaque fiole d'Erlenmeyer 100 mL de milieu sont inoculés à 0,1% (v/v) avec une pré-culture âgée de 240h. Pour tester l'effet de la lumière combinée à la concentration en phosphore, on illumine de façon indépendante les fioles d'Erlenmeyer avec un système de LED blanche ou de LED bleue (455 nm). L'intensité lumineuse pour chacune des conditions est de 100 µmol m⁻² s⁻¹. Les cellules sont cultivées à une température de 42°C sous agitation modérée (200 tours/minute). Le suivi de la croissance des cellules est effectué toutes les 24h par mesure d'absorbance à 800 nm. Lorsque la phase de stationnaire est atteinte (environ 190h) 50 mL de suspension cellulaire sont prélevés afin d'effectuer une mesure de masse sèche par filtration, des mesures de concentration en phosphore dans le milieu grâce à une mesure par Reflectoquant® (méthodes connue de l'homme du métier).

L'estimation de la teneur intracellulaire 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] (A). Les autres pigments comme la chlorophylle et les caroténoïdes ont été estimés par une méthode de dosage par HPLC connue de l'homme du métier (B).

Résultats

5 Cet essai montre que déjà à 180h la concentration en phycocyanine est 300% plus élevée en lumière bleue qu'en lumière blanche (Fig. 2A). A 250h cette différence bien que significative n'est plus que de 25%.

En analysant le contenu en phosphore du milieu à 250h, on constate qu'il en reste environ 100 mg/L pour les Erlenmeyers en lumière bleue alors qu'en lumière blanche il
10 reste 5 mg/L et que nous sommes en dessous des valeurs en phosphore du milieu induisant la production phycocyanine comme nous le verrons plus tard dans le point 3. A 180h les souches ne contiennent pas de chlorophylle mais déjà du β -carotène et de la zéaxanthine (Fig. 2B).

Des essais avec des longueurs de lumière bleue de 475 nm montrent un effet
15 similaire à celle de 455 nm ; il est donc envisageable d'utiliser toute la plage de longueur d'onde de lumière bleue pour favoriser la production de phycocyanine.

A part la lumière blanche seul la lumière bleue a permis d'obtenir une croissance de la souche avec production de phycocyanine.

L'exposition à la lumière bleue permet une croissance plus ou moins équivalente à
20 celle observée en lumière blanche, avec une augmentation importante de la teneur intracellulaire de PC par gramme de masse sèche (Figure 2).

Exemple 3 : Effet de la composition du milieu de culture sur la production de phycocyanine.

Matériel et méthodes

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

Milieu de culture :

Pour tester l'effet de la concentration en phosphore on effectue un suivi des cultures sur 4 milieux différents. Ces milieux sont composés d'une même base :

30 30 g/L glycérol, 8 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 716mg/L MgSO_4 , 44mg/L CaCl_2 , 3 mL/L de solution stock Fe-EDTA (FeSO_4 à 6,9g/L et d'EDTA- Na_2 à 9,3g/L) et 4 ml/L de solution de trace métal (3,09g/L EDTA- Na_2 ; 0,080g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2,860g/L H_3BO_3 ; 0,040g/L $\text{NaVO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1,820g/L MnCl_2 ; 0,040g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,220g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,017g/L Na_2SeO_3 ; 0,030g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Pour la limitation en phosphore on impose des concentrations en KH_2PO_4 de
35 250mg/L, 500mg/L, 1g/L, et 2g/L. Une fois les milieux assemblés, on ajuste le pH à 3 avec du H_2SO_4 36N puis on les stérilise. Le même protocole est appliqué pour les milieux

ou la concentration en azote varie, cette fois ci en gardant la concentration en KH_2PO_4 à une valeur initiale de 1 g/l.

Conditions de culture ;

Dans chaque fiole d'Erlenmeyer 100 ml de milieu sont inoculés à 0,1% avec une
5 préculture âgée de 240h. Les cellules sont cultivées à une température de 42°C sous agitation modérée (140 tours/minute) avec un éclairage constant par tube fluorescent (Osram 865 Cool Day light) à $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Le suivi de la croissance des cellules est effectué toutes les 24h par mesure d'absorbance à 800 nm.

L'estimation de la teneur en phycocyanine par gramme de matière sèche a été
10 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] (A). Les autres pigments comme la chlorophylle et les caroténoïdes ont été estimés par une méthode de dosage par HPLC connue de l'homme du métier (B).

Résultats :

15 La figure 3 présente les résultats de ces essais

(A) Croissance de la souche en présence de différentes concentration en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dans le milieu initial.

(B) Estimation de la teneur intracellulaire en phycocyanine dans la biomasse en fin de culture ;

20 (C) Croissance de la souche en présence de différentes concentrations en KH_2PO_4 dans le milieu initial ;

(D) Estimation de la quantité de PC dans la biomasse à 180h et 250h :

Pour ces expériences les cellules sont éclairées par de la lumière blanche ($100 \mu \text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

25 Hormis, l'ajout de quantités importantes d'azotes dans le milieu culture visant à favoriser la production de phycocyanine, la Demanderesse a pu mettre en évidence que la quantité de phosphore dans le milieu est prépondérante pour la production de phycobiliprotéines et de caroténoïdes (Figure 3).

