

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

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

3 089 231

②① N° d'enregistrement national : **18 72316**

⑤① Int Cl⁸ : **C 12 N 1/12** (2019.01), A 01 K 61/54, C 09 B 61/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 04.12.18.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 05.06.20 Bulletin 20/23.

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

⑥③ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : UNIVERSITE DU MANS Etablis-
sement public — FR et CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) ETABLISSE-
MENT PUBLIC A CARACTERE SCIENTIFIQUE ET
TECHNOLOGI — FR.

⑦② Inventeur(s) : MOUGET Jean-Luc, PASETO
Pamela, JACQUETTE Boris, ZEBIRI Lila et FALAISE
Charlotte.

⑦③ Titulaire(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) ETABLISSE-
MENT PUBLIC A CARACTERE SCIENTIFIQUE ET
TECHNOLOGI, UNIVERSITE DU MANS Etablis-
sement public.

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu.

⑤⑦ La présente demande concerne un procédé d'obten-
tion d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu,
comprenant les étapes a) de fourniture d'une solution
aqueuse comprenant un pigment bleu issu d'au moins un
microorganisme du genre *Haslea*, b) de précipitation du pig-
ment bleu à l'hydroxyde de sodium, c) de séparation de la
phase précipitée de la phase aqueuse, d) de solubilisation
du pigment bleu compris dans la phase précipitée et e) de
dialyse.

FR 3 089 231 - A1



Description

Titre de l'invention : procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu

Domaine technique

[0001] La présente invention se situe dans le domaine des procédés d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu, par exemple du pigment « *marennine* ». Elle concerne plus particulièrement un procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu comprenant les étapes a) de fourniture d'une solution aqueuse comprenant un pigment bleu issu d'au moins un microorganisme du genre *Haslea*, b) de précipitation du pigment bleu à l'hydroxyde de sodium, c) de séparation de la phase précipitée de la phase aqueuse, d) de solubilisation du pigment bleu compris dans la phase précipitée, et e) de dialyse.

Technique antérieure

[0002] Certaines espèces de diatomée du genre *Haslea* sont connues pour leur capacité à produire un pigment bleu hydrosoluble, responsable du phénomène de verdissement des branchies et autres organes palléaux des huîtres. Ce verdissement repose sur la prolifération erratique de la diatomée dans les bassins ostréicoles (claires à huîtres) et présente un grand intérêt économique pour les ostréiculteurs, les huîtres vertes (i.e. de type « *vertes de claire* » ou « *finés de claire vertes* ») étant plus rares et plus chères que les huîtres non vertes affinées dans les claires. L'intérêt du pigment bleu pour ses applications dans l'aquaculture est croissant notamment compte tenu de la production et de la commercialisation des huîtres vertes au niveau international.

[0003] Des procédés permettant de cultiver la diatomée *Haslea* en masse ont notamment été décrits dans les demandes de brevet FR 2837833 et FR 2654743. Des procédés pour l'extraction du pigment bleu, notamment le pigment bleu nommé « *marennine* » produit par l'espèce *H. ostrearia*, à partir d'un milieu de culture ont également été décrits (cf. Pouvreau *et al.*, 2006a, Pouvreau *et al.*, 2006b, Pouvreau *et al.*, 2007, Turcotte *et al.*, 2016). Néanmoins, ces procédés présentent de nombreuses limitations, notamment compte tenu des étapes d'ultrafiltration et de chromatographie d'échange d'anions sur colonne. De plus, du fait que ces étapes augmentent le coût et le temps de réalisation du procédé, l'étape d'ultrafiltration n'est pas adaptée à de grands volumes (e.g. une vingtaine de litres et plus, par exemple de surnageant) qui sont nécessaires afin d'obtenir des solutions aqueuses enrichies en pigment bleu à l'échelle industrielle. Par ailleurs, une part importante du pigment bleu semble être également perdue dans la fraction écartée par l'ultrafiltration dans le procédé décrit par Pouvreau *et al.*, 2006a, réduisant le rendement final du pigment.

[0004] Il existe donc, à l'heure actuelle, un besoin pour de nouveaux procédés d'obtention de solutions aqueuses enrichies en pigment bleu, en particulier à partir de grands volumes. Il existe également un besoin pour de nouveaux procédés plus simples et plus rapides que ceux utilisés à ce jour. En particulier, il existe un besoin pour de nouveaux procédés ne comprenant pas d'étape d'ultrafiltration ou de chromatographie sur colonne, de préférence sans impact néfaste sur le rendement et/ou sur la qualité du pigment bleu. Il existe également un besoin pour de nouveaux procédés permettant de diminuer le coût de l'enrichissement. Enfin, il existe un besoin pour de nouveaux procédés à partir desquels une solution aqueuse comprenant le pigment bleu peut être directement utilisée dans des applications industrielles, telles que le verdissement des huîtres.

Résumé de l'invention

[0005] La présente invention a pour objet un procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu comprenant notamment une étape de précipitation du pigment bleu à l'hydroxyde de sodium, une étape de séparation de la phase précipitée de la phase aqueuse, une étape de solubilisation de la phase précipitée et une étape de dialyse.

[0006] En effet, dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont mis en évidence qu'un procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu comprenant ces étapes permet d'éviter toute étape d'ultrafiltration et de chromatographie sur colonne. Le procédé de l'invention est avantageux car une solution aqueuse enrichie en pigment bleu peut être obtenue, avec une concentration finale en pigment bleu égale ou supérieure à celle obtenue dans l'art antérieur, tout en limitant les coûts du procédé. En effet, il est estimé que les étapes d'ultrafiltration selon la méthode de Pouvreau *et al.*, 2006a entraîne une perte du pigment bleu d'environ 30 à 40% de la masse du départ. De plus, le procédé est très facile à mettre en œuvre et peut être utilisé sur des grands volumes de solution aqueuse. Ce procédé est également avantageux car il permet de réduire le temps total de mise en œuvre du procédé nécessaire à l'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu.

[0007] Le procédé de l'invention permet également d'obtenir une solution aqueuse enrichie en pigment bleu adaptée pour une utilisation dans le verdissement des huîtres.

[0008] Dans un premier aspect, la présente invention concerne donc un procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu comprenant :

- [0009]
- a) la fourniture d'une solution aqueuse comprenant un pigment bleu issu d'au moins un microorganisme du genre *Haslea*,
 - b) une étape de précipitation du pigment bleu à l'hydroxyde de sodium,
 - c) une étape de séparation de la phase précipitée de la phase aqueuse,

- d) une étape de solubilisation du pigment bleu compris dans la phase précipitée, et
e) une étape de dialyse.
- [0010] Les étapes b) et c) permettent d'obtenir une précipitât du pigment bleu qui peut ensuite être solubilisé, afin d'obtenir une solution enrichie en pigment bleu sans étape intermédiaire d'ultrafiltration ou de chromatographie sur colonne. L'étape de séparation (étape c)) permet avantageusement d'éliminer les impuretés solubles non-précipitées à l'hydroxyde de sodium. Avantageusement, l'étape e) de dialyse permet d'obtenir une solution aqueuse de pigment bleu tout en réduisant les impuretés (e.g. élimination de sels).
- [0011] De préférence, l'étape c) de séparation comprend une décantation et/ou une centrifugation, de préférence une décantation suivie par une centrifugation. Ceci permet d'éliminer la majorité, voire l'intégralité, de la phase aqueuse.
- [0012] De préférence, le pigment bleu est précipité par l'ajout d'au moins 0,3 à 0,4 volumes d'hydroxyde de sodium 1 M. Le pigment bleu est ainsi compris dans la phase précipitée alors que des composés hydrosolubles non-désirés sont conservés dans la phase aqueuse.
- [0013] De préférence, le pigment bleu compris dans la phase précipitée est solubilisé à l'étape d) par de l'acide carboxylique, de préférence de l'acide formique.
- [0014] De préférence, le procédé comprend en outre une étape de filtration stérilisante, de préférence sur un filtre ayant une porosité de 0,22 μm avant l'étape e).
- [0015] De préférence, le procédé comprend en outre au moins une étape de filtration à travers un filtre ayant une taille moyenne de pores d'au moins 1,2 μm avant l'étape b), de préférence, une première filtration à travers un filtre ayant une taille moyenne de pores comprise entre 12 et 15 μm suivie par une deuxième filtration à travers un filtre ayant une taille moyenne de pores de 1,2 μm . Avantageusement, cette première filtration permet d'éviter le colmatage lors de la deuxième filtration.
- [0016] De préférence, la solution aqueuse enrichie en pigment bleu obtenue à l'étape e) comprend une concentration en pigment bleu d'au moins 90 mg/L.
- [0017] De préférence, la phase aqueuse obtenue à l'étape c) est soumise à une nouvelle étape de précipitation selon l'étape b) suivie d'une étape de séparation selon l'étape c).
- [0018] De préférence, lors de l'étape e) de dialyse, la membrane de dialyse a un seuil de coupure compris entre 1 et 3,5 kDa.
- [0019] De préférence, la solution aqueuse fournie à l'étape a) est un surnageant d'une culture d'au moins une diatomée sélectionnée parmi : *Haslea ostrearia*, *Haslea karadagensis*, *Haslea provincialis*, *Haslea nusantara*, *Haslea silbo sp nov*, et *Haslea acoran sp nov*, de préférence à partir d'une culture de diatomée *Haslea ostrearia* NCC 497 déposée auprès du BEA le 1^{er} octobre 2018 sous le numéro BEA_IDA_0065B.
- [0020] Selon un deuxième aspect, la présente invention concerne une solution aqueuse

enrichie en pigment bleu susceptible d'être obtenue par le procédé tel que décrit ici.

