

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

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
21 janvier 2016 (21.01.2016)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2016/009145 A1**

(51) Classification internationale des brevets :  
C07K 1/14 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)  
A23J 1/00 (2006.01) C07K 1/36 (2006.01)  
A23K 1/00 (2006.01) C07K 14/405 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2015/051940

(22) Date de dépôt international :  
16 juillet 2015 (16.07.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
14 56944 18 juillet 2014 (18.07.2014) FR

(71) Déposant : ROQUETTE FRERES [FR/FR]; 1 rue de la  
Haute Loge, F-62136 Lestrem (FR).

(72) Inventeur : PATINIER, Samuel; 84 rue de Lille, F-59890  
Quesnoy sur Deule (FR).

(74) Mandataires : BERNARDI, Céline et al.; Cabinet Plasse-  
raud, 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (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,  
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).

Publiée :

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

(54) Title : METHOD FOR EXTRACTING SOLUBLE PROTEINS FROM MICROALGAL BIOMASS

(54) Titre : PROCEDE D'EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES DE BIOMASSES DE MICROALGUES

(57) Abstract : The invention relates to a method for preparing a protein isolate of the biomass of microalgae of the genus *Chlorella*, characterised in that it comprises the following steps: supplying a microalgal biomass produced by fermentation; optionally washing the biomass so as to eliminate the soluble interstitial compounds, thermal permeabilisation of the biomass at a temperature of between 50 and 150°C, preferably between 100 and 150°C, for between 10 seconds and 5 minutes, preferably between 10 seconds and 1 minute; elimination of the biomass permeabilised in this way by means of a solid-liquid separation technique selected from the group consisting of frontal or tangential filtration, flocculation and centrifuging, more specifically multi-stage centrifuging, in order to obtain a soluble fraction; optionally recovering and clarifying the soluble fraction thus obtained by microfiltration in such a way as to remove the residual insoluble elements therefrom; ultrafiltration of the soluble fraction on a membrane with a cut-off threshold lower than 5 kDa, preferably between 1 and 5 kDa, in order to produce a soluble protein isolate; then evaporation, pasteurisation and atomisation of said protein isolate.

(57) Abrégé : L'invention est relative à un procédé de préparation d'un isolât protéique de la biomasse de microalgues du genre *Chlorella*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : - fourniture d'une biomasse de microalgues produite par fermentation, - de manière optionnelle, lavage de la biomasse de manière à éliminer les composés solubles interstitiels, perméabilisation thermique de la biomasse à une température comprise entre 50 et 150°C, de préférence 100 et 150°C, pendant une durée comprise entre 10 secondes et 5 minutes, de préférence pendant une durée comprise entre 10 secondes et 1 minute, - élimination de la biomasse ainsi perméabilisée par une technique de séparation solide-liquide choisie dans le groupe constitué de la filtration frontale ou tangentielle, la floculation et la centrifugation, plus particulièrement la centrifugation multi-étagée, pour obtenir une fraction soluble, - de manière optionnelle, récupération et clarification de la fraction soluble ainsi obtenue par microfiltration de manière à la débarrasser des insolubles résiduels, - ultrafiltration de la fraction soluble, sur membrane de seuil de coupure inférieur à 5 kDa, de préférence compris entre 1 et 5 kDa, afin d'obtenir un isolât protéique soluble, puis - évaporation, pasteurisation et atomisation dudit isolât protéique.

WO 2016/009145 A1

## PROCEDE D'EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES DE BIOMASSES DE MICROALGUES

La présente invention concerne un procédé d'extraction des protéines solubles de  
5 la biomasse de microalgues.

La présente invention concerne également les isolats de protéines de microalgues  
ainsi obtenus.

### ***Présentation de l'état de l'art***

10 Il est bien connu de l'homme du métier que les chlorelles sont une source  
potentielle de nourriture, car elles sont riches en protéines et autres nutriments essentiels.

Elles sont décrites comme renfermant 45% de protéines, 20% de matières grasses,  
20% de glucides, 5% de fibres et 10% de minéraux et de vitamines.

