

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 038 914**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **15 56792**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **C 12 N 1/12** (2017.01), **C 12 R 1/89**, **C 12 P 21/00**, **23/00**, **A 61 K 36/02**, **8/99**, **A 23 L 17/60**, **A 23 K 20/00**, **10/16**

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 17.07.15.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la demande : 20.01.17 Bulletin 17/03.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension : Polynésie-Fr

⑦① Demandeur(s) : *FERMENTALG Société anonyme — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *CAGNAC OLIVIER, PAGLIARDINI JULIEN, CALLEJA PIERRE et LAPENDRIE ADELINE.*

⑦③ Titulaire(s) : *FERMENTALG Société anonyme.*

⑦④ Mandataire(s) : *CABINET LTL S.A.S. LAW TECH LINK.*

⑤④ **BIOMASSE DE THRAUSTOCHYTRIDES, PROCEDE DE CULTURE ET UTILISATIONS.**

⑤⑦ L'invention se place le domaine des cultures de microalgues particulièrement des Thraustochytrides. Elle a pour objet une biomasse de Thraustochytrides riche en protéines et contenant des acides gras polyinsaturés tel que du DHA, son procédé d'obtention et ses utilisations.

FR 3 038 914 - A1



## DOMAINE DE L'INVENTION

L'invention se place dans le domaine des cultures de microalgues particulièrement des Thraustochytrides. Elle a pour objet une biomasse de Thraustochytrides riche en protéines et en lipides, et éventuellement comprenant des caroténoïdes, son procédé d'obtention et ses utilisations dans l'alimentation.

## ETAT DE LA TECHNIQUE

On connaît plusieurs sources de protéines et des sources de lipides d'origine végétale pour leur utilisation dans l'alimentation humaine ou animale, directement ou comme compléments alimentaires, pour apporter aux animaux et humains des acides aminés nécessaires à leur métabolisme. Par "sources de protéines", on entend des sources d'acides aminés disponibles pour les animaux ou humains une fois les aliments ingérés. Les lipides, en particulier les acides gras polyinsaturés ("polyunsaturated fatty acids en anglais" ou PUFAs), ont un intérêt en tant que source d'énergie, ainsi que pour leurs propriétés thérapeutiques.

Parmi les acides gras polyinsaturés, certains hautement insaturés (AGHI) de la série des oméga-3 (PUFA- $\omega$ 3), en particulier, l'acide éicosapentaénoïque (EPA ou C20 :5  $\omega$ 3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA ou C22 :6  $\omega$ 3), et de la série des oméga-6 (PUFA- $\omega$ 6), en particulier, l'acide arachidonique (ARA ou AA ou encore acide eicosatétraénoïque C20 :4  $\omega$ 6) ont une importance nutritionnelle reconnue et présentent de fortes potentialités en terme d'applications thérapeutiques. Il serait donc souhaitable de pouvoir fournir des nouvelles sources de protéines et de PUFAs pour leur utilisation dans l'alimentation animale et humaine. Des sources qui contiennent des protéines ainsi que des lipides, en particulier, des PUFAs, présenteraient des avantages considérables.

Comme sources de protéines, on connaît la farine de poissons. Celle-ci a l'inconvénient d'être une source d'origine animale dont la disponibilité se réduit. Cette matière première provient de la pêche, et ses procédés de fabrication sont polluants et coûteux du fait des traitements thermiques appliqués et du traitement des déchets (eaux résiduaires, contaminants). La farine de poissons est relativement riche en protéines mais, par contre, elle est pauvre en lipides (on peut citer des teneurs d'environ 8% en matière sèche), puisque les huiles sont extraites au préalable pour commercialisation en nutrition humaine et animale. Son

profil lipidique varie en fonction de son origine. La farine de poisson est aujourd'hui utilisée dans les aliments pour animaux, notamment en aquaculture

La plus connue des sources de protéines végétales employée dans l'alimentation animale est le soja, généralement employé sous forme de tourteaux, résidu solide restant après extraction de l'huile. Toutefois, l'emploi de tourteaux de soja présente plusieurs inconvénients associés à leur origine. Les tourteaux sont généralement importés de pays qui pratiquent une culture intensive du soja au détriment d'autres végétaux source de biodiversité. En outre, de nombreux pays favorisent la culture de variétés de soja génétiquement modifiées (OGM), que l'on retrouve mélangées aux sojas non OGM dans les tourteaux, ce qui ne permet pas de répondre à une demande croissante de produits alimentaires d'origine végétale sans OGM. D'ailleurs, le soja n'est pas une source de lipides tels que des PUFAs.

Les tourteaux co-produits des autres graines oléagineuses sont également des sources de protéines couramment utilisées en alimentation animale (tourteaux de colza ; tournesol, coton, arachide etc.) de même que les co-produits d'autres agro industries en particulier amidonnerie et féculerie (protéines de maïs, blé, pois, pomme de terre, riz, etc.). Ces sources de protéines sont généralement pauvres en lipides. De plus, les acides gras les constituants contiennent très peu de PUFA majoritairement des acides gras "Omega 6" dont la surconsommation par les animaux impactent la qualité des lipides de leurs produits.

Ces sources, souvent impropres à la consommation humaine pour des raisons nutritionnelles (facteurs anti nutritionnels) ou sensoriels (goût) peuvent être retravaillées afin de pouvoir les offrir en alimentation humaine sous forme d'isolats, concentrats, farines, gluten ou hydrolysats voire peptides. Ces produits souvent très purifiés sont très coûteux et n'apportent que peu de nutriments d'intérêt à côté de la protéine.

Se développent également de nouvelles sources de protéines issues de graines moins répandues (lupin, lin, chanvre, chia ...). Elles restent très confidentielles du fait de leur faible disponibilité et/ou leur prix élevé.

On connaît d'autres sources de protéines végétales, notamment la spiruline ou la chlorelle, employées comme compléments alimentaires chez l'homme.

La spiruline, comme la chlorelle, présentent toutefois l'inconvénient d'une faible productivité en protéine qui ne permet pas le passage à une culture en

fermenteur à rendement élevé. Leur culture ne permet pas de répondre à un objectif de production industrielle plus large, économiquement viable, d'une source de protéines alimentaires dont les qualités lui permettront de remplacer les sources usuelles comme le soja dans l'alimentation des animaux et de l'homme.

5 De plus, la chlorelle et la spiruline ont un contenu très faible en PUFAs.

Comme les protéines et les lipides, les caroténoïdes présentent également un intérêt dans les nutriments animale et humaine. Les caroténoïdes sont des pigments plutôt orange et jaune, liposolubles. Ils sont synthétisés par toutes les algues, toutes les plantes vertes et par de nombreux champignons et bactéries  
10 (dont les cyanobactéries). Ils sont absorbés par les animaux et les êtres humains dans leur nourriture. Les caroténoïdes ont deux principaux pics d'absorption situés autour de 440 et 475 nm.

Les caroténoïdes sont généralement utilisés en tant que pigments, mais ils ont aussi un rôle important pour la santé humaine et animale en tant qu'agents  
15 antioxydants. Enfin, ils présentent la capacité de stimuler le système immunitaire et prévenir certaines maladies des yeux, en particulier la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Des molécules d'intérêt dont la production est recherchée sont, en particulier, des pigments, tels que la lutéine, la fucoxanthine, l'astaxanthine, la zéaxanthine, la canthaxanthine, l'échinénone, le bêta-carotène et  
20 la phoenicoxanthine.

Actuellement, les pigments cités ci-dessus sont produits à partir de sources végétales. Souvent, la production de ces pigments à grande échelle demande une main d'œuvre intensive et de grandes surfaces de production. Par exemple, la lutéine est obtenue à partir de pétales de calendula, après un procédé d'extraction  
25 et purification, concentration et recristallisation dans une forme cristalline. Cette forme est difficile à manipuler et est vendue en suspension dans l'huile de maïs ou de tournesol. La production de lutéine par voie chimique synthétique est beaucoup plus chère que la voie d'extraction des calendulas. Les autres sources de lutéine existantes (crustacés, jaunes d'œuf) ont une disponibilité limitée ou ont un  
30 contenu assez faible (maïs) pour rendre ces sources rentables pour la production de lutéine à l'échelle industrielle.

Par ailleurs aujourd'hui, aucune des sources de protéines, ni d'acides gras citées, mentionnées ci-dessus, ne contient des quantités importantes de caroténoïdes.

De nouvelles sources de caroténoïdes, notamment de lutéine, de fucoxanthine, d'astaxanthine, de zéaxanthine, de cantaxanthine, d'échinénone, de bêta-carotènes et de phoenicoxanthine doivent donc être recherchées afin de répondre à la demande croissante du marché pour ces molécules.

Les protistes connus pour répondre à une capacité de production industrielle en fermenteurs, sont employés depuis longtemps pour la production de matières grasses riches en acides gras polyinsaturés comme le DHA ou l'EPA, par exemple WO 97/37032. Certains protistes sont capables, sous certaines conditions, de produire des caroténoïdes. Cependant, les biomasses obtenues jusqu'à maintenant, y compris après extraction des matières grasses, ne contenaient pas de teneurs suffisantes en protéines pour permettre leur usage comme source de protéines dans l'alimentation, pour le moins sans étapes additionnelles d'enrichissement en protéines économiquement coûteuses.

L'un des buts que vise l'invention est de fournir une nouvelle source de protéines et de lipides, en particulier des PUFAs pour l'alimentation animale ou humaine répondant à un objectif de production industrielle large, économiquement viable. Cette source de protéines et de PUFAs peut également comprendre des caroténoïdes, en particulier, des carotènes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ou  $\zeta$ -carotène, lycopène et phytoène) et les xanthophylles (astaxanthine, anthéroxanthine, citranaxanthine, cryptoxanthine, canthaxanthine, diadinoxanthine, diatoxanthine, flavoxanthine, fucoxanthine, lutéine, néoxanthine, phoenicoxanthine, rhodoxanthine, rubixanthine, siphonaxanthine, violaxanthine, zéaxanthine).

L'invention montre que dans certaines conditions de culture, les Thraustochytrides, connus pour leur utilisation dans la production d'huiles à fortes teneurs en acides gras polyinsaturés (DHA et EPA, notamment) sont des microorganismes aptes à produire une grande quantité de protéines, ce qui peut en faire une source de protéines alimentaires substituable aux farines de poisson, pour l'alimentation animale et une source protéique de haute valeur pour la nutrition humaine. Les inventeurs, après de nombreuses expériences, ont pu déterminer des conditions de culture permettant l'obtention d'une forte teneur en

protéines tout en gardant une teneur en lipides d'au moins 20% (par rapport à la matière sèche), dont 25-60%, de préférence 40-60% de PUFAs. Ils ont aussi pu déterminer des conditions de culture permettant d'orienter des cellules vers la production des caroténoïdes en plus des protéines et des PUFAs.

## 5 **EXPOSE DE L'INVENTION**

Ainsi, l'invention a pour objet premier une biomasse de Thraustochytrides pouvant comprendre, en poids par rapport au poids de la matière sèche, au moins 20% de protéines, préférentiellement au moins 30% de protéines, pouvant aller jusqu'à plus de 40% de protéines, voire plus de 60% de protéines en poids par rapport au poids de la matière sèche. La biomasse peut contenir, de manière générale, entre 35% et 65% de protéines, en particulier, de 45% à 55% de protéines par rapport au poids de la matière sèche.