Brève description des dessins

[0021] [fig.1]

Schéma illustrant le procédé selon l'invention. Les cadres en pointillés représentent des étapes optionnelles.

[0022] La figure 2 présente la caractérisation de la solution aqueuse enrichie en pigment bleu de type « *marennine* » appelé « *MCPN* » obtenue selon la présente invention par :

[0023] [fig.2a]

Spectre d'absorption ultraviolet (UV)-visible de la marennine concentrée obtenue selon la présente invention (diluée 6 fois), avec comparaison au spectre obtenu avec une solution de marennine purifiée selon le procédé de Pouvreau et al 2006a (« marennine pure ») à 0,2 mg/mL

[0024] [fig.2b]

Spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) avec comparaison au spectre obtenu avec une solution de « marennine pure »

[0025] [fig.2c]

est une analyse de chromatographie d'exclusion de taille (SEC-HPLC).

[0026] AU correspond aux « unités d'absorbance », ppm aux « parties par million ».

[0027] La figure 3 est une comparaison des caractéristiques du pigment bleu de type « *marennine* » préparé selon le procédé de la présente invention (appelé « *MCPN* ») ou selon le procédé de Turcotte *et al* 2016 (« *blue water* » ou « *BW* ») ou encore selon Pouvreau *et al* 2006a ("marennine pure")

[0028] [fig.3a]

est un spectre d'absorption ultraviolet (UV)-visible

[0029] [fig.3b]

est un spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN)

[0030] [fig.3c]

est une analyse de chromatographie d'exclusion de taille (SEC-HPLC).

[0031] AU correspond aux « unités d'absorbance », ppm aux « parties par million ».

Description des modes de réalisation

[0032] Comme indiqué précédemment, dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont mis en évidence un nouveau procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu comprenant les étapes de précipitation du pigment bleu à l'hydroxyde de sodium, de séparation de la phase précipitée de la phase aqueuse, de solubilisation de la phase précipitée, et de dialyse. En effet, les inventeurs ont démontré que, de façon surprenante, un procédé comprenant ces étapes permet avantageusement d'éviter toute étape d'ultrafiltration et de chromatographie sur colonne.

[0033] Le procédé selon l'invention présente l'avantage d'obtenir une solution aqueuse enrichie en pigment bleu avec une concentration finale en pigment bleu au moins égale à celle obtenue en utilisant les procédés existants, tout en limitant les coûts du procédé. De plus, le procédé est très facile à mettre en œuvre, et peut être utilisé sur de grands volumes de solution aqueuse. Le rendement en pigment bleu obtenu par le procédé de l'invention est, de façon intéressante, supérieur à celui obtenu par les procédés selon l'art antérieur. Ce procédé permet de plus de réduire le temps nécessaire pour obtenir une solution aqueuse enrichie en pigment bleu.

Procédé d'obtention

[0034] Un premier aspect de l'invention concerne donc un procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu comprenant :

[0035] a) la fourniture d'une solution aqueuse comprenant un pigment bleu issu d'au moins un microorganisme du genre *Haslea*,
 b) une étape de précipitation du pigment bleu à l'hydroxyde de sodium,
 c) la séparation de la phase précipitée de la phase aqueuse,
 d) une étape de solubilisation de la phase précipitée, et
 e) une étape de dialyse.

[0036] Les étapes a) à e) sont mises en œuvre dans l'ordre a), puis b), puis c), puis d), puis e). Dans certain cas (voir ci-dessous), des étapes supplémentaires (à l'exclusion de toute étape d'ultrafiltration et/ou de chromatographie sur colonne) peuvent s'intercaler :

- [0037] • Avant l'étape a)
 Par exemple, l'étape a) peut être précédée d'une étape de culture des diatomées du genre *Haslea* et, optionnellement, par une étape de lyse des diatomées du genre *Haslea* présentes dans la solution aqueuse.
- Entre les étapes a) et b)
 Par exemple, une étape de filtration peut être ajoutée entre les étapes a) et b).
- Entre les étapes c) et d)
 Par exemple, la phase aqueuse obtenue à l'étape c) peut être resoumise aux étapes b) et c) et le précipité obtenu groupé avec celui obtenu auparavant.
- Entre les étapes d) et e)
 Par exemple, une étape de filtration peut être ajoutée entre les étapes d) et e).
- Après l'étape e)
 Par exemple, une étape de concentration ou de formulation peut être ajoutée après l'étape e).

[0038] Ces différentes étapes supplémentaires optionnelles sont détaillées ci-dessous.

[0039] Le procédé de purification selon l'invention est notamment mis en œuvre à partir d'une solution aqueuse comprenant un pigment bleu issu d'au moins un mi-

croorganisme du genre *Haslea*, de préférence à partir d'un surnageant d'un milieu de culture d'au moins un microorganisme du genre *Haslea*.

Pigment bleu

- [0040] Par « *pigment bleu* » on entend, au sens de la présente invention, un pigment bleu hydrosoluble produit par une diatomée du genre *Haslea*. Ledit pigment bleu peut notamment être le pigment bleu appelé « *marennine* » produit par la diatomée *H. ostrearia* ou toute autre pigment bleu produit par une diatomée du genre *Haslea*, telle que *H. karadagensis* (Gastineau et al., 2012), *H. provincialis* (Gastineau et al., 2016), *H. nusantara* (Prasetya et al., 2018), *H. silbo sp nov* (Gastineau et al., 2011), ou *H. acoran sp nov* (Gastineau et al., 2011). Ledit pigment bleu peut comprendre ou consiste en plusieurs pigments bleus produits par différentes diatomées. De préférence, le pigment bleu selon l'invention comprend la marennine. Selon un mode particulier, le pigment bleu selon l'invention consiste en la marennine.
- [0041] Une distinction peut généralement être faite entre la forme intracellulaire (celle présente dans la diatomée) et la forme extracellulaire du pigment bleu qui est relarguée dans le milieu marin. À titre d'exemple, la forme intracellulaire de la marennine a une masse molaire différente de la forme extracellulaire (Pouvreau *et al.*, 2006a).
- [0042] Dans le cadre de la présente invention, le pigment bleu peut comprendre du pigment bleu en sa forme intracellulaire et/ou sa forme extracellulaire. Selon un premier mode de réalisation, le pigment bleu consiste essentiellement en sa forme extracellulaire. De préférence, le pigment bleu consiste en sa forme extracellulaire. Selon un autre mode de réalisation, le pigment bleu comprend à la fois la forme intracellulaire et la forme extracellulaire. Selon un autre mode de réalisation, le pigment bleu consiste essentiellement en sa forme intracellulaire. De préférence, le pigment bleu consiste en sa forme intracellulaire.

Étape a)

- [0043] L'étape a) du procédé selon l'invention est une étape de fourniture d'une solution aqueuse comprenant un pigment bleu issu d'au moins un microorganisme du genre *Haslea*.
- [0044] Par « *solution aqueuse* » on entend toute solution comprenant du pigment bleu issu d'au moins un microorganisme du genre *Haslea*. Selon un mode de réalisation préféré, ladite solution aqueuse est une culture de diatomée. La culture de diatomée comprend les diatomées elles-mêmes et le surnageant (i.e. le milieu de culture sans les diatomées). De préférence, ladite solution aqueuse comprend le surnageant. Ceci serait le cas, par exemple, si le surnageant est mélangé avec une autre solution avant l'étape a), par exemple de l'eau. Selon un autre mode de réalisation préféré, ladite solution aqueuse consiste essentiellement en le surnageant. De préférence, ladite solution

aqueuse est le surnageant. Les méthodes adaptées à séparer les diatomées du milieu de culture, afin de fournir le surnageant sont bien connues par la personne du métier. Une telle étape peut notamment être réalisée par centrifugation avec récupération du surnageant ou par filtration.

- [0045] De préférence, ladite diatomée est sélectionnée dans le groupe consistant en : *H. ostrearia*, *H. karadagensis*, *H. provincialis*, *H. nusantara*, *H. silbo sp nov*, *H. acoran sp nov*. De façon préférentielle, ladite diatomée est *H. ostrearia*, de façon plus préférentielle *H. ostrearia* NCC 497 de façon encore plus préférentielle *H. ostrearia* NCC 497 déposée auprès du « Banco Español de Algas » (BEA), Universidad de Las Palmas de GC, Muelle de Taliarte s/n, 35214 Telde – Las Palmas, Espagne le 1^{er} octobre 2018 sous le numéro BEA_IDA_0065B.
- [0046] Selon un mode de réalisation particulier, la solution aqueuse peut comprendre du pigment bleu hydrosoluble produit par au moins deux espèces de diatomées, ou par au moins deux souches d'une espèce donnée (e.g. deux souches de *H. ostrearia*). Lesdites diatomées peuvent avoir été cultivées ensemble, ou cultivées individuellement. Lorsque les diatomées sont cultivées individuellement, la culture, de préférence les surnageants de culture, de chaque diatomée sont additionnées ensemble à l'étape a).
- [0047] Selon un mode de réalisation préféré, lorsque au moins deux espèces sont cultivées ensemble, l'une des deux espèces est *H. ostrearia*. Selon un mode de réalisation préféré, lorsqu'au moins deux souches de *H. ostrearia* sont cultivées ensemble, l'une des deux souches est *H. ostrearia* NCC 497, de préférence *H. ostrearia* NCC 497 déposée auprès du « Banco Español de Algas » (BEA) le 1^{er} octobre 2018 sous le numéro BEA_IDA_0065B.
- [0048] Dans certains cas, la solution aqueuse fournie à l'étape a) comprend des diatomées lysées. Une étape de lyse peut donc précéder l'étape a). Une étape de lyse est notamment avantageuse lorsqu'une solution comprenant à la fois des formes extracellulaires et intracellulaires du pigment bleu est désirée. Une étape de lyse permet en effet de libérer du pigment bleu intracellulaire dans le surnageant ou dans toute autre solution aqueuse. À titre d'exemple, la lyse des diatomées peut être effectuée selon la méthode décrite dans Pouvreau *et al.*, 2006a telle que décrite à la page 770.
- [0049] Selon un mode de réalisation particulier, la concentration en pigment bleu de la solution aqueuse à l'étape a) est comprise entre 2 et 7 mg/L, plus avantageusement entre 3 et 5 mg/L. Selon un mode de réalisation particulier, la concentration en pigment bleu de la solution aqueuse à l'étape a) est d'au moins 2 mg/L, de préférence d'au moins 3 mg/L. La concentration en pigment bleu dans la solution aqueuse peut être déterminée par la personne de métier au vu de ses connaissances générales. À titre d'exemple non-limitatif, la concentration en pigment bleu peut être déterminée par spectrophotométrie, par la méthode de Lowry (Pouvreau, *et al.*, 2006b), ou par HPLC