La Demanderesse a pu déterminer que pour des croissances équivalente (Figure
30 3C), c'est à dire que pour des concentrations en phosphore non restrictives, la production de phycocyanine était supérieure dans un milieu contenant 250 mg/l de KH_2PO_4 (soit 0.0025 mole de phosphore/L) à celle obtenue dans un milieu contenant 2 g/l de KH_2PO_4 (soit mole de phosphore/L) (Figure 3B).

De façon linéaire plus la concentration en phosphore dans le milieu initial est
35 importante pour une concentration dans le milieu initial en source de carbone fixe, plus la

teneur intracellulaire en phycocyanine diminue, et inversement. Autrement dit, plus le rapport P/C des concentrations initiales dans le milieu (exprimé en mole de phosphore/mole de carbone) est important, plus la teneur intracellulaire en phycocyanine et en caroténoïdes dans la biomasse augmente.

5 De ce fait, le procédé de culture discontinue vise à maintenir un niveau de phosphore dans le milieu permettant de combiner croissance et production de phycobiliprotéines et de caroténoïdes, en déterminant une gamme de concentration en phosphore idéale. Contrairement à ce qui a été décrit dans la demande internationale WO2015107312 pour les chlorelles, la carence en phosphore n'induit pas une
10 augmentation de la teneur en protéines de façon globale chez *Galdieria sulphuraria*. Selon nos résultats la concentration en phycobiliprotéines augmente alors que la teneur en protéines de la biomasse (AA%) reste stable.

Exemple 4 : Effets combinés de la lumière bleue et de la concentration en phosphore sur la production de phycocyanines et de caroténoïdes.

15 **Matériel et méthodes**

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

Milieu de culture :

30 g/L glycérol, 8 g/L (NH₄)₂SO₄, 716mg/L MgSO₄, 44mg/L CaCl₂, 3 mL/L de solution stock Fe-EDTA (FeSO₄ à 6,9g/L et d'EDTA-Na₂ à 9,3g/L) et 4 ml/L de solution de
20 trace métal (3,09g/L EDTA-Na₂ ; 0,080g/L CuSO₄.5H₂O ; 2,860g/L H₃BO₃ ; 0,040g/L NaVO₃.4H₂O ; 1,820g/L MnCl₂ ; 0,040g/L CoCl₂.6H₂O ; 0,220g/L ZnSO₄.7H₂O ; 0,017g/L Na₂SeO₃ ; 0,030g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O).

Conditions de culture :

25 Une gamme de concentration en phosphore, sous forme de KH₂PO₄, en présence de lumière bleue ou de lumière blanche a été utilisée pour faire croître des souches de *Galdieria sulphuraria* en Erlenmeyer pendant 250h.

KH ₂ PO ₄	250 mg	250 mg	500 mg	500 mg	1000 mg	1000 mg	2000 mg	2000 mg
Lumière	Blanche	Bleue	Blanche	Bleue	Blanche	Bleue	Blanche	Bleue
Condition	1	2	3	4	5	6	7	8

30 Dans chaque fiole d'Erlenmeyer 100 mL de milieu sont inoculés à 0,1% (v/v) avec une pré-culture âgée de 240h. Pour tester l'effet de la lumière combinée à la concentration en phosphore, on illumine de façon indépendante les fioles d'Erlenmeyer avec un système de LED blanche ou de LED bleue (455 nm). L'intensité lumineuse pour chacune des conditions est de 100 µmol m⁻² s⁻¹. Les cellules sont cultivées à une température de 42°C sous agitation modérée (200 rpm). Le suivi de la croissance des cellules est effectué toutes les 24h par mesure d'absorbance à 800 nm.

Résultats :

La figure 4 présente les résultats de ces essais

Visuellement les souches présentent une différence de coloration allant du vert bleu au jaune pâle en passant par le vert.

5 De façon similaire à ce qui a été décrit dans les expériences précédentes on retrouve l'effet positif de la lumière bleue et de la carence en phosphore.

Si l'on compare de façon croisée les données il apparaît clairement que la condition la plus favorable pour la production de pigments que ce soit de la phycocyanine, des caroténoïdes ou de la chlorophylle, est une culture en lumière bleue en présence de faible
10 concentration de phosphore.

Le tableau 4 ci-dessous montre les concentrations des différents pigments dans la biomasse après 250 h de croissance.

Conditions	Phycocyanine*	Chlorophylle A*	β -carotène*	Zéaxanthine*
1	30	0,989	0,214	0,115
2	60	2,154	0,543	0,441
3	25	0,993	0,239	0,131
4	53	1,687	0,393	0,307
5	24	1,073	0,252	0,182
6	40	0,738	0,162	0,089
7	20	0,408	0,114	0,081
8	39	0,622	0,120	0,063

*: (mg/g de matière sèche)

**Tableau 4. Concentration des différents pigments dans la biomasse après 250 h de
15 croissance.**

Bien que significatif dans les deux cas, l'effet de la concentration en phosphore est beaucoup plus marqué en présence de lumière bleue que de lumière blanche, les concentrations pouvant être multipliées par deux pour la phycocyanine (Figure 4A et Tableau 4), par 4,5 pour les β -carotènes, et par 7 pour la zéaxanthine (Figure 4B et
20 Tableau 4).