Etant donné leur abondance et leur profil en acides aminés, les protéines de  
15 microalgues sont ainsi considérées comme une source alternative aux protéines de soja ou  
de pois en Alimentation.

La fraction protéique peut être également valorisée comme agent fonctionnel dans  
les industries cosmétiques, voire pharmaceutiques.

Cependant, les développements en applications alimentaires des protéines de  
20 microalgues n'ont pas été significatifs, car la présence, dans lesdites fractions, de  
composés indésirables (telle la chlorophylle) conduit à des changements non souhaités de  
couleur, goût et structure des compositions alimentaires en contenant.

Pour augmenter leur potentialité en applications alimentaires et pour augmenter  
également leur valeur commerciale, ces protéines doivent donc être extraites des  
25 microalgues sans impacter leur structure moléculaire.

Les techniques « douces » d'extraction seraient donc nécessaires pour isoler les  
protéines de grandes solubilités et de bonnes propriétés technico-fonctionnelles, mais la  
rigidité des parois des microalgues, notamment des microalgues vertes, s'y oppose  
fondamentalement car elle perturbe l'extraction et l'intégrité des protéines intracellulaires.

30 C'est ainsi qu'au contraire des conditions physiques ou chimiques classiquement  
« dures » sont mises en œuvre pour rompre la paroi des microalgues.

De nombreuses études proposent ainsi des technologies de type dissolution  
alcaline, extraction par solvants organiques, ou homogénéisation haute pression.

Dans ces choix technologiques, la dénaturation des protéines n'était cependant  
35 pas considérée comme gênante, puisque la plupart de ces méthodes étaient développées  
pour des finalités d'analyses ou destinées à fournir un substrat pour la digestion  
enzymatique productrice d'hydrolysats protéiques.

Or, un procédé de désintégration efficace préservant l'intégrité des composants cellulaires se doit de maximaliser non seulement le rendement mais aussi la qualité des produits extraits.

5 En d'autres termes, un procédé de désintégration optimisé de la paroi doit par exemple éviter :

- la contamination chimique des produits ciblés,
- la mise en œuvre d'énergie de rupture trop importante ; celle-ci pouvant occasionner une dégradation ou dénaturation irréversible des molécules intracellulaires d'intérêt.

10 Par ailleurs, pour des productions à grande échelle, il est important que le procédé choisi soit transposable à cette échelle.

Enfin, l'introduction de cette étape de désintégration cellulaire doit être aisée et ne doit pas avoir un impact négatif sur les étapes de procédé/traitement subséquentes.

15 Toutes ces limitations influencent l'efficacité du procédé de désintégration et par là-même sa consommation énergétique.

C'est la raison pour laquelle la technologie de broyage à billes est préférée, car elle est considérée comme efficace pour libérer les protéines intracellulaires sous leur forme native.

20 Dans un broyeur à billes, les cellules sont agitées en suspension avec de petites particules sphériques. Le cassage des cellules est provoqué par les forces de cisaillement, le broyage entre les billes, et les collisions avec des billes.

La description d'un broyeur à billes approprié est par exemple faite dans le brevet US 5.330.913. Ces billes cassent les cellules pour en libérer le contenu cellulaire. On obtient alors une suspension de particules de plus petite taille que les cellules d'origine sous  
25 la forme d'une émulsion « huile dans eau ».

Cette émulsion est généralement atomisée et l'eau est éliminée, laissant une poudre sèche contenant cependant un mélange hétérogène composé de débris cellulaires, de composés solubles interstitiels et d'huile.

30 La difficulté à résoudre dans l'emploi de ces technologies de désintégration cellulaire est l'isolement du seul contenu intracellulaire (à l'exclusion des débris membranaires, des sucres, des fibres et des matières grasses) et la préservation, notamment, de la qualité de la charge protéique.

Dans le cas de la microalgue du genre *Tetraselmis sp*, Anja Schwenzfeier et al (Bioresource Technology, 2011, 102, 9121 – 9127) ont proposé un procédé garantissant la  
35 solubilité et la qualité de l'aminogramme des protéines isolées et débarrassées des contaminants (telles les substances colorantes) comprenant les étapes suivantes :

- désintégration cellulaire par broyage à billes,

- centrifugation de la suspension de microalgues broyées,
- dialyse du surnageant,
- passage sur résine échangeuse d'ions,
- dialyse de l'éluat,
- 5       - décoloration, puis
- lavage et remise en solution.