Les pourcentages en poids en protéines peuvent être exprimés tant par rapport aux protéines elles-mêmes que par rapport aux acides aminés contenus dans lesdites protéines. Les pourcentages indiqués ici sont calculés par la somme des acides aminés totaux contenus dans la biomasse (norme ISO 13903 :2005) et non pas à partir de l'azote total. Par exemple, un analyseur d'acides aminés peut être utilisé pour mesurer les acides aminés totaux. Le tryptophane est dosé à part, sa valeur est ensuite additionnée à la somme des autres acides aminés pour obtenir la somme des acides aminés totaux.

En outre, ladite biomasse peut comprendre, en poids par rapport au poids de la matière sèche, au moins 20% de matière grasse, préférentiellement au moins 30% de matière grasse. Cette matière grasse peut contenir entre 25% et 60%, de préférence, entre 40% et 60% de PUFAs, tels que de l'ARA, du DHA et/ou de l'EPA. Selon un mode de réalisation de l'invention, le DHA peut être le PUFA préféré.

Selon certains modes de réalisation de l'invention, ladite biomasse peut comprendre également entre 5 et 250 ppm (ng/mg de matière sèche), de préférence entre 150 et 200 ppm de caroténoïdes.

L'invention concerne également un procédé de production d'une biomasse telle que définie ci-dessus et ci-après, caractérisé en ce qu'il comprend :

a. une première étape de culture des Thraustochytrides dans des conditions de hétérotrophie ou mixotrophie dans un milieu de culture approprié, à une

température comprise entre environ 24°C et 35°C et dans des conditions pouvant favoriser la production de protéines à une teneur d'au moins 35% de protéines en poids par rapport au poids de la matière sèche ;

5 b. une deuxième étape de culture dans des conditions d'hétérotrophie ou de mixotrophie à une température comprise entre environ 18°C et 25°C et inférieure à celle de l'étape a) dans des conditions pouvant favoriser l'accumulation de matière grasse jusqu'à au moins 20%, de préférence au moins 30%, et pouvant favoriser l'accumulation du DHA au sein de la matière grasse jusqu'à au moins 25%, de préférence au moins 35% de la matière grasse jusqu'à l'obtention d'une densité  
10 de culture d'au moins 40 g/L en matière sèche, préférentiellement au moins 60 g/L, plus préférentiellement au moins 80 g/L ;

c. une troisième étape de récupération de la biomasse obtenue à la deuxième étape par séparation de ladite biomasse du milieu de culture (la récolte) ; cette étape peut être suivie d'une homogénéisation et, le cas échéant

15 d. une quatrième étape de séchage de la biomasse récupérée à la troisième étape.

Le temps de culture peut-être, de manière générale, compris entre 40 et 100 heures, de préférence entre 65 et 96 heures, par exemple, 70, 84 ou 96 heures. La méthode de culture objet de l'invention peut permettre de manière générale  
20 d'atteindre une concentration en biomasse supérieure à 100 g/L, voire 120 g/L.

Dans la première étape a), les cellules peuvent être cultivées pendant environ 18-30 heures, de préférence pendant 24h. Après cette première étape de culture, par exemple, à partir d'environ 24h de culture, la température peut être abaissée à environ 18-24°C (pour démarrer l'étape b)). Cette baisse en température peut  
25 favoriser la production des acides gras et éventuellement des caroténoïdes. La culture à basse température peut être en général poursuivie jusqu'à entre environ 50 et 70 heures de culture, et en tout cas de préférence, jusqu'à la fin de la culture.

On peut éventuellement induire la production des caroténoïdes pendant la  
30 culture, de préférence, pendant l'étape b). Pour cela, des conditions mixotrophiques avec une lumière, de préférence, bleue à environ 435-475nm, de préférence 455 nm, peuvent être appliquées. Des caroténoïdes tels que l'astaxanthine, la canthaxanthine, le bêta-carotène et la phoenicoxanthine,

peuvent être produits avec ces longueurs d'onde. La lumière peut être, de manière générale, appliquée pour au moins 18 heures, de préférence pour au moins 24 heures.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la lumière peut être  
5 appliquée à la culture à partir de 24 à 50 heures, plus préférentiellement, à partir de 45 heures de culture et jusqu'à la fin de la culture.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'une biomasse telle que ci-dessus ou  
ci-après, dans les domaines de l'alimentation humaine ou animale, notamment en  
aquaculture. L'invention concerne aussi l'utilisation d'une biomasse telle que ci-  
10 dessus ou ci-après, pour l'amélioration de la performance des animaux. Ladite  
performance peut être évaluée par la mesure de l'indice de consommation, du  
gain de poids ou encore du "Feed Conversion Ratio", tous connus à l'homme de  
métier.

L'invention concerne aussi un aliment comprenant une telle biomasse qui  
15 permet à la fois d'augmenter sa valeur et sa densité nutritionnelle.

L'invention concerne également la biomasse selon l'invention pour son  
utilisation en thérapie, notamment dans le traitement et dans la prévention de la  
malnutrition.

Elle concerne également des compositions cosmétique ou pharmaceutique  
20 pour l'homme ou les animaux et des aliments, ou compositions alimentaires pour  
l'homme ou les animaux, qui comprennent une biomasse selon l'invention.

### **DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION**

Par "mutants", on entend un organisme dérivé de la souche originelle dont le  
patrimoine génétique a été modifié soit par un processus naturel, soit par des  
25 méthodes physico-chimiques connues par l'homme de l'art pouvant générer des  
mutations aléatoires (UV etc.), soit par des méthodes de génie génétique.

Par "conditions de mixotrophie" ou par "en mode mixotrophe", on entend une  
culture avec un apport de lumière et un apport en substrat carboné organique et  
dans l'obscurité.

30 Par "conditions de mixotrophie à dominante hétérotrophe", on entend des  
conditions d'illumination dans lequel la majeure partie de l'énergie pour la  
croissance des cellules est fourni par une source de carbone organique, mais  
dans lequel la lumière a un impact sur la croissance et / ou la composition des

cellules. Cette lumière peut être fournie soit en continu, avec ou sans variations d'intensité, ou de façon discontinue avec des périodes d'obscurité entre les périodes d'éclairage, dans la mesure où il y a un effet sur le métabolisme des cellules exposées à ladite illumination. La périodicité de la variation de l'intensité ou de discontinuités peut être régulière au cours du temps, ou peut être modifié  
5 avec les différentes phases de la croissance cellulaire. La mixotrophie à dominante hétérotrophe permet de produire des molécules d'intérêt en couplant à la fois les avantages de l'autotrophie et de l'hétérotrophie. Sous ces conditions, comme en hétérotrophie, le substrat organique nourrit les microalgues pour  
10 produire de grandes quantités de biomasse, mais le chloroplaste et les autres organites capteurs d'énergie lumineuse de la cellule sont activés. La lumière agit comme signal pouvant induire une réponse du métabolisme, par exemple la synthèse de pigments.

Le terme "de caroténoïde" regroupe les carotènes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ou  $\zeta$ -carotène, lycopène et phytoène) et les xanthophylles (astaxanthine, anthéroxanthine, citranaxanthine, cryptoxanthine, canthaxanthine, diadinoxanthine, diatoxanthine, flavoxanthine, fucoxanthine, lutéine, néoxanthine, rhodoxanthine, rubixanthine, siphonaxanthine, violaxanthine, zéaxanthine).  
15

On entend avantageusement par "biomasse" selon l'invention, un ensemble de cellules de Thraustochytrides produites par la culture desdits protistes, et présentant les teneurs en protéines, en acides gras, et éventuellement en caroténoïdes, décrites dans le présent texte, cellules qui peuvent avoir conservé ou non leur intégrité physique.  
20

On comprend donc que ladite biomasse peut comprendre une quantité de cellules de Thraustochytrides dégradées allant de 0% à 100%. Par "dégradé", on entend que lesdites cellules de Thraustochytrides peuvent avoir vu leur structure et/ou leur composition modifiées. Par exemple, elles peuvent avoir subi une étape de séchage ou alors une étape de récolte de leur huile, l'important étant que la biomasse comprenant ces cellules présente les teneurs en protéines, en acides gras, et éventuellement en caroténoïdes, décrites dans le présent texte.  
25  
30

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la biomasse peut n'avoir pas subi de traitements qui modifient sa composition en acides aminés au cours ou après récolte, c'est à dire que les traitements que peut subir cette biomasse

après récolte ne viennent pas en altérer la composition en acides aminés. En particulier, la biomasse peut ne pas subir d'étape d'enrichissement en protéines et en acides aminés.

Selon un mode plus préféré de l'invention, la biomasse n'a pas subi de  
5 traitements qui modifient sa composition en acides aminés et en matière grasse, et le cas échéant en caroténoïdes, c'est à dire que les traitements que subit cette biomasse après récolte ne viennent pas en altérer la composition en acides aminés et en matières grasses, et éventuellement en caroténoïdes. En particulier, la composition relative des acides aminés par rapport à la matière grasse reste  
10 substantiellement constante.

Il a été observé dans certains cas que les Thraustochytrides non dégradés dans la biomasse selon l'invention peuvent présenter de meilleures propriétés de conservation et de digestibilité que des Thraustochytrides dégradés. Une des formes préférées de l'invention est une biomasse comprenant une quantité  
15 substantiellement majoritaire de Thraustochytrides qui ne sont pas dégradés.

Par "dégradé", on entend selon l'invention des Thraustochytrides dont l'intégrité structurelle et/ou chimique a pu être altérée comme par exemple des Thraustochytrides lysés, résultant par exemple d'un procédé d'homogénéisation.

Il n'en demeure pas moins évident qu'une fois produite, ladite biomasse  
20 pourra être utilisée brute, séchée ou non, ou alors subir tout traitement nécessaire à son utilisation, notamment homogénéisée.

Selon l'invention, ladite biomasse peut présenter, en poids par rapport au poids de la matière sèche, un taux d'humidité de 1% à 95%.

Préférentiellement selon un mode de réalisation de l'invention, ladite biomasse  
25 peut présenter, en poids par rapport au poids de la matière sèche, un taux d'humidité de 70% à 90%, préférentiellement 80% à 85%.

Préférentiellement encore selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, ladite biomasse peut présenter, en poids par rapport au poids de la matière sèche, un taux d'humidité de 1% à 10%, préférentiellement de 2% à 7%.

Selon l'invention, lesdits Thraustochytrides peuvent être de l'ordre des  
30 Thraustochytriales, préférentiellement de la sous-classe des Thraustochytriaceae, encore plus préférentiellement d'un genre pouvant être choisi dans le groupe comprenant les genres *Aurantiochytrium*, *Aplanochytrium*, *Botryochytrium*,

*Japonochytrium*, *Oblongichytrium*, *Parietichytrium*, *Schizochytrium*, *Sicyoidochytrium*, *Thraustochytrium* et *Ulkenia*.

Les Thraustochytrides sont des microorganismes non génétiquement modifiés ou aussi des microorganismes génétiquement modifiés. Dans l'éventualité où des  
 5 Thraustochytrides génétiquement modifiés seraient employés, ils ne contiennent pas de gènes codant pour une ou plusieurs enzymes qui permettent de dégrader ou digérer la biomasse en vue de son utilisation comme aliment.