Exemple 5 : Effets combinés de la lumière bleue et de la concentration en phosphore sur la production de phycocyanines et de caroténoïdes en culture continue

Conditions de culture :

25 La souche *Gladieria UTEX 2919* a été cultivée dans les conditions de l'exemple 1, avec 500 mg de KH₂PO₄ et une contre-pale bleue délivrant jusqu'à 3 Watts de puissance lumineuse à une longueur d'onde de 455 nm. Le milieu d'alimentation est dimensionné pour obtenir entre 60 et 65 g de matière sèche par litre de moût. La concentration de

chaque élément du milieu est ajustée afin de respecter les ratios du milieu utilisé pour le pied de cuve décrit dans l'exemple 1.

Pour la première phase de culture correspondant à la culture en batch, fed batch et puis à la stabilisation au alentour de 60 g de MS/L, la lumière est maintenu à 50% de la puissance maximale. A partir de 600 heures de culture, considéré comme la phase de production, la puissance lumineuse est passé à 100% soit 3 Watts.

Figure 5 A: (-○-) suivi de croissance par matière sèche ; (-□-) suivi de croissance par mesure d'absorbance à 800 nm.

Figure 5 B: Mesure de l'évolution du contenu intracellulaire en phycocyanine au cours de la culture.

Résultats :

Après 3 semaines le régime de permanent de culture a été établi entre 60 et 65 g de MS par litre de moût (Figure 5A). Lorsque la puissance de lumière est augmenter à 600h s'en suit une augmentation progressive de la teneur en PC dans la biomasse jusqu'à atteindre 40 mg/g de MS. En moyenne la teneur en PC mesurée sur les 200 dernières heures culture reste proche de cette valeur.

Exemple 6 : Caractérisation physicochimique de la phycocyanine extraite de la souche *Gladieria UTEX 2919* cultivée selon l'invention.

Protocoles des tests

La souche *Gladieria UTEX 2919* a été cultivée dans les conditions de l'exemple 2.

Pour ces essais la phycocyanines a été extraite selon le protocole décrit par Moon et al., 2014 (*op.citus*). La phycocyanine mesure de couleur bleue se fait par mesure d'absorbance à 618 nm grâce à un spectrophotomètre (Amersham Biosciences Ultra Spec 2100 Pro). La perte de couleur exprimée en pourcentage se calcule de façon relative à la mesure de l'absorbance de l'échantillon dans les conditions de référence, pH 6 pour le test pH, 25°C pour le test de température, 0 % d'éthanol pour la résistance à l'alcool.

Pour le test de résistance en condition acide le pH est descendu de façon graduelle par ajout d'une solution d'acide citrique à la préparation de phycocyanine. Pour chaque valeur de pH un échantillon de la solution de phycocyanine est prélevé et son absorbance à 618 nm mesuré.

Pour les essais de résistance à la température la solution de phycocyanine est placée pendant 30 minutes dans un bain-marie préalablement chauffé à 70°C, après

refroidissement à température ambiante l'absorbance de l'échantillon à 618 nm est mesurée.

Pour les essais de résistance à l'alcool, 1 volume de solution de phycocyanine est mélangé à 1 volume équivalent d'une solution d'éthanol à 0%, 40 %, 60% , 80%, et 100% pour obtenir au final une solution de phycocyanine contenant 0%, 20%, 30%, 40%, et 50% respectivement. Après 1 heure d'incubation une mesure d'absorbance à 618 nm est effectuée pour chaque mélange.

Résultats :

Les résultats de ces essais sont présentés à la figure 6

La figure 6A montre que la phycocyanine extraite de la souche *Galdieria sulphuraria* (UTEX 2919) présente encore plus de 80% de sa coloration à pH 2.75.

La figure 6B montre que la phycocyanine extraite de la souche *Galdieria sulphuraria* (UTEX 2919) présente encore plus de 40% de sa coloration après 30 minutes d'incubation à 70°C.

La figure 6C montre que la phycocyanine extraite de la souche *Galdieria sulphuraria* (UTEX 2919) présente encore plus de 30% de sa coloration après 1 heure d'incubation dans 40% d'éthanol.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux décrits dans l'art antérieur pour la phycocyanine de spiruline (<http://www.dlt-spl.co.jp/business/en/spirulina/linablue.htm>).

REFERENCES

Chen, Feng, and Yiming Zhang ; Enzyme and Microbial Technology 20, no. 3 (February 15, 1997): 221–24

Sloth JK & al., ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, Vol.28, n° 1-2, Janvier 2006, 168-175

Graverholt OS & al., APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Vol. 77, n° 1, 5 septembre 2007, 69-75

Gross W and Schnarrenberger C, "Heterotrophic Growth of Two Strains of the Acidothermophilic Red Alga *Galdieria Sulphuraria*." Plant and Cell Physiology 36, no. 4 (June 1, 1995): 633–38

Jouen & al., 1999, "Clarification and Concentration with Membrane Technology of a Phycocyanin Solution Extracted from *Spirulina Platensis*." *Biotechnology Techniques* 13, no. 12 (December 1999): 877–81

Moon & al., 2014, "Isolation and Characterization of Thermostable Phycocyanin from *Galdieria Sulphuraria*" 31 (2014): 1–6

Nichols K & al., BOTANICAL GAZETTE, Vol. 124, n° 2, 1^{er} décembre 1962, 85-93

Steinmuler K & al., PLANT PHYSIOLOGY, Vol. 76, n° 4, 1^{er} décembre 1984, 935-939