Cependant, ce procédé de laboratoire (pour traiter 24 g de biomasse) n'est pas transposable à l'échelle industrielle, où le procédé de broyage à billes est plutôt mis en œuvre pour récupérer une biomasse complète.

- 10       Des solutions alternatives ont été proposées en changeant complètement la technologie de libération du contenu intracellulaire des microalgues, comme le traitement électrique à champ pulsé.

L'exposition des cellules biologiques à un champ électrique pulsé de haute intensité peut en effet altérer la structure de la membrane cellulaire.

- 15       Le champ externe provoque le chargement de la membrane. A une tension transmembranaire suffisante (0,5-1 V), l'arrangement moléculaire des phospholipides change, ce qui conduit à faire perdre à la membrane son rôle de barrière, la rendant perméable. En fonction des conditions mises en œuvre, cette perméabilisation membranaire peut être réversible ou irréversible.

- 20       Pour une extraction efficace des composés intracellulaires, il reste cependant conseillé à l'homme du métier utilisateur de cette technologie de provoquer une perméabilisation irréversible de la membrane, ce qui conduit à sa désintégration.

- 25       Cette rupture de la membrane facilite alors la libération du contenu cellulaire et, en cas d'utilisation d'une technique complémentaire d'extraction par solvant, facilite également la pénétration du solvant dans la cellule.

Cette technique, quoique prometteuse, n'est malheureusement pas extrapolable à une échelle industrielle pour traiter une biomasse produite en réacteur de 1 à 200 m<sup>3</sup>.

- 30       Il résulte qu'il demeure un besoin non satisfait de disposer d'une technologie de fragilisation des parois des microalgues apte à libérer le contenu intracellulaire sans désintégrer la cellule ni altérer la qualité de ses composants.

La société Demanderesse a trouvé que ce besoin pouvait être satisfait en combinant un procédé de perméabilisation thermique des cellules de microalgues avec des étapes de centrifugation et de séparation membranaire (microfiltration, ultrafiltration).

- 35       La société Demanderesse va ainsi à l'encontre d'un préjugé technique qui veut que les méthodes thermiques de disruption cellulaire, tout comme les forces de cisaillement provoquées par la désintégration mécanique, soient des technologies plutôt mises en

œuvre pour dégrader ou dénaturer les produits issus des microalgues (Richmond, 1986, *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Inc – Molina Grima et al., 2003, *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics*, *Biotechnol. Adv.* 20:491–515).

5 Par ailleurs, une fois libérées du compartiment intracellulaire, la récupération des molécules est réalisée aisément par centrifugation et séparation membranaire, étant donné que le traitement thermique développé par la société Demanderesse ne conduit pas à la désintégration de la paroi cellulaire.

10 La présente invention est relative à un procédé de perméabilisation thermique de la biomasse de microalgues du genre *Chlorella* de manière à en récupérer les fractions solubles enrichies notamment en peptides et polypeptides et en oligosaccharides.

Plus précisément, le procédé selon l'invention est un procédé de préparation d'un isolat protéique de la biomasse de microalgues du genre *Chlorella*, comprenant les étapes

15 suivantes :

- fourniture d'une biomasse de microalgues produite par fermentation,
- de manière optionnelle, lavage de la biomasse de manière à éliminer les composés solubles interstitiels,
- perméabilisation thermique de la biomasse à une température comprise entre  
20 50 et 150°C, de préférence 100 et 150°C, pendant une durée comprise entre 10 secondes et 5 minutes, de préférence pendant une durée comprise entre 10 secondes et 1 minute,
- élimination de la biomasse ainsi perméabilisée par une technique de séparation solide-liquide choisie dans le groupe constitué de la filtration frontale ou  
25 tangentielle, la floculation et la centrifugation, plus particulièrement la centrifugation multi-étagée, pour obtenir une fraction soluble,
- de manière optionnelle, récupération et clarification de la fraction soluble ainsi obtenue par microfiltration de manière à la débarrasser des insolubles résiduels,
- ultrafiltration de la fraction soluble (clarifiée ou non clarifiée, selon que l'étape  
30 précédente de récupération et clarification soit respectivement effectuée ou non), sur membrane de seuil de coupure inférieur à 5 kDa, de préférence compris entre 1 et 5 kDa, afin d'obtenir un isolat protéique soluble, puis
- évaporation, pasteurisation et atomisation dudit isolat protéique.

