

(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
20 décembre 2018 (20.12.2018)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/229364 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A23L 5/46 (2016.01) A23L 33/195 (2016.01)
A61K 35/748 (2015.01)

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).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2018/000172

(22) Date de dépôt international :

15 juin 2018 (15.06.2018)

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec revendications modifiées (art. 19(1))

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1770630 15 juin 2017 (15.06.2017) FR

(71) Déposants : ALGAMA [FR/FR] ; 4 Rue Pierre Fontaine, 91000 Evry (FR). UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE [FR/FR] ; 74 Rue Louis Pasteur, 84029 Avignon Cedex 01 (FR).

(72) Inventeurs : CHEMAT, Farid ; 9 Rue Daniel Sorano, 84310 Morieres-les-Avignon (FR). ABERT VIAN, Maryline ; 94 Avenue des Tourterelles, 30390 Aramon (FR). VERNES, Léa ; 12 Rue Sapho, 84130 Le Pontet (FR). FELICE, Thomas ; 3 Rue du commandant Duval, 92140 Clamart (FR). GONCALVES ALVES, Mathieu ; 23 Rue Rodier, 75009 Paris-9E-Arrondissement (FR).

(74) Mandataire : TOUROUDE & ASSOCIATES ; TOUROUDE, Magali, 2 Bis rue Alfred Nobel, 77420 Champs Sur Marne (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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),

(54) Title: METHOD FOR EXTRACTING WATER-SOLUBLE COMPOUNDS FROM MICROALGAE AND/OR CYANOBACTERIA

(54) Titre : PROCÉDÉ D'EXTRACTION DE COMPOSÉS HYDROSOLUBLES À PARTIR DE MICROALGUES ET/OU DE CYANOBACTÉRIES

(57) Abstract: The present invention relates to the field of upgrading biomass, in particular algal biomass, and more specifically the present invention relates to a method for extracting water-soluble compounds from microalgae and/or cyanobacteria, as well as the product obtained by this method and the uses of same, in particular in the food industry or as food supplements.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte au domaine de la valorisation de la biomasse notamment de la biomasse algale, plus précisément la présente invention a pour objet un procédé d'extraction de composés hydrosolubles à partir de microalgues et/ou de cyanobactéries, ainsi que le produit obtenu par ce procédé et ses applications notamment dans le domaine alimentaire ou comme compléments alimentaires.



WO 2018/229364 A1

Procédé d'extraction de composés hydrosolubles à partir de microalgues et/ou de cyanobactéries

La présente invention se rapporte au domaine de la valorisation de la biomasse notamment de la biomasse algale, plus précisément la présente invention a pour objet un procédé d'extraction de composés hydrosolubles à partir de microalgues et/ou de cyanobactéries, ainsi que le produit obtenu par ce procédé et ses applications notamment dans le domaine alimentaire ou comme compléments alimentaires.

Afin de faire face à l'augmentation de la demande alimentaire mondiale, de nombreux industriels s'orientent vers des ressources alternatives telles que les microalgues. Ces microorganismes, d'une grande biodiversité, représentent une source de biomasse unique. Leur production se différencie de celle des plantes maraichères et céréalières, cultivées sur des terres arables, par leur rendement surfacique très élevé.

Cultivées depuis plus de 30 ans, les microalgues constituent un produit alimentaire à part entière. En nutrition humaine et animale, deux approches de valorisation existent : la première consiste à viser une consommation de la microalgue entière, la deuxième concerne l'extraction, la transformation et le conditionnement de molécules bioactives issues de celles-ci. En France, seules trois espèces de microalgues sont autorisées pour une consommation humaine sans transformation et détiennent des propriétés nutritionnelles exceptionnelles : la spiruline ou *Arthrospira platensis*, la microalgue verte *Chlorella* et la diatomée *Odontella aurita*. Ces micro-organismes s'annoncent comme des éléments majeurs dans l'enjeu de l'alimentation mondiale, grâce à leur teneur unique en protéines et au faible impact environnemental de leur production : faible consommation en eau et en énergie.

En particulier, la spiruline a ainsi attiré, ces dernières années, l'attention d'un grand nombre de chercheurs et d'industriels. Elle est déjà très répandue sur le marché sous la forme séchée non transformée, pour sa consommation en tant que complément alimentaire.

La spiruline contenant un grand nombre de composés d'intérêt à forte valeur ajoutée, de nombreux chercheurs et industriels se sont intéressés à l'extraction de composés d'intérêt à partir de cette cyanobactérie. La biomolécule usuellement extraite à partir de la spiruline est la phycocyanine (PC), protéine pigmentaire bleue à activité antioxydante, représentant 20 % de son poids sec (Vonshak, 1997). Cet intérêt grandissant pour la phycocyanine s'explique