Rellan, S, et coll. ; Food and Chemical Toxicology 47 (2009) 2189–2195

FR 2 789 399

WO2012/035262

REVENDICATIONS

1. Procédé de culture d'algues rouges unicellulaires (ARUs) de la classe des *Cyanidiophyceae*, dans un milieu comprenant au moins une source de carbone,
5 ledit procédé comprenant au moins une étape d'éclairage sous la forme d'un rayonnement présentant un spectre étroit de longueur d'onde comprise entre 400 et 550 nm.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les ARUs sont de l'ordre des Cyanidiales, très avantageusement des familles des Cyanidiaceae ou des
10 Galdieriaceae, particulièrement des genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* ou *Galdieria*, très particulièrement des espèces *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Cyanidioschyzon merolae* DBV201, *Cyanidium caldarium*, *Cyanidium daedalum*, *Cyanidium maximum*, *Cyanidium partitum*, *Cyanidium rumpens*, *Galdieria daedala*, *Galdieria maxima*, *Galdieria partita* ou encore *Galdieria sulphuraria*,
15 préférentiellement de l'espèce *Galdieria sulphuraria*.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que l'éclairage est sous la forme d'un rayonnement présentant un spectre étroit de longueur d'onde comprise entre 420 nm et 500 nm, avantageusement entre 430 et 480 nm, très préférentiellement 455 nm.
- 20 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la source carbonée est choisie parmi le glucose, du saccharose, de l'acétate ou encore du glycérol.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la source carbonée est à une concentration dans le milieu initial comprise entre 5 mM et 1,5 M, de préférence 50 mM et 800 mM.
25
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que dans le cas d'une culture discontinue les concentrations en carbone et en phosphore dans le milieu de culture initial ou, dans le cas d'une culture alimentée de type discontinue ou continue les quantités consommées en carbone et phosphore
30 au cours de la culture, peuvent être telles que le rapport P/C de ces concentrations exprimé en mole de phosphore/mole de carbone est inférieur à 0,01898, avantageusement inférieur à 0,01503, plus avantageusement inférieur à 0,01054, encore plus avantageusement inférieur à 0,00527, préférentiellement inférieur à 0,00263, très préférentiellement inférieur à 0,00131.

7. Biomasse susceptible d'être obtenue par le procédé tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle présente une densité en ARUs comprise entre 20 et 200 g/l de matière sèche, préférentiellement entre 90 et 150 g/l de matière sèche.
- 5 8. Biomasse selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce qu'elle présente une teneur en phycobiliprotéines (phycocyanine et allaophycocyanine) comprise entre 29 et 250 mg/g de matière sèche, préférentiellement entre 35 et 150 mg/g de matière sèche.
9. Biomasse selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce
10 qu'elle présente une teneur en phycocyanine comprise entre 29 et 200 mg/g de matière sèche, préférentiellement entre 40 et 100 mg/g de matière sèche.
10. Biomasse selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisée en ce qu'elle comprend une phycocyanine présentant une coloration bleue pas ou peu altérée dans une solution dont le pH est compris entre 8 et 2, préférentiellement
15 entre 7 et 3, très préférentiellement entre 4 et 5, et/ou présentant une coloration bleue pas ou peu altérée à des températures supérieures à 50°C et/ou présentant une coloration bleue pas ou peu altérée à l'éthanol.
11. Procédé de préparation de phycocyanines qui comprend les étapes suivantes :
a) cultiver des ARUS de la classe des *Cyanidiophyceae*, dans un milieu de culture
20 comprenant au moins une source de carbone avec au moins une étape d'éclairage sous la forme d'un rayonnement présentant un spectre étroit de longueur d'onde comprise entre 400 et 550 nm, selon l'une des revendications 1 à 6, pour obtenir un mout de fermentation comprenant lesdites ARUs dans le milieu de culture, à une densité cellulaire d'au moins 20 g/L de matière sèche,
25 b) récupérer la biomasse obtenue à partir du mout de fermentation, et
c) récupérer les phycocyanines à partir de la biomasse.
12. Utilisation de la biomasse telle que décrite à l'une quelconque des revendications 6 à 10, pour l'alimentation humaine ou animale, la cosmétique.
13. Utilisation de la biomasse telle que décrite à l'une quelconque des revendications 6
30 à 10, pour la préparation de phycocyanine et/ou de caroténoïdes.
14. Produit comprenant au moins de la biomasse telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 7 à 12.
15. Phycocyanine susceptible d'être obtenue à partir de la biomasse telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 6 à 10 ou obtenue par le procédé selon la
35 revendication 11.

16. Utilisation de la phycocyanine telle que décrite à la revendication 15 en alimentation et/ou comme colorant.
17. Produit comprenant au moins de la phycocyanine telle que décrite à la revendication 15