35

**Choix de la microalgue**

De préférence, les microalgues du genre *Chlorella* sont choisies dans le groupe constitué de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* et *Chlorella protothecoides*, et sont plus particulièrement *Chlorella protothecoides*.

5 Dans un mode de réalisation particulier, la souche est *Chlorella protothecoides* (souche UTEX 250 - *The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin - USA*).

Dans un autre mode de réalisation particulier, la souche est *Chlorella sorokiniana* (souche UTEX 1663 - *The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin -*  
10 *USA*).

La culture en conditions hétérotrophiques et en l'absence de lumière conduit classiquement à la production d'une biomasse de chlorelles présentant une teneur en protéines (évaluée par la mesure du taux d'azote N x 6,25) de 45 à 70 % en poids de cellules sèches.

15 Comme il sera exemplifié ci-après, cette culture est réalisée en deux étapes :  
- préculture dans un milieu contenant du glucose et de l'extrait de levures pendant 72 h à 28°C sous agitation, puis  
- culture pour production de la biomasse proprement dite en glucose et extrait de levures pendant plus de 36 h à 28°C, sous agitation et à pH 6,5 régulé à  
20 l'ammoniaque,  
ce qui conduit à environ 80 g/L de biomasse à une teneur en protéines (évalué par le N x 6,25) de l'ordre de 52 % en poids de cellules sèches.

La biomasse est ensuite collectée par séparation solide-liquide, par filtration frontale ou tangentielle ou par tout moyen connu par ailleurs de l'homme du métier.

25 De manière optionnelle, la société Demanderesse recommande ensuite de laver la biomasse de manière à éliminer les composés solubles interstitiels par une succession de concentration (par centrifugation) / dilution de la biomasse.

Au sens de l'invention, on entend par « composés solubles interstitiels » tous les contaminants organiques solubles du milieu de fermentation, par exemple les composés hydrosolubles tels les sels, le glucose résiduel, les oligosaccharides de degré de polymérisation (ou DP) 2 ou 3 ou les peptides.  
30

Cette biomasse ainsi purifiée de ses composés solubles interstitiels est ensuite ajustée préférentiellement à une matière sèche comprise entre 15 et 30 % en poids, de préférence à une matière sèche comprise entre 20 et 30 %.

***Perméabilisation thermique de la biomasse***

On réalise alors le traitement thermique à une température comprise entre 50 et 150 °C, de préférence 100 et 150 °C, pendant une durée comprise entre 10 secondes et 5 minutes, de préférence pendant une durée comprise entre 10 secondes et 1 minute.

5 Ce traitement permet de laisser diffuser les composants intracellulaires dans le milieu réactionnel.

Enfin, au terme de ces étapes, on laisse refroidir à une température finale comprise entre 0° et 10 °C, de préférence à une température de l'ordre de 4 °C.

10 Sans être liée par une quelconque théorie, la société Demanderesse considère que le traitement thermique, réalisé dans ces conditions opératoires, pourrait agir ainsi comme un procédé de fragilisation membranaire qui autorise le relargage spontané des composants solubles du compartiment intracellulaire, voire de la matrice extracellulaire.

15 En plus des substances ioniques, des substances organiques tels que les hydrates de carbone (majoritairement DP1 et DP2), les peptides et les polypeptides sont drainés hors de la cellule.

Au contraire, les lipides et composés organiques hydrophobes restent dans les cellules, ce qui démontre bien que les cellules sont perméabilisées et non lysées ou détruites.