Avantageusement, lesdits Thraustochytrides peuvent être choisis parmi les espèces *Aplanochytrium kerguelense* ; *Aplanochytrium minuta* ; *Aplanochytrium*  
 10 *stocchinoi* ; *Aplanochytrium sp.* PR24-1 ; *Aurantiochytrium limacinum* ; *Aurantiochytrium limacinum* AB022107 ; *Aurantiochytrium limacinum* HM042909 ; *Aurantiochytrium limacinum* JN986842 ; *Aurantiochytrium limacinum* SL1101 JN986842 ; *Aurantiochytrium mangrovei* ; *Aurantiochytrium mangrovei* DQ323157 ; *Aurantiochytrium mangrovei* DQ356659 ; *Aurantiochytrium mangrovei* DQ367049  
 15 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/2 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/3 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/4 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/5 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/6 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/1 ; *Aurantiochytrium sp.* AB052555 ; *Aurantiochytrium sp.* AB073308 ; *Aurantiochytrium sp.* ATCC PRA276 DQ836628 ; *Aurantiochytrium*  
 20 *sp.* BL10 FJ821477 ; *Aurantiochytrium sp.* LY 2012 PKU Mn5 JX847361 ; *Aurantiochytrium sp.* LY2012 JX847370 ; *Aurantiochytrium sp.* N1-27 ; *Aurantiochytrium sp.* SD116 ; *Aurantiochytrium sp.* SEK209 AB290574 ; *Aurantiochytrium sp.* SEK217 AB290572 ; *Aurantiochytrium sp.* SEK 218 AB290573 ; *Aurantiochytrium sp.* 18W-13a ; *Botryochytrium radiatum* ;  
 25 *Botryochytrium radiatum* Raghukumar 16 ; *Botryochytrium radiatum* SEK353 ; *Botryochytrium sp.* ; *Botryochytrium sp.* BUTRBC 143 ; *Botryochytrium sp.* Raghukumar 29 ; *Oblongichytrium minutum* ; *Oblongichytrium multirudimentalis* ; *Oblongichytrium sp.* ; *Oblongichytrium sp.* SEK347 ; *Parieticytrium sarkarianum* ; *Parieticytrium sarkarianum* SEK351 ; *Parieticytrium sarkarianum* SEK364 ;  
 30 *Parieticytrium sp.* ; *Parieticytrium sp.* F3-1 ; *Parieticytrium sp.* H1-14 ; *Parieticytrium sp.* NBRC102984 ; *Phytophthora infestans* ; *Schizochytrium aggregatum* DQ323159 ; *Schizochytrium aggregatum* DQ356661 ; *Schizochytrium aggregatum* ; *Schizochytrium limacinum* ; *Schizochytrium limacinum* OUC166

HM042907 ; *Schizochytrium mangrovei* ; *Schizochytrium mangrovei* FB1 ;  
*Schizochytrium mangrovei* FB3 ; *Schizochytrium mangrovei* FB5 ; *Schizochytrium*  
*minutum* ; *Schizochytrium* sp. ATCC20888 DQ367050 ; *Schizochytrium* sp. KGS2  
 KC297137 ; *Schizochytrium* sp. SKA10 JQ248009 ; *Schizochytrium* sp. ATCC  
 5 20111 ; *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 ; *Schizochytrium* sp. ATCC 20111  
 DQ323158\* ; *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 DQ356660 ; *Schizochytrium* sp.  
 ATCC 20889 ; *Schizochytrium* sp. ATCC 26185 ; *Schizochytrium* sp. BR2.1.2 ;  
*Schizochytrium* sp. BUCAAA 032 ; *Schizochytrium* sp. BUCAAA 093 ;  
*Schizochytrium* sp. BUCACD 152 ; *Schizochytrium* sp. BUCARA 021 ;  
 10 *Schizochytrium* sp. BUCHAO 113 ; *Schizochytrium* sp. BURABQ 133 ;  
*Schizochytrium* sp. BURARM 801 ; *Schizochytrium* sp. BURARM 802 ;  
*Schizochytrium* sp. CCAP 4087/3 ; *Schizochytrium* sp. CCAP 4087/1 ;  
*Schizochytrium* sp. CCAP 4087/4 ; *Schizochytrium* sp. CCAP 4087/5  
 ; *Schizochytrium* sp. FJU-512 ; *Schizochytrium* sp. KH105 ; *Schizochytrium* sp.  
 15 KK17-3 ; *Schizochytrium* sp. KR-5 ; *Schizochytrium* sp. PJ10.4 ; *Schizochytrium*  
 sp. SEK 210 ; *Schizochytrium* sp. SEK 345 ; *Schizochytrium* sp. SEK 346 ;  
*Schizochytrium* sp. SR21 ; *Schizochytrium* sp. TIO01 ; *Sicyoidochytrium minutum*  
 SEK354 ; *Sicyoidochytrium minutum* NBRC 102975 *Sicyoidochytrium minutum*  
 NBRC 102979 ; *Thraustochytriidae* sp. BURABG162 DQ100295 ;  
 20 *Thraustochytriidae* sp. CG9 ; *Thraustochytriidae* sp. LY2012 JX847378 ;  
*Thraustochytriidae* sp. MBIC11093 AB183664 ; *Thraustochytriidae* sp. NIOS1  
 AY705769 ; *Thraustochytriidae* sp. #32 DQ323161 ; *Thraustochytriidae* sp. #32  
 DQ356663 ; *Thraustochytriidae* sp. RT49 DQ323167 ; *Thraustochytriidae* sp.  
 RT49 DQ356669 ; *Thraustochytriidae* sp. RT49 ; *Thraustochytriidae* sp. The12  
 25 DQ323162 ; *Thraustochytriidae* sp. The12 ; *Thraustochytrium aggregatum* ;  
*Thraustochytrium aggregatum* DQ356662 ; *Thraustochytrium aureum* ;  
*Thraustochytrium aureum* DQ356666 ; *Thraustochytrium gaertnerium* ;  
*Thraustochytrium kinnei* ; *Thraustochytrium kinnei* DQ323165 ; *Thraustochytrium*  
*motivum* ; *Thraustochytrium multirudimentale* ; *Thraustochytrium pachydermum* ;  
 30 *Thraustochytrium roseum* ; *Thraustochytrium* sp. 13A4.1 ; *Thraustochytrium* sp.  
 ATCC 26185 ; *Thraustochytrium* sp. BL13 ; *Thraustochytrium* sp. BL14 ;  
*Thraustochytrium* sp. BL2 ; *Thraustochytrium* sp. BL3 ; *Thraustochytrium* sp. BL4 ;  
*Thraustochytrium* sp. BL5 ; *Thraustochytrium* sp. BL6 ; *Thraustochytrium* sp. BL7 ;

*Thraustochytrium sp.* BL8 ; *Thraustochytrium sp.* BL9 ; *Thraustochytrium sp.*  
 BP3.2.2 ; *Thraustochytrium sp.* BP3.3.3 ; *Thraustochytrium sp.* caudivorum ;  
*Thraustochytrium sp.* CHN-1 ; *Thraustochytrium sp.* FJN-10 ; *Thraustochytrium sp.*  
 HK1 ; *Thraustochytrium sp.* HK10 ; *Thraustochytrium sp.* HK5 ; *Thraustochytrium*  
 5 *sp.* HK8 ; *Thraustochytrium sp.* HK8a ; *Thraustochytrium sp.* KK17-3 ;  
*Thraustochytrium sp.* KL1 ; *Thraustochytrium sp.* KL2 ; *Thraustochytrium sp.* KL2a  
 ; *Thraustochytrium sp.* ONC-T18 ; *Thraustochytrium sp.* PJA10.2 ;  
*Thraustochytrium sp.* TR1.4 ; *Thraustochytrium sp.* TRR2 ; *Thraustochytrium*  
*striatum* ; *Thraustochytrium striatum* ATCC24473 ; *Thraustochytrium striatum*  
 10 DQ323163 ; *Thraustochytrium striatum* DQ356665 ; *Thraustochytrium visurgense* ;  
*Ulkenia amoeboidea* SEK 214 ; *Ulkenia profunda* ; *Ulkenia profunda* BUTRBG 111  
 ; *Ulkenia sp.* ; *Ulkenia sp.* ATCC 28207 ; *Ulkenia visurgensis* ; *Ulkenia visurgensis*  
 BURAAA 141 ; *Ulkenia visurgensis* ATCC 28208.

Préférentiellement selon l'invention, les Thraustochytrides peuvent être choisis  
 15 parmi les genres *Aurantiochytrium* et *Schizochytrium*, préférentiellement parmi les  
 espèces *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/2 ; *Aurantiochytrium mangrovei*  
 CCAP 4062/3 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/4 ; *Aurantiochytrium*  
*mangrovei* CCAP 4062/5 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/6 ;  
*Aurantiochytrium* CCAP 4062/1 ; *Schizochytrium sp.* CCAP 4087/3 ;  
 20 *Schizochytrium sp.* CCAP 4087/1 ; *Schizochytrium sp.* CCAP 4087/4 ;  
*Schizochytrium sp.* CCAP 4087/5.

Selon des modes de réalisation préférés de l'invention, la biomasse peut avoir  
 une teneur en protéines, en poids par rapport au poids de la matière sèche, d'au  
 moins 30%, de préférence d'au moins 40%, très préférentiellement de 35% à  
 25 55%. Selon des modes de réalisation préférés de l'invention la biomasse peut  
 avoir une teneur en protéines, en poids par rapport au poids de la matière sèche  
 comprise entre 35% et 65%.

Selon des modes de réalisation préférés de l'invention, la biomasse peut avoir  
 une teneur en matière grasse, en poids par rapport au poids de la matière sèche,  
 30 d'au moins 20%, préférentiellement d'au moins 30%, dont 25% à 60%, de  
 préférence, 40% à 60% de PUFAs. En particulier, le rapport DHA : protéines (en  
 poids par rapport au poids de la matière sèche) peut être compris entre 1 : 1,5 et  
 1 : 9, de préférence entre 1 : 2 et 1 : 7, plus préférentiellement entre 1 : 5 et 1 : 6.

Selon certains des modes de réalisation préférés de l'invention, la biomasse peut avoir éventuellement une teneur en caroténoïdes, comprise entre 5 et 250 ppm par rapport au poids de la matière sèche, de préférence entre 150 et 200 ppm. La teneur en caroténoïdes peut dépendre des conditions d'éclairage mais aussi du milieu de culture et de la conduite du procédé. Par conséquent, une même souche de micro-algue peut produire des quantités de pigments différentes en fonction des conditions de culture.

Selon des modes de réalisation préférés de l'invention, ladite biomasse peut être une biomasse :

- 10 - de Thraustochytrides pouvant être choisis parmi les genres *Aurantiochytrium* et *Schizochytrium*, préférentiellement parmi les espèces *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/2 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/3 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/4 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/5 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/6 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/1 ; *Schizochytrium sp.* CCAP 4087/3 ; *Schizochytrium sp.* CCAP 4087/1 ; *Schizochytrium sp.* CCAP 4087/4 ; *Schizochytrium sp.* CCAP 4087/5 ; et pouvant présenter :
  - une teneur en protéines, en poids par rapport au poids de la matière sèche, d'au moins 30%, de préférence d'au moins 40%, très préférentiellement de 35% à 20 55%, ou 45% à 55% ;
  - une teneur en matière grasse, en poids par rapport au poids de la matière sèche, d'au moins 20%, préférentiellement d'au moins 30%, dont 25 à 60%, de préférence, 40 à 60% de PUFAs ;
  - éventuellement une teneur en caroténoïdes, comprise entre 5 et 250 ppm par rapport au poids de la matière sèche, de préférence entre 150 et 200 ppm ; et
  - un taux d'humidité avant séchage compris entre 70% et 90%, préférentiellement entre 80% et 85% ou un taux d'humidité après séchage compris entre 1% et 10%, préférentiellement entre 2% et 7%.