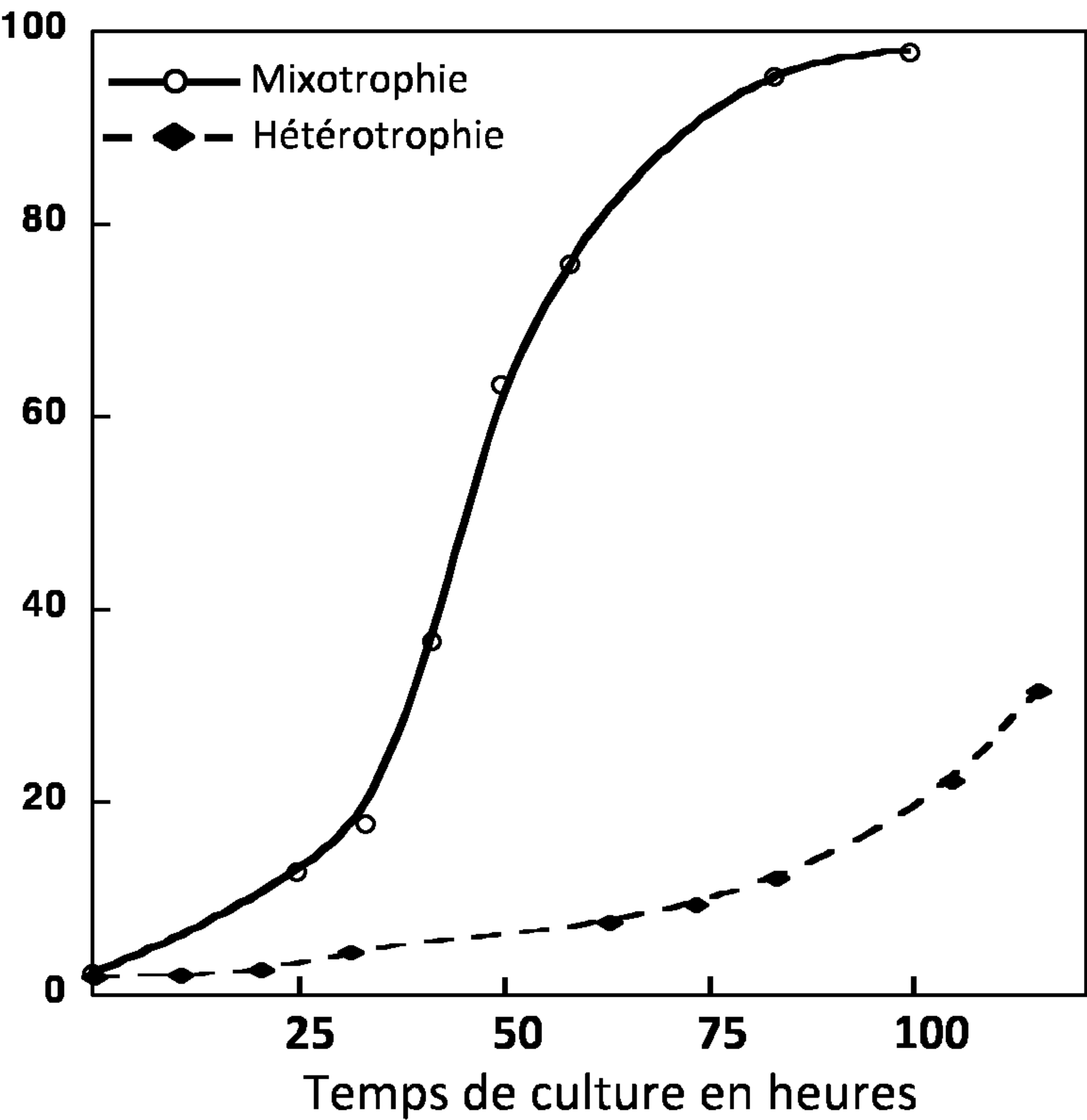


Figure 1

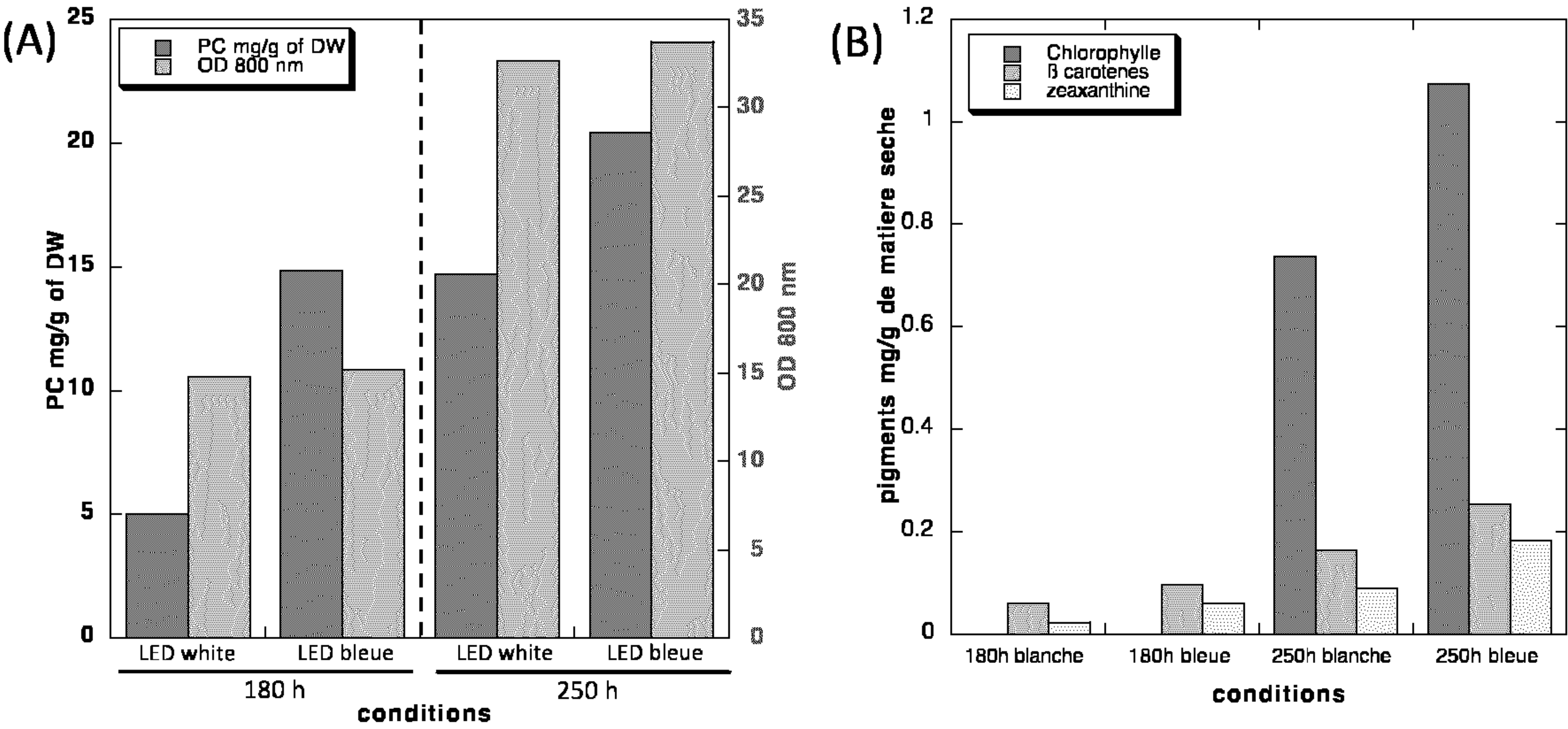