20 Le procédé selon l'invention ne conduit donc pas à la formation d'une émulsion, mais bien à une suspension aqueuse.

Le relargage de toutes ces substances solubles à travers la membrane perméabilisée s'apparente à un procédé de diffusion libre de type dialyse.

25 Par voie de conséquence, un temps de latence peut être nécessaire pour permettre une diffusion suffisante après le traitement thermique qui perméabilise la membrane.

Dans la littérature, le procédé de perméabilisation par champ pulsé des membranes de levures pour en extraire les protéines demande de 4 h à 6 h (Ganeva et al., 2003, *Analytical Biochemistry*, 315, 77-84).

30 Selon l'invention, un temps de réaction beaucoup plus court est mis en œuvre, compris entre 10 secondes et 5 minutes.

La biomasse résiduelle est ensuite éliminée par une technique de séparation solide-liquide par filtration frontale ou tangentielle, par floculation, par centrifugation, ou par tout moyen connu par ailleurs de l'homme du métier, ce qui permet de récupérer aisément la fraction soluble débarrassée des cellules de microalgues.

35 Au préalable de cette étape d'élimination de la biomasse, il est possible de procéder à une dilution des cellules perméabilisées afin d'améliorer le rendement et la qualité de cette étape de séparation solide-liquide.

La fraction soluble résultante est finalement composée essentiellement de protéines (50 – 80 % p/p) et d'hydrates de carbone (5 – 15 % p/p).

### ***Séparation membranaire***

5 Les procédés classiques de récupération des protéines solubles reposent généralement sur une étape de précipitation desdites protéines par l'acide trichloracétique (10 % poids/volume) ou au sulfate d'ammonium.

Cependant, ces isolements par précipitation font suite à des procédés de cassage cellulaire très destructeurs (le plus souvent par sonication ou homogénéisation) qui, s'ils  
10 permettent en effet d'augmenter les rendements d'extraction, conduisent surtout à des protéines de faible solubilité et dénaturées.

Leur refonctionnalisation ne peut alors être envisagée que par le biais de leur produit d'hydrolyse (en peptides) par des moyens chimiques (lyse à la soude), physiques (traitement à haute température) ou enzymatiques (enzymes protéolytiques).

15 Le procédé selon l'invention permet bien au contraire de libérer des peptides et polypeptides natifs, intacts, dont toutes les fonctionnalités peuvent toujours s'exprimer.

Le procédé de l'invention conduit ensuite à l'isolement des protéines d'intérêt, par fractionnement membranaire.

La société Demanderesse recommande ainsi de procéder en deux étapes :

- 20
- éventuellement, récupération et clarification de la fraction soluble ainsi obtenue par microfiltration de manière à la débarrasser des insolubles résiduels,
  - ultrafiltration de la fraction soluble (clarifiée ou non clarifiée, selon que l'étape précédente de récupération et clarification soit respectivement effectuée ou non), sur membrane de seuil de coupure inférieur à 5 kDa, de préférence

25 compris entre 1 et 5 kDa, afin d'obtenir un isolat protéique soluble.

L'exploitation de ces voies permet de purifier les peptides et polypeptides solubles de leurs sels et sucres résiduels.

On obtient alors un isolat de protéines solubles ayant une teneur en protéines supérieure à 90 % en poids.

30

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent, lesquels se veulent illustratifs et non limitatifs.

35



## EXEMPLES

**Exemple 1 : Production de *Chlorella protothecoides* en fermentation de type fed-batch**

5

La souche utilisée est *Chlorella protothecoides* UTEX 250.

Pré-culture :

10

- 500 mL de milieu dans un Erlenmeyer de 2L ;
- Composition du milieu (en g/L) :

Tableau 1.

Macro éléments (g/L)	Glucose	40
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
	Acide Citrique	1
	Clerol FBA 3107 (antimousse)	0,1
Micro-éléments et Vitamines (mg/L)	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	30
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1
	MnSO <sub>4</sub> .1H <sub>2</sub> O	8
	CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,2
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,4
	Thiamine HCl	1
	Biotine	0,015
	B12	0,01
	Calcium pantothenate	0,03
	Acide p-aminobenzoïque	0,06

15 L'incubation se déroule dans les conditions suivantes : durée : 72 h ; température : 28°C ; agitation : 110 rpm (Incubateur Infors Multitron).