notamment par son pouvoir colorant. Actuellement, les colorants alimentaires bleus utilisés en France sont synthétiques : bleu patenté V et bleu brillant ; ils figurent souvent parmi les ingrédients des bonbons et boissons... Le bleu patenté V serait à l'origine d'une amplification de l'hyperactivité chez les enfants et pourrait constituer un potentiel allergène, c'est pourquoi il a récemment été interdit aux Etats Unis, Canada et Australie. De ce fait, une attention particulière a été portée sur l'usage de colorants naturels, et en particulier de la phycocyanine. De nombreuses études portent ainsi sur l'extraction de cette protéine à partir de la spiruline. A l'échelle du laboratoire des procédés tels que la macération dans différents solvants, la lyse enzymatique, les ultrasons, sont employés. Ainsi les études bibliographiques détaillent plusieurs protocoles d'extraction de la PC à partir de la spiruline : emploi des ultrasons (20 kHz, 200W) dans du tampon phosphate 0.1 M et pH 6.8 (Furuki *et al*, 2003), macération dans du tampon phosphate durant 4h à température ambiante sous agitation continue (Chaiklahan et al, 2011), emploi de tampon Tris-HCl avec des lysozymes (Wenjun *et al*, 2013), macération à froid dans de l'eau distillée durant 24h (Kamble *et al*, 2013), macération dans du tampon sodium acétate à 30 °C durant 24h (Silveira *et al.*, 2007).

Afin de produire des extraits de PC en grande quantité, des procédés d'extraction à partir de spiruline ont été mis au point ou adaptés à l'échelle industrielle. On trouve ainsi des brevets protégeant les procédés d'extraction. Par exemple, le brevet WO 2014045177 A1 déposé en 2013 par Ecosystem protège un procédé d'extraction consistant à faire macérer la biomasse de spiruline durant 15 jours dans du glycérol puis d'employer une filtration frontale afin de récupérer le filtrat contenant la PC concentrée. Toutefois, ce procédé d'extraction par macération présente deux inconvénients : la durée d'extraction et le faible rendement. D'autres méthodes, dites d'« intensification », ont émergé ces dernières années afin de pallier ce problème : l'usage de microondes, ultrasons, fluides supercritiques (CO₂), lyse enzymatique... Les fluides supercritiques sont principalement employés pour extraire les composés hydrophobes, liposolubles tels que les caroténoïdes, tocophérols, acides gras... (Supercritical Carbon Dioxide and Microwave-Assisted Extraction of Functional Lipophilic Compounds from *Arthrospira platensis*, Esquivel-Hernández et al, 2016). Par ailleurs, plusieurs auteurs rapportent l'emploi d'ultrasons pour l'extraction de microalgue, et notamment de spiruline (Ultrasound assisted extraction of beta-carotene from *Spirulina platensis*, Dey and Rathod, 2013 _ Phycocyanin extraction from microalgae *Spirulina platensis* assisted by ultrasound irradiation : effect of time and temperature, Hadiyanto *et al.*, 2016). Ces techniques dites d'« intensification » présentent l'avantage d'être plus rapides et efficaces en comparaison aux méthodes conventionnelles telles que la macération. Cependant, les techniques d'extraction par

ultrasons classiques ne permettent pas l'obtention d'un extrait dont la composition en composés hydrosolubles soit modulable selon la nature et la quantité souhaitée pour chaque composé hydrosoluble.

Les procédés cités précédemment visent l'obtention d'extraits de spiruline « titrés » en phycocyanine pour des applications de colorant alimentaire naturel ou bien de complément alimentaire sous forme d'ampoules unitaires. Seuls quelques rares extraits de spiruline sont, à ce jour, destinés à être incorporés à des formulations alimentaires et servent uniquement à les colorer.

Chez certaines autres microalgues telles que *Chlorella*, qui est constituée de cellulose et possède une forte rigidité entraînant une résistance élevée de l'algue vis-à-vis des contraintes mécaniques, ces procédés ne permettraient pas d'extraire efficacement les composés hydrosolubles telles que la chlorophylle.

Les Demandeurs ont aujourd'hui mis au point un procédé qui permet de moduler les bulles de cavitation générées par les ultrasons, à l'origine de l'efficacité de l'extraction, par d'autres paramètres appliqués pendant le traitement des micro-algues aux ultrasons, tels que la pression, la température, et le débit, permettant ainsi une intensification et une modulation du procédé d'extraction de composés hydrosolubles, selon la nature et la quantité des composés hydrosolubles souhaités dans l'extrait.

Contrairement à ce qui existe déjà sur le marché, le procédé selon l'invention permet de générer de manière optimisée, à l'échelle industrielle, à partir d'une biomasse de microalgues de départ, d'une solution aqueuse et d'un procédé, différents extraits à haute valeur nutritionnelle, riches en composés hydrosolubles, en particulier protéines, vitamines hydrosolubles, chlorophylle, phycocyanine et minéraux, destiné à l'alimentation humaine lesdits extraits ayant des compositions modulables en lesdits composés hydrosolubles. Selon les paramètres de puissance ultrasonore (Pus), Température, Pression et débit choisis au départ, il est ainsi possible de faire varier la composition nutritionnelle de l'extrait mais également sa couleur.