Figure 2

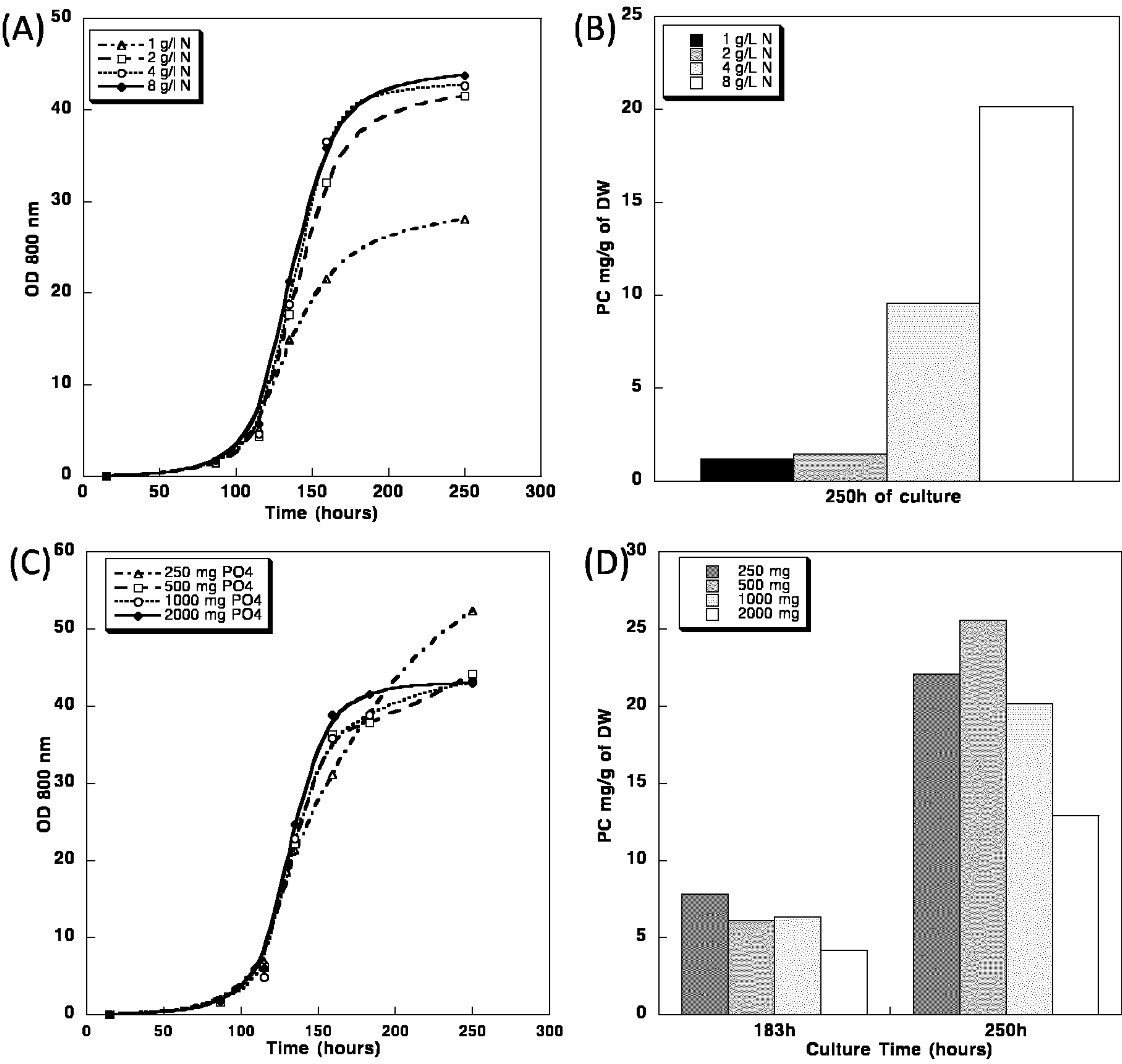


Figure 3