par filtration sur gel reliée à un détecteur à photodiode (Pouvreau *et al.*, 2007). De préférence, la concentration en pigment bleu est déterminée par spectrophotométrie en utilisant le coefficient d'extinction publié dans Pouvreau, *et al.* (2006b).

[0050] De préférence, le pH de la solution aqueuse comprenant du pigment bleu est compris entre 7 et 9, plus préférentiellement d'environ 8 (+/- 0,2).

[0051] Selon un mode de réalisation particulier, la solution aqueuse comprenant le pigment bleu fournie à l'étape a) n'a subi aucune étape préalable de filtration. De manière optionnelle, la solution aqueuse fournie à l'étape a) est toutefois filtrée avant l'étape b). Cette étape supplémentaire est particulièrement préférée lorsque la solution aqueuse comprend des agrégats ou toute autre particule non hydrosoluble car l'étape de filtration permet de séparer ces impuretés en amont de la précipitation, améliorant ainsi la pureté du précipité obtenu à l'étape b). Selon un mode préférentiel, une étape de filtration est intercalée entre les étapes a) et b) lorsque la solution aqueuse est une culture de diatomée, l'étape de filtration permettant de séparer le surnageant des diatomées avant toute autre étape. La porosité du filtre permet de préférence de retenir les diatomées, sans toutefois retenir d'autres composés (e.g. le pigment bleu). Les méthodes et les filtres adaptés à une telle étape de filtration sont bien connus par la personne du métier. Une telle étape peut notamment être réalisée en utilisant des filtres de type microfibre de verre (commercialisés par Whatman, par exemple de type GF/C).

[0052] Selon un mode de réalisation particulier, au moins une étape de filtration est réalisée, plus préférentiellement, au moins deux étapes de filtration sont réalisées. Selon un premier mode de réalisation, la filtration est effectuée à travers un filtre ayant une taille moyenne de pores d'au moins 1,2 μm . Selon un deuxième mode de réalisation, l'étape de filtration est réalisée à travers deux filtres de taille différente, le deuxième filtre ayant une taille moyenne de pores plus petite que le premier filtre et d'au moins de 1,2 μm . Avantageusement, la première filtration permet d'éviter le colmatage lors de la deuxième filtration.

[0053] Aussi, selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'étape de filtration comprend une première filtration à travers un filtre ayant une taille moyenne de pores comprise entre 12 et 15 μm suivi par une deuxième filtration à travers un filtre ayant une taille moyenne de pores de 1,2 μm .

Étape b)

[0054] Après l'étape a) de fourniture d'une solution aqueuse comprenant le pigment bleu, ledit pigment bleu est précipité à l'hydroxyde de sodium. A partir du moment où l'hydroxyde de sodium est ajouté à la solution aqueuse selon l'étape b), la solution est appelée « *mélange* », car comprenant à la fois une phase précipitée et une phase aqueuse.

[0055] Lors de l'étape b), la majorité du pigment bleu est précipitée et se retrouve donc sous

forme solide, dans la phase précipitée. Avantageusement, l'hydroxyde de sodium est ajouté jusqu'à la complète précipitation du pigment bleu. La quantité d'hydroxyde de sodium à ajouter varie en fonction de la concentration du pigment bleu dans la solution aqueuse de l'étape a) ainsi que le volume de la solution aqueuse. La précipitation complète conduit à la décoloration de la phase aqueuse. Aussi, l'étape de précipitation par ajout d'hydroxyde de sodium correspond à une étape facilement réalisable par la personne du métier, compte tenu de l'aspect visuel de celle-ci. Avantageusement, les composés hydrosolubles non-désirés présents dans la solution aqueuse tels protéines et glucides, voire d'autres composés n'ayant pas d'absorption dans le spectre visible, restent dans la phase aqueuse.

[0056] Selon un mode de réalisation particulier, le pourcentage final (masse/masse) d'hydroxyde de sodium par rapport à la solution aqueuse (masse d'hydroxyde de sodium / masse de la solution aqueuse x 100) mis en œuvre à l'étape b) est compris entre 0,02 et 0,04 %. De préférence, la concentration de la solution d'hydroxyde de sodium ajoutée à la solution aqueuse est inférieure ou égale à 10 M, de préférence inférieure ou égale à 2 M, plus préférentiellement comprise entre 1 M et 2 M, plus encore plus préférentiellement égale à 1 M ou à 2 M. La personne du métier reconnaîtra que ledit pourcentage final d'hydroxyde de sodium par rapport à la solution aqueuse peut varier en fonction de la concentration ou quantité initiale en pigment bleu dans la solution aqueuse fournie à l'étape a).

[0057] À titre d'exemple, une complète précipitation peut être observée par l'ajout de 5 à 10 mL d'hydroxyde de sodium 1 M à une solution aqueuse ayant un volume de 1 L et une concentration en pigment bleu de quelques mg/L.

[0058] De préférence, le pH du mélange obtenu suite à l'étape b) est d'au moins 12.

[0059] Selon un mode de réalisation, l'hydroxyde de sodium est ajouté en plusieurs fois, avantageusement goutte par goutte. Pendant le temps d'ajout de l'hydroxyde de sodium, le mélange peut être sous agitation ou non. De préférence, le mélange est sous agitation. Pendant le temps d'ajout de l'hydroxyde de sodium, la solution aqueuse peut être maintenue entre 4°C et 25°C, par exemple entre 4°C et 8°C ou à température ambiante, par exemple entre 20 et 25°C.

Étape c)

[0060] Après l'étape b) précipitation du pigment bleu à l'hydroxyde de sodium, la phase précipitée et la phase aqueuse du mélange sont séparées. Par « *séparation* » on entend ici la séparation physique des deux phases. Avantageusement, en plus de séparer les deux phases, l'étape c) permet de limiter le volume du mélange à traiter en aval. Les méthodes adaptées à une telle étape de séparation sont bien connues par la personne du métier. Une telle étape peut notamment être réalisée par décantation et/ou par centrifugation. À titre d'exemple non-limitatif, l'étape de séparation peut être effectuée entre

4°C et 25°C, par exemple entre 4°C et 8°C ou à température ambiante, par exemple entre 20 et 25°C.

- [0061] De préférence, la séparation selon l'étape c) comprend une décantation. Par « *décantation* » on entend, au sens de la présente invention, une opération qui consiste à laisser reposer le mélange pendant une période de temps donnée, de manière à ce que le précipité se dépose par différence de gravité, afin de retirer la phase aqueuse. De préférence, la décantation comprend donc une étape de repos du mélange avant la séparation physique de la phase précipitée de la phase aqueuse. De préférence, pendant que le mélange est laissé au repos, il n'est pas sous agitation.
- [0062] Selon un mode préférentiel, le mélange est laissé au repos pendant une durée de temps égale ou supérieure à 5 heures, de façon plus préférée égale ou supérieure à 10 heures, de façon encore plus préférée égale ou supérieure à 15 heures. Selon un autre mode de réalisation préféré, le mélange est laissé au repos pendant une durée de temps égale à 5 heures. Avantagusement, le repos du mélange pendant une durée de temps égale ou supérieure à 5 heures permet d'optimiser la formation du précipité en plus de permettre le dépôt du précipité au fond du récipient. Dans certains cas (par ex. lorsque la quantité de précipité est faible), il serait avantageux de laisser reposer le mélange pendant une durée égale ou supérieure à 16 heures.
- [0063] Le mélange peut être laissé au repos entre 4°C et 25°C, par exemple entre 4°C et 8°C ou à température ambiante, par exemple entre 20 et 25°C.
- [0064] De préférence, une partie de la phase aqueuse (par exemple, 80 % à 90 % de la phase aqueuse) est retirée du mélange. De préférence, au moins 80 %, au moins 85 %, au moins 90 % de la partie aqueuse est retirée du mélange. La phase aqueuse ainsi retirée peut être conservée pour une utilisation ultérieure ou éliminée. La phase aqueuse est conservée, de préférence, à une température comprise entre 4°C et 25°C, par exemple entre 4°C et 8°C ou à température ambiante, par exemple entre 20 et 25°C.
- [0065] Comme indiqué ci-dessus, en retirant une partie de la phase aqueuse, le volume du mélange à traiter est réduit d'autant. Ceci est particulièrement avantageux lorsque de grands volumes (par ex. supérieurs à 25, 50 ou 100 L) sont fournis comme solution aqueuse de départ (c-à-d. à l'étape a)).
- [0066] Selon un autre mode de réalisation, la séparation est effectuée par centrifugation. Par « *centrifugation* » on entend la séparation de la phase précipitée de la phase aqueuse par la force centrifuge (par rotation rapide). Le mélange peut également être laissé au repos dans les conditions décrites ci-dessus avant la centrifugation.
- [0067] La personne du métier saura déterminer les conditions de centrifugation adéquates pour obtenir la séparation de la phase précipitée comprenant le précipité du pigment bleu de la phase aqueuse. À titre d'exemple non-limitatif, le mélange peut être centrifugé à une accélération d'au moins 4000 x g, de préférence d'au moins 12 000 x

g. Lorsque le mélange est centrifugé à une accélération d'au moins 12 000 x g (e.g. entre 12 000 et 13 000 x g), la durée de la centrifugation est avantageusement d'au moins 20 min, de préférence d'au moins 30 min, de préférence pendant 20 à 35 min. Le mélange peut subir une ou plusieurs centrifugations, qui peuvent être à condition identique ou différente (i.e. à durée ou accélération croissante). De préférence, le mélange subit une seule étape de centrifugation. De préférence, le mélange est centrifugé à une accélération comprise entre 12 000 et 13 000 x g pendant 30 minutes.