Ainsi un premier objet de la présente invention concerne un procédé d'obtention de composés hydrosolubles à partir de microalgues eucaryotes (microalgues) ou procaryotes (cyanobactéries), caractérisé en ce que ledit procédé comprend au moins une étape d'extraction desdits composés hydrosolubles par un traitement d'ultrasons avec application d'une puissance ultrasonore (Pus) comprise entre 10 et 1000 W/L appliquée aux microalgues ou aux

cyanobactéries en mélange avec une solutions aqueuse à laquelle est appliquée, de préférence de manière concomitante une pression (P) comprise entre 1 et 2 bars, une température (T) comprise entre 5 et 70°C, et un débit (D) compris entre 1 et 1000 L/heure.

Par microalgues, on entend désigner selon la présente invention les microalgues eucaryotes, qui sont caractérisée par une paroi cellulaire et un noyau, comprenant les chlorophytes, les chrysophytes et les pyrophytes, lesdits microalgues eucaryotes étant communément dénommées « microalgues », et les microalgues procaryotes, qui ne possèdent pas de noyau et de paroi cellulaire, comprenant les cyanophytes, ci-après dénommées spécifiquement « cyanobactéries ».

De manière préférée selon l'invention, les microalgues eucaryotes sont choisies parmi les chlorophytes, de préférence parmi *Chlorella*, *Nannocloropsis*, *Dunaliella* et *Euglena*.

De manière préférée selon l'invention, les cyanobactéries sont choisies parmi la spiruline (*Arthrospira platensis* ou *Spirulina maxima*) et l'AFA (*Aphanizomenon Floes-aquae*).

De manière particulièrement préférée selon l'invention la microalgue selon l'invention est la spiruline

Par composés hydrosolubles, on entend désigner selon la présente invention des composés solubles dans l'eau et contenus dans les microalgues et/ou les cyanobactéries, de préférence choisi parmi les protéines et peptides, les vitamines hydrosolubles, de préférence les vitamines du groupe B (en particulier Thiamine (B1), Riboflavine (B2), Niacine (B3), Acide pantothénique (B5), pyridoxine (B6), Biotine (B8), Folate (B9), Cobalamine (B12)), les minéraux, de préférence le sodium, le calcium, le potassium, le magnésium et le fer, la C-phycocyanine (ou phycocyanine), et la chlorophylle.

De manière particulièrement préférée selon l'invention la microalgue selon l'invention est la spiruline et le composé hydrosoluble est la C-phycocyanine.

Par traitement d'ultrasons avec application d'une puissance ultrasonore (Pus) on entend désigner selon la présente invention un traitement physique mettant en œuvre un réacteur à ultrasons. De manière préférée selon l'invention, la puissance ultrasonore est comprise entre 10

et 1000 W/L de solution aqueuse mélangée aux microalgues ou aux cyanobactéries, de manière préférée entre 30 et 100 W/L, de manière encore préférée entre 50 et 80 W/L. De manière préférée, l'énergie déployée par le réacteur à ultrasons varie entre 500 et 5000 J, le débit d'alimentation du réacteur à ultrasons varie de 1 L/heure à 1000L/heure, de préférence 1L/heure, et le traitement aux ultrasons est réalisé pendant une durée variant de 30 secondes à 90 minutes.

Par solution aqueuse on entend désigner selon la présente invention une solution aqueuse compatible pour un usage alimentaire. De manière préférée, on entend désigner une eau tamponnée, de préférence du tampon phosphate à pH 7, le tampon utilisé étant le sodium phosphate. En particulier, il est préférable que la solution aqueuse selon l'invention ne comprennent pas de conservateurs chimiques, ou encore de solvants organiques d'origine pétrochimique (méthanol, chloroforme, hexane, ethanol) qui présentent une toxicité qui les rendraient incompatibles pour un usage alimentaire des composés hydrosolubles obtenus par le procédé selon l'invention. Il n'est pas souhaitable non plus d'utiliser un solvant acide car certains composés hydrosolubles comme la phycocyanine sont très sensibles au pH et toute variation important du pH, en dessous de pH5 et au-dessus de pH 7,5 entraîne sa précipitation. Un solvant alcoolique n'est pas préféré car certains composés hydrosolubles comme la phycocyanine perdent alors une grande partie de leurs propriétés anti-oxydantes.

De manière préférée selon la présente invention, le rapport microalgues ou cyanobactéries /solution aqueuse est compris entre 1/5^{ème} et 1/50^{ème}.

De manière concomitante à ce traitement ultrasonore et à ce débit est appliqué une pression (P) comprise entre 1 et 2 bars, et une température (T) comprise entre 5 et 70°C, de manière préférée entre 20 et 30°C. De manière particulièrement préférée, la température est maintenue constante entre 20 et 30°C pendant toute la durée du procédé d'extraction des composés hydrosolubles.