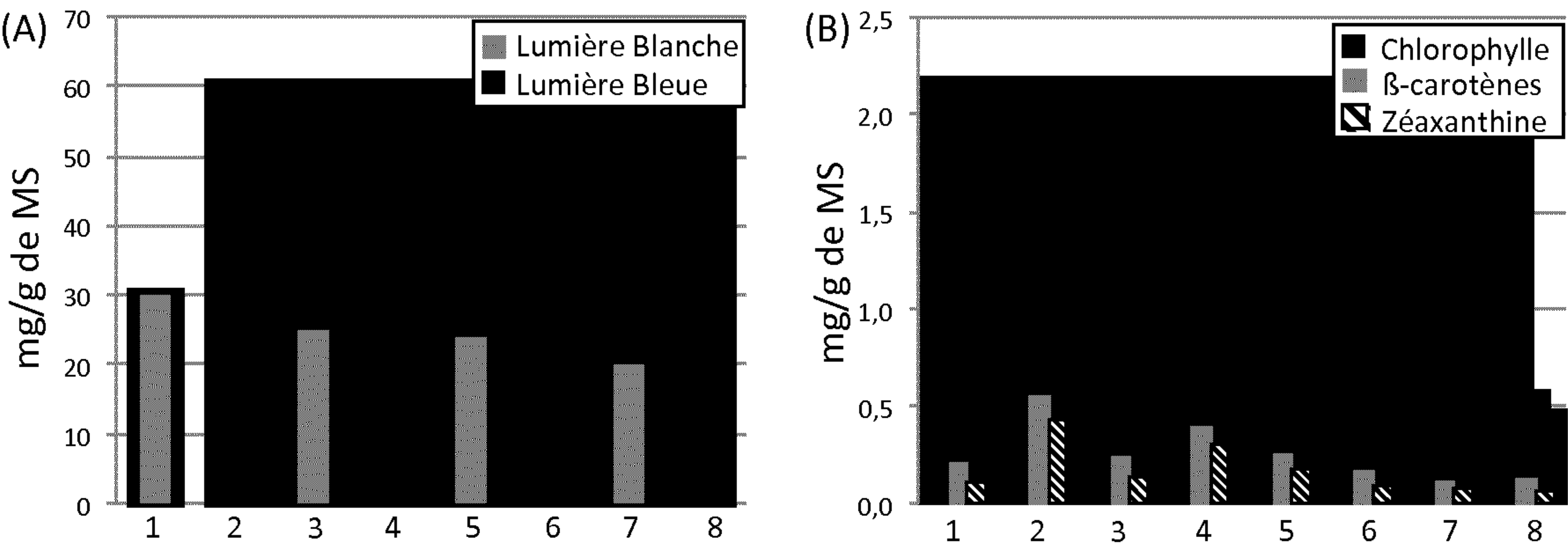


Figure 4

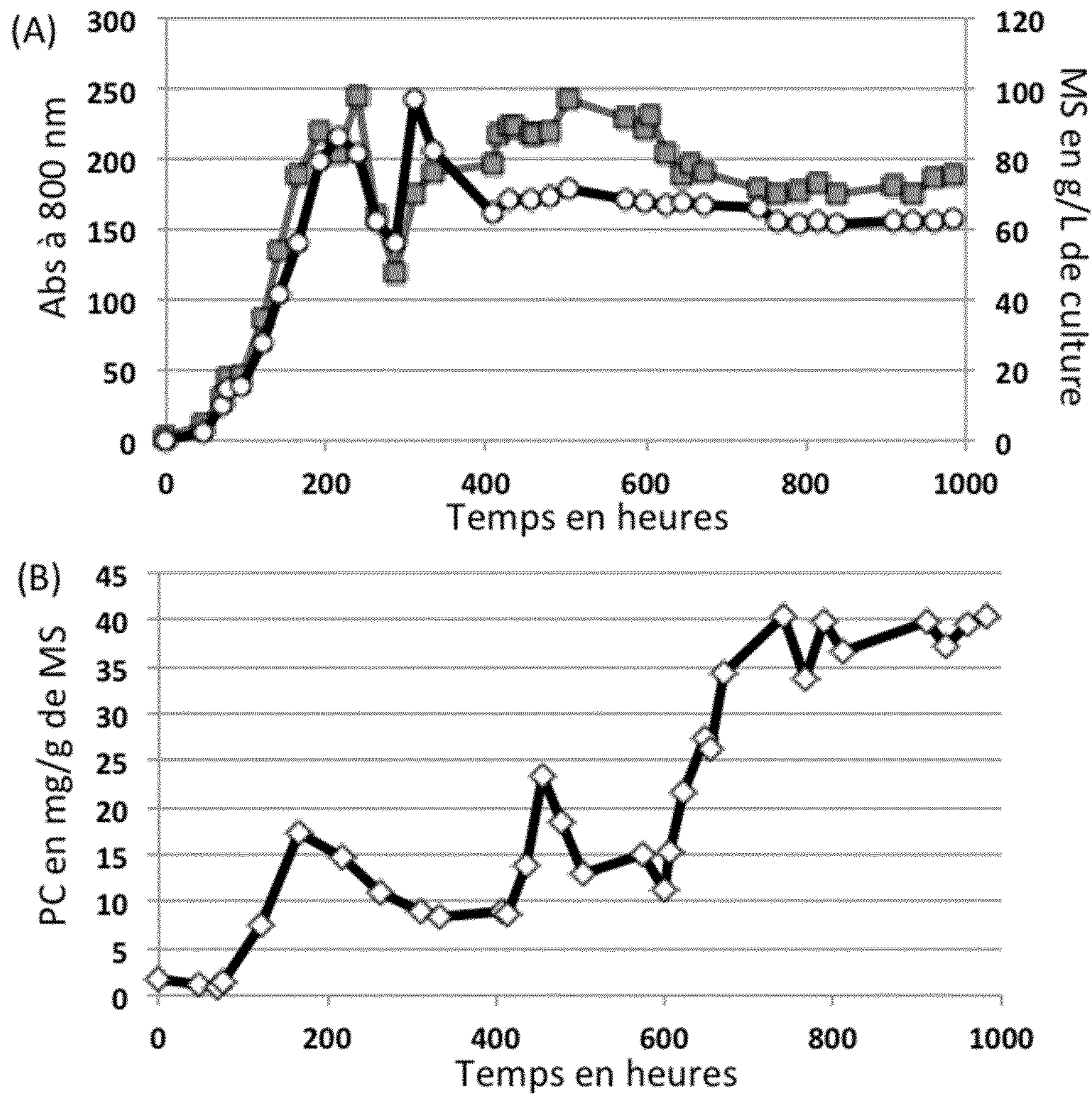