[0068] Lors de la centrifugation, la phase précipitée comprenant le pigment bleu forme le culot alors que les composants hydrosolubles non-précipités restent dans la phase aqueuse. Comme lors de la décantation, une grande partie de la phase aqueuse est retirée suite à la centrifugation. La phase aqueuse ainsi retirée peut être conservée pour une utilisation ultérieure ou éliminée.

[0069] De préférence, la centrifugation a lieu à une température comprise entre 4°C et 25°C, de façon plus préférentielle entre 4°C et 8°C ou à température ambiante, par exemple entre 20 et 25°C.

[0070] Selon un mode de réalisation préférentiel, l'étape de séparation comprend la décantation et la centrifugation, de préférence selon les conditions précitées. De façon préférentielle, le mélange est décanté avant d'être centrifugé. La combinaison de ces deux techniques est particulièrement avantageuse car la décantation permet de réduire le volume du mélange à centrifuger, une grande partie de la phase aqueuse pouvant désormais être retirée avant centrifugation. Lorsqu'une partie de la phase aqueuse est retirée lors de la décantation et une autre partie de la phase aqueuse est retirée suite à la centrifugation, les phases aqueuses peuvent ensuite être combinées ensemble.

Étape optionnelle

[0071] À l'issue de l'étape c), deux phases séparées sont obtenues : la phase précipitée et la phase aqueuse. Dans certains cas, il peut être avantageux d'effectuer les étapes de précipitation et de séparation (correspondant aux étapes b) et c) précitées) sur la phase aqueuse ainsi obtenue. Ceci est particulièrement préféré lorsque la phase aqueuse comprend une quantité résiduelle de pigment bleu et permet d'améliorer le rendement final en pigment bleu.

[0072] De préférence, la phase aqueuse soumise aux étapes b) et c) comprend l'ensemble des phases aqueuses obtenues lors de la séparation à l'étape c).

[0073] De préférence, lors de l'étape c), le mélange est laissé au repos pendant une durée de temps égale ou supérieure à 3 heures, de façon plus préférentielle pendant une durée de temps égale ou supérieure à 16 heures. Ceci permet notamment d'améliorer le rendement de récupération du pigment bleu obtenu par le procédé selon l'invention.

Étape d)

- [0074] Après l'étape c) de séparation de la phase précipitée de la phase aqueuse, la phase précipitée comprenant le pigment bleu est solubilisée. La personne du métier saura identifier une solution appropriée permettant de solubiliser le pigment bleu précipité.
- [0075] De préférence, le pigment bleu de la phase précipitée est solubilisé par l'ajout d'un acide faible, tel qu'un acide carboxylique. Par « *acide carboxylique* » on entend tout acide comprenant un groupement carboxyle, tel que l'acide acétique, l'acide formique, l'acide carbonique, l'acide propénoïque, etc. De préférence, le pigment bleu est solubilisé par l'ajout d'acide formique (CAS no. 64-18-6). De préférence, le pigment bleu est solubilisé par l'ajout d'une solution d'acide carboxylique à 5% (m/m), de façon plus préférentielle par l'ajout d'une solution d'acide formique à 5% (m/m).
- [0076] De préférence, le ratio en volume de la solution aqueuse fournie à l'étape a) et la solution aqueuse enrichie en pigment bleu à l'étape d) (solution fournie à l'étape a) / solution obtenue à l'étape d)) est d'au moins 29 / 1, de façon plus préférentielle d'au moins 30 / 1, de façon encore plus préférentielle d'au moins 40 / 1. Selon un mode préférentiel, le ratio entre le volume de la solution aqueuse fournie à l'étape a) et le volume de la solution aqueuse enrichie en pigment bleu obtenu à l'étape d) est compris entre 29 / 1 et 40 / 1. La personne du métier reconnaîtra toutefois que ledit ratio entre le volume de solution aqueuse fournie à l'étape a) et le volume de la solution enrichie en pigment bleu à l'étape d) peut varier en fonction de la concentration initiale en pigment bleu dans la solution aqueuse fournie à l'étape a). Aussi, une concentration plus élevée du pigment bleu dans la solution aqueuse fournie à l'étape a) (e.g. supérieure à 7 mg/mL) pourrait nécessiter l'ajout d'un volume supérieur de la solution solubilisant (par ex. l'acide formique), et ainsi un ratio inférieur à 29 / 1.
- [0077] De préférence, la solution enrichie en pigment bleu obtenue à l'étape d) a un pH compris entre 3,0 et 4,0, de préférence entre 3,0 et 3,5.
- [0078] De préférence, à l'issue de l'étape d), le pigment bleu présent en solution à une concentration égale ou supérieure à 90 mg/L. Aussi, la solution enrichie en pigment bleu obtenue à l'issue de l'étape d) est avantageusement enrichie en pigment bleu d'au moins 12-fois, avantageusement d'au moins 18-fois, plus avantageusement d'au moins 30-fois par rapport à la solution aqueuse fournie à l'étape a).

Étape optionnelle

- [0079] À l'issue de l'étape d), une ou plusieurs étapes optionnelles peuvent être présentes. À titre d'exemple, une étape de filtration, telle qu'une étape de filtration stérilisante, est effectuée. De préférence, à l'issue de l'étape d), une étape de filtration est effectuée, plus préférentiellement sur un filtre ayant une porosité de 0,22 µm. Cette étape de filtration permet, de façon avantageuse, de retirer tout débris cellulaire restant de manière rapide et peu coûteuse.

Étape e)

- [0080] Après l'étape d) de solubilisation, la solution enrichie en pigment bleu est soumise à une étape de dialyse. La solution enrichie en pigment bleu obtenue à l'étape d) peut être dialysée contre toute solution aqueuse appropriée, telle que, par exemple, de l'eau distillée. Les méthodes et les membranes adaptées à la dialyse sont bien connues par la personne du métier. Une telle étape peut notamment être réalisée en utilisant une membrane de dialyse ayant un seuil de coupure compris entre 1 et 3,5 kDa.
- [0081] Selon un mode préféré, la membrane de dialyse a un seuil de coupure compris entre 1 et 3,5 kDa, de préférence un seuil de coupure de 1 kDa, de 2 kDa, ou de 3,5 kDa.
- [0082] De préférence, l'étape de dialyse est réalisée pendant une durée minimale de 48 heures, plus avantageusement de 72 heures. De préférence, la solution aqueuse appropriée utilisée pendant la dialyse (e.g. de l'eau) est changée toutes les 12 heures environ. De préférence, la dialyse de la solution enrichie en pigment bleu est réalisée contre environ 2 L de la solution aqueuse appropriée (e.g. de l'eau).
- [0083] L'étape de dialyse permet notamment d'augmenter le pH de la solution. L'étape de dialyse permet également d'éliminer les sels et les agents précipitants présents dans cette solution aqueuse (e.g. $\text{Mg}(\text{OH})_2$).
- [0084] De manière préférée, à l'issue de l'étape e), la solution aqueuse enrichie en pigment bleu comprend une concentration égale ou supérieure à 90 mg/L en pigment bleu, de manière plus préférée égale ou supérieure à 100 mg/L, égale ou supérieure à 110 mg/L, égale ou supérieure à 120 mg/L, égale ou supérieure à 130 mg/L, égale ou supérieure à 140 mg/L, de manière encore plus préférée égale ou supérieure à 150 mg/L.
- [0085] De préférence, la solution enrichie en pigment bleu obtenue à l'étape e) a un pH compris entre 4,5 et 5,5.
- [0086] Ladite solution aqueuse enrichie en pigment bleu est préférablement conservée à environ 4°C ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) et à l'obscurité à l'issue de l'étape e) de dialyse ou à l'issue de toute autre étape lorsqu'une étape supplémentaire est présente après l'étape e). En effet, les inventeurs ont démontré que le pigment bleu contenu dans la solution est stable pendant plusieurs mois à cette température et à l'obscurité. Il ne serait donc pas obligatoire d'ajouter un excipient quelconque, tel qu'un agent stabilisant, à l'issue du procédé de l'invention.

Autres étapes ultérieures optionnelles

- [0087] Même si le procédé décrit ci-dessus permet d'obtenir une solution aqueuse enrichie en pigment bleu ayant une pureté et un rendement élevés, dans certains cas, il peut toutefois être avantageux d'effectuer une ou plusieurs étapes supplémentaires, par exemple de concentration ou de formulation. Le procédé selon l'invention peut ainsi en outre comprendre au moins une étape supplémentaire et postérieure à l'étape e) de

concentration ou de formulation.