De manière préférée selon l'invention, le mélange microalgue/solution aqueuse est accueilli dans un réservoir à double paroi. Ledit réservoir peut être thermostaté grâce à une circulation d'eau et un thermostat permettant de régler la température souhaitée. Le mélange est ensuite envoyé grâce à une pompe et une vanne vers un réacteur à ultrasons comprenant une sonde ultrasonore reliée à un générateur d'ultrasons. Ledit réacteur à ultrasons peut lui aussi être préférentiellement doté d'une double paroi permettant d'être thermostaté grâce à une circulation d'eau et un thermostat permettant de régler la température souhaitée. La vanne

permet d'imposer une résistance à la circulation du mélange et donc d'augmenter la pression subit par le mélange. De préférence, un manomètre permet de suivre, en amont du réacteur ultrasonore la pression exercée sur le mélange, et de moduler l'ouverture de la vanne pour appliquer la pression souhaitée sur le mélange.

Ainsi, de manière préférée selon l'invention, la température (T) est contrôlée grâce à un thermostat, de préférence via une circulation d'eau thermostatée dans la double paroi d'un réacteur comprenant le mélange microalgue/solution aqueuse, et le mélange est maintenu à la température souhaitée. Il est à noter que lors de l'étape de traitement aux ultrasons, avec éventuellement application d'une pression supérieure à 1 bar, la température du mélange va avoir tendance à augmenter, et que le thermostat peut avoir alors le rôle de maintenir une température constante du mélange. Le contrôle de la température permet d'éviter une élévation trop importante qui risquerait d'endommager les composés hydrosolubles sensibles à la chaleur, dits thermolabiles. La Demanderesse a mis en évidence que lorsque la température excède les 40°C certaines molécules d'intérêt comme la phycoyanine peuvent être masquées (par la chlorophylle par exemple). Par ailleurs la température optimale à l'extraction composés hydrosolubles d'intérêts se situe autour de 25°C. Ainsi avec une thermorégulation à 20°C, couplée à l'effet chauffant des ultrasons, une température avoisinant les 25-30 °C (proche de la température optimale d'extraction) est obtenue. Cependant, la modulation de la température permet d'extraire différents types de composés : à faible température l'extraction de composés thermolabiles est favorisée alors qu'à température élevée les composés sensibles à la chaleur sont masqués mais d'autres molécules plus difficiles à extraire à froid se retrouvent en solution comme la chlorophylle (de nature apolaire, soluble dans les solvants organiques en temps normal).

De manière préférée selon l'invention, la pression (P) est appliquée à l'aide d'une vanne sur le système permettant d'alimenter le réacteur où sera appliquée P_{us} et permet d'imposer une résistance à la circulation du mélange microalgue/solution aqueuse dans le système. Plus la vanne est proche de la position fermée, plus l'écoulement est rendu difficile du fait du rétrécissement de l'orifice, ce qui provoque un ralentissement de la circulation du mélange microalgue/solution aqueuse dans le système ; or la pompe impose un débit constant ce qui provoque une élévation de la pression.

Selon un aspect préféré de la présente invention, la puissance ultrasonore, la pression, la température et le débit sont modulés pour faire varier les composés hydrosolubles extraits desdites microalgues eucaryotes ou cyanobactéries.

Ainsi, en modulant Pus, T, P et/ou D, différents extraits peuvent être produit à partir d'une même biomasse de microalgue ou de cyanobactérie de départ, avec une solution aqueuse donnée.

Ainsi, de manière préférée selon l'invention, plus la puissance ultrasonore, la pression et la température délivrées au milieu sont importantes, plus l'extrait sera riche en protéines et en chlorophylle. Au contraire, moins la puissance ultrasonore et la température sont importantes, moins l'extrait sera riche en composés hydrosolubles.

Ainsi par exemple on peut appliquer une puissance ultrasonore de 100 W/L avec une pression de 2 bars à une température contrôlée de 20°C pendant 10 min sur un mélange de spiruline et tampon phosphate 7 pour obtenir un extrait plus riche en chlorophylle, et donc de couleur verte plus intense que par un procédé avec une puissance ultrasonore de 30 W/L avec une pression de 1 bar à une température contrôlée de 20°C pendant 10 min qui sera plus bleu.

De manière préférée selon la présente invention, la durée de l'étape de traitement ultrasonore est comprise entre 1 à 90 minutes. La modulation de la durée permet de faire varier la composition en composés hydrosolubles, et donc également la concentration. Ceci s'explique par le fait que plus le mélange microalgue/solution aqueuse passe fréquemment dans le réacteur à ultrasons, plus il va être soumise aux ultrasons et libérer de composés hydrosolubles.

Selon un aspect préféré de la présente invention, la puissance ultrasonore, la pression, la température et le débit sont modulés pour faire varier la couleur de l'extrait obtenu par ledit procédé.

Ainsi, de manière préférée selon l'invention, plus la puissance ultrasonore, la pression et la température délivrées au milieu sont importantes, plus l'extrait sera riche en protéines et en chlorophylle et donc de couleur verte intense. Au contraire, moins la puissance ultrasonore et

la température sont importantes, moins l'extrait sera riche en composés hydrosoluble et plus la couleur de l'extrait généré sera bleue (du fait de l'absence de chlorophylle).

Selon un aspect préféré de la présente invention, les étapes sont appliquées au mélange de microalgues eucaryotes ou cyanobactéries et de solution aqueuse en continu, de préférence à l'aide d'une pompe assurant la circulation du mélange dans un circuit fermé ou ouvert.