La pré-culture est ensuite transférée dans un fermenteur de 30L de type Sartorius.

20

Culture pour production de biomasse :

Le milieu est le suivant :

Tableau 2.

Macro éléments (g/L)	Glucose	40
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,8
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1,4
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,4
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2
	Clerol FBA 3107 (antimousse)	0,3
Micro-éléments et Vitamines (mg/L)	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	40
	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	15
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2
	Thiamine HCl	6
	Biotine	0,1
	B12	0,06
	Calcium pantothenate	0,2
	Acide p-aminobenzoïque	0,2

5

Le volume initial ( $V_i$ ) du fermenteur est ajusté à 17 L après ensemencement. Il est porté à 20 à 25 L environ en final.

10

Les paramètres de conduite de la fermentation sont les suivants :

Tableau 3.

Température	28 °C
pH	5,0 – 5,2 par $\text{NH}_3$ 28% w/w
$\text{pO}_2$	20% +/- 5% (maintenue par agitation)
Agitation	300 RPM mini
Débit d'air	15 L/min

15

Lorsque la concentration résiduelle en glucose tombe en dessous de 10 g/L, un apport de glucose sous forme d'une solution concentrée à 800 g/L environ est réalisé de façon à maintenir la teneur en glucose entre 0 et 20 g/L dans le fermenteur.

### Résultats

En 40h, on obtient 80 g/L de biomasse contenant 52 % de protéines.

### Exemple 2. Perméabilisation thermique de la biomasse de *Chlorella* *protothecoides* et récupération de la fraction soluble

La biomasse obtenue selon l'exemple 1 est :

- centrifugée et lavée de manière à être amenée à une matière sèche de 220 g/l et à une pureté de plus 90 % (pureté définie par le rapport entre la matière sèche de la biomasse sur la matière sèche totale), puis
- traitée thermiquement par UHT sur un barème d'une dizaine de secondes à 135°C.

La biomasse « partiellement solubilisée » ainsi obtenue présente de l'ordre de 50 % de peptides et protéines (exprimés en acides aminés totaux), 20 % de sucres et 15 % de lipides, correspondant à un taux de solubilisation entre 20 et 50% relativement à la biomasse totale initiale.

Elle est ensuite séparée de la fraction soluble par séparation centrifuge.

Les solubles « bruts » renferment alors entre 60 et 75% de peptides et protéines (exprimés en acides aminés totaux – dont 90 % d'arginine et acide glutamique), entre 10 et 25 % de sucres et moins de 1% de lipides.

La biomasse « appauvrie », dans le culot de centrifugation, présente quant à elle encore entre 20 et 35 % de peptides et protéines (exprimés en acides aminés totaux), 25 à 35 % de sucres et surtout entre 20 à 25 % de lipides.

Le perméat « P1 » de microfiltration présentant une matière sèche de 5 % et titrant entre 60 et 75 % de peptides et protéines (exprimés en acides aminés totaux) est ensuite ultrafiltré sur membrane de seuil de coupure < 5 kDa.

Le rétentat « R2 » d'ultrafiltration ainsi obtenu présente 10 % (5 à 20%) de matière sèche, et contient plus de 90 % de peptides présentant un poids moléculaire supérieur ou égal à 5 kDa.

Le perméat « P2 » inférieur à 3 % de matière sèche, contient quant à lui des peptides présentant un poids moléculaire inférieur à 5 kDa et des oligosaccharides de DP inférieur ou égal à 2.

Ce perméat « P2 » peut alors être notamment filtré sur membrane d'osmose inverse (présentant un taux de réjection en NaCl de 93 %), de manière à obtenir :

- un rétentat « R3 » à plus de 10% de matière sèche contenant des peptides présentant un poids moléculaire inférieur à 5 kDa et des oligosaccharides de DP 2, tel le saccharose ;
- un perméat « R3 » à 0,1 % de matière sèche contenant des oligosaccharides de DP1, des sels, des acides aminés libres et des acides organiques.