[0088] À titre d'exemple non-limitatif, il peut être avantageux de concentrer par la suite le pigment bleu compris dans la composition, par exemple par une étape d'évaporation, notamment afin d'obtenir une concentration plus élevée en pigment bleu. À titre d'exemple non-limitatif, il peut également être avantageux de formuler le pigment bleu dans une composition. Afin d'adapter la solution aqueuse enrichie en pigment bleu issue du procédé selon l'invention à une utilisation particulière, la composition peut subir une étape de formulation, par exemple par l'addition d'un excipient et/ou d'un véhicule et/ou par tout autre changement de composition de ladite solution aqueuse enrichie en pigment bleu, tel qu'un ajout d'une solution tampon. Dans d'autres cas, l'étape de formulation peut être une étape de séchage, par exemple, permettant d'obtenir le pigment bleu en forme de poudre.

[0089] Dans un mode de réalisation particulier, le procédé selon l'invention comprend en outre, après l'étape e) de dialyse, une ou plusieurs des étapes suivantes visant à adapter la composition à une formulation particulière et/ou à augmenter la pureté du produit :

- [0090] • une étape de concentration ; et/ou
- une étape de formulation.

[0091] Chaque étape optionnelle identifiée ci-dessus peut être présente en tant qu'étape supplémentaire unique du procédé, en combinaison avec une ou plusieurs autres étapes optionnelles, ou avec toutes les autres étapes optionnelles.

[0092] La présente invention a pour autre objet la solution aqueuse obtenue par le procédé décrit ici.

[0093] La solution de pigment bleu enrichie obtenue par le procédé de l'invention peut notamment être utilisée comme source de pigment bleu naturel à destination de l'agro-alimentaire et de la cosmétique, ou comme substance antimicrobienne pour usage en aquaculture. La présente invention a pour autre objet l'utilisation de la solution aqueuse enrichie en pigment bleu obtenue par le procédé décrit ici comme source de pigment bleu naturel à destination de l'agro-alimentaire et de la cosmétique, ou comme substance antimicrobienne pour usage en aquaculture.

Exemples

[0094] L'invention est illustrée par les exemples non limitatifs suivants. Ces enseignements comprennent des alternatives, des modifications et des équivalents, qui pourront être appréciés par une personne du métier.

Exemple 1 : Procédé selon l'invention

[0095] Un procédé mis au point permettant d'obtenir une solution aqueuse enrichie en pigment bleu, ici de la marennine, sans aucune étape d'ultrafiltration ou de chromatographie sur colonne est décrit ci-dessous.

Matériels et méthodes

[0096] Matériel biologique

[0097] Les souches d'*Hasleaostrearia* ont été isolées dans des claires ostréicoles de la baie de Bourneuf (France) et identifiées par microscopie électronique à balayage (souche NCC 497). Des cultures en batch ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 200 mL en utilisant un milieu d'eau de mer artificielle adapté de Harrison *et al.* (Harrison *et al.* 1980) et stérilisé par autoclavage (salinité finale du milieu 31 ± 1 ppm et pH $7,6 \pm 0,2$). Les cultures d'*H.ostrearia* ont été maintenues dans une chambre de culture à température contrôlée à 16°C sous un éclairage de 200 μmol de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ délivrés par des tubes fluorescents blancs avec un cycle jour/nuit de 14/10 heures. Lorsque les cultures atteignaient le début de la phase stationnaire de croissance, le surnageant de culture contenant la marennine extracellulaire était récupéré après décantation des cellules et filtré grossièrement au travers d'un filtre à filtration rapide de porosité 15 μm (150 mm Filter paper, Fisher Scientific®). Le surnageant filtré était gardé dans la chambre à température contrôlée sous obscurité avant de passer aux étapes décrites dans les procédures générales.

[0098] Procédé d'enrichissement du pigment bleu en solution aqueuse

[0099] Optionnellement, le milieu de culture d'*Haslea ostrearia* est filtré à 1,2 μm (filtres GF/C).

[0100] Le milieu de culture d'*H. ostrearia*, comprenant de la marennine à une concentration d'environ 3 à 4 mg/L, est ensuite placé sous agitation modérée et soumis à une précipitation par ajout de 5 mL d'hydroxyde de sodium (1 M) par 1 litre de culture filtrée en goutte à goutte puis laissé décanter jusqu'à apparition d'une couche verdâtre au fond de la bouteille et disparition de la coloration de la phase aqueuse (environ 5 heures) à température ambiante sans agitation.

[0101] Après la décantation, une grande partie de la phase aqueuse (e.g. de 80 à 90 %) est retirée. Optionnellement, la phase aqueuse est mise de côté pour traitement ultérieur.

[0102] Le mélange comprenant le reste de la phase aqueuse et la phase précipitée est centrifugé à 12 880 x g (10 000 rpm) pendant 30 minutes. La phase aqueuse restante est ensuite séparée de la phase précipitée. Optionnellement, les phases aqueuses sont rassemblées et resoumises à une précipitation par ajout d'hydroxyde de sodium puis laissées décanter comme décrit ci-dessus, en décantant au moins 3h, voire toute une nuit (e.g. 16 heures), pour améliorer le rendement de récupération de la marennine et diminuer encore le volume de travail.

[0103] Après la centrifugation, la phase précipitée obtenue est solubilisée dans une solution d'acide formique (HCOOH) à 5%. La solubilisation est réalisée dans un volume de 250 à 350 mL d'acide formique.

[0104] La solution obtenue est filtrée à 0,22 μm sur membrane de cellulose régénérée. Enfin,

une dialyse contre 2 L d'eau est réalisée dans un boudin de dialyse de 1 kDa pendant 72 heures en changeant l'eau de dialyse 2 fois par jour.

Résultats

[0105] Une solution aqueuse enrichie en marennine (90 mg/L minimum) avec un pH compris entre 4,5 à 5,5 notée « MCPN » est obtenue. Aussi, de façon très avantageuse, la marennine dans la solution aqueuse enrichie est concentré de 26-fois.

[0106] **Exemple 2 : Caractérisation de la solution « MCPN »**

[0107] La solution aqueuse enrichie en marennine a été caractérisée par la spectrométrie UV-Visible, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie d'exclusion-diffusion (HPLC-SEC). Une solution de marennine considérée pure et obtenue selon la méthode de Pouvreau et al (2006a) a également été analysée à titre comparatif.

Matériels et méthodes

[0108] Les spectres d'absorption UV-visible ont été réalisés sur un spectrophotomètre UV-3100PC (VWR). L'analyse est effectuée en mode scan de 190 à 800 nm.

[0109] L'analyse RMN a été effectuée sur la plateforme RMN liquide de l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans à l'Université du Mans. L'appareil utilisé est un Spectromètre Bruker AVANCE 400MHz avec les sondes BBFO+ 5mm large bande (1H, 19F et de 15N à 31P, z-gradient, accord automatique) et QNP 5mm (1H, 19F, 31P, 13C, z-gradient) et un passeur d'échantillon de type B-ACS 60.

[0110] L'analyse chromatographique a été réalisée sur une chaîne HPLC Waters Alliance 2690 équipée d'un détecteur par ampérométrie pulsée PAD 996 et du logiciel Empower. Une colonne Xbridge® Protein BEH SEC 125 Å, 3,5 µm, 7,8 * 300 mm (Waters) a été utilisée avec une élution isocratique (Na₂CO₃ 250 mM, NaN₃ 0,05%, pH 8) et un débit de 0,5 mL / min.

Résultats

[0111] Le spectre d'absorption et le spectre RMN de la solution MCPN sont très similaires à ceux de la marennine pure (Figure 2A et 2B). De plus, le chromatogramme de la solution MCPN, ne représente qu'une autre impureté (pic à 10,963 min) et un petit épaulement sur le pic de la marennine à 17,607 minutes (Figure 2C).

[0112] Avantageusement, la solution aqueuse enrichie en pigment bleu (ici, la marennine) obtenue par le procédé de l'invention possède les mêmes caractéristiques que celles de la marennine pure. Aussi, le procédé mis au point permet avantageusement d'obtenir un produit de pureté élevée sans étape d'ultrafiltration ou de chromatographie sur colonne.

[0113] **Exemple 3 : Evaluation de variant e s du procédé selon l' E xemple 1**

[0114] Une série d'essais a été réalisée en variant les conditions des différentes étapes, selon

le **Tableau 1** ci-dessous.

[0115] [Tableaux1]

ETAPE / MODIFICATION	RESULTATS / OBSERVATIONS
b) / précipitation du pigment bleu à l'hydroxyde de sodium 2M	Pas de différence observée par rapport au procédé décrit à l'Exemple 1
b) / température à 4°C	Pas de différence observée par rapport au procédé décrit à l'Exemple 1, voire une amélioration de la précipitation
d) / re-solubilisation par ajout d'acide fort (HCl)	Différences observées dans les propriétés spectrophotométriques de la marennine
e) / Boudin de dialyse de 2 kDa ou de 3,5 kDa	Pas de différence observée par rapport au procédé décrit à l'Exemple 1

Conditions opératoires des essais représentatifs

[0116] On constate que les différentes variantes testées du procédé ne modifient pas la solution aqueuse enrichie en pigment bleu, à l'exception de la phase de re-solubilisation par acide chlorhydrique.

[0117] **Exemple 4 : Enrichissement du pigment bleu produit par d'autres espèces d'*Haslea***

[0118] Le procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu tel que décrit ici a été testé en utilisant le surnageant de différentes espèces d'*Haslea* produisant le pigment bleu comme solution aqueuse de départ (à l'étape a)) (cf. **Tableau 2**).