Les teneurs et types de caroténoïdes obtenus peuvent être contrôlés par le choix de la longueur d'onde de la lumière incidente, ainsi que par les conditions d'illumination. Les caroténoïdes tels que la lutéine, la fucoxanthine, l'astaxanthine, la zéaxanthine, la canthaxanthine, l'échinénone, le bêta-carotène et la phoenicoxanthine peuvent être produits selon des modes de réalisation de

l'invention. Pour induire la production des caroténoïdes choisis parmi l'astaxanthine, la canthaxanthine, le bêta-carotène et la phoenicoxanthine, la culture est exposée à une lumière bleue (environ 435-475 nm, de préférence 455 nm). Selon un mode de réalisation, les caroténoïdes peuvent avoir une teneur par rapport à la matière grasse en astaxanthine entre 5% et 30%, une teneur en phoenicoxanthine entre 15% et 30% et une teneur en bêta-carotènes entre 0% et 30%.

L'invention a aussi pour objet un procédé de production d'une biomasse telle que décrite précédemment qui comprend :

10 a. une première étape de culture en hétérotrophie ou en mixotrophie des Thraustochytrides dans un milieu de culture approprié, à une température comprise entre environ 24°C et 35°C et dans des conditions pouvant favoriser la production de protéines à une teneur d'au moins 35% de protéines en poids par rapport au poids de la matière sèche en conditions ;

15 b. une deuxième étape de culture en hétérotrophie ou en mixotrophie à une température entre environ 18°C et 25°C et inférieure à celle de l'étape a) dans des conditions pouvant favoriser l'accumulation de matière grasse jusqu'à au moins 20%, de préférence au moins 30%, et pouvant favoriser l'accumulation des acides gras polyinsaturés (PUFAs), de préférence du DHA, et/ou de l'EPA, et/ou de  
20 l'ARA, au sein de la matière grasse jusqu'à au moins 25%, de préférence au moins 35% de la matière grasse, et éventuellement favorisant la production des caroténoïdes, jusqu'à l'obtention d'une densité de culture d'au moins 40 g/L en matière sèche, préférentiellement au moins 60 g/L, plus préférentiellement au moins 80 g/L ;

25 c. une troisième étape de récupération de la biomasse obtenue à la deuxième étape par séparation de ladite biomasse du milieu de culture (la récolte) ; et, le cas échéant

d. une quatrième étape de séchage de la biomasse récupérée à la troisième étape.

30 De manière préférentielle, l'étape a) de culture des Thraustochytrides peut être mise en œuvre dans un milieu de culture et dans des conditions appropriées pour favoriser la production de protéines.

De manière générale, ledit milieu de culture approprié peut être un milieu de culture connu de l'homme de métier pour la culture des Thraustochytrides, en l'adaptant pour les cellules qui ne se trouvent pas en carence d'azote durant l'étape a). On peut citer en tant qu'exemple les milieux à base de sels marins complémentés avec une source de carbone. On peut citer par exemple le milieu de type Verduyn modifié (sels marins 15 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/L,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  24 mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3 mg/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3 mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,04 mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg/L, pantothénate 3,2 mg/L, hydrochlorure de thiamine 9,5 mg/L, vitamine B12 0,15 mg/L). On peut également citer des milieux de culture de type, ATCC790 MB2216 ou F/2.

Selon un mode de réalisation de l'invention, ledit milieu de culture approprié peut être, de préférence, un milieu de culture chimiquement défini qui peut comprendre une source de carbone, une source d'azote, une source de phosphore et des sels.

Par "milieu de culture chimiquement défini", on entend selon l'invention un milieu de culture dans lequel la teneur de chaque élément est connue. Précisément, l'invention vise un milieu pouvant ne pas comporter de matières organiques riches ou complexes. Par matières organiques riches ou complexes, on entend des matières organiques non purifiées, se présentant sous la forme de mélanges pour lesquels la composition exacte et les concentrations des divers composants du mélange ne sont pas connues avec exactitude, pas maîtrisées, et peuvent présenter une variabilité significative d'un lot à un autre. Comme exemple de matière organique riche ou complexe, on peut citer les extraits de levure ou les peptones qui sont des produits d'une réaction d'hydrolyse de protéines ou encore les matières minérales riches comme par exemple les sels minéraux marins ou autres agents de croissance complexes, n'ayant pas de concentration fixe de chacun de leurs composants.

Selon l'invention, ledit milieu défini peut comprendre des sels choisis parmi les sels de calcium, de cobalt, de manganèse, de magnésium, de zinc, de nickel, de cuivre, de potassium, de fer, de sodium, et leurs mélanges.

Avantageusement, lesdits sels peuvent être choisis parmi le chlorure de calcium, le chlorure de cobalt, le chlorure de manganèse, le sulfate de magnésium, le sulfate de zinc, le sulfate de nickel, le sulfate de cuivre, le sulfate

de potassium, le sulfate ferreux, le sulfate de potassium, le molybdate de sodium, le sélénite de sodium, le chlorure de sodium et leurs mélanges.

Selon un mode de réalisation de l'invention et selon les souches employées, le milieu peut également comprendre du chlorure de sodium (NaCl), notamment pour  
5 certaines souches d'origine marine.

Selon ce mode de réalisation, on peut citer à titre d'exemple de souches marines pouvant admettre un milieu de culture pouvant comprendre du chlorure de sodium, les souches de *Schizochytrium sp.*, en particulier *Schizochytrium sp.* CCAP 4062/3 et CCAP4087/4.

10 Selon un autre mode de réalisation de l'invention et selon les souches employées, le milieu peut ne pas comprendre du chlorure de sodium (NaCl), à tout le moins comprendre une quantité de chlorure de sodium très faible, ayant moins de 3,5 g/L, de préférence moins de 1 g/L, plus préférentiellement moins de 10 mg/L d'ions de sodium et moins de 1 g/L, de préférence moins de 500 mg/L,  
15 plus préférentiellement 200 mg/L d'ions de chlorure.

Selon ce mode de réalisation, on peut citer à titre d'exemple de souches pouvant admettre un milieu de culture pouvant ne pas comprendre du chlorure de sodium (NaCl), à tout le moins comprendre une quantité de chlorure de sodium très faible, les souches d'*Aurantiochytrium mangrovei*, en particulier les souches  
20 *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/4 et CCAP 4062/1.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la source de carbone dudit milieu défini peut être un (ou des) glucide(s), un (ou des) acétate(s), un ou des alcools, une ou des molécules complexes, ou tout mélange, en toute proportion d'au moins deux de ces sources.

25 Par tout mélange, en toute proportion d'au moins deux de ces sources, on entend au moins l'un des mélanges suivants, en toute proportion : un (ou des) glucide(s) et un (ou des) acétate(s), un (ou des) glucide(s) et un (ou des) alcool(s), un (ou des) glucide(s) et une (ou des) molécule(s) complexe(s), un (ou des) acétate(s) et un (ou des) alcool(s), un (ou des) acétate(s) et une (ou des)  
30 molécule(s) complexe(s) et un (ou des) alcool(s) et une (ou des) molécule(s) complexe(s), un (ou des) glucide(s) et un (ou des) acétate(s) et un (ou des) alcool(s), un (ou des) glucide(s) et un (ou des) acétate(s) et une (ou des)

molécule(s) complexe(s), un (ou des) glucide(s) et un (ou des) acétate(s) et un (ou des) alcool(s) et une (ou des) molécule(s) complexe(s).

Selon l'invention, ladite source d'azote dudit milieu défini peut-être choisie parmi un (ou des) sel(s) de nitrate, un (ou des) sel(s) de glutamate, un (ou des) sel(s) d'ammonium, l'urée, l'ammoniaque ou tout mélange, en toute proportion d'au moins deux de ces sources.

Par tout mélange, en toute proportion d'au moins deux de ces sources, on entend au moins l'un des mélanges suivants, en toute proportion : un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) de glutamate et un (ou des) sel(s) d'ammonium et de l'urée et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) de glutamate et un (ou des) sel(s) d'ammonium et de l'urée ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) de glutamate et un (ou des) sel(s) d'ammonium et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) de glutamate et de l'urée et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) d'ammonium et de l'urée et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) de glutamate et un (ou des) sel(s) d'ammonium ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) de glutamate et de l'urée ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) de glutamate et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) d'ammonium et de l'urée ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) d'ammonium et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) de nitrate et de l'urée et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) de glutamate et un (ou des) sel(s) d'ammonium et de l'urée et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) de glutamate et un (ou des) sel(s) d'ammonium et de l'urée ; un (ou des) sel(s) de glutamate et un (ou des) sel(s) d'ammonium et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) de glutamate et de l'urée et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) d'ammonium et de l'urée et de l'ammoniaque ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) de glutamate ; un (ou des) sel(s) de nitrate et un (ou des) sel(s) d'ammonium ; un (ou des) sel(s) de nitrate et de l'urée ;

Selon un mode de réalisation de l'invention, la source de phosphore dudit milieu défini peut être choisie parmi l'acide phosphorique, les sels de phosphate, avantageusement de l'hydrogénophosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), ou du dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), ou du dihydrogénophosphate de



de l'acide phosphorique et de l'hydrogénophosphate de sodium ; de l'acide phosphorique et du dihydrogénophosphate de sodium ; de l'acide phosphorique et du dihydrogénophosphate de potassium ; de l'acide phosphorique et de l'hydrogénophosphate de potassium ; de l'hydrogénophosphate de sodium et du dihydrogénophosphate de sodium ; de l'hydrogénophosphate de sodium et du dihydrogénophosphate de potassium ; de l'hydrogénophosphate de sodium et de l'hydrogénophosphate de potassium ; du dihydrogénophosphate de sodium et du dihydrogénophosphate de potassium ; du dihydrogénophosphate de sodium et de l'hydrogénophosphate de potassium ; du dihydrogénophosphate de potassium et de l'hydrogénophosphate de potassium.

Selon un mode de réalisation de l'invention, ledit milieu de culture pourra comprendre du chlorure de magnésium, avantageusement sous forme de tétrahydrate ( $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) ; du chlorure de calcium, avantageusement sous forme de dihydrate ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ; du chlorure de cobalt hexahydrate ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ; du chlorure de manganèse (II) tétrahydrate ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) ; du sulfate de magnésium heptahydrate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ; du sulfate de zinc heptahydrate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ; du sulfate de nickel hexahydrate ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ; du sulfate de cuivre pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ; du sulfate de potassium ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) ; du sulfate ferreux heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ; de l'acide borique ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) ; de l'acide éthylène diamine tétraacétique sous forme disodique dihydrate ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ; du molybdate de sodium dihydrate, ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ; du sélénite de sodium, ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) ; à titre de vitamine de la thiamine, de la cobalamine ou vitamine B12, du panthoténate ou vitamine B5 ; une source de carbone ; une source d'azote ; une source de phosphore.