Figure 5

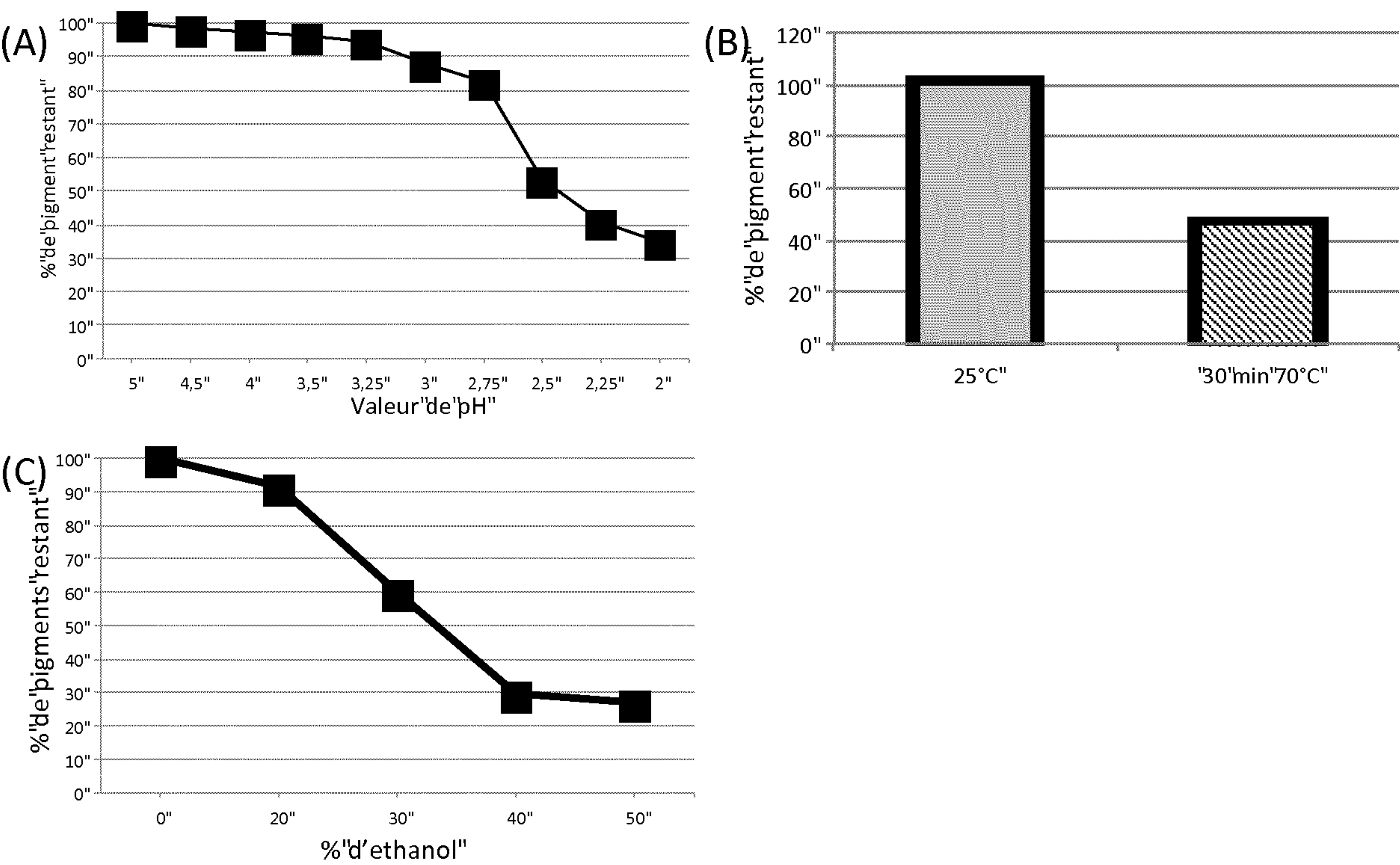


Figure 6