[0119] [Tableaux2]

Espèce d' <i>Haslea</i>	Origine
<i>H. ostrearia</i>	Polder de Bouin (Vendée, France)
<i>H. provincialis</i>	Boulouris (Var, France)
<i>H. ostrearia</i>	San Juan Islands (Oregon, USA)
<i>H. silbo sp nov</i>	Morehead City (North Carolina, USA)

Espèces d'*Haslea* testées

[0120] On constate que la culture de différentes espèces d'*Haslea* produisant du pigment bleu peut être utilisée en tant que solution aqueuse à l'étape a) du procédé selon l'invention, dont la culture des espèces décrites ci-dessus.

Exemple 5 : Essai comparatif

[0121] Le procédé selon l'invention a été effectué en parallèle au procédé actuellement utilisé tel que décrit par Pouvreau (Pouvreau *et al.*, 2006a).

Matériels et méthodes

[0122] Le procédé d'enrichissement du pigment bleu selon l'invention a été effectué tel que décrit à l'Exemple 1. Les procédés de Pouvreau *et al.*, 2006a et de Turcotte *et al.*, 2016 ont été réalisés en parallèle. Brièvement, ces procédés débutent par une étape de filtration sur filtre Whatman GF/F (0,45 µm) du surnageant d'une culture d'*Haslea ostrearia*, suivie par une étape d'ultrafiltration (récupération de la fraction comprise entre 3 kDa et 30 kDa) (Turcotte *et al.*, 2016), suivi pour Pouvreau *et al.*, 2006a d'une étape de chromatographie semi-préparative par échange d'anions (passage sur colonne contenant une résine Sepharose). Le pigment retenu sur la résine est élué par une solution saline puis la solution est dialysée.

[0123] Les spectres d'absorption UV-visibles, les spectres RMN, et la chromatographie d'exclusion-diffusion (HPLC-SEC) de la solution aqueuse obtenue par le procédé décrit ici (la solution « MCPN ») et celle obtenue par les procédés de Pouvreau *et al.*, 2006a (« marennine pure » et Turcotte *et al.* 2016 (solution appelée « blue water, BW ») ont ensuite été déterminés et comparés ensemble. Ces techniques sont détaillées à l'exemple 2, ci-dessus.

Résultats

[0124] Comme indiqué dans le **Tableau 3** ci-dessus, on constate que la durée du procédé selon la présente invention est plus courte que celle de l'art antérieur, que le coût est fortement réduit. Par ailleurs, on constate que les spectres d'absorption de la « BW », de la « marennine pure » et de la « MCPN » sont très comparables. Le décalage observé au niveau de la zone 640-680 m est dû à la différence du pH entre les solutions. De plus, les chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC montrent que la « MCPN » est plus pure que la « BW ».

[0125] [Tableaux3]

Paramètre/Résultat	Procédé selon l'invention	Procédé selon Pouvreau, 2006a
Durée du procédé (en nombre d'heures)	108 (pour 10 L surnageant)	562 (pour 10 L surnageant)
Coût estimé des matériels	NaOH : 52€/kg Acide formique : 50€/L	Prix moyen résine échangeuse anions : 1000€/kg Coût moyen colonne ultrafiltration jetable : 250€
Concentration initiale en marennine (en mg/L)	3,4	3,4
Concentration finale en marennine (en mg/L)	90 à 110 (selon l'essai)	110

Comparaison des procédés

Liste des documents cités

[0126] Gastineau, 2011. Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du

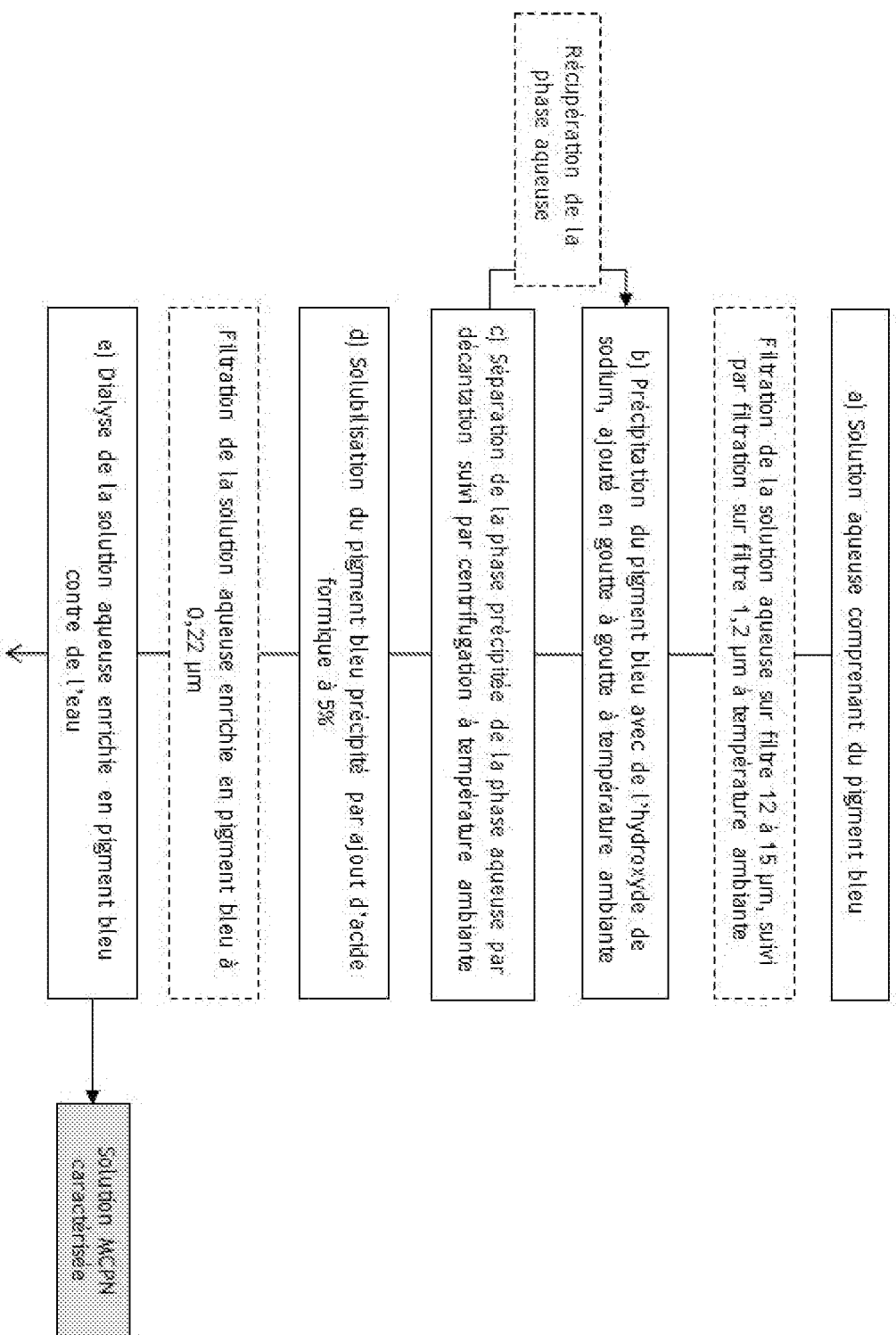
genre *Haslea* et valorisation de leurs pigments de type marennine. Sciences agricoles, Université du Maine.

- [0127] Gastineau, *et al.*, 2012. *Haslea karadagensis* (Bacillariophyta): a second blue diatom, recorded from the Black Sea and producing a novel blue pigment. Eur. J. Phycol., 47: 469-479
- [0128] Gastineau, *et al.*, 2016. A new blue-pigmented hasleoid diatom, *Haslea provincialis*, from the Mediterranean Sea. Eur. J. Phycol, 51: 156-170
- [0129] Harrison, *et al.*, 1980. A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. J. Phycol. 16, 28–35.
- [0130] Pouvreau, *et al.*, 2006a. Purification of the blue-green pigment - marennine from the marine tychopeagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. J. Appl. Phycol., 18, 769–781.
- [0131] Pouvreau, *et al.*, 2006b. Preliminary characterization of the blue-green pigment - marennine from the marine tychopeagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. J. Appl. Phycol., 18, 757–767.
- [0132] Pouvreau, *et al.*, 2007. Method for the quantification of the blue-green pigment marennine synthesized by the marine diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen using HPLC gel-filtration and photodiode-array detection. J. Appl. Phycol. 19, 263–270.
- [0133] Prasetya, *et al.*, 2018. *Haslea nusantara*, a new blue diatom from the Java Sea, Indonesia: Morphology, biometry and molecular characterization. Crypt. & Algal. (sous presse)
- [0134] Robert, *et al.*, 2002. Extraction and quantitative analysis of the blue pigment "marennine" synthesized by the diatom *Haslea ostrearia*. Journal of Applied Phycology, 14: 299-305.
- [0135] Turcotte, *et al.*, 2016. Prophylactic effect of *Haslea ostrearia* supernatant culture containing the pigment marennine to stabilize bivalve hatchery production. Aquatic Living Resources, 29: 401 (9 pages).