Selon un aspect préféré de la présente invention, le procédé d'obtention de composés hydrosolubles selon l'invention comprend en outre, une étape supplémentaire de séparation solide-liquide, de préférence par centrifugation, de l'extrait obtenu lors de l'étape d'extraction.

Selon un aspect préféré de la présente invention, le procédé d'obtention de composés hydrosolubles selon l'invention comprend en outre une étape supplémentaire de filtration de la partie liquide obtenue par séparation de la partie solide (débris cellulaires) de l'extrait.

De manière préférée selon la présente invention, la filtration est effectuée de manière frontale, avantageusement sur filtre alimentaire, par exemple en polyamide, notamment en nylon, avec une finesse de 2 à 50 microns, de préférence inférieure à 25 microns.

Selon un deuxième aspect, l'invention concerne les produits tels qu'obtenus par le procédé selon l'invention renfermant des composés hydrosolubles présents dans les microalgues ou cyanobactéries.

Plus particulièrement, ledit procédé permet d'extraire des microalgues et cyanobactéries les composés hydrosolubles, séparés de la fraction liposoluble de la microalgue ou de la cyanobactérie. Préférentiellement, l'extrait produit possèdera des qualités organoleptiques ainsi qu'une composition nutritionnelle optimale.

Selon un troisième aspect, l'invention concerne l'utilisation des produits tels qu'obtenus par le procédé selon l'invention dans des compositions chimiques, alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Compte tenu des avantages évoqués ci-dessus présentés par ces filtrats/extraits, leurs applications dans le domaine alimentaire, médical ou cosmétique, y compris comme

compléments alimentaires, s'avèrent particulièrement intéressantes. L'invention vise également en tant que nouveaux produits les rétentats obtenus à l'issue de l'étape de filtration. Ces rétentats sont également utilisables dans le domaine alimentaire, médical ou cosmétique ou comme compléments alimentaires.

On décrira maintenant, à titre d'exemple non limitatif, un mode de réalisation de l'invention en référence aux dessins schématiques annexés dans lesquels la figure 1 est un schéma du dispositif de montage de mano-thermo-sonication (MTS) pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, comprenant une sonde et un réacteur ultrasonore pour générer Pus, un thermostat pour régler T, une vanne et un manomètre pour régler P et une pompe pour régler D. On décrira maintenant, à titre d'exemple non limitatif, le séquençement du procédé selon l'invention

Ledit procédé se présente sous la forme d'un circuit fermé ou ouvert (selon le nombre de cycles choisi) permettant le traitement d'une solution de microalgues (5 % en MS) en continu.

Description des différents éléments du montage MTS :

- 1) Le réservoir permet d'accueillir le mélange microalgue et solution aqueuse à traiter. Il s'agit d'un réservoir à double paroi pouvant être thermostaté grâce à une circulation d'eau.
- 2) Une pompe régule la circulation du mélange dans le système à débit constant.
- 3) La sonde ultrasonore est reliée à un générateur permettant de fixer la puissance ultrasonore souhaitée. La sonde est immergée dans le liquide à traiter au 2/3 et émet une fréquence fixe qui lui est propre (environ 20 kHz).
- 4) Le réacteur à ultrasons est doté d'une double paroi permettant de thermostatier le mélange via une circulation d'eau thermostatée. La sonde ultrasonore pénètre le réacteur de manière à délivrer des ondes ultrasonores dans le milieu.
- 5) La vanne permet d'imposer une résistance à la circulation du mélange et donc d'augmenter la pression dans le système. Il est possible de suivre visuellement cette variation de pression sur le manomètre présent en amont du réacteur ultrasonore.

Une fois le mélange traité aux ultrasons dans le dispositif continu, une vidange du système est effectuée afin d'amener le mélange dans un module de centrifugation permettant une séparation

solide/liquide entre les résidus de biomasse solides et la fraction hydrosoluble. Une étape de filtration permet d'obtenir un extrait clair et limpide.

Exemples :

Exemple 1 : US faible puissance, sans pression → extrait bleu

La biomasse (*Arthrospira platensis*) est mélangée à une solution aqueuse d'extraction (tampon phosphate pH 7) selon le ratio 1/20 ; soit 1 g de biomasse pour 20 g de solution aqueuse. Dans ce cas, nous introduisons 4 g de spiruline dans 80 mL de solution aqueuse. Le mélange est soumis aux ultrasons à faible puissance ultrasonore (30 W) durant 10 min, avec une thermorégulation à 20 °C. Aucune pression n'est imposée au système. Les extraits sont ensuite centrifugés 10 min à 8000 rpm puis filtré par filtration frontale sur Büchner (porosité 8 µm) afin de retirer des éventuelles particules en suspension.

L'extrait obtenu est de couleur bleue du fait de la présence de phycocyanine (8.34 g/100 g Matière Sèche (MS)) et contient 33.36 g/100 g MS de protéines.