5

L'isolat protéique « R2 » est alors :

- neutralisé à pH 7 à la potasse,
- concentré par évaporation à 35% de matière sèche (MS),
- pasteurisé et
- atomisé.

10

## REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un isolat protéique de la biomasse de microalgues du genre *Chlorella*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5           - fourniture d'une biomasse de microalgues produite par fermentation,
- de manière optionnelle, lavage de la biomasse de manière à éliminer les composés solubles interstitiels,
- perméabilisation thermique de la biomasse à une température comprise entre 50 et 150°C, de préférence 100 et 150°C, pendant une durée comprise entre 10       10 secondes et 5 minutes, de préférence pendant une durée comprise entre 10 secondes et 1 minute,
- élimination de la biomasse ainsi perméabilisée par une technique de séparation solide-liquide choisie dans le groupe constitué de la filtration frontale ou tangentielle, la floculation et la centrifugation, plus particulièrement la 15       centrifugation multi-étagée, pour obtenir une fraction soluble,
- de manière optionnelle, récupération et clarification de la fraction soluble ainsi obtenue par microfiltration de manière à la débarrasser des insolubles résiduels,
- ultrafiltration de la fraction soluble, sur membrane de seuil de coupure inférieur à 5 kDa, de préférence compris entre 1 et 5 kDa, afin d'obtenir un isolat 20       protéique soluble, puis
- évaporation, pasteurisation et atomisation dudit isolat protéique.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les microalgues du genre *Chlorella* sont choisies dans le groupe constitué de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* et *Chlorella protothecoides*, et sont plus particulièrement *Chlorella protothecoides*.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2015/051940

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C07K1/14	A23J1/00
	C07K14/405	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K A23J A23K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SU 731 935 A1 (VNI BIOTEKHNIKESKIJ I MIKROBI [SU]) 5 May 1980 (1980-05-05) claim 1; example 1	1,2
A	ALINA-VIOLETA URSU ET AL: "Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae Chlorella vulgaris", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 157, 1 March 2014 (2014-03-01), pages 134-139, XP055108068, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.071 paragraph [02.2]	1,2
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :  "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 September 2015		06/10/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Jetter, Sonya

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2015/051940

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>COUSTETS M ET AL: "Flow Process for Electroextraction of Total Proteins from Microalgae", JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY, SPRINGER, XX, vol. 246, no. 10, 11 April 2013 (2013-04-11), pages 751-760, XP035326801, ISSN: 0022-2631, DOI: 10.1007/S00232-013-9542-Y [retrieved on 2013-04-11] page 759, column 1, line 1 - line 24 -----</p>	1,2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

### Information on patent family members

International application No

PCT/FR2015/051940

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
SU 731935	A1	05-05-1980	SU 731935 A1	05-05-1980
			SU 1138073 A1	07-02-1985
-----				



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/051940

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> INV. C07K1/14 A23J1/00 A23K1/00 C07K1/34 C07K1/36 C07K14/405 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K A23J A23K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SU 731 935 A1 (VNI BIOTEKHNIKESKIJ I MIKROBI [SU]) 5 mai 1980 (1980-05-05) revendication 1; exemple 1 -----	1,2
A	ALINA-VIOLETA URSU ET AL: "Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae Chlorella vulgaris", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 157, 1 mars 2014 (2014-03-01), pages 134-139, XP055108068, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.071 alinéa [02.2] ----- -/-	1,2
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents         </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe         </div> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center;">29 septembre 2015</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center;">06/10/2015</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center;">Jetter, Sonya</div>

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>COUSTETS M ET AL: "Flow Process for Electroextraction of Total Proteins from Microalgae", JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY, SPRINGER, XX, vol. 246, no. 10, 11 avril 2013 (2013-04-11), pages 751-760, XP035326801, ISSN: 0022-2631, DOI: 10.1007/S00232-013-9542-Y [extrait le 2013-04-11] page 759, colonne 1, ligne 1 - ligne 24 -----</p>	1,2

### Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR2015/051940

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (avril 2005)