Revendications

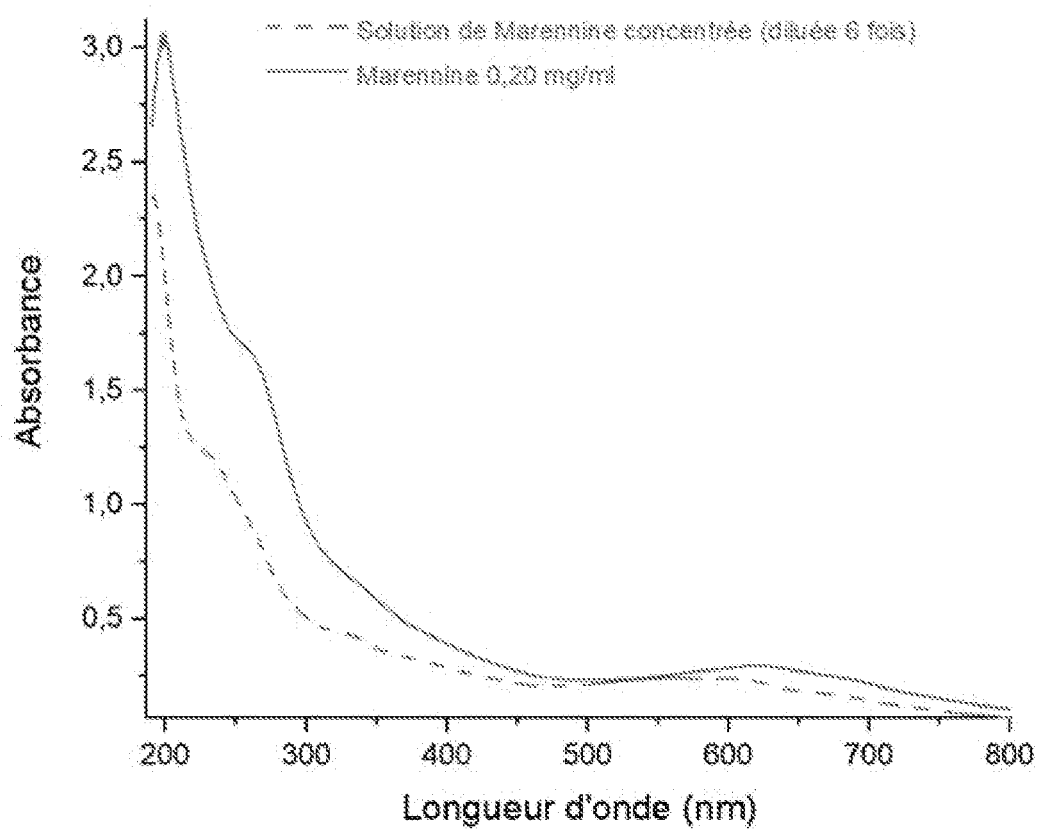
- [Revendication 1] Procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu, comprenant :
- a) la fourniture d'une solution aqueuse comprenant un pigment bleu issu d'au moins un microorganisme du genre *Haslea*,
 - b) une étape de précipitation du pigment bleu à l'hydroxyde de sodium,
 - c) une étape de séparation de la phase précipitée de la phase aqueuse,
 - d) une étape de solubilisation du pigment bleu compris dans la phase précipitée, et
 - e) une étape de dialyse.
- [Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape de séparation c) comprend une décantation et/ou une centrifugation, de préférence une décantation suivie par une centrifugation.
- [Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le pigment bleu est précipité à l'étape b) par l'ajout de 0,02 et 0,04 % (m/m) d'hydroxyde de sodium.
- [Revendication 4] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le pigment bleu compris dans la phase précipitée obtenue à l'étape c) est solubilisé à l'étape d) par de l'acide carboxylique, de préférence de l'acide formique.
- [Revendication 5] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de filtration stérilisante, de préférence sur un filtre ayant une porosité de 0,22 μm , avant l'étape e).
- [Revendication 6] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une étape de filtration à travers un filtre ayant une taille moyenne de pores d'au moins 1,2 μm avant l'étape b), de préférence une première filtration à travers un filtre ayant une taille moyenne de pores comprise entre 12 et 15 μm suivie par une deuxième filtration à travers un filtre ayant une taille moyenne de pores de 1,2 μm .
- [Revendication 7] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la phase aqueuse obtenue à l'étape c) est soumise à une nouvelle étape de précipitation selon l'étape b) suivie d'une séparation selon l'étape c).
- [Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la membrane de dialyse a un seuil de coupure compris entre 1 et 3,5 kDa.

- [Revendication 9] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la solution aqueuse fournie à l'étape a) est un surnageant d'une culture d'au moins une diatomée sélectionnée parmi : *Haslea ostrearia*, *Haslea karadagensis*, *Haslea provincialis*, *Haslea nusantara*, *Haslea silbo sp nov*, *Haslea acoran sp nov*, de préférence à partir d'une culture de diatomée *Haslea ostrearia* NCC 497 déposée auprès du BEA le 1er octobre 2018 sous le numéro BEA_IDA_0065B.
- [Revendication 10] Solution aqueuse enrichie en pigment bleu susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

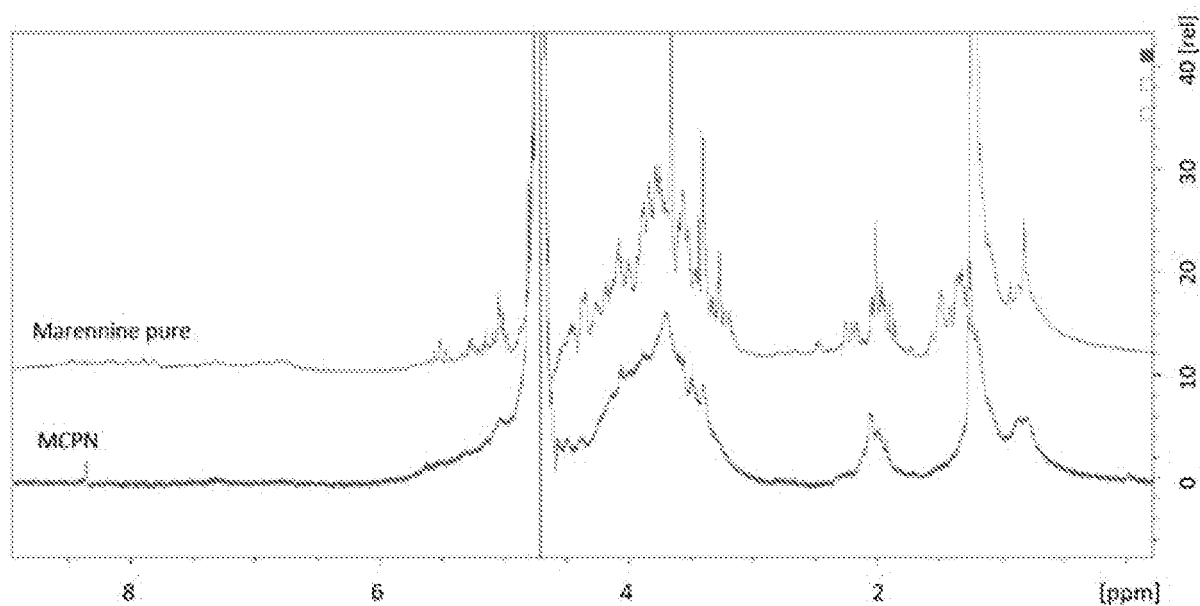


[Fig. 1]

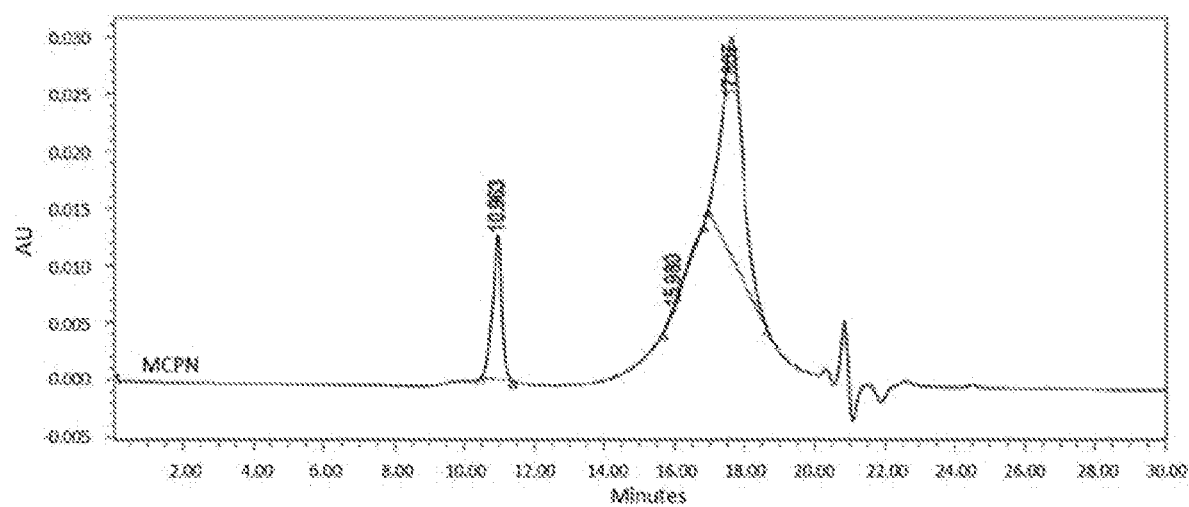
[Fig. 2a]