Exemple 2 : US forte puissance + pression → extrait vert riche en protéines

La biomasse (*Arthrospira platensis*) est mélangée à la solution aqueuse d'extraction (tampon phosphate pH 7) au ratio 1/20 ; soit 1 g de biomasse pour 20 g de solution aqueuse. Dans ce cas, nous introduisons 4 g de spiruline dans 80 mL de solution aqueuse. Le mélange est soumis aux ultrasons à puissance ultrasonore (100 W/L, soit environ 80 % d'amplitude) durant 10 min, avec une thermorégulation à 20 °C et une pression avoisinant les 2 bars. Les extraits sont ensuite centrifugés 10 min à 8000 rpm puis filtré par filtration frontale sur Büchner (porosité 8 µm) afin de retirer des éventuelles particules en suspension.

L'extrait obtenu est de couleur verte intense du fait de la présence de chlorophylle qui a été extraire du fait de l'intensité de la méthode. La phycocyanine est toujours présente dans l'extrait (11.47 g/100 g MS) et la teneur en protéines est de 46.19 %.

Revendications

1. Procédé d'obtention de composés hydrosolubles à partir de microalgues eucaryotes ou procaryotes (cyanobactéries), caractérisé en ce que ledit procédé comprend au moins une étape d'extraction desdits composés hydrosolubles par un traitement d'ultrasons avec application d'une puissance ultrasonore (P_{us}) comprise entre 1 et 1000 W/L appliquée aux microalgues ou aux cyanobactéries en mélange avec une solution aqueuse à laquelle est appliquée, de préférence de manière concomitante, une pression (P) comprise entre 1 et 2 bars, une température (T) comprise entre X et 70°C, et un débit (D) compris entre X et 1L/min.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la puissance ultrasonore, la pression, la température et le débit sont modulés pour faire varier les composés hydrosolubles extraits desdites microalgues eucaryotes ou aux cyanobactéries.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la durée de l'étape est comprise entre 30 secondes et 1h.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la puissance ultrasonore, la pression, la température et le débit sont modulés pour faire varier la couleur de l'extrait obtenu par ledit procédé.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les étapes sont appliquées au mélange de microalgues eucaryotes ou cyanobactéries et de solution aqueuse en continu, de préférence à l'aide d'une pompe assurant la circulation du mélange dans un circuit fermé ou ouvert.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les composés hydrosolubles extraits sont choisis parmi les protéines et peptides, les vitamines hydrosolubles, de préférence les vitamines du groupe B, les minéraux, de préférence le sodium, le calcium, le potassium, le magnésium et le fer, la C-phycocyanine, et la chlorophylle.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les microalgues eucaryotes sont choisies parmi *Chlorella*, *Nannocloropsis*, *Dunaliella* et *Euglena*, et que les cyanobactéries sont choisies parmi la spiruline (*Arthrospira platensis* ou *Spirulina maxima*) et l'AFA (*Aphanizomenon Floes-aquae*).
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire de séparation solide-liquide, de préférence par centrifugation, de l'extrait obtenu.
9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire de filtration de la partie liquide obtenue par séparation de l'extrait.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le rapport microalgues ou cyanobactéries /solution aqueuse est compris entre $1/5^{\text{ème}}$ et $1/50^{\text{ème}}$.
11. Produits tels qu'obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes renfermant des composés hydrosolubles présents dans les microalgues ou cyanobactéries.
12. Utilisation des produits selon la revendication 11 dans des compositions chimiques, alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

REVENDEICATIONS MODIFIÉES
reçues par le Bureau international le 28 novembre 2018 (28.11.2018)

- 5 1. Procédé d'obtention de composés hydrosolubles à partir de microalgues eucaryotes ou procaryotes (cyanobactéries), caractérisé en ce que ledit procédé comprend au moins une étape d'extraction desdits composés hydrosolubles par un traitement d'ultrasons avec application d'une puissance ultrasonore (Pus) comprise entre 10 et 1000 W/L appliquée aux microalgues ou aux cyanobactéries en mélange avec un solution aqueuse à laquelle est appliquée, de manière concomitante, une pression (P) comprise entre 1 et 10 2 bars, une température (T) comprise entre 5 et 70°C, et un débit (D) compris entre 1 et 1000 L/heure.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la puissance ultrasonore, la pression, la température et le débit sont modulés pour faire varier les composés hydrosolubles extraits desdites microalgues eucaryotes ou aux cyanobactéries.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la durée de l'étape est comprise entre 30 secondes et 90 minutes.
- 20 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la puissance ultrasonore, la pression, la température et le débit sont modulés pour faire varier la couleur de l'extrait obtenu par ledit procédé.
- 25 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les étapes sont appliquées au mélange de microalgues eucaryotes ou cyanobactéries et de solution aqueuse en continu, de préférence à l'aide d'une pompe assurant la circulation du mélange dans un circuit fermé ou ouvert.
- 30 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les composés hydrosolubles extraits sont choisi parmi les protéines et peptides, les vitamines hydrosolubles, de préférence les vitamines du groupe B, les minéraux, de préférence le sodium, le calcium, le potassium, le magnésium et le fer, la C-phycocyanine, et la chlorophylle.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les microalgues eucaryotes sont choisies parmi *Chlorella*, *Nannocloropsis*, *Dunaliella* et *Euglena*, et que les cyanobactéries sont choisies parmi la spiruline (*Arthrospira platensis* ou *Spirulina maxima*) et l'AFA (*Aphanizomenon Floes-aquae*).
- 5
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire de séparation solide-liquide, de préférence par centrifugation, de l'extrait obtenu.
- 10
9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire de filtration de la partie liquide obtenue par séparation de l'extrait.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le rapport microalgues ou cyanobactéries /solution aqueuse est compris entre $1/5^{\text{ème}}$ et
- 15 $1/50^{\text{ème}}$.
11. Produits tels qu'obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes renfermant des composés hydrosolubles présents dans les microalgues ou cyanobactéries, séparés de la fraction liposoluble de la microalgue ou de la
- 20 cyanobactérie.
12. Utilisation des produits selon la revendication 11 dans des compositions chimiques, alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