Selon une forme préférée de l'invention, dans ledit milieu de culture le chlorure de magnésium peut être à une concentration comprise entre 0,008 et 0,012 g/L, avantageusement entre 0,009 et 0,011 g/L ; le chlorure de calcium peut être à une concentration comprise entre 0,40 et 0,70 g/L, avantageusement entre 0,50 et 0,60 g/L ; le chlorure de cobalt hexahydrate peut être à une concentration comprise entre 0,00008 et 0,00013 g/L, avantageusement entre 0,00009 et 0,00012 g/L ; le chlorure de manganèse (II) tétrahydrate peut être à une concentration comprise entre 0,008 et 0,013, avantageusement entre 0,009 et 0,012 g/L ; le sulfate de magnésium heptahydrate peut être à une concentration

comprise entre 6 et 10 g/L, avantageusement entre 7 et 9 g/L ; le sulfate de zinc heptahydrate peut être à une concentration comprise entre 0,008 et 0,013, avantageusement 0,009 et 0,012 g/L ; le sulfate de nickel hexahydrate peut être à une concentration comprise entre 0,004 et 0,007 g/L, avantageusement 0,005 et 0,006 g/L ; le sulfate de cuivre pentahydrate peut être à une concentration comprise entre 0,005 et 0,009 g/L, avantageusement entre 0,006 et 0,008 g/L ; le sulfate de potassium peut être à une concentration comprise entre 0,5 et 3,5 g/L, avantageusement entre 1 et 3 g/L ; le sulfate ferreux heptahydrate peut être à une concentration comprise entre 0,03 et 0,05 g/L, avantageusement entre 0,035 et 0,045 g/L ; l'acide borique peut être à une concentration comprise entre 0,0155 et 0,0195 g/L, avantageusement entre 0,0165 et 0,0185 g/L ; l'acide éthylène diamine tétraacétique sous forme disodique dihydrate peut être à une concentration comprise entre 0,10 et 0,14 g/L, avantageusement entre 0,11 et 0,13 g/L ; le molybdate de sodium dihydrate peut être à une concentration comprise entre 0,00001 et 0,0003 g/L, avantageusement entre 0,00005 et 0,0002 g/L ; le sélénite de sodium peut être à une concentration comprise entre 0,00000015 et 0,000019 g/L, avantageusement entre 0,00000016 et 0,00000018 g/L ; la thiamine peut être à une concentration comprise entre 0,015 et 0,05 g/L, avantageusement entre 0,025 et 0,04 g/L ; la cobalamine ou vitamine B12 peut être à une concentration comprise entre 0,0004 et 0,00065 g/L, avantageusement entre 0,00045 et 0,00060 g/L ; le panthoténate ou vitamine B5 peut être à une concentration comprise entre 0,008 et 0,013, avantageusement entre 0,009 et 0,012 g/L ; la source de carbone peut être à une concentration comprise entre 45 et 65 g/L, avantageusement entre 50 et 60 g/L ; la source d'azote peut être à une concentration comprise entre 7 et 11 g/L, avantageusement entre 8 et 10 g/L ; la source de phosphore peut être à une concentration comprise entre 2 et 6 g/L, avantageusement entre 3 et 5 g/L.

Très préférentiellement selon l'invention, dans ledit milieu de culture le chlorure de magnésium est à une concentration de 0,0108 g/L, le chlorure de calcium est à une concentration de 0,55 g/L ; le chlorure de cobalt hexahydrate ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) est à une concentration de 0,000108 g/L ; le chlorure de manganèse (II) tétrahydrate est à une concentration de 0,0108 g/L ; le sulfate de magnésium heptahydrate est à une concentration de 8,01 g/L ; le sulfate de zinc heptahydrate

est à une concentration de 0,0108 g/L ; le sulfate de nickel hexahydrate est à une concentration de 0,0056 g/L ; le sulfate de cuivre pentahydrate est à une concentration de 0,0072 g/L ; le sulfate de potassium est à une concentration de 2,09 g/L ; le sulfate ferreux heptahydrate est à une concentration de 0,04 g/L ;  
5 l'acide borique est à une concentration comprise entre 0,0155 et 0,0195 g/L de 0,0175g/L ; l'acide éthylène diamine tétraacétique sous forme disodique dihydrate est à une concentration de 0,12 g/L ; le molybdate de sodium dihydrate, est à une concentration de 0,000108 g/L ; le sélénite de sodium, est à une concentration de 0,000000173 g/L ; la thiamine est à une concentration de 0,032 g/L ; la  
10 cobalamine ou vitamine B12 est à une concentration de 0,00052 g/L ; le panthoténate ou vitamine B5 est à une concentration de 0,0108 g/L ; la source de carbone est à une concentration de 55 g/L ; la source d'azote est à une concentration de 9 g/L ; la source de phosphore est à une concentration de 4 g/L.

Selon l'invention, la première étape a) de culture du procédé peut être réalisée  
15 en mode discontinu dit "batch", en mode semi-continu dit "fed batch" ou en mode d'alimentation continu.

Selon un mode de réalisation de l'invention, lorsque le procédé est mis en œuvre en mode "fed batch", il peut comprendre une première étape divisée en deux sous-étapes, une première sous-étape a1) de croissance dans le milieu de  
20 culture approprié jusqu'à l'obtention d'une densité de culture d'au moins 20 g/L, préférentiellement au moins 40 g/L, plus préférentiellement au moins 60 g/L, encore plus préférentiellement au moins 80 g/L, suivie d'une deuxième sous-étape a2) de production de protéine dans laquelle on peut ajouter au milieu de culture, simultanément ou successivement, une ou plusieurs solution(s) d'enrichissement  
25 en source de carbone, en source d'azote et en source de phosphore, de manière à maintenir dans le milieu de culture une teneur en source de carbone comprise entre 5 et 200 g/L, préférentiellement entre 10 et 50 g/L, une teneur en source d'azote comprise entre 0,5 et 5 g/L, préférentiellement entre 0,5 et 2 g/L et une teneur en source de phosphore comprise entre 0,5 et 5 g/L, préférentiellement 0,5  
30 et 2 g/L. De manière générale, les sous étapes a1) et a2) sont effectuées à une température entre 24 et 35°C, de préférence entre 25 et 30°C.

La deuxième étape du procédé b) commence en général à partir d'environ 24h après le début de la culture. Elle est en général effectuée à une température entre

18 et 25°C. Cette baisse en température oriente la production vers des acides gras polyinsaturés de longues chaînes (PUFAs), notamment de DHA, ARA, et EPA, au lieu des protéines. Le profil d'acide(s) gras produit(s) dépend, généralement, de la souche mise en culture.

5 Pendant l'étape b) de manière générale, comme on fait pour l'étape a2), on peut ajouter au milieu de culture, simultanément ou successivement, une ou plusieurs solution(s) d'enrichissement en source de carbone, et/ou en source d'azote et/ou en source de phosphore, de manière à maintenir dans le milieu de culture une teneur en source de carbone comprise entre 5 et 200 g/L,  
10 préférentiellement entre 10 et 50 g/L, une teneur en source d'azote comprise entre 0,5 et 5 g/L, préférentiellement entre 0,5 et 2 g/L et une teneur en source de phosphore comprise entre 0,5 et 5 g/L, préférentiellement 0,5 et 2 g/L.

La culture est arrêtée, de manière générale, entre 50 et 70 heures après le début de la culture.

15 On peut éventuellement induire la production des caroténoïdes pendant la culture, de préférence, pendant l'étape b) mais on peut le faire pendant la durée de la culture aussi. Pour induire la production des caroténoïdes, des conditions mixotrophiques avec une lumière, de préférence, bleue à environ 435-475 nm, de préférence 455 nm, sont appliquées. La culture est ainsi en mode mixotrophe. Des  
20 caroténoïdes tels que l'astaxanthine, la canthaxanthine, des bêta-carotènes et la phoenicoxanthine, sont produits avec ces longueurs d'onde. La lumière est de manière générale appliquée pour au moins 18 heures, de préférence pour au moins 24 heures. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la lumière est appliquée à la culture à partir de 24 à 50 heures, plus préférentiellement, à  
25 partir de 45 heures de culture. Cet éclairage se poursuit, de manière générale, de préférence, jusqu'à la fin de la culture. Il est aussi possible d'arrêter l'éclairage peu de temps avant la fin de la culture (par exemple, un quart d'heure, un demi-heure, trois quarts heures ou une heure avant la fin).

Selon certains modes de réalisation de l'invention la culture est exposée à la  
30 lumière, en général, pour au moins 18 heures, de préférence au moins 24 heures avant la fin de la culture. Selon un mode de réalisation de l'invention, la culture est éclairée dès le départ, c'est-à-dire pendant les étapes a) et b) de culture. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la culture est éclairée à partir du

moment où l'étape b) commence. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la culture est éclairée pendant au moins les dernières 18 heures de culture, de préférence pendant au moins les dernières 24 heures de culture.

On peut utiliser la lumière blanche, mais les inventeurs ont constaté des teneurs en caroténoïdes plus élevées en utilisant la lumière bleue, à une longueur d'onde d'environ 435-475 nm, de préférence 455 nm. En général, la culture est exposée à la lumière à partir de 40 à 50 heures de culture (c'est-à-dire, à partir de 40 à 50 heures après le début de la de culture), de préférence, à partir de 45 heures de culture et jusqu'à la fin de la culture (entre 50 et 70 heures). Dans ces conditions, on obtient une teneur en caroténoïdes d'environ 150-250 ppm (ng/mg), de préférence 180 à 200 ppm (matière sèche). Selon un mode de réalisation, des caroténoïdes ont une teneur en astaxanthine entre 5 et 30%. Selon un mode de réalisation, des caroténoïdes ont une teneur en phoenicoxanthine entre 15 et 30%. Selon un mode de réalisation, des caroténoïdes ont une teneur en bêta-carotènes entre 0 et 30%.

De manière générale, les étapes a) et b) du procédé peuvent être effectuées en conditions hétérotrophiques et/ou en conditions mixotrophiques. Pour obtenir des caroténoïdes, dans l'étape b) la culture est effectuée en mixotrophie pour au moins 24 heures avant la fin de la culture.

Selon un mode de l'invention, par exemple quand on ne produit pas de caroténoïdes, la culture est menée entièrement en conditions d'hétérotrophie. En général, l'utilisation des conditions de mixotrophie lors de la culture a un effet positif sur la production des lipides, notamment des PUFAs, ainsi que sur la production des caroténoïdes, et permet d'augmenter le rendement en biomasse, en acides gras, notamment en PUFAs, en particulier en DHA et en caroténoïdes.

Des étapes a1), a2) et b) peuvent être effectuées indépendamment en conditions d'hétérotrophie ou en conditions de mixotrophie. Selon un mode de réalisation de l'invention, les étapes a1) et a2) sont menées en conditions d'hétérotrophie, puis l'étape b), entièrement ou en partie, en conditions de mixotrophie. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'étape a1) est menée en conditions d'hétérotrophie et l'étape a2) en conditions de mixotrophie.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, pendant l'étape b) la culture est exposée, en conditions de mixotrophie, à une lumière blanche. Selon un autre

mode de réalisation de l'invention, pendant l'étape b) la culture est exposée, en conditions de mixotrophie, à une lumière blanche, jusqu'à 40 à 50, de préférence 45 heures de culture, puis la culture est exposée à une lumière bleue avec une longueur d'onde d'environ 435-475 nm, de préférence 455 nm pour au moins 24 heures.