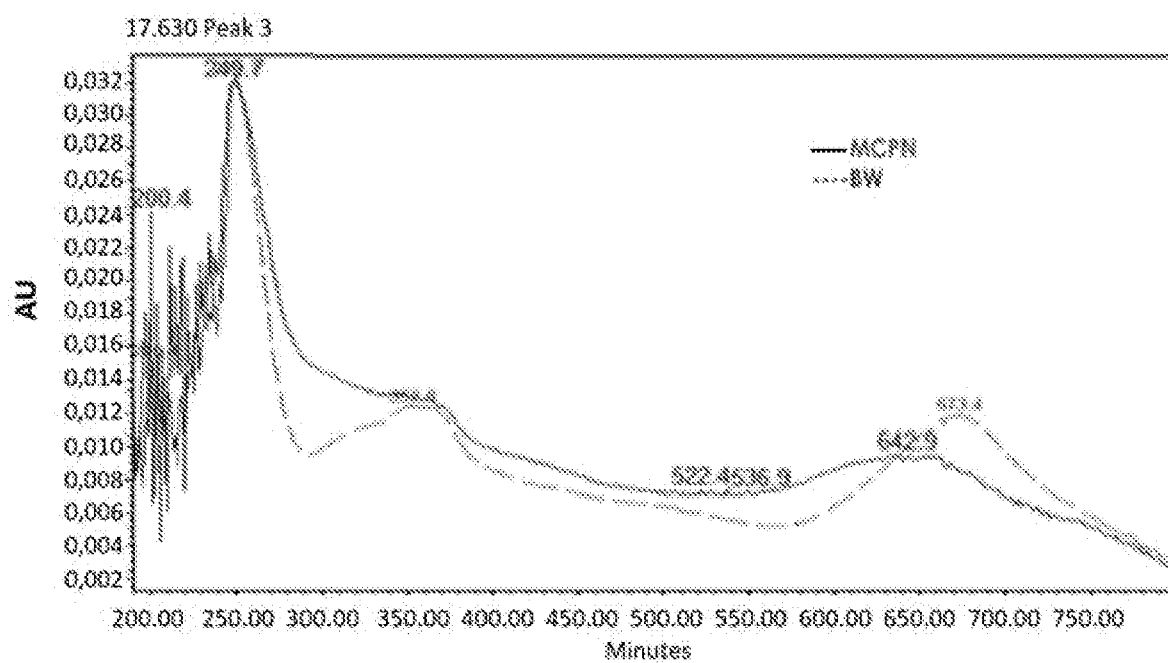
[Fig. 2b]



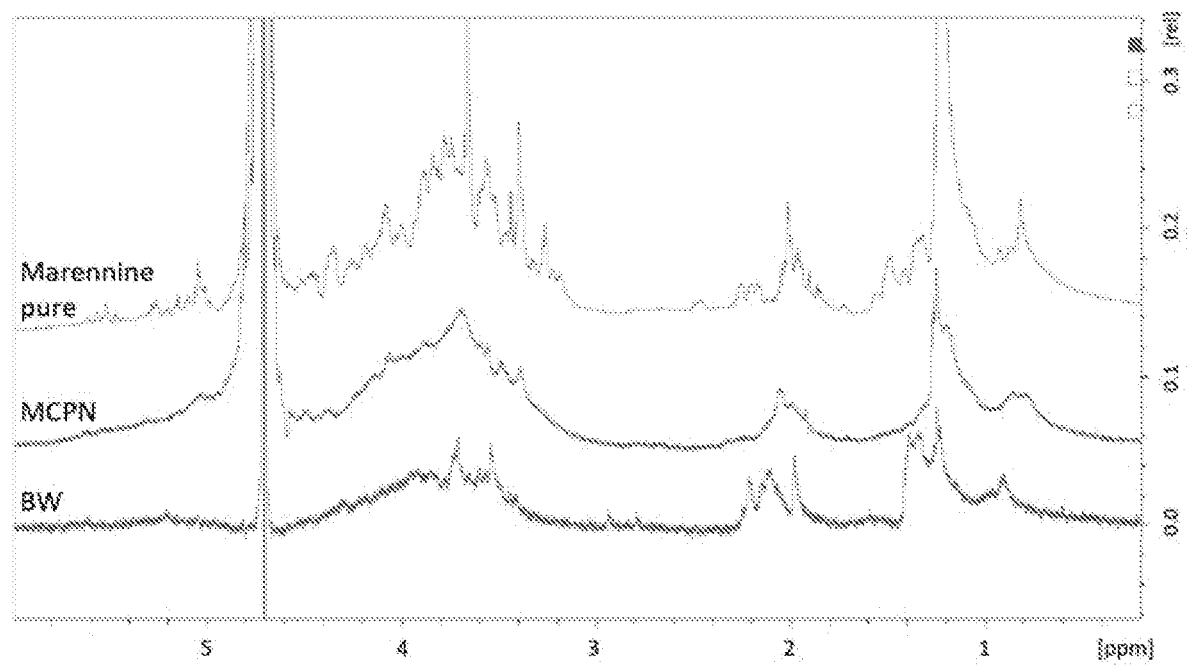
[Fig. 2c]



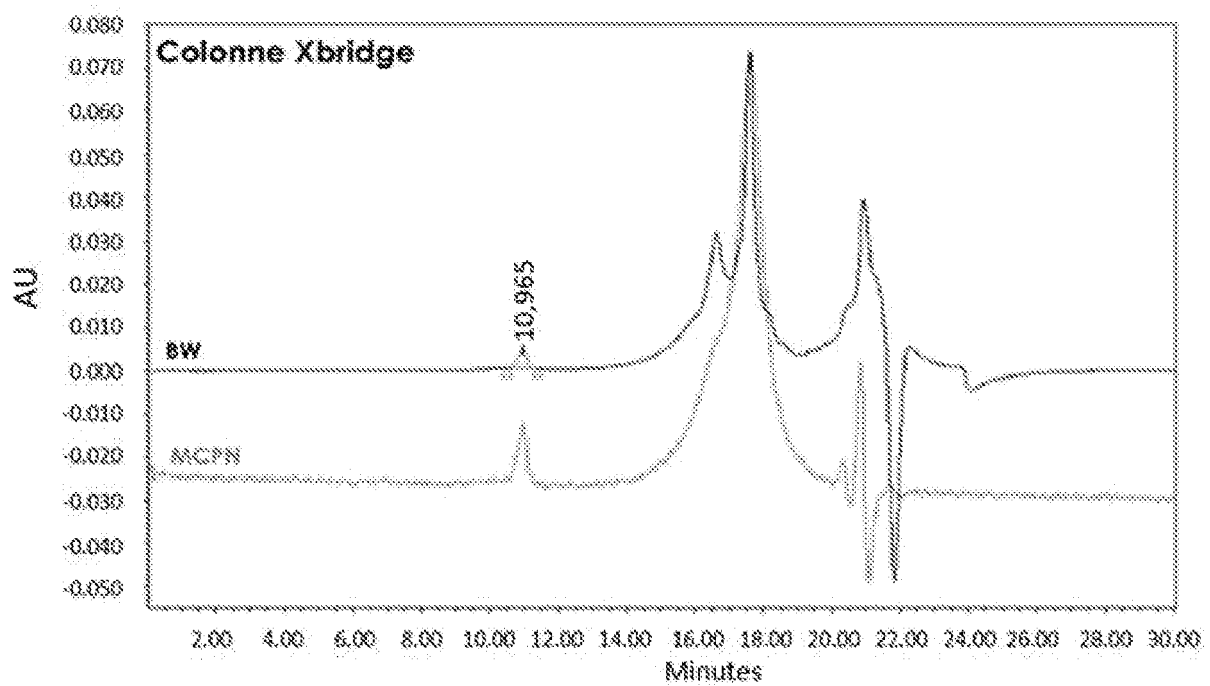
[Fig. 3a]



[Fig. 3b]



[Fig. 3c]



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 862187
FR 1872316

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI		
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes				
X,D	FRANÇOIS TURCOTTE ET AL: "Prophylactic effect of Haslea ostrearia culture supernatant containing the pigment marennine to stabilize bivalve hatchery production", AQUATIC LIVING RESOURCES, vol. 29, no. 4, 1 octobre 2016 (2016-10-01), page 401, XP55600302, ISSN: 0990-7440, DOI: 10.1051/alr/2016032 * abrégé * * Materials and Methods * -----	1-10	C12N1/12 A01K61/54 C09B61/00		
X,D	JEAN-BERNARD POUVREAU ET AL: "Purification of the blue-green pigment marennine from the marine tychopelagic diatom Haslea ostrearia (Gaillon/Bory) Simonsen", JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 18, no. 6, 1 novembre 2006 (2006-11-01), pages 769-781, XP019450416, ISSN: 1573-5176, DOI: 10.1007/S10811-006-9088-9 * abrégé * * Extraction * ----- -/--	1-10	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;"> C12N C12R </td> </tr> </table>	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)	C12N C12R
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)					
C12N C12R					
Date d'achèvement de la recherche		Examineur			
28 juin 2019		Keller, Yves			
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant					

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 862187
FR 1872316

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	JEAN-BERNARD POUVREAU ET AL: "Preliminary characterisation of the blue-green pigment marennine from the marine tychopelagic diatom Haslea ostrearia (Gaillon/Bory) Simonsen", JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 18, no. 6, 1 novembre 2006 (2006-11-01), pages 757-767, XP019450415, ISSN: 1573-5176, DOI: 10.1007/S10811-006-9087-X * le document en entier * -----	1-10	
T	Gastineau: "Marennine, Promising Blue Pigments from a Widespread Haslea Diatom Species Complex", 28 mai 2014 (2014-05-28), XP55600084, Extrait de l'Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4071570/ [extrait le 2019-06-27] * le document en entier * -----		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	JEAN-BERNARD POUVREAU ET AL: "Method for the quantification of the blue-green pigment marennine synthesized by the marine diatom Haslea ostrearia (Gaillon/Bory) Simonsen using HPLC gel-filtration and photodiode-array detection", JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 19, no. 3, 22 décembre 2006 (2006-12-22), pages 263-270, XP019502325, ISSN: 1573-5176 * le document en entier * -----	1-10	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
28 juin 2019		Keller, Yves	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)