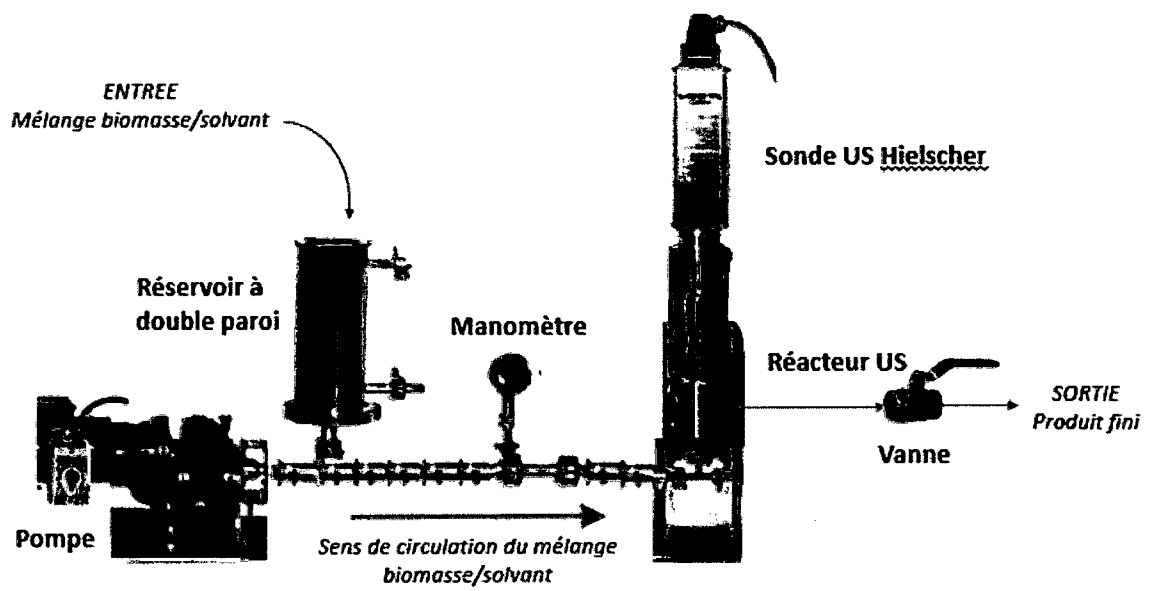


Figure 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2018/000172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23L5/46 A61K35/748 A23L33/195
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)
A23L A61K

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, BIOSIS, FSTA, WPI 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	CN 104 844 707 A (JIANGXI SANDAXIN DAZE BIOLOG ENGINEERING CO LTD) 19 August 2015 (2015-08-19) examples 1-3	11,12
A	----- examples 1-3	1-10
X	CN 105 820 237 A (DONGTAI C B N BIO-ENGINEERING CO LTD) 3 August 2016 (2016-08-03) examples 1-3	11,12
A	----- examples 1-3	1-10
	----- -/-	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 September 2018

Date of mailing of the international search report

08/10/2018

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

Vermeulen, Stéphane

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2018/000172

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARIMI N. S. ET AL.: "Optimization of protein extraction from <i>Spirulina platensis</i> to generate a potential co-product and a biofuel feedstock with reduced nitrogen content", FRONTIERS IN ENERGY RESEARCH, vol. 3, 30, 23 June 2015 (2015-06-23), pages 1-9, XP002776375,	11,12
A	Selection of Pretreatment; page 2, right-hand column Comparison of Different Pretreatments; page 4, left-hand column	1-10
X	----- FURUKI TAKAO ET AL: "Rapid and selective extraction of phycocyanin from <i>Spirulina platensis</i> with ultrasonic cell disruption", JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, KLUWER, DORDRECHT, NL, vol. 15, no. 4, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 319-324, XP009502020, ISSN: 0921-8971, DOI: 10.1023/A:1025118516888 cited in the application	11,12
A	Materials and methods; page 320, left-hand column Results; page 321, left-hand column page 322; figures 5-7	1-10
X	----- HADIYANTO H ET AL: "Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae <i>Spirulina platensis</i> ", EMIRATES JOURNAL OF FOOD AND AGRICULTURE, vol. 28, no. 4, April 2016 (2016-04), pages 227-234, XP002776376,	11,12
A	Conclusion; page 233; table 4	1-10
A	----- WANG M ET AL: "Microalgal Cell Disruption via Ultrasonic Nozzle Spraying", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY ; PART A: ENZYME ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS INC, NEW YORK, vol. 175, no. 2, 5 November 2014 (2014-11-05), pages 1111-1122, XP035428928, ISSN: 0273-2289, DOI: 10.1007/S12010-014-1350-Z [retrieved on 2014-11-05] figure 1; table 1	1-12
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2018/000172