Selon un mode de réalisation de l'invention, dans la mise en œuvre d'une culture en mode mixotrophe, l'éclairement est variable et/ou discontinu. Un éclairage sous formes de flashes est particulièrement favorable sur le développement des protistes et permet d'accroître la productivité de ceux-ci, notamment en ce qui concerne leur production de lipides et de caroténoïdes.

Par "éclairage discontinu", il faut entendre un éclairage ponctué par des périodes d'obscurité. Les périodes d'obscurité peuvent occuper plus d'un quart du temps, de préférence la moitié du temps ou plus, durant lequel les algues sont cultivées.

Selon un aspect préféré de l'invention, l'éclairement est discontinu et plus préférentiellement sous forme de flashes. Un flash, au sens de l'invention, est un éclairage lumineux de courte durée, c'est-à-dire de moins de 30 minutes. La durée peut être de moins de 15 minutes, de préférence de moins de 5 minutes ou plus préférentiellement encore de moins de 1 minute. Selon certains modes de réalisation de l'invention, la durée du flash peut être de moins d'une seconde. Par exemple, le durée du flash peut être 1/10 d'une seconde, ou 2/10 d'une seconde, ou 3/10 d'une seconde, ou 4/10 d'une seconde, ou 5/10 d'une seconde, ou 6/10 d'une seconde, ou 7/10 d'une seconde, ou 8/10 d'une seconde, ou 9/10 d'une seconde. L'éclairage lumineux, ou le flash, est généralement d'une durée supérieure à 15 secondes. Elle est généralement comprise entre 5 secondes et 10 minutes, de préférence entre 10 secondes et 2 minutes, plus préférentiellement entre 20 secondes et 1 minute. Ces durées de flash sont appropriées pour des apports de lumière de "basse fréquence".

Selon ce dernier mode de réalisation où le régime d'illumination (l'apport de la lumière) est de "basse fréquence", le nombre de flashes peut être compris entre environ 2 et 3600 par heure. Il peut être, par exemple, compris entre 100 et 3600 flashes par heure. Il peut être également compris entre 120 et 3000, ou entre 400 et 2500, ou entre 600 et 2000, ou entre 800 et 1500 flashes par heure. Il peut être

également compris entre 2 et 200, préférentiellement entre 10 et 150, plus préférentiellement entre 15 et 100, et plus préférentiellement encore entre 20 et 50 par heure.

Selon un mode de réalisation, un flash peut avoir une durée entre 1/150000  
5 seconde et 1/1000 seconde. Ces durées de flash sont appropriées pour des régimes d'illumination de "haute fréquence" ; c'est-à-dire avec des fréquences de flash de 150kHz à 1kHz respectivement.

Selon ce mode de réalisation où le régime d'illumination (l'apport de la  
lumière) est de "haute fréquence", les flashes peuvent avoir lieu entre  $3,6 \times 10^5$  et  
10  $5,4 \times 10^9$  fois par heure. Dans ce cas, la variation de la lumière a une fréquence  
entre 1 kHz et 150 kHz, c'est-à-dire entre 1000 et 150 000 flashes par seconde.  
L'apport de lumière selon ce dernier mode de réalisation de l'invention est nommé  
"haute fréquence".

Le nombre de flashes par heure peut être choisi en fonction de l'intensité et de  
15 la durée des flashes (voir ci-dessous). En général, l'intensité de la lumière apportée  
sous forme de flashes peut être comprise entre 5 et 1000  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , de  
préférence entre 5 et 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , ou 50 et 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , et plus  
préférentiellement entre 150 et 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  correspond à  
1 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (Einstein), unité souvent utilisée dans la littérature.

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

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, des conditions de  
mixotrophie à dominante hétérotrophe sont utilisées. Les thraustochytrides ne  
possèdent pas de chloroplastes. Par conséquent, la majorité de l'énergie utilisée  
pour la croissance vient de la source de carbone du milieu de culture. Dans ce  
30 cas, la lumière induit certaines voies métaboliques dans la cellule mais ne permet  
pas de fixer le carbone par la photosynthèse.

Selon un mode de réalisation préféré, l'éclairage des cultures peut être  
assuré par un dispositif d'illumination interne au fermenteur. Ainsi, l'efficacité de

l'illumination est meilleure par rapport à une configuration où la lumière pénètre par des hublots à partir de sources disposées à l'extérieur. Les dispositifs d'illumination peuvent être disposés sur l'ensemble tournant muni de pales ou sur des pièces tubulaires plongeant dans la masse à traiter, ou encore au fond ou au  
5 plafond de la cuve. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le dispositif d'illumination peut être situé sur les contre-pales à l'intérieur du fermenteur. Un tel dispositif est décrit dans la demande de brevet français Ne°1353641. Le fermenteur peut être ainsi muni d'une pluralité de sources d'illumination portées par des contre-pales, ces dernières ayant pour fonction  
10 d'empêcher la formation d'un vortex au sein de la biomasse sous l'action de l'ensemble tournant de brassage. Ces sources d'illumination sont de préférence encapsulées, partiellement ou complètement dans au moins une partie de ces contre pales, dans une matière compatible avec la biomasse et en une épaisseur permettant de diffuser ladite lumière vers l'intérieur de la cuve.

15 Selon l'invention, la culture peut être réalisée par toute technique de culture connue, par exemple en fioles ou en réacteur, mais aussi en fermenteurs ou encore dans tout contenant apte à la croissance de protistes, particulièrement de Thraustochytrides, comme par exemple des bassins de type "raceway", à condition que ladite technique permette de mettre en œuvre les conditions de  
20 culture requises.

De manière préférentielle, la culture peut être réalisée en fermenteurs selon les méthodes connues de culture des protistes en fermenteurs.

25 Selon l'invention, la troisième étape c) du procédé permettant la récupération de ladite biomasse peut être réalisée dans des conditions appropriées pour obtenir une biomasse pouvant présenter le taux d'humidité recherché.

Ladite récupération des protistes peut être réalisée par toute technique permettant la récupération de la biomasse, notamment les méthodes de filtration, gravimétrique ou sous pression réduite, de centrifugation, de décantation, ou bien encore des méthodes de précipitation suivie d'une filtration gravimétrique.

30 L'invention a aussi pour objet une biomasse susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention tel que décrit précédemment dans toutes ses variantes.

L'invention a encore pour objet l'utilisation d'une biomasse telle que décrite précédemment dans les domaines cosmétiques, pharmaceutiques, alimentaires (alimentation humaine ou animale).

On pourra distinguer dans l'alimentation animale, l'alimentation des animaux d'élevage, en particulier en élevage industriel et celle des animaux domestiques ou encore des animaux de compagnie ou des animaux dits de "loisir", comme les poissons d'aquarium ou les oiseaux de volière ou en cage.

Par "animal d'élevage" on entend notamment les animaux de pacage (notamment les bovins élevés pour la viande, le lait, le fromage et le cuir ; les ovins élevés pour la viande, la laine et le fromage ; les caprins), les porcins, les lapins, les volailles (les poulets, les poules, les dindes, les canards, les oies et autres), les équidés (poneys, chevaux, poulains), destinés à supporter des activités humaines (transport, loisirs) ou leur alimentation, les animaux aquatiques (par exemple les poissons, les crevettes, les huîtres et les moules). On pourra toutefois distinguer l'alimentation des poissons jusqu'au stade d'alevins, et celle des poissons élevés, y compris les aliments et compositions alimentaires qui leur sont destinées.

On les distinguera des animaux domestiques, animaux de compagnie ou animaux de loisir. Ils comprennent également des mammifères, ruminants ou non, des oiseaux ou des poissons. Ils comprennent en particulier les chiens et les chats.

L'invention a aussi pour objet un aliment, ou composition alimentaire, pour l'homme ou les animaux, pouvant comprendre une biomasse selon l'invention telle que décrite précédemment. On entend par "aliment" toute composition qui peut servir à la nourriture de l'homme ou des animaux, en particulier les animaux d'élevage.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'aliment peut être constitué de la biomasse, séchée ou non, transformée ou non, ou de la biomasse, séchée ou non, transformée ou non, mélangée à tout autre additif, véhicule ou support, utilisé dans le domaine de l'alimentation humaine ou animale. On peut citer comme exemple en tant qu'additifs les conservateurs alimentaires, les colorants, les exhausteurs de goût, les régulateurs du pH, les charges, les agents épaississants, texturants ou les agents liants. On peut également citer des vitamines, des

probiotiques et des prébiotiques, ou encore des additifs pharmaceutiques comme par exemple des hormones de croissance, des antibiotiques.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la biomasse, séchée ou non, transformée ou non, peut être utilisée elle-même en tant que véhicule ou support, additif, conservateur alimentaire, colorant, exhausteur de goût, charge, agent épaisissant, texturant ou agent liant dans un produit destiné à l'alimentation humaine ou animale.

La présente invention concerne en particulier des aliments pour animaux et plus particulièrement pour les animaux d'élevage. Ces aliments peuvent se présenter habituellement sous la forme de mélanges simples, de farines, de granulés, de soupe ou de fourrages (fourrage frais, ensilages, foin...) dans lesquels peut être incorporée la biomasse selon l'invention. Ces aliments peuvent être réalisés par l'éleveur lui-même ou fabriqués chez un professionnel de l'alimentation animale. On entend par "aliment" tout ce qui peut servir à la nourriture des animaux.

Pour l'élevage intensif des animaux, les aliments peuvent comprendre, en plus de la biomasse algale, une base nutritionnelle et des additifs nutritionnels. L'essentiel de la ration alimentaire de l'animal peut être alors constituée par la "base nutritionnelle" et la biomasse algale. Cette base peut être constituée à titre d'exemple par un mélange de céréales, de protéines et de matières grasses d'origine animale et/ou végétale.

Les bases nutritionnelles pour animaux sont adaptées à l'alimentation de ces animaux et sont bien connues de l'homme du métier. Dans le cadre de la présente invention, ces bases nutritionnelles peuvent comprendre par exemple de la farine de poisson, des dérivés du maïs, du blé, des pois et du soja et autres graines. Ces bases nutritionnelles peuvent être adaptées aux besoins des différentes espèces animales auxquelles elles sont destinées. Ces bases nutritionnelles peuvent déjà contenir des additifs nutritionnels comme des vitamines, des sels minéraux et des acides aminés.

Les additifs utilisés en alimentation animale peuvent être ajoutés à la base nutritionnelle ou à la biomasse algale. Ces additifs peuvent être ajoutés pour améliorer certaines caractéristiques des aliments, par exemple pour en relever le goût, pour rendre plus digestes les matières premières des aliments pour

animaux, conserver plus efficacement les aliments ou protéger les animaux. Ils sont fréquemment utilisés dans les élevages intensifs de grande envergure.

Les additifs pouvant être utilisés en alimentation animale se déclinent, notamment, dans les sous-catégories suivantes (source EFSA) :

- 5       - additifs technologiques : par exemple, conservateurs, antioxydants, émulsifiants, stabilisateurs, régulateurs d'acidité et additifs pour l'ensilage ;
  - additifs sensoriels : par exemple, arômes, colorants,
  - additifs nutritionnels : par exemple, vitamines, acides aminés, oligo-éléments ;
- 10      - additifs zootechniques : par exemple, améliorateurs de digestibilité, stabilisateurs de flore intestinale, tels que des probiotiques et prébiotiques ;
  - coccidiostatiques et histomonostatiques (antiparasitaires).