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/154472 A1 (UNILEVER PLC [GB]; UNILEVER NV [NL]; CONOPCO INC DBA UNILEVER [US]) 2 October 2014 (2014-10-02) page 11, line 31 - page 12, line 6 -----	1-12
A	KOTOVICZ VALESCA ET AL: "Pulsed hydrostatic pressure and ultrasound assisted extraction of soluble matter from mate leaves (Ilex paraguariensis): Experiments and modeling", SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY, vol. 132, 30 April 2014 (2014-04-30), pages 1-9, XP029038396, ISSN: 1383-5866, DOI: 10.1016/J.SEPPUR.2014.04.036 figure 2; table 1 4. Conclusions; page 8 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2018/000172

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 104844707	A	19-08-2015	NONE

CN 105820237	A	03-08-2016	NONE

WO 2014154472	A1	02-10-2014	AR 095724 A1 04-11-2015
		BR 112015021105	A2 18-07-2017
		EP 2988619	A1 02-03-2016
		MX 344808	B 09-01-2017
		WO 2014154472	A1 02-10-2014

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2018/000172

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A23L5/46 A61K35/748 A23L33/195 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A23L A61K		
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, BIOSIS, FSTA, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CN 104 844 707 A (JIANGXI SANDAXIN DAZE BIOLOG ENGINEERING CO LTD) 19 août 2015 (2015-08-19) exemples 1-3	11,12
A	-----	1-10
X	CN 105 820 237 A (DONGTAI C B N BIO-ENGINEERING CO LTD) 3 août 2016 (2016-08-03) exemples 1-3	11,12
A	-----	1-10
-/-		
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
14 septembre 2018		08/10/2018
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Vermeulen, Stéphane

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PARIMI N. S. ET AL.: "Optimization of protein extraction from Spirulina platensis to generate a potential co-product and a biofuel feedstock with reduced nitrogen content", FRONTIERS IN ENERGY RESEARCH, vol. 3, 30, 23 juin 2015 (2015-06-23), pages 1-9, XP002776375,	11,12
A	Selection of Pretreatment; page 2, colonne de droite Comparison of Different Pretreatments; page 4, colonne de gauche	1-10
X	----- FURUKI TAKAO ET AL: "Rapid and selective extraction of phycocyanin from Spirulina platensis with ultrasonic cell disruption", JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, KLUWER, DORDRECHT, NL, vol. 15, no. 4, 1 juillet 2003 (2003-07-01), pages 319-324, XP009502020, ISSN: 0921-8971, DOI: 10.1023/A:1025118516888 cité dans la demande	11,12
A	Materials and methods; page 320, colonne de gauche Results; page 321, colonne de gauche page 322; figures 5-7	1-10
X	----- HADIYANTO H ET AL: "Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae Spirulina platensis", EMIRATES JOURNAL OF FOOD AND AGRICULTURE, vol. 28, no. 4, avril 2016 (2016-04), pages 227-234, XP002776376,	11,12
A	Conclusion; page 233; tableau 4	1-10
A	----- WANG M ET AL: "Microalgal Cell Disruption via Ultrasonic Nozzle Spraying", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY ; PART A: ENZYME ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS INC, NEW YORK, vol. 175, no. 2, 5 novembre 2014 (2014-11-05), pages 1111-1122, XP035428928, ISSN: 0273-2289, DOI: 10.1007/S12010-014-1350-Z [extrait le 2014-11-05] figure 1; tableau 1	1-12
	----- -/--	

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	WO 2014/154472 A1 (UNILEVER PLC [GB]; UNILEVER NV [NL]; CONOPCO INC DBA UNILEVER [US]) 2 octobre 2014 (2014-10-02) page 11, ligne 31 - page 12, ligne 6 -----	1-12
A	KOTOVICZ VALESCA ET AL: "Pulsed hydrostatic pressure and ultrasound assisted extraction of soluble matter from mate leaves (Ilex paraguariensis): Experiments and modeling", SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY, vol. 132, 30 avril 2014 (2014-04-30), pages 1-9, XP029038396, ISSN: 1383-5866, DOI: 10.1016/J.SEPPUR.2014.04.036 figure 2; tableau 1 4. Conclusions; page 8 -----	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2018/000172

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 104844707	A	19-08-2015	AUCUN	
CN 105820237	A	03-08-2016	AUCUN	
WO 2014154472	A1	02-10-2014	AR 095724 A1	04-11-2015
			BR 112015021105 A2	18-07-2017
			EP 2988619 A1	02-03-2016
			MX 344808 B	09-01-2017
			WO 2014154472 A1	02-10-2014