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne des aliments pour animaux d'élevage pouvant comprendre entre 1% et 60%, de préférence entre 1 et 20%, de  
15 façon tout à fait préférentielle entre 3% et 8% d'une biomasse séchée ou obtenue par le procédé selon l'invention.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne des aliments pour animaux d'élevage pouvant comprendre entre 1% et 40%, de préférence entre 5 et 10% d'une biomasse non séchée obtenue par le procédé de l'invention.

20       Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'aliment peut être destiné aux animaux d'élevage, en particulier les bovins, les ovins, les porcins, les lapins, les volailles et les équidés.

25       Selon un autre mode particulier de l'invention, l'aliment peut être destiné aux animaux aquatiques, en particulier aux poissons, au moins jusqu'au stade alevins, voire y compris les poissons d'élevage. L'utilisation d'une biomasse riche en protéines et PUFAs et comprenant des pigments en fin de phase de croissance permet d'améliorer la qualité de la chair (grâce à la présence des PUFAs et des pigments).

30       Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, l'aliment peut être destiné aux animaux domestiques, animaux de compagnie et/ou animaux de loisirs.

Enfin, selon un autre mode de réalisation de l'invention, la composition alimentaire peut être destinée à l'homme, en particulier, la composition peut être adaptée aux enfants, adolescents, adultes ou personnes âgées,

L'invention a également pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique pour l'homme ou les animaux pouvant comprendre une biomasse  
5 selon l'invention telle que décrite précédemment.

Selon l'invention, la composition cosmétique ou pharmaceutique peut ne comprendre que de la biomasse, séchée ou non, transformée ou non, ou de la biomasse, séchée ou non, transformée ou non, mélangée à tout autre additif, véhicule ou support, utilisé dans le domaine de la cosmétique ou de la pharmacie  
10 comme par exemple les conservateurs, les colorants, les régulateurs du pH.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation de la biomasse telle que décrite précédemment en thérapie, par exemple dans la prévention et le traitement de la malnutrition. Il est connu que dans le traitement de la malnutrition, la carence en protéine est la plus préjudiciable et coûteuse à traiter. La biomasse, selon un mode de réalisation de l'invention, peut constituer une solution complète de choix pour prévenir et/ou traiter la malnutrition, notamment des enfants et les seniors. Elle peut constituer une source protéique équilibrée et digestible (la carence en protéine est la plus préjudiciable et coûteuse). Sa fraction protéique peut être associée à une source de lipides de haute qualité nutritionnelle nécessaires à un bon développement sain des enfants. La biomasse selon l'invention peut être également adaptée pour utilisation par des personnes âgées pour la prévention et/ou le traitement de la malnutrition, et des autres maladies liées au vieillissement. Dans ce cadre, l'apport en caroténoïdes de la biomasse selon  
20 l'invention peut être également très bénéfique pour la santé de ces populations, les personnes âgées étant susceptibles aux maladies telles que le DMLA.

La biomasse peut donc être incorporée dans un aliment complet (sous forme humide ou de poudre destinées à être réhydratées) un aliment de collation tels que des barres de céréales, des biscottes, des gâteaux secs ou non, des confiseries, des produits de cuisson tels que des crèmes, des poudres en mix, des  
30 produits laitiers, des céréales ou des boissons. La biomasse peut être présente

dans des suppléments alimentaires, par exemple sous forme de poudre, pâte à tartiner ou sauces à ajouter à l'alimentation quotidienne.

### EXEMPLES

D'autres aspects et caractéristiques de l'invention pourront apparaître à la lecture des exemples qui suivent.

#### Exemple 1 : Procédé de culture à 25°C

Les cultures d'*Aurantiochytrium* CCAP4062/1 ont été réalisées dans des fermenteurs (bioréacteurs) de 1 à 2 L utiles avec automates dédiés et supervision par station informatique. Le système a été régulé en pH via l'ajout de base (NH<sub>4</sub>OH,). La température de culture a été fixée à 25°C puis descendu à 18°C à 24h de culture. La pression d'oxygène dissous a été régulée dans le milieu tout au long de la culture, par la vitesse d'agitation (220 - 1200 t/min), le débit d'air (0,6 - 2 vvm), voire le débit d'oxygène (0 - 2 vvm). Les paramètres de régulation, intégrés dans l'automate de supervision, ont permis de maintenir une pO<sub>2</sub> constante comprise entre 5% et 30%. Le temps de culture a été de 72 heures.

La composition du milieu de culture utilisé pendant la culture est donnée dans le tableau :

<b>Solution principale</b>	<b>Concentration g/L</b>
KCl	0,36
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,175
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	6,750
CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,55
KNO <sub>3</sub>	0,04667
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0,30940
Na <sub>2</sub> EDTA,2H <sub>2</sub> O	3,094.10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	7,3.10 <sup>-5</sup>
CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	1,6.10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	5,4.10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	1,48.10 <sup>-6</sup>
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1,73.10 <sup>-6</sup>
NiSO <sub>4</sub> ,6H <sub>2</sub> O	2,98.10 <sup>-6</sup>
CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	9,8.10 <sup>-6</sup>
EDTA-Fe	0,03
<b>Carbone</b>	<b>g/L</b>
Glucose	55
<b>Azote</b>	<b>g/L</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7
<b>Ajout après autoclave</b>	
<b>Vitamines</b>	<b>g/L</b>
Thiamine	8.10 <sup>-3</sup>
Vitamine B12	1,3.10 <sup>-4</sup>
Panathothénate	2,7.10 <sup>-3</sup>

Solution d'ajout 1	Concentration g/L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	31,9
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	25,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	61,38
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,61
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *	138,24
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,165
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,165
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,6·10 <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,6·10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,11
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	8,6·10 <sup>-2</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	1,81
Thiamine	0,49
Vitamine B12	8·10 <sup>-3</sup>
Panthothénate	0,1656
Solution d'ajout 2	Concentration g/L
Glucose	750
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *	34

Des ajouts de glucoses ont été faits sous forme des solutions d'enrichissement ayant un ratio molaire de carbone à phosphore (C :P) de 530 :1.

- Des précultures ont été réalisées sur une table d'agitation (140 t/min) en enceinte à température contrôlée (26°C), une première de 24h puis de 70h.

#### Suivi des cultures :

La concentration en biomasse totale a été suivie par mesure de la masse sèche (filtration sur filtre GF/F, Whatman, puis séchage en étuve, à 105°C, pendant 24 h minimum avant pesée). L'aspect de la biomasse est beige clair.

- Les analyses en contenus lipidiques totaux et des acides gras ont été réalisées selon les méthodes classiquement décrites dans la littérature [Folch J, *et al.*, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957 May ; 226(1) :497-509].

#### Résultats :

Référence Essai	Temps culture	MS (g/L)	% MG/MS	% AA/MS	% DHA/MG
Essai A	71h	95	25,8	44,6	29
Essai B	71h	105	27,9	45,2	32

#### **Exemple 2 : Procédé de culture avec étape a) à 30°C**

Les cultures d'*Aurantiochytrium* CCAP4062/4 ont été réalisées dans des fermenteurs (bioréacteurs) de 1 à 2 L utiles avec automates dédiés et supervision par station informatique. Le système a été régulé à pH 6 via l'ajout de base

(NH<sub>4</sub>OH). La température de culture a été fixée à 30°C puis descendu à 18°C à 24h de culture. La pression d'oxygène dissous a été régulée dans le milieu tout au long de la culture, par la vitesse d'agitation (220 - 1200 t/min), le débit d'air (0,3 - 1 vvm), voire le débit d'oxygène (0 - 1 vvm). Les paramètres de régulation, intégrés dans l'automate de supervision, ont permis de maintenir une pO<sub>2</sub> constante comprise entre 5% et 30%. Le temps de culture a été compris entre 40 et 100 heures (essai A : 69 heures, essai B : 51 heures)

Le milieu de culture est le même que celui de l'exemple 1.

Des ajouts de glucose sous forme d'une solution d'enrichissement ayant un ratio molaire de carbone : azote : phosphore (CNP) de 190,5 : 7,3 : 1 ont été faits pour l'essai A. Pour l'essai B la solution d'enrichissement et avait un ratio molaire CNP de 95,3 : 3,2 : 1

Un chainage de préculture a été réalisé sur table d'agitation (140 t/min) en enceinte à température contrôlée (26°C), une première de 24h puis de 70h.

Suivi des cultures :

La concentration en biomasse totale a été suivie par mesure de la masse sèche (filtration sur filtre GF/F, Whatman, puis séchage en étuve, à 105°C, pendant 24 h minimum avant pesée). L'aspect de la biomasse est beige clair.

Les analyses en contenus lipidiques totaux et des acides gras ont été réalisées selon les méthodes classiquement décrites dans la littérature [Folch J, *et al.*, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957 May ; 226(1) :497-509].

Référence Essai	Temps culture	MS (g/L)	% MG/MS	% AA	%DHA/MG
Essai A	69h	128	22	48	37
Essai B	51h	130	24	40	33

### **Exemple 3 : Procédé de culture avec éclairage en lumière bleue pendant les derniers 25 heures de l'étape b)**

Les cultures d'*Aurantiochytrium* CCAP4062/4 ont été réalisées dans des fermenteurs (bioréacteurs) de 5 L utiles avec automates dédiés et supervision par station informatique. Le système a été régulé à pH 5 via l'ajout de base (NaOH). La température de culture a été fixée à 30°C puis descendu à 18°C à 24h de culture. Les paramètres de régulation, intégrés dans l'automate de supervision, ont permis de maintenir une pO<sub>2</sub> constante comprise entre 5% et 30%. Le temps de culture a été de 70 heures. La culture a été exposée à lumière bleue (longueur

d'onde 455 nm) à partir de 45h de culture. Les sources de lumières sont en forme de LEDs (ou DELs en français, pour diode électroluminescente) ont été montés sur deux contre-pales dans le bioréacteur.

Le milieu de culture est le même que celui de l'Exemple 1.

- 5 Des ajouts de glucose sous forme d'une solution d'enrichissement avec un ratio molaire CNP de 37 : 4 : 1 ont été faits.

Un chainage de préculture a été réalisé sur table d'agitation (140 t/min) en enceinte à température contrôlée (26°C), une première de 24h puis de 70h. Cela était suivi d'une préculture en fermenteur de 24h.

- 10 Suivi des cultures :

La concentration en biomasse totale a été suivie par mesure de la masse sèche (filtration sur filtre GF/F, Whatman, puis séchage en étuve, à 105°C, pendant 24 h minimum avant pesée).

- 15 Les analyses en contenus lipidiques totaux ont été réalisées selon les méthodes classiquement décrites dans la littérature [Folch J, *et al.*, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957 May ; 226(1) :497-509].

Référence Essai	Temps culture	MS (g/L)	% MG/MS	% AA	% DHA/MG
Essai L.A	70h	130	23	51	30

- 20 L'aspect de la biomasse est jaune/orange. La différence de couleur par rapport les Exemples 1 et 2 qui ont donné une biomasse de couleur blanc/crème claire est due à la présence de caroténoïdes (principalement bêta-carotènes, cantaxanthine, phoenicoxanthine et astaxanthine) dans le flacon de gauche.

Caroténoïdes mesuré dans l'essai A : 199 ppm.

	Astaxanthine	Phenicoxanthine	Canthaxanthine
ppm*	32	50,9	116
% de caroténoïdes totaux	16%	26%	58%

\* Ppm= ng/mg de MS.

## REVENDICATIONS

1. Biomasse de Thraustochytrides comprenant, en poids par rapport au poids de la matière sèche, au moins 35%, préférentiellement au moins 45% de protéines, pouvant aller jusqu'à plus de 60% de protéines, en particulier de 45 à 55% de protéines, et au moins 20%, de préférence au moins 30% de matière grasse, et éventuellement entre 5 et 250 ppm, de préférence entre 150 et 200 ppm de caroténoïdes.
2. Biomasse selon la revendication 1, caractérisé en ce que des caroténoïdes ont une teneur par rapport à la matière grasse en astaxanthine entre 5 et 30%, une teneur en phoenicoxanthine entre 15 et 30% et une teneur en bêta-carotènes entre 0 et 30%.
3. Biomasse selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la matière grasse a une teneur de 25 à 60%, de préférence de 40 à 60% en acides gras polyinsaturés choisi parmi AA, DHA et EPA.
4. Biomasse selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdits Thraustochytrides sont de l'ordre des Thraustochytriales, préférentiellement de la sous-classe des Thraustochytriaceae, encore plus préférentiellement d'un genre choisi dans le groupe comprenant *Aurantiochytrium*, *Aplanochytrium*, *Botryochytrium*, *Japonochytrium*, *Oblongichytrium*, *Parietichytrium*, *Schizochytrium*, *Sicyoidochytrium*, *Thraustochytrium* et *Ulkenia*.
5. Biomasse selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que lesdits Thraustochytrides sont choisis parmi les genres *Aurantiochytrium* et *Schizochytrium*, préférentiellement parmi les espèces *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/2 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/3 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/4 ; *Aurantiochytrium mangrovei*, CCAP 4062/5 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/6 ; *Aurantiochytrium mangrovei* CCAP 4062/1 ; *Schizochytrium sp.* 4087/3 ; *Schizochytrium sp.* CCAP 4087/1 ; *Schizochytrium sp.* CCAP 4087/4 ; *Schizochytrium sp.* CCAP 4087/5.
6. Procédé de production d'une biomasse telle que définie dans l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a. une première étape de culture des Thraustochytrides dans des conditions de hétérotrophie ou mixotrophie dans un milieu de culture approprié, à une température comprise entre environ 24°C et 35°C et dans des conditions pouvant favoriser la production de protéines à une teneur d'au moins 35% de protéines en poids par rapport au poids de la matière sèche ;
- b. une deuxième étape de culture dans des conditions de hétérotrophie ou de mixotrophie à une température entre environ 18°C et 25°C et inférieure à celle de l'étape a) dans des conditions pouvant favoriser l'accumulation de matière grasse jusqu'à au moins 20%, de préférence au moins 30%, et favorisant l'accumulation du DHA, EPA et/ou AA au sein de la matière grasse jusqu'à entre 25% et 60%, de préférence entre 40 et 60% de la matière grasse et jusqu'à l'obtention d'une densité de culture d'au moins 40 g/L en matière sèche, préférentiellement au moins 60 g/L, plus préférentiellement au moins 80 g/L ;
- c. une troisième étape de récupération de la biomasse obtenue à la deuxième étape par séparation de ladite biomasse du milieu de culture (la récolte), éventuellement suivi d'une homogénéisation ; et, le cas échéant
- d. une quatrième étape de séchage de la biomasse récupérée à la troisième étape.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce la culture est éclairée, de préférence, avec la lumière de longueur d'onde entre 435 et 475 nm, pendant au moins 18 heures, de préférence au moins 24 heures].
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la culture est éclairée pendant au moins les dernières 18 heures de culture, de préférence pendant au moins les dernières 24 heures de culture.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la culture est éclairée à partir d'environ 24-50 heures de culture, de préférence, à partir de 45 heures de culture et jusqu'à la fin de la culture.
10. Procédé selon la revendication 6 à 9, caractérisé en ce que ledit milieu de culture approprié est un milieu défini comprenant une source de carbone, une source d'azote, une source de phosphore et des sels.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisé en ce que ledit milieu défini comprend des sels choisis parmi les sels de calcium, de cobalt, de manganèse, de magnésium, de zinc, de nickel, de cuivre, de potassium, de fer, de sodium, et leurs mélanges, avantageusement choisis  
5 parmi le chlorure de calcium, le chlorure de cobalt, le chlorure de manganèse, le sulfate de magnésium, le sulfate de zinc, le sulfate de nickel, le sulfate de cuivre, le sulfate de potassium, le sulfate ferreux, le sulfate de potassium, le molybdate de sodium, le sélénite de sodium, le chlorure de sodium et leurs mélanges.
- 10 12. Procédé selon l'une des revendications 6 à 11, caractérisé en ce que la première étape a) de culture est réalisée en mode dit "batch", en mode dit "fed batch" ou en mode continu.
13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la culture en "fed batch" comprend une première étape divisée en deux sous-étapes, une  
15 première sous-étape a1) de croissance dans le milieu de culture approprié jusqu'à l'obtention d'une densité de culture d'au moins 20 g/L, préférentiellement au moins 40 g/L, plus préférentiellement au moins 60 g/L, encore plus préférentiellement au moins 80 g/L, suivie d'une deuxième sous-étape a2) de production dans laquelle on ajoute au milieu de culture,  
20 simultanément ou successivement, une ou plusieurs solution(s) d'enrichissement en source de carbone, en source d'azote et en source de phosphore.
14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que, à l'étape a2), la teneur en source de carbone est maintenue entre 5 et 200 g/L,  
25 préférentiellement entre 10 et 50 g/L, la teneur en source d'azote est maintenue entre 0,5 et 5 g/L, préférentiellement entre 0,5 et 2 g/L et la teneur en source de phosphore est maintenue entre 0,5 et 5 g/L, préférentiellement 0,5 et 2 g/L.
15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 14, caractérisé en ce que l'éclairement est variable et/ou discontinu, de préférence sous formes de  
30 flashes.
16. Biomasse susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 15.

17. Utilisation non thérapeutique d'une biomasse telle que décrite à l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 16 dans les domaines cosmétiques et en alimentation humaine ou animale.
- 5 18. Utilisation non thérapeutique d'une biomasse de Thraustochytrides telle que décrite à l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 16 pour l'amélioration de la performance des animaux, évaluée par la mesure de l'indice de consommation, du gain de poids ou encore du "Feed Conversion Ratio".
- 10 19. Composition cosmétique ou pharmaceutique pour l'homme ou les animaux comprenant une biomasse telle que décrite à l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 16.
20. Aliment caractérisé en ce qu'il comprend une biomasse telle que décrite à l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 16.
- 15 21. Aliment selon la revendication 20 caractérisé en ce qu'il est destiné à l'alimentation humaine, en particulier, un aliment adapté aux enfants, adolescents, adultes ou personnes âgées ,
22. Aliment pour animaux d'élevage, caractérisé en ce qu'il comprend entre 1% et 60%, de préférence entre 1% et 20%, plus préférentiellement entre 3% et 8% d'une biomasse telle que décrite selon l'une des revendications 1 à 5, ou 16.
- 20 23. Biomasse selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 16 pour son utilisation en thérapie.
24. Aliment pour aquaculture, caractérisé en ce qu'il comprend entre 1% et 60%, de préférence entre 1% et 20%, plus préférentiellement entre 3% et 8% d'une biomasse telle que décrite selon l'une des revendications 1 à 5, ou 16.



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

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

FA 815113  
FR 1556792

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	WO 2015/004402 A2 (FERMENTALG [FR]) 15 janvier 2015 (2015-01-15) * le document en entier * -----	1-24	C12N1/12 C12R1/89 C12P21/00 C12P23/00
X	WO 2015/004403 A2 (FERMENTALG [FR]) 15 janvier 2015 (2015-01-15) * le document en entier * -----	1-24	A23K1/14 A23K1/16 A23L1/337 A23L1/03
A	WO 2015/079182 A1 (ROQUETTE FRERES [FR]) 4 juin 2015 (2015-06-04) * abrégé * -----	1-24	A61K36/02 A61K8/99
A	WO 2012/175027 A1 (ROQUETTE FRERES [FR]; PORA BERNARD [CN]; ZHOU JIE [CN]) 27 décembre 2012 (2012-12-27) * exemple 8 * -----	1-24	
A	US 2010/239533 A1 (APT KIRK E [US] ET AL) 23 septembre 2010 (2010-09-23) * exemple 1 * -----	1-24	
A	SUN LINA ET AL: "Differential effects of nutrient limitations on biochemical constituents and docosahexaenoic acid production of Schizochytriumsp", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 159, 4 mars 2014 (2014-03-04), pages 199-206, XP028646306, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2014.02.106 * alinéa [03.3] * -----	1-24	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12N C12P
			-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 avril 2016		Bilang, Jürg	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date	
autre document de la même catégorie		de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		& : 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 815113  
FR 1556792

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	YAMASAKI T ET AL: "Utilization of Shochu distillery wastewater for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls using thraustochytrid", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 102, no. 4, 1 octobre 2006 (2006-10-01), pages 323-327, XP028042220, ISSN: 1389-1723, DOI: 10.1263/JBB.102.323 [extrait le 2006-10-01] * abrégé *	1-24	
A	LIU YING ET AL: "Culturable diversity and biochemical features of thraustochytrids from coastal waters of Southern China", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, DE, vol. 98, no. 7, 24 novembre 2013 (2013-11-24), pages 3241-3255, XP035329079, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/S00253-013-5391-Y [extrait le 2013-11-24] * abrégé *	1-24	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	"International Symposium on Fish Nutrition and Feeding", 30 mai 2014 (2014-05-30), XP055150488, Extrait de l'Internet: URL:http://www.protix.eu/wp-content/uploads/2014/07/ISFNF14-Proceedings.pdf [extrait le 2014-11-03] * abrégé *	1-24	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 avril 2016		Bilang, Jürg	
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	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1556792 FA 815113**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **19-04-2016**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2015004402 A2	15-01-2015	EP 3019592 A2	18-05-2016
		FR 3008423 A1	16-01-2015
		WO 2015004402 A2	15-01-2015
-----			
WO 2015004403 A2	15-01-2015	EP 3019593 A2	18-05-2016
		FR 3008422 A1	16-01-2015
		WO 2015004403 A2	15-01-2015
-----			
WO 2015079182 A1	04-06-2015	AUCUN	
-----			
WO 2012175027 A1	27-12-2012	CN 102839129 A	26-12-2012
		CN 103827289 A	28-05-2014
		JP 5894666 B2	30-03-2016
		JP 2014522635 A	08-09-2014
		KR 20140019840 A	17-02-2014
		WO 2012175027 A1	27-12-2012
-----			
US 2010239533 A1	23-09-2010	AR 071493 A1	23-06-2010
		TW 201036554 A	16-10-2010
		US 2010239533 A1	23-09-2010
		US 2012088831 A1	12-04-2012